



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **335365**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20052198	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.10.03 PCT/GB2003/04310
(22)	Inng.dag	2005.05.04	(85)	Videreføringsdag	2005.05.04
(24)	Løpedag	2003.10.03	(30)	Prioritet	2002.10.09, GB, 0223399 2003.02.05, GB, 0302604 2003.02.22, GB, 0304064 2003.06.05, US, 475784
(41)	Alm.tilgj	2005.05.04			
(45)	Meddelt	2014.12.01			
(73)	Innehaver	Immunocore Ltd, 57c Milton Park, Abingdon, GB-OX144RX OXFORDSHIRE, Storbritannia			
(72)	Oppfinner	Adaptimmune Ltd, 9400 Garsington Road, Oxford Business Park, GB-OX42HN OXFORD, Storbritannia			
		Bent Karsten Jakobsen, c/o Avidex Ltd, 57C Milton Park, GB-OX144RX ABINGDON, OXFORDSHIRE, Storbritannia			
		Meir Glick, 63 Golden Road, US-MA02072 STOUGHTON, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Enkeltkjedede, rekombinante T-cellereseptorer, multivalent T-celle reseptor (TCR)-kompleks, nukleinsyre-molekyl omfattende en sekvens som koder for en scTCR og dennes vektor samt et preparat; fremgangsmåte for å påvise en TCR-ligand og fremgangsmåter for å identifisere en inhibitor eller potensiell inhibitor av interaksjonen mellom en scTCR og en TCR-ligand			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9918129 A1 US 6080840 A REITER et al; Construction of a functional disulfide-stabilized TCR Fv indicates that antibody and TCR Fv frameworks are very similar in structure; Immunity, vol. 2, nr. 3, 1995, s. 281-287, ISSN 1074-7613.			
(57)	Sammendrag				

En enkeltkjedet, T-cellereseptor (scTCR) som omfatter et segment som utgjøres av en TCR- α -kjedevariabelregionsekvens fusjonert med N-terminalen til en TCR- α -kjedekonstantregionekstracellulærsekvens, et β -segment som utgjøres av en TCR- β -kjedevariabelregion fusjonert med N-terminalen til en TCR- β -kjedekonstantregionekstracellulærsekvens, og en linkersekvens som binder sammen C-terminalen til α -segmentet med N-terminalen til β -segmentet eller vise versa, der konstantregionekstracellulærsekvensene til α - og β -segmentene er bundet sammen med en disulfidbinding, der lengden på linkersekvensen og posisjonen til disulfidbindingen er slik at variabelregionsekvensene til cc- og P-segmentene er gjensidig orientert vesentlig som i native α -T-cellereseptorer. Komplekser av to eller flere slike scTCRene, og anvendelse av scTCRene ved terapi og i ulike screeningapplikasjoner, blir også tilkjennegitt.

Foreliggende oppfinnelse vedrører enkeltkjedede T-cellereseporer (TCRer).

Bakgrunn for oppfinnelsen

5 Native TCRer

Som for eksempel beskrevet i WO 99/60120 medierer TCRer gjenkjenning av spesifikke viktigste vevsforlikelighetskompleks (MHC)-peptidkomplekser ved T-celler, og er i egenskap av dette essensielle for funksjonen til den cellulære delen av immunsystemet.

Antistoffer og TCRer er bare to typer av molekyler som gjenkjenner antigener på en spesifikk måte, og slik er TCRen den eneste reseptoren for spesielle peptidantigener som er presentert på MHC, der det fremmede peptidet ofte er det eneste tegn på en unormalhet inne i cellen. T-cellegjenkjenning forekommer når en T-celle og en antigenpresenterende celle (APC) er i direkte fysisk kontakt, og blir initiert ved binding av antigenspesifikke TCRer til pMHC-komplekser.

15 Den native TCR er et heterodimert celleoverflateprotein tilhørende immunoglobulin-superfamilien som er assosiert med invariante proteiner i CD3-komplekset som er involvert i mediering av signaloverføring. TCRer forekommer i $\alpha\beta$ - og $\gamma\delta$ -former som er strukturelt lignende, men som har svært distinkte, anatomiske lokaliseringer og sannsynligvis funksjoner. MHC-klasse-I- og MHC-klasse-II-ligander er også immunoglobulinsuperfamilieproteiner, men er 20 spesialiserte for antigenpresentasjon og har et svært polymorft peptidbindingsete som gjør dem i stand til å presentere et bredt utvalg av korte peptidfragmenter på APC-celleoverflaten.

Ytterligere to klasser av proteiner er kjent for å være i stand til å virke som TCR-ligander. (1) CD1-antigener er MHC-klasse-I-relaterte molekyler hvis gener er lokaliserte på et annet kromosom enn de klassiske MHC-klasse-I- og MHC-klasse-II-antigenene. CD1-molekyler 25 er i stand til å presentere peptid- og ikke-peptid- (f.eks. lipid, glykolipid) enheter for T-celler på en måte som er analog med konvensjonelle klasse-I- og klasse-II-MHC-peptidkomplekser. Se for eksempel (Barclay et al., (1997) The Leucocyte Antigen Factsbook, 2. utgave, Academic Press) og (Bauer (1997) Eur J Immunol 27 (6) 1366-1373)) (2) Bakterielle superantigener er løselige toksiner som er i stand til å binde både klasse-II-MHC-molekyler og en undergruppe av 30 TCRer. (Fraser (1989) Nature 339 221-223). Mange superantigener oppviser spesifisitet for ett eller to Vbeta-segmenter, mens andre oppviser mer promiskuøs binding. I hvert tilfelle er superantigenet i stand til å utløse en forsterket immunrespons i kraft av dets evne til å stimulere undergrupper av T-celler på en polyklonal måte.

Den ekstracellulære delen av nativ heterodimer $\alpha\beta$ TCR består av to polypeptider der 35 hvert har et membranproksimalt konstant domene og et membrandistalt variabelt domene (se figur 1). Hvert av de konstante og variable domenene inkluderer en intrakjededisulfidbinding. De variable domenene inneholder de svært polymorfe løkkene som er analoge med de komplementaritetsbestemmende regionene (CDRer) i antistoffer. CDR3 i TCR interagerer med peptidet som er presentert av MHC, og CDRe 1 og 2 interagerer med peptidet og MHC.

Mangfoldet av TCR-sekvenser blir generert via somatisk rearrangering av sammenbundne variable (V), diversitets (D), sammenbindende (J) og konstante gener. Funksjonelle α -kjede-polypeptider blir dannet av rearrangerte V-J-C-regioner, mens β -kjeder består av V-D-J-C-regioner. Det ekstracellulære, konstante domenet har en membranproksimal region og en immunoglobulinregion. Det finnes ett enkelt α -kjedekonstantdomene, kjent som TRAC, og to ulike β -konstantdomener, kjent som TRBC1 og TRBC2 (IMGT-nomenklatur). Det er fire aminosyreforskjeller mellom disse β -konstantdomenene, der tre av disse er i domenene som benyttes for å fremstille enkeltkjede-TCRene ifølge foreliggende oppfinnelse. Disse forskjellene er alle inne i ekson 1 i TRBC1 og TRBC2: $N_4K_5 \rightarrow K_4N_5$ og $F_{37} \rightarrow Y$ (IMGT-nummerering, ulikheter TRBC1 $\rightarrow$ TRBC2), og der den siste aminosyreendringen mellom de to TCR β -kjedekonstant-regionene er i ekson 3 i TRBC1 og TRBC2: $V_1 \rightarrow E$. Omfanget av hvert av de ekstracellulære TCR-domenene er noe variabelt. Likevel kan en fagperson på området med letthet bestemme posisjonen til domenegrensene ved å benytte en referanse slik som The T Cell Receptor Facts Book, Lefranc & Lefranc, Publ. Academic Press 2001.

Enkeltkjede-TCRer

Enkeltkjede-TCRer (scTCRer) er kunstige konstruksjoner som består av en enkelt aminosyretråd som på samme måte som native, heterodimere TCRer binder til MHC-peptidkomplekser. Dessverre har forsøk på å fremstille funksjonelle alfa/beta-analog scTCRer ved ganske enkelt å binde alfa- og betakjedene, slik at begge blir uttrykt i en enkel, åpen leseramme, ikke vært vellykket, sannsynligvis på grunn av den naturlige ustabiliteten i alfa-beta-løselig domeneparing.

På grunn av dette har spesielle teknikker som benytter ulike trunkeringer på én av, eller begge, alfa- og betakjedene vært nødvendig for fremstillingen av scTCRer. Disse formatene ser kun ut til å være anvendbare på et svært begrenset utvalg av scTCR-sekvenser. Soo Hoo et al. (1992) PNAS. 89 (10): 4759-63 rapporterer uttrykkingen av en muse-TCR i et enkeltkjedeformat fra 2C-T-celleklonen ved å benytte en trunkert beta- og alfakjede bundet til en 25-aminosyrelinker og bakteriell periplasmisk uttrykking (se også Schodin et al. (1996) Mol. Immunol 33 (9): 819-29). Denne designen danner også basis for m6-enkeltkjede-TCR rapportert av Holler et al. (2000) PNAS. 97 (10): 5387-92 som er avledet fra 2C-scTCR og binder til den samme H2-Ld-begrensede alloepitop. Shusta et al. (2000) Nature Biotechnology 18: 754-759 rapporterer å benytte enkeltkjede-2C-TCR-konstruksjoner i gjæruttrykkingseksperimenter som frembrakte muterte TCRer med forbedret termostabilitet og løselighet. Denne rapporten viste også evnen til disse uttrykte 2C-TCRer til å selektivt binde celler som uttrykker deres beslektede pMHC. Khandekar et al. (1997) J. Biol. Chem. 272 (51): 32190-7 rapporterer om en tilsvarende design for den murine D10-TCR, selv om denne scTCR var fusjonert med MBP og uttrykt i bakterielt cytoplasma Hare et al. (1999) Nat. Struct. Biol. 6 (6): 574-81) Hilyard et al. (1994) PNAS. 91 (19): 9057-61 rapporterer om en human scTCR

som er spesifikk for influensamatriksprotein-HLA-A2, ved å benytte en $V\alpha$ -linker- $V\beta$ -design og uttrykt i bakterielt periplasma.

Chung et al. (1994) PNAS. 91 (26) 12654-8 rapporterer om produksjonen av human scTCR ved å benytte en $V\alpha$ -linker- $V\beta$ -design og uttrykking på overflaten av en pattedyrcellelinje.

- 5 Denne rapporten inkluderer ikke noen referanse til peptid-HLA-spesifikk binding av scTCR. Plaksin et al. (1997) J. Immunol. 158 (5): 2218-27 rapporterer om en tilsvarende $V\alpha$ -linker- $V\beta$ - $C\beta$ -design for å produsere en murin scTCR som er spesifikk for en HIV-gp120-H-2D^d-epitop. Denne scTCR blir uttrykt som bakterielle inklusjonslegemer og blir refoldet *in vitro*.

10 Terapeutisk anvendelse

Det er behov for målsøkende enheter som er i stand til å lokaliseres til celler som er rammet av sykdomsprosesser. Slike målsøkende enheter kan bli benyttet enten for direkte å blokkere den feilrettede virkningen til immunsystemet som er ansvarlig for autoimmun sykdom, eller som et middel for å levere cytotoksiske midler til kreftceller.

- 15 Ideelt må molekyler som er passende til disse applikasjonene ha en spesifikk affinitet for en cellemarkør som er direkte involvert i den relevante sykdomsprosessen. Antistoffer er blitt benyttet til dette formålet.

Screeningsanvendelse

- 20 Et antall viktige cellulære interaksjoner og celleresponser, inkludert den TCR-medierte immunsynapsen, blir kontrollert ved kontakter som blir gjort mellom celleoverflatereseptorer og ligander som er presentert på overflaten til andre celler. Disse typene av spesifikke molekyllære kontakter er av stor viktighet for den korrekte, biokjemiske reguleringen i menneskekroppen og blir derfor studert inngående. I mange tilfeller er målet for slike studier å finne frem til en
25 måte for å modulere cellulære responser for å kunne forhindre eller motkjempe sykdom.

- Derfor er fremgangsmåter som kan bli benyttet for å identifisere forbindelser som binder med noen grad av spesifisitet til humane reseptorer eller ligandmolekyler, viktige som ledetråder for oppdagelsen og utviklingen av nye sykdomsterapeutiske midler. Spesielt har forbindelser som interferer med visse reseptorligandinteraksjoner umiddelbart potensiale som
30 terapeutiske midler eller bærere.

- Fremskritt i kombinatorisk kjemi som muliggjør relativt enkel og kostnadseffektiv produksjon av svært store forbindelsesbiblioteker, har økt omfanget av forbindelsestesting enormt. Nå utgjøres begrensningene til screeningsprogrammer oftest av egenskapene til analysene som kan bli benyttet, produksjonen av passende reseptor- og ligandmolekyler og
35 hvor godt disse analysene kan bli tilpasset til høyomsetningsscreeningsfremgangsmåter.

Av kjent teknikk vedrører WO 9918129 A1 et løselig enkeltkjede TCR omfattende α og β variabel- og konstantdomener koblet sammen med en peptidlinkersekvens. Videre beskrives DNA molekyl som koder for slikt TCR samt metoder for fremstilling av slike TCR og

anvendelser. US 6080840 A angår en løselig TCR sammensatt av de ekstracellulære domener og koblet til et GPI-anker som gjør at de kan frigjøres enzymatisk fra membran. I det løselige TCR har α og β -domenene den native konformasjon. Videre diskuteres mulige modifikasjoner, blant annet å introdusere ekstra Cysteiner for å danne disulfidbindinger.

- 5 REITER et al. beskriver i Immunity, vol. 2, nr. 3, 1995, s. 281-287, løselige α/β TCR-dimerer stabilisert ved innføring av disulfidbindinger mellom cysteinresidier i det konstante området av variabelt domene. TCR-dimerene blir korrekt foldet, og har en redusert tendens til å aggregere.

10 **Kort beskrivelse av oppfinnelsen**

- Denne oppfinnelsen tilgjengeliggjør en ny klasse av alfa/beta-analog-scTCRer som er kjennetegnet ved tilstedeværelsen av en disulfidbinding mellom residier på den enkle aminosyretråden, der denne bindingen bidrar til stabiliteten til paringen mellom alfa- og betaregioner på molekylet. Slike TCRer er nyttige for screening eller for fremstilling av et
15 preparat for terapeutiske formål.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en enkeltkjede-T-cellereseptor (scTCR) som omfatter et α -segment som utgjøres av en TCR- α -kjedevariabelregionsekvens fusjonert med
20 N-terminalen på en TCR- α -kjedekonstantregionekstracellulærsekvens, et β -segment som utgjøres av en TCR- β -kjedevariabelregionsekvens fusjonert til N-terminalen på en TCR- β -kjedekonstantregionekstracellulærsekvens og en linkersekvens som binder sammen C-terminalen på α -segmentet med N-terminalen på β -segmentet eller vise versa, der konstantregionekstracellulærsekvensen til α - og β -segmentene er bundet sammen med en
25 disulfidbinding mellom cysteinrester som er substituert for:

Thr 48 i ekson 1 av TRAC*01 og Ser 57 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

Thr 45 i ekson 1 av TRAC*01 og Ser 77 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

Tyr 10 i ekson 1 av TRAC*01 og Ser 17 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

Thr 45 i ekson 1 av TRAC*01 og Asp 59 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

- 30 eller

Ser 15 i ekson 1 av TRAC*01 og Glu 15 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01. der lengden til linkersekvensen og posisjonen til disulfidbindingen er slik at variabel region sekvensene til α - og β -segmentene er gjensidig orientert, vesentlig som i native $\alpha\beta$ -T-cellereseptorer.

- 35 I scTCRene ifølge oppfinnelsen blir nødvendigheten av at variabelregionsekvensene til α - og β -segmentene er gjensidig orientert, vesentlig som i native $\alpha\beta$ -T-cellereseptorer, testet ved å bekrefte at molekyler binder til den relevante TCR-liganden (pMHC-kompleks, CD1-antigenkompleks, superantigen eller superantigen/MHC-kompleks) - hvis det binder, da er betingelsen oppfylt. Interaksjoner med pMHC-komplekser kan bli målt ved å benytte et

BIAcore-3000- eller BIAcore-2000-instrument. Henholdsvis eksempel 3 her eller WO99/6120 tilveiebringer detaljerte beskrivelser av fremgangsmåtene som er nødvendige for å analysere TCR-binding til MHC-peptidkomplekser. Disse fremgangsmåtene er like anvendelige for undersøkelsen av TCR/CD1 og TCR/superantigeninteraksjoner. For å kunne benytte disse fremgangsmåtene i undersøkelsen av TCR/CD1-interaksjoner, er løselige former av CD1 nødvendige, der produksjonen av disse er beskrevet i (Bauer (1997) Eur J Immunol 27 (6) 1366-1373.

α - og β -segmenter

10 Konstantregionekstracellulærsekvensene som foreligger i α - og β -segmentene, tilsvarer foretrukket de som foreligger i humant TCR, og det gjør også variabelregionsekvensene som foreligger i α - og β -segmentene. Likevel behøver ikke overensstemmelsen mellom slike sekvenser å være 1:1 på et aminosyrenivå. N- eller C-trunkering og/eller aminosyredelesjon og/eller substitusjon relativt i forhold til de tilsvarende, humane TCR-sekvensene er akseptabelt, gitt at det totale resultatet er gjensidig orientering av variabelregionsekvenser i α - og β -segmentene som i native α - og β -cellereseptorer og opprettholdelse av peptid-MHC-bindingsfunksjonalitet. Spesielt fordi konstantregionekstracellulærsekvensene som er til stede i α - og β -segmentene ikke er direkte involvert i kontakter med peptid-MHC-komplekset, på hvilket scTCR binder, kan de være kortere enn, eller kan inneholde substitusjoner eller delesjoner relativt i forhold til ekstracellulærkonstantdomenesekvenser i native TCRer.

Konstantregionekstracellulærsekvensen som foreligger i α -segmentet, kan inkludere en sekvens som tilsvarer det ekstracellulære, konstante Ig-domenet på en TCR- α -kjede, og/eller konstantregionekstracellulærsekvensen som foreligger i β -segmentet, kan inkludere en sekvens som tilsvarer det ekstracellulære, konstante Ig-domenet i en TCR- β -kjede.

I en utførelsesform av oppfinnelsen tilsvarer α -segmentet vesentlig hele den variable regionen til en TCR- α -kjede fusjonert med N-terminalen til vesentlig hele det ekstracellulære domenet til den konstante regionen på en TCR- α -kjede, og/eller β -segmentet tilsvarer vesentlig hele den variable regionen på en TCR- β -kjede fusjonert med N-terminalen til vesentlig hele det ekstracellulære domenet i den konstante regionen på en TCR- β -kjede.

I en annen utførelsesform tilsvarer konstantregionekstracellulærsekvensene som er til stede i α - og β -segmentene de konstante regionene på α - og β -kjedene i native TCR trunkert på deres C-terminale ender, slik at cysteinresidien som danner den native interkjede-disulfidbindingen i TCRen er ekskludert. Alternativt kan disse cysteinresidiene bli substituert med en annen aminosyreresidie, slik som serin eller alanin, slik at den native disulfidbindingen blir fjernet. I tillegg inneholder den native TCR- β -kjeden en uparet cysteinresidie, og denne residien kan bli deletert fra, eller erstattet med, en ikke-cysteinresidie i β -sekvensen på scTCRen ifølge oppfinnelsen.

I en spesiell utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan TCR- α - og - β -kjedevariabel-regionsekvensene som er til stede i α - og β -segmentene sammen tilsvare det funksjonelle, variable domenet i en første TCR, og TCR- α - og - β -kjedekonstantregionekstracellulær-sekvensene som er til stede i α - og β -segmentene, kan tilsvare de i en annen TCR, der den første og andre TCR stammer fra samme art. Dermed kan α - og β -kjedevariabelregion-sekvensene som er til stede i α - og β -segmentene tilsvare de i en første human TCR, og de α - og β -kjedekonstantregionekstracellulære sekvensene kan tilsvare de i en annen human TCR, for eksempel kan A6-tax-sTCR-konstantregionekstracellulærsekvenser bli benyttet som rammeverk på hvilket heterologe, variable domener kan bli fusjonert.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen tilsvare TCR- α - og - β -kjedevariabelregion-sekvensene som er til stede i α - og β -segmentene sammen det funksjonelle, variable domenet i en første TCR, og TCR- α - og - β -kjedekonstantregionekstracellulærsekvensene som er til stede i α - og β -segmentene, tilsvare de på en annen TCR, der den første og andre TCR stammer fra ulike arter. I denne utførelsesformen er det foretrukket at TCR- α - og - β -kjedevariabelregion-sekvensene som er til stede i α - og β -segmentene, sammen tilsvare det funksjonelle, variable domenet i en human TCR, og TCR- α - og - β -kjedekonstantregionekstracellulærsekvensene som er til stede i α - og β -segmentene tilsvare de i en muse-TCR. Slike utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse har det fortrinnet at scTCRene inneholder ikke-humane konstant-regionsekvenser som sannsynligvis er immunogene, og som dermed sannsynligvis øker den totale immunresponsen mot dTCRen når den er lokalisert på sin målcelle. Immunresponsen mot avvikende celler, slik som kreftceller, kan dermed bli forbedret.

Linker

I foreliggende oppfinnelse binder en linkersekvens α - og β -segmentene, slik at det dannes en enkel polypeptidtråd. Linkersekvensen kan for eksempel ha formelen -P-AA-P- der P er prolin, og AA representerer en aminosyresekvens der aminosyrene er glysin og serin.

For at scTCRen skal binde til et MHC-peptidkompleks, må α - og β -segmentene bli paret slik at variabelregionsekvensene derav er orientert for slik binding. Dermed bør linkerens tilstrekkelig lengde til å dekke distansen mellom C-terminalen til α -segmentet og N-terminalen til β -segmentet, eller vise versa. På den annen side bør for lang linkerlengde foretrukket bli unngått i tilfelle enden på linkerens på den N-terminale variabelregionsekvensen blokkerer eller reduserer binding av scTCRen til målpeptid-MHC-komplekset.

For eksempel i tilfellet der konstantregionekstracellulærsekvensene som er til stede i α - og β -segmentene tilsvare de konstante regionene på α - og β -kjedene til en nativ TCR trunkert på deres C-terminale ende, slik at cysteinresidene som danner den native interkjededisulfidbindingen i TCRen blir ekskludert, og linkersekvensen binder sammen C-terminalen på α -segmentet med N-terminalen på β -segmentet, kan linkerens bestå av fra 26 til 41, for eksempel 29, 30, 31 eller 31 aminosyrer, og en spesiell linker har formelen -PGGG-(SGGGG)₅-P- der P er prolin, G er glysin og S er serin.

Disulfidbinding

En prinsipiell karakteriserende egenskap ved scTCRene ifølge foreliggende oppfinnelse er disulfidbindingen mellom cysteinresidiene substituert for visse aminosyrer i konstant-regionekstracellulærsekvensene i α - og β -segmentene. I noen tilfeller kan både en nativ og en ikke-nativ disulfidbinding være ønskelig i de foreliggende scTCRene.

Posisjonen til disulfidbindingen er styrt av nødvendigheten av at variabelregionsekvensene til α - og β -segmentene er gjensidig orientert vesentlig som i native $\alpha\beta$ -T-cellereseporer.

Disulfidbindingene kan bli dannet ved å mutere ikke-cysteinresidier på α - og β -segmenter til cystein, og gjøre at bindingen blir dannet mellom de muterte residiene. Residier, hvis respektive β -karboner er omtrent 6 Å (0,6 nm) eller mindre, og foretrukket i området 3,5 Å (0,35 nm) til 5,9 Å (0,59 nm) fra hverandre i den native TCR, er foretrukket, slik at en disulfidbinding kan bli dannet mellom cycteinresidier som er introdusert i stedet for de native residiene. Det er foretrukket at disulfidbindingen foreligger mellom residier i konstantimmunoglobulinregionen, selv om den kan foreligge mellom residier i den membranproksimale region. Foretrukne seter der cysteiner kan bli introdusert for å danne disulfidbindingen, er de følgende residier i ekson 1 i TRAC*01 for TCR- α -kjeden og TRBC1*01 eller TRBC2*01 for TCR- β -kjeden:

TCR- α -kjede	TCR- β -kjede	Nativ β -karbonseparasjon (nm)
Thr 48	Ser 57	0,473
Thr 45	Ser 77	0,533
Tyr 10	Ser 17	0,359
Thr 45	Asp 59	0,560
Ser 15	Glu 15	0,59

Nå når residiene i humane TCRer som kan bli mutert til cysteinresidier for å danne en ny interkjededisulfidbinding i scTCRer ifølge oppfinnelsen er blitt identifisert, vil fagfolk på området være i stand til å mutere TCRer fra andre arter på samme måte for å fremstille en scTCR for denne arten. Hos mennesker behøver den erfarne fagperson kun å se etter de følgende motivene i de respektive TCR-kjedene for å identifisere residien som skal bli mutert (den skyggelagte residien er residien som skal muteres til en cysten).

α -kjede Thr 48: DSDVYITDKTVLDMRSMDFK (aminosyrer 39-58 i ekson 1 i TRAC*01-genet)

α -kjede Thr 45: QSKDSDVYITDKTVLDMRSM (aminosyrer 36-55 i ekson 1 i TRAC*01-genet)

	α -kjede Tyr 10:	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDK (aminosyrer 1-20 i ekson 1 TRAC*01-genet)
5	α -kjede Ser 15:	DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF (aminosyrer 6-25 i ekson 1 i TRAC*01-genet)
	β -kjede Ser 57:	NGKEVHSGVSTDPQLKEQP (aminosyrer 48-67 i ekson 1 i TRBC1*01- & TRBC2*01-genene)
10	β -kjede Ser 77:	ALNDSRYALSSRLRVSATFW (aminosyrer 68-87 i ekson 1 i TRBC1*01- & TRBC2*01-genene)
	β -kjede Ser 17:	PPEVAVFEPSEAEISHTQKA (aminosyrer 8-27 i ekson 1 i TRBC1*01- & TRBC2*01-genene)
15	β -kjede Asp 59:	KEVHSGVSTDPQLKEQPAL (aminosyrer 50-69 i ekson 1 i TRBC1*01- & TRBC2*01-genene)
20	β -kjede Glu 15:	VFPPEVAVFEPSEAEISHTQ (aminosyrer 6-25 i ekson 1 i TRBC1*01- & TRBC2*01-genene)

I andre arter er det ikke sikkert a TCR-kjedene inneholder en region som har 100 % identitet med motivene ovenfor. Likevel vil fagfolk på området være i stand til å benytte motivene ovenfor for å identifisere den ekvivalente del av TCR- α - og - β -kjeden og dermed residien som skal bli mutert til cystein. Sammenligningsteknikker kan bli benyttet med hensyn til dette. For eksempel kan ClustalW, som er tilgjengelig på websiden til the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>) bli benyttet for å sammenligne motivene ovenfor med en spesiell TCR-kjedesekvens for å kunne lokalisere den relevante delen av TCR-sekvensen som skal muteres.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer innenfor sitt omfang $\alpha\beta$ -analog-scTCRer i tillegg til de fra andre pattedyr, inkludert, men ikke begrenset til, mus, rotte, gris, geit og sau. Også inkludert er humane/ikke-humane, kimere scTCRer som diskutert ovenfor. Som nevnt ovenfor, vil fagfolk på området være i stand til å bestemme seter som er ekvivalente med de ovenfor beskrevne, humane setene, på hvilke cysteinresidier kan bli introdusert for å danne en interkjededisulfidbinding. For eksempel viser de følgende aminosyresekvensene til muse-C α - og -C β -løselige domener, sammen med motiver som viser de murine residiene som er ekvivalente med de humane residiene nevnt ovenfor som kan ble mutert til cysteiner for å danne en TCR-interkjededisulfidbinding (der de relevante residiene er skyggelagte):

Muse-C α -løselig domene:

PYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
5 FTCQDIFKETNATYPSSDVP

Muse-C β -løselig domene:

EDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGREVHSGVSTDPQAYKESNYSYC
LSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVQTQNISAEAWGRAD

10

Murin ekvivalent av human α -kjede Thr 48: ESGTFITDKTVLDMKAMDSK

Murin ekvivalent av human α -kjede Thr 45: KTMESGTFITDKTVLDMKAM

15 Murin ekvivalent av human α -kjede Tyr 10: YIQNPEPAVYQLKDPRSQDS

Murin ekvivalent av human α -kjede Ser 15: AVYQLKDPRSQDSTLCLFTD

Murin ekvivalent av human β -kjede Ser 57: NGREVHSGVSTDPQAYKESN

20

Murin ekvivalent av human β -kjede Ser 77: KESNYSYCLSSRLRVSATFW

Murin ekvivalent av human β -kjede Ser 17: PPKVSLFEPSKAEIANKQKA

25 Murin ekvivalent av human β -kjede Asp 59: REVHSGVSTDPQAYKESNYS

Murin ekvivalent av human β -kjede Glu 15: VTPPKVSLFEPSKAEIANKQ

Som diskutert ovenfor kan A6-tax-sTCR-ekstracellulærkonstantregionene bli
30 benyttet som rammeverk, på hvilke heterologe, variable domener kan bli fusjonert. Det er
foretrukket at de heterologe variabelregionsekvansene er bundet til konstantregion-
sekvansene på ethvert punkt mellom disulfidbindingen og de N-terminale endene til
konstantregionsekvansene. I tilfellet med A6-tax-TCR- α - og - β -konstantregionsekvansene kan
disulfidbindingen bli dannet mellom cysteinresidier som er introdusert på henholdsvis
35 aminosyreresidierne 158 og 172. Derfor er det foretrukket at de heterologe α - og β -
kjedevariabelregionsekvansforbindelsespunktene ligger mellom henholdsvis residierne 159 eller
173 og N-terminalen på α - eller β -konstantregionsekvansene.

Ytterligere aspekter

En scTCR (som foretrukket er human) ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli tilveiebrakt i vesentlig ren form, eller som et rensset eller isolert preparat. For eksempel kan det bli tilveiebrakt i en form som i all vesentlighet er fri for andre proteiner.

5 Et flertall av scTCRer ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli tilveiebrakt i et multivalent kompleks. Dermed tilveiebringer foreliggende oppfinnelse i et aspekt et multivalent T-cellereseptor-(TCR)-kompleks som omfatter et flertall av løselige T-cellereseptorer som beskrevet her. Hvert av flertallene av løselige TCRer er foretrukket identiske.

10 I det multivalente komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse kan scTCRene foreligge i form av multimerer, og/eller kan foreligge på, eller bli assosiert med, et lipiddobbeltlag, for eksempel et liposom.

I sin enkleste form omfatter et multivalent scTCR-kompleks ifølge oppfinnelsen en multimer av to eller tre eller fire eller flere T-cellereseptormolekyler assosiert (for eksempel
15 kovalent eller på annen måte forbundet) med hverandre, foretrukket via et linkermolekyl. Passende linkermolekyler inkluderer, men er ikke begrenset til, multivalente forbindelsesmolekyler, slik som avidin, streptavidin, neutravidin og ekstravidin, der hver av disse har fire bindingssteder for biotin. Dermed kan biotinylerede TCR-molekyler bli dannet som multimerer av T-cellereseptorer som har et flertall av TCR-bindingssteder. Antallet TCR-
20 molekyler i multimeren vil være avhengig av mengden av TCR i forhold til mengden av linkermolekyl som er benyttet for å danne multimerene, og også på tilstedeværelsen eller fravær av andre biotinylerede molekyler. Foretrukne multimerer er dimere, trimere eller tetramere TCR-komplekser.

Strukturer som er en god del større enn TCR-tetramerer, kan bli benyttet for å finne
25 eller målsøke celler som uttrykker spesifikke MHC-peptidkomplekser. Foretrukket er strukturene i området 10 nm til 10 µm i diameter. Hver struktur kan oppvise flere scTCR-molekyler som har en tilstrekkelig spredning, slik at to eller flere TCR-molekyler på strukturen kan binde simultant til to eller flere peptidkomplekser på en celle og dermed øke muligheten til den multimer bindingsenheten for cellen.

30 Passende strukturer til anvendelse ved oppfinnelsen, for å danne komplekser med én eller et flertall av scTCRer, inkluderer membranstrukturer, slik som liposomer og faste strukturer som foretrukket er partikler, slik som kuler, for eksempel latekskuler. Andre strukturer som kan bli eksternt belagte med T-cellereseptormolekyler er også passende. Foretrukket er strukturene belagte med T-cellereseptormultimerer heller enn med individuelle
35 T-cellereseptormolekyler.

I tilfellet med liposomer kan T-cellereseptormolekylene eller multimerer derav være bundet til, eller på annen måte assosiert med, membranen. Teknikker for dette er velkjente for fagfolk på området.

Et merke eller en annen enhet, slik som en toksisk eller terapeutisk enhet, kan bli inkludert i et multivalent scTCR-kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel kan merket eller en annen enhet bli inkludert i en blandet molekylmultimer. Et eksempel på et slikt multimer molekyl er en tetramer som inneholder tre scTCR-molekyler og et

5 peroksidasemolekyl. Dette kan bli oppnådd ved å blande TCRen og enzymet ved et molart forhold på 3:1 for å generere tetramere komplekser og isolere det ønskede komplekset fra komplekser som ikke inneholder det korrekte forholdet av molekyler. Disse blandede molekylerne kan inneholde enhver kombinasjon av molekyler, gitt at sterisk hindring ikke kompromitterer, eller signifikant kompromitterer, den ønskede funksjonen av molekylerne.

10 Posisjoneringen av bindingssetene på streptavidinmolekylet er passende for blandede tetramere siden sterisk hindring ikke er tilbøyelig til å forekomme.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å påvise MHC-peptidkomplekser som omfatter å:

- a. tilveiebringe en scTCR ifølge foreliggende oppfinnelse,
- 15 b. kontakte scTCRen med MHC-peptidkompleksene og påvise binding av scTCRen til MHC-peptidkompleksene.

Terapeutisk anvendelse

scTCRen (eller multivalentkompleks derav) ifølge oppfinnelsen, kan alternativt eller

20 ytterligere bli assosiert med (for eksempel kovalent, eller på annen måte, bundet til) et terapeutisk middel som for eksempel kan være en toksisk enhet til bruk for å drepe celler eller et immunstimulerende middel, slik som et interleukin eller et cytokin. Et multivalent scTCR-kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha forbedret bindingsevne for en TCR-ligand, slik som et pMHC-kompleks eller CD1-molekyl, sammenlignet med en ikke-multimer T-

25 cellereseptorheterodimer. Dermed er de multivalente scTCR-kompleksene ifølge foreliggende oppfinnelse spesielt nyttige for å finne eller målsøke celler som presenterer spesielle antigener *in vitro* eller *in vivo*, og er også nyttige som intermediater for fremstillingen av ytterligere multivalente TCR-komplekser som har slike anvendelser. scTCRen eller det multivalent scTCR-kompleks kan derfor bli tilveiebrakt i en farmasøytisk akseptabel formulering for fremstilling av

30 et preparat for anvendelse *in vivo*.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en preparat som kan anvendes i en fremgangsmåte for å levere et terapeutisk middel til en målcelle, der fremgangsmåten omfatter å kontakte potensielle målceller med en scTCR eller det multivalent scTCR-kompleks i overensstemmelse med oppfinnelsen under betingelser som muliggjør binding av scTCRen eller multivalent scTCR-

35 kompleks til målcellen, der nevnte scTCR eller multivalent scTCR-kompleks er spesifikt for MHC-peptidkompleksene og har det terapeutiske middelet assosiert dermed.

Spesielt kan et preparat av den løselige scTCR eller det multivalente scTCR-komplekset bli benyttet for å levere terapeutiske midler til stedet der celler presenterer et spesielt antigen. Dette vil være nyttig i mange situasjoner og spesielt mot tumorer. Et terapeutisk middel kan bli

levert slik at det vil utøve sin effekt lokalt, men ikke bare på cellen som det binder til. Dermed forespeiler en spesiell strategi antitumormolekyler bundet til T-cellerreseptorer eller multivalente scTCR-komplekser som er spesifikke for tumorantigener.

Mange terapeutiske midler kan bli benyttet ved denne anvendelsen, for eksempel
 5 radioaktive forbindelser, enzymer (perforin for eksempel) eller kjemoterapeutiske midler (cis-platin for eksempel). For å forsikre at toksiske effekter blir utøvd på den ønskede lokaliseringen, kan toksinet foreligge inne i et liposom som er bundet til streptavidin, slik at forbindelsen blir frigjort sakte. Dette vil forhindre skadelige effekter under transporten i kroppen og forsikre at toksinet har maksimal effekt etter binding av scTCR-en til de relevante
 10 antigenpresenterende cellene.

Andre passende terapeutiske midler inkluderer:

- småmolekylære cytotoksiske midler, dvs. forbindelser med evnen til å drepe pattedyrceller som har en molekylvekt på mindre enn 700 daltons. Slike forbindelser
 15 kan også inneholde toksiske metaller som er i stand til å ha en cytotoksisk effekt. Videre skal det forstås slik at disse småmolekylære, cytotoksiske midlene også inkluderer prolegemidler, dvs. forbindelser som brytes ned eller blir omdannet under fysiologiske betingelser for å frigi cytotoksiske midler. Eksempler på slike midler inkluderer cis-platin, maytansinderivater, rachelmycin, calicheamisin, docetaxel,
 20 etopsid, gemcitabin, ifosfamid, irinotecan, melfalan, mitoksantron, sorfimer-natriumfotofrin II, temozolmid, topotecan, trimetreatglukuronat, auristatin E, vincristin og doxorubicin,
- peptidcytotoksiner, dvs. proteiner eller fragmenter derav med evnen til å drepe pattedyrceller. Eksempler inkluderer ricin, difteritoksin, pseudomonas bakterielt
 25 exotoksin-A, DNase og RNase,
- radionuklider, dvs. ustabile isotoper av elementer som brytes ned med den samtidige utstrålingen av én eller flere av α - og β -partikler eller γ -stråler. Eksempler inkluderer jod 131, rhenium 186, indium 111, yttrium 90, vismut 210 og 213, actinium 225 og astatin 213,
- prolegemidler, slik som antistoffrettede enzymprolegemidler,
 30
- immunstimulerende midler, dvs. enheter som stimulerer immunrespons. Eksempler inkluderer cytokiner, slik som IL-2, kjemokiner, slik som IL-8, platefaktor 4, melanomvekststimulatorisk protein osv., antistoffer eller fragmenter derav, komplementaktivatorer, xenogene proteindomener, allogene proteindomener, virus-
 35 /bakterieproteindomener og virus-/bakteriepeptider.

Løselige scTCR-er eller multivalente scTCR-komplekser ifølge oppfinnelsen kan bli bundet til et enzym som er i stand til å omdanne et prolegemiddel til et legemiddel. Dette

gjør prolegemiddelet i stand til å bli omdannet til legemiddelet kun på stedet der det er nødvendig (dvs. som er målsøkt av scTCRen).

Eksempler på passende MHC-peptidmål for scTCRen ifølge oppfinnelsen inkluderer virusepitoper, slik som HTLV-1-epitoper (for eksempel er tax-peptidet, begrenset av HLA-A2, HTLV-1 assosiert med leukemi), HIV-epitoper, EBV-epitoper, CMV-epitoper, melanomepitoper (for eksempel MAGE-1 HLA-A1 begrenset epitop) og andre kreftspesifikke epitoper (for eksempel nyrecellekarsinomet som er assosiert med antigen G250 begrenset av HLA-A2) og epitoper assosiert med autoimmune forstyrrelser, slik som revmatoid artritt. Ytterligere sykdomsassosierte pMHC-mål som er passende for anvendelse i foreliggende oppfinnelse er listet opp i the HLA Factbook (Barclay (red.) Academic Press) og mange andre er i ferd med å bli identifisert.

Lokalisering av legemiddellevering via spesifisiteten til scTCRer kan potensielt øke flertallet av sykdomsbehandlinger.

Virussykdommer som det foreligger legemidler mot, for eksempel HIV, SIV, EBV, CMV, vil kunne dra fordel av at legemiddelet blir frigjort eller aktivert i nærheten av infiserte celler. For kreft vil lokaliseringen i nærheten av tumorer eller metastaser forbedre effekten av toksiner eller immunstimulerende midler. I autoimmune sykdommer kan immunundertrykkende legemidler bli frigitt sakte og ha mer lokal effekt over et lengre tidsrom, mens den totale immunkapasiteten til individet blir påvirket minimalt. Ved forhindringen av transplantatavstøtninger kan effekten av immunundertrykkende legemidler bli optimalisert på samme måte. For vaksinelevering kan vaksineantigenet bli lokalisert i nærheten av antigenpresenterende celler og dermed øke effektiviteten til antigenet. Fremgangsmåten kan også bli benyttet ved synliggjøringshensikter.

scTCRene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet for å modulere T-celleaktivering av binding til spesifikke ligander, slik som pMHC, og derved inhibere T-celleaktivering. Autoimmunsykdommer som involverer T-cellemediert inflammasjon og/eller vevskade, kan bli tilpasset til denne tilnærmingen, for eksempel type I-diabetes. Kjennskap til den spesifikke peptidepitopen som ble presentert av den relevante pMHC, er nødvendig for denne anvendelsen.

Medikamenter i overensstemmelse med oppfinnelsen vil vanligvis bli tilført som en del av et sterilt farmasøytisk preparat som normalt inkluderer en farmasøytisk akseptabel bærer. Dette farmasøytiske preparatet kan foreligge i enhver passende form (avhengig av den ønskede administreringsfremgangsmåten til en pasient). Det kan bli tilveiebrakt i enhetsdoseringsform, vil generelt være tilveiebrakt i en forseglet beholder og kan bli tilveiebrakt som en del av et sett. Et slikt sett vil normalt (selv om det ikke er nødvendig) inkludere instruksjoner for anvendelse. Det kan inkludere et flertall av nevnte enhetsdoseringsformer.

Det farmasøytiske preparatet kan bli tilpasset for administrering på enhver passende måte, for eksempel for oral (inkludert buccal eller sublingval), rektal, nasal,

topisk (inkludert buccal, sublingval eller transdermal), vaginal eller parenteral (inkludert subkutan, intramuskulær, intravenøs eller intradermal) administrering. Slike preparater kan bli fremstilt ved hjelp av enhver fremgangsmåte som er kjent på fagområdet for farmasi, for eksempel ved å blande den aktive ingrediensen med bæreren/bærerne eller eksipiensen/eksipiensene under sterile betingelser.

Screeningsanvendelse

scTCRene ifølge foreliggende oppfinnelse er i stand til å bli benyttet i screeningsfremgangsmåter som er designet for å identifisere modulatorer, inkludert inhibitorer, av den TCR-medierte, cellulære immunsynapsen.

Som kjent for fagfolk på området foreligger det et antall analyseformater som tilveiebringer en hensiktsmessig basis for protein-proteininteraksjonsscreeninger av denne typen.

Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay-systemer, slik som AphaScreen, støtter seg på anvendelsen av "donor"- og "akseptor"-kuler som er belagte med et lag med hydrogel på hvilket reseptor- og ligandproteiner kan bli bundet. Interaksjonen mellom disse reseptor- og ligandmolekylene bringer kulene nær hverandre. Når disse kulene blir utsatt for laserlys, konverterer en fotosensitiv enhet på donorkula, nærliggende oksygen til en mer eksitert enkelttilstand. Enkelttilstandsoksygenmolekylene diffuserer over for å reagere med en kjemiluminescensenhet på akseptorkulen som ytterligere aktiverer fluorofores som finnes på den samme kulen. Fluorofores emitterer deretter lys ved 520-620 nanometer, og dette signaliserer at reseptor-ligandinteraksjonen har forekommet. Tilstedeværelsen av en inhibitor av reseptor-ligandinteraksjonen gjør at dette signalet reduseres.

Surface Plasmon Resonance (SPR) er en optisk interfaseanalyse der én bindingspartner (normalreseptoren) blir immobilisert på en "brikke" (sensoroverflaten) og bindingen av den andre bindingspartneren (normalt liganden) som er løselig, og som blir ledet til å flyte over brikken, blir påvist. Bindingen av liganden fører til en økning i konsentrasjon av protein nær brikkens overflate, noe som fører til en endring i den refraktive indeksen i den regionen. Overflaten på brikken blir sammensatt slik at endringen i refraktiv indeks kan bli påvist ved hjelp av surface plasmon resonance, et optisk fenomen hvorved lys ved en viss inngangsvinkel på en tynn metallfilm forårsaker en reflektert stråle med redusert intensitet som skyldes resonanseksitasjon av bølger av oscillerende overflateladningstetthet (surface plasmons). Resonansen er svært sensitiv overfor endringer i den referaktive indeksen på den andre siden av metallfilmen, og det er dette signalet som blir benyttet for å påvise binding mellom de immobiliserte og de løselige proteinene. Systemer som tillater hensiktsmessig anvendelse av SPR-deteksjon av molekylære interaksjoner og dataanalyse er kommersielt tilgjengelige. Eksempler er Iasys-maskiner (Fisons) og Biacore-maskinene.

Andre interfaseoptiske analyser inkluderer total internal reflectance fluorescence (TIRF), resonant mirror (RM) og optical grating coupler sensor (GCS) og er diskutert mer detaljert i Woodbury and Venton (J. Chromatog. B. 725 113-137 (1999)). Scintillasjons-proksimitetsanalysen (SPA) er blitt benyttet for å screene forbindelsesbiblioteker for inhibitorer av lavaffinitetsinteraksjonen mellom CD28 og B7 (K_d er sannsynligvis i området 4 μ M (Van der Merwe et al. J. Exp. Med. 185:393-403 (1997), Jenh et al., Anal Biochem 165(2)287-93 (1998)). SPA er en radioaktiv analyse som gjør bruk av betapartikkel-emisjon fra visse radioaktive isotoper som overfører energi til scintillator som er immobilisert på indikatoroverflaten. Den korte rekkevidden til betapartiklene i løsning sikrer at scintillasjon bare forekommer når betapartiklene blir emittert i nærhet av scintillatoren. Når den blir benyttet til deteksjon av protein-proteininteraksjoner blir en interaksjonspartner merket med radioisotopen, mens den andre enten blir bundet til kuler som inneholder scintillator eller belagt på en overflate sammen med scintillator. Hvis analysen kan bli satt opp optimalt, vil radioisotopen bli brakt nært nok inntil scintillatoren slik at fotonemisjon kan bli aktivert kun når binding mellom de to proteinene forekommer.

Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for å identifisere en inhibitor av interaksjonen mellom en scTCR og en TCR-ligand valgt fra MHC-peptid-komplekser, CD1-antigenkomplekser, superantigener og MHC-peptid/-superantigen-komplekser omfattende å kontakte scTCRen med en scTCR-ligandbindingspartner i nærvær av, og i fravær av, en testforbindelse, og bestemme hvorvidt nærværet av testforbindelsen reduserer binding av scTCRen til liganden, der en slik reduksjon blir tatt som en identifisering av en inhibitor.

Et siste aspekt av forbindelsen er en fremgangsmåte for å identifisere en potensiell inhibitor av interaksjonen mellom en scTCR og TCR-ligand valgt fra MHC-peptidkomplekser, CD1-antigenkomplekser, superantigener og MHC-peptid/superantigen-komplekser omfattende å kontakte scTCR eller scTCR-ligandbindingspartneren med en testforbindelse og bestemme hvorvidt testforbindelsen binder til scTCRen og/eller liganden, der slik binding blir tatt som en identifikasjon på en potensiell inhibitor. Dette aspektet av oppfinnelsen kan finne spesiell anvendelse i interfaseoptiske analyser, slik som de som blir utført ved å benytte BIAcore-systemet.

Eksempler

Oppfinnelsen er ytterligere beskrevet i de følgende eksemplene.

I det følgende blir referanse gjort til de medfølgende tegningene der:

Figurene 1a og 1b henholdsvis viser nukleinsyresekvensen til α - og β -kjedene til en løselig A6 TCR som er mutert for å introdusere et cysteinkodon. Skyggeleggingen indikerer de introduserte cysteinkodons,

Figur 2a viser A6-TCR- α -kjede-ekstracellulæraminosyresekvensen, inkludert T₄₈→C-mutasjonen (understreket) benyttet for å produsere den nye disulfidinterkjede-

bindingen, og figur 2b viser A6 TCR- β -kjede-ekstracellulæraminosyresekvensen, inkludert S₅₇→C-mutasjonen (understreket) benyttet til å produsere den nye disulfidinterkjede-bindingen,

Figur 3 viser DNA- og aminosyresekvensen til Gly/Ser-linkeren (30mer)

Figur 4 oppsummerer kloningsstrategien som er benyttet for å produsere scDiS A6 TCR.

Figur 5a viser DNA-sekvensen til scDiS A6 TCR.

Figur 5b viser aminosyresekvensen til scDiS A6 TCR.

Figur 6 illustrerer elueringen av scDiS A6 TCR-protein fra en POROS 50HQ-ionebytterkolonne ved å benytte en 0-500 mM NaCl-gradient, som indikert ved den rette linjen,

Figur 7 viser resultatet av både reduserende SDS-PAGE (coomassie-farget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (coomassie-farget) geler av fraksjonene A15, B10, B9 og B3 fra kolonnekjøringen som er illustrert i figur 6. Fraksjonene B9 og B10 inneholder klart protein som tilsvarer den forventede størrelsen på scDiS A6 TCR.

Figur 8 illustrerer elueringen av scDiS A6 TCR-eluering fra en Superdex 200 gelfiltreringskolonne av fraksjonene B10-B7 fra ionebytterkolonnekjøringen som er vist i figur 6.

Figur 9 viser resultatet av både reduserende SDS-PAGE (coomassie-farget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (coomassie-farget) geler av fraksjonene B8, B7, B3 og B2 fra gelfiltreringskolonnekjøringen som er illustrert i figur 8. Fraksjon B7 inneholder åpenbart protein som tilsvarer den forventede størrelse for scDiS A6 TCR,

Figur 10 er en siste gelfiltreringskjøring i BIAcore-buffer av de konsentrerte fraksjonene B9-B6 av gelfiltreringskjøringen som er vist i figur 8. scDiS A6 TCR eluerer som en enkelt stor topp,

Figur 11 viser BIAcore-data for binding av scDiS A6 TCR til HLA-A2 TAX,

Eksempel 1 - design av primere og mutagenese av A6-tax-TCR- α - og - β -kieder for å introdusere cysteinresidene som er nødvendige for dannelsen av en ny interkjededisulfidbinding

For å mutere A6-tax-treonin 48 i ekson 1 i TRAC*01 til cystein, ble de følgende primerne designet (mutasjon er vist med små bokstaver):

5'-C ACA GAC AAA tgT GTG CTA GAC AT

5'-AT GTC TAG CAC Aca TTT GTC TGT G

For å mutere A6 tax serin 57 i ekson 1 i både TRBC1*01 og TRBC2*01 til cystein, ble de følgende primerne designet (mutasjon er vist med små bokstaver):

5'-C AGT GGG GTC tGC ACA GAC CC

5'-GG GTC TGT GCa GAC CCC ACT G

PCR-mutagenese

5 Ekspresjonsplasmidet inneholdende genene for A6-tax-TCR- α - eller - β -kjeden ble mutert ved å benytte α -kjedeprimerne eller β -kjedeprimerne på følgende måte. 100 ng plasmid ble blandet med 5 μ l 10 Mm dNTP, 25 μ l 10xPfu-buffer (Stratagene), 10 enheter Pfu-polymerase (Stratagene) og sluttvolumet ble justert til 240 μ l med H₂O. 48 μ l av denne blandingen ble tilsatt primere fortynnet til å gi en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M i 50 μ l
10 sluttreaksjonsvolum. Etter et første denatureringstrinn på 30 sekunder ved 95 °C ble reaksjonsblandingen utsatt for 15 runder med denaturering (95 °C, 30 sek.), annealing (55 °C, 60 sek.) og elongering (73 °C, 8 min.) i en hybaid-PCR-ekspress-PCR-maskin. Produktet ble deretter fordøyd i 5 timer ved 37 °C med 10 enheter DpnI-restriksjonsenzym (New England Biolabs). 10 μ l av den fordøyde reaksjonsblandingen ble transformert inn
15 kompetente XL-1-blue-bakterier og dyrket i 18 timer ved 37 °C. En enkeltkoloni ble plukket og dyrket over natt i 5 ml TYP + ampicillin (16 g/l bacto-trypton, 16 g/l gjær-ekstrakt, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l K₂HPO₄, 100 mg/1 ampicillin). Plasmid-DNA ble rensset på en Qiagen-miniprepkolonne i henhold til forhandlers instruksjoner, og sekvensen ble bekreftet ved hjelp av automatisert sekvensering på sekvenseringsfasiliteten til Department of
20 Biochemistry, Oxford University. De respektive, muterte nukleinsyre- og aminosyre-sekvensene er vist i figurene 1a og 2a for α -kjeden og figurene 1b og 2b for β -kjeden.

Eksempel 2 - design, uttrykking og testing av en enkeltkjede-A6-TCR som inneholder en ny disulfidinterkjedebinding

25 Ekspresjonsvektorene inneholdende DNA-sekvensene til de muterte A6 TCR α - og β -kjedene som inneholder de ytterligere cysteinresidiene som er nødvendige for dannelsen av en ny disulfid som er fremstilt i eksempel 1 og som vist i figurene 1a og 1b, ble benyttet som basisen for fremstillingen av en enkeltkjede-A6 TCR, med unntaket av at stoppkodonet (TAA) var fjernet fra enden av α -kjedesequensen på følgende måte:
30 scDiS A6 TCR inneholder en linkersekvens på 30 aminosyrer mellom C-terminalen til TCR- α -kjeden og N-terminalen til β -kjeden. Figur 3 viser DNA- og aminosyresekvensen til denne linker. Kloningsstrategien som ble benyttet for å fremstille scDiS A6 TCRen er summert i figur 4.

35 Kort fortalt, ble alfa- og beta-kjedene i A6-dsTCRen amplifisert ved PCR ved å benytte primere som inneholder restriksjons seter som vist i figur 4, dvs.:

Alpha 5' primer: ccaaggccatatgcagaaggaagtggagcagaactct

Alpha 3' primer: ttgggcccgcgggatccgccccgggggaactttctgggctgggg

Beta 5' primer: tccccggggggcgggatccggcgggcccaacgctgggtgtcactcag

Beta 3' primer: gggaagcttagtctgctctaccccaggcctcg

De to fragmentene som derved ble fremstilt ble sammensydd med PCR ved å benytte de 5' alfa- og 3' betaprimerne for å gi en enkeltkjede-TCR med en kort linker inneholdende XmaI-BamHI-ApaI-setene. Dette fragmentet ble klonet inn i pGMT7.

5 Fullengdelinkeren ble deretter innsatt i to trinn, først ble et fragment på 42bp innsatt ved å benytte XmaI og BamHI-setene:

5' -CC GGG GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGT TCA GGC GGT GGC G -3'
3' - C CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCA AGT CCG CCA CCG CCT AG-5'

10 Deretter ble et fragment på 48 bp innsatt ved å benytte BamHI- og ApaI-setene for å danne en linker på 90 bp mellom 3' ende på alfakjeden og 5' ende på betakjeden. 48 bp-fragmentet ble fremstilt ved hjelp av PCR-forlengning av en blanding av de følgende oligoer:

5' - GC GGA TCC GGC GGT GGC GGT TCG GGT GGC GGT GGC TC-3'
3' - CCA AGC CCA CCG CCA CCG AGT CCG CCA CCG CCC GGG TG -5'

15 Produktet av denne forlengningen ble fordøyd med BamHI og ApaI og ligert inn i det fordøyde plasmidet inneholdende linkerfragmentet på 42 bp. Den komplette DNA- og aminosyresekvensen til scDiS A6 TCRen er vist figurene 5a og 5b.

Uttrykking og rensing av enkeltkjededisulfidbundet A6-TCR:

20 Ekspresjonsplasmidet inneholdende enkeltkjededisulfidbundet A6 TCR ble transformert inn i *E.coli*-stammen BL21pLysS, og enkelte ampicillinresistente kolonier ble dyrket ved 37 °C i TYP (ampicillin 100 µg/ml) medium til OD₆₀₀ på 0,4 før proteinuttrykking ble indusert med 0,5 mM IPTG. Celler ble høstet tre timer etter induksjon ved sentrifugering i 30 minutter ved 4 000 rpm i en Beckmann J-6B. Cellepelletter ble
25 resuspendert i en buffer inneholdende 50 mM tris-HCl, 25 % (w/v) sukrose, 1 mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 10 mM DTT, pH 8,0. Etter et over-natt-trinn med frysing - tining, ble resuspenderte celler sonikert i 1 minutt pulser i totalt omtrent 10 minutter i en milsonix XL2020-sonikator ved å benytte en standard 12 mm- diameter- probe. Inklusjonslegeme-
30 pelletter ble fremskaffet ved sentrifugering i 30 minutter ved 13 000 rpm i en Beckmann J2-21-sentrifuge. Tre detergentvaskinger ble deretter utført for å fjerne celleavfall og membrankomponenter. Hver gang ble inklusjonslegemepelletten homogenisert i en triton-

buffer (50 mM tris-HCl, 0,5 % triton-X100, 200 mM NaCl, 10 mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 2 mM DTT, pH 8,0) før den ble spunnet ned ved sentrifugering i 15 minutter ved 13 000 rpm i en Beckmann J2-21. Detergent og salt ble deretter fjernet ved hjelp av en lignende vasking i følgende buffer: 50 mM tris-HCl, 1 mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 2 mM DTT, pH 8,0. Til slutt ble inklusjonslegemene delt i like volumer på 30 mg og frosset ned ved -70 °C. Inklusjonslegemeproteinutbytte ble kvantifisert ved å løseliggjøre med 6 M guanidin-HCl og målinger med en Bradford-fargebindingsanalyse (PerBio).

Omtrent 15 mg av den løseliggjorte inklusjonslegemekjeden ble tint fra frosne stokkløsninger. Inklusjonslegemene ble fortynnet til en sluttkonsentrasjon på 5 mg/ml i 6 M guanidinløsning og DTT (2 M stokkløsning) ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10 mM. Blandingen ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter. 1 liter av den følgende refoldingsbufferen: 100 mM tris pH 8,5, 400 mM L-Arginin, 2 mM EDTA, 5 mM redusert glutation, 0,5 mM oksidert glutation, 5 M urea, 0,2 mM PMSF ble fremstilt og rørt kraftig ved 5°C ± 3 °C. Redoksparet (2-merkaptoetylamin og cystamin, henholdsvis til sluttkonsentrasjoner på 6,6 mM og 3,7 mM) ble tilsatt omtrent 5 minutter før tilsetning av de denaturerte TCR-kjedene. Proteinene ble deretter tilsatt for å refolde i omtrent 5 timer ± 15 minutter med røring ved 5 °C ± 3 °C. Refoldingen ble deretter dialysert to ganger, først mot 10 liter 100 mM urea, deretter mot 10 liter 100 mM urea, 10 mM tris pH 8,0. Begge refoldings- og dialysetrinn ble utført ved 6-8 °C.

scTCR ble separert fra degraderingsprodukter og urenheter ved å sette den dialyserte refoldingsløsningen på en POROS 50 HQ anionbytterkolonne og eluere bundet protein med en gradient av 0-500 mM NaCl over 50 kolonnevolumer ved å benytte en aktarensen (Pharmacia) som i figur 6. Toppfraksjoner ble lagret ved 4 °C og analysert med coomassiefarget SDS-PAGE (figur 7) før det ble sammenslått og konsentrert. scTCR ble deretter rensert og kjennetegnet ved å benytte en Superdex 200HR gelfiltreringskolonne (figur 8) prebalansert i HBS-EP-buffert (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,5 mM EDTA, 0,05 % nonidet p40). Toppfraksjoner ble lagret ved 4 °C og analysert med coomassiefarget SDS-PAGE (figur 9) før det ble sammenslått og konsentrert. Til slutt ble konsentrerte fraksjoner B9-B6 kjørt gjennom et annet gelfiltreringstrinn for å fremstille rensert protein i BIAcore buffer, figur 10). Toppen som eluerte ved en relativ molekylvekt på omtrent 50 kDa ble sammenslått. Dette ble konsentrert før karakterisering ved BIAcore surface plasmon resonance analyse.

Eksempel 3 - BIAcore-surface-plasmon-resonance-karakterisering av scTCR-binding til HLA-A2-tax

En surface plasmon resonance biosensor (BIAcore 3000) ble benyttet for å analysere bindingen av A6 scTCR til sin peptid-MHC-ligand (HLA-A2-tax). Dette ble fremmet ved å fremstille enkeltstående pMHC-komplekser (beskrevet nedenfor) som ble immobilisert på en streptavidinbelagt bindingsoverflate på en semiorientert måte, som tillot

effektiv testing av bindingen av en løselig T-cellereseptor til opp til fire ulike pMHC (immobilisert på separate flowceller) samtidig. Manuell injeksjon av HLA-kompleks gjør at det presise nivået av immobiliserte klasse I-molekyler kan bli manipulert enkelt.

5 Slike immobiliserte komplekser er i stand til å binde både T-cellereseptorer og koreseptoren CD8 $\alpha\alpha$, der begge kan bli injisert i den løselige fasen.

Biotinylerede klasse-I-HLA-A2-tax-komplekser ble refoldet *in vitro* fra bakterielt uttrykte inklusjonslegemer inneholdende de tilhørende subenhetsproteinene og det syntetiske peptid, etterfulgt av rensing og *in vitro*-enzymatisk biotinylering (O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266:9-15). HLA-tungkjede ble uttrykt med et C-terminalt biotinyleringsmerke som erstatter transmembran- og cytoplasmadomenene til proteinet i 10 en passende konstruksjon. HLA-lettkjeden eller β 2-mikroglobulin ble også uttrykt som inklusjonslegemer i *E.coli* fra en passende konstruksjon, ved et nivå på ~500 mg/liter bakteriekultur.

E.coli-celler ble lysert og inklusjonslegemet ble rensert til omtrent 80 % renhet. 15 Protein fra inklusjonslegemer ble denaturert i 6 M guanidin-HCl, 50 mM tris pH 8,1, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 mM EDTA og ble refoldet ved en konsentrasjon på 30 mg/liter tungkjede, 30 mg/liter β 2m i 0,4 M L-arginin-HCl, 100 mM tris pH 8,1, 3,7 mM cystamin, mM cysteamin, 4 mg/ml peptid (for eksempel tax 11-19) ved tilsetning av en enkelt puls med denaturert protein i refoldingsbuffer ved <5 °C. Refolding ble tillatt å 20 bli fullstendig ved 4 °C i minst én time.

Buffer ble byttet ved dialyse i 10 volumer med 10 mM tris pH 8,1. To utskiftninger av buffer var nødvendig for å redusere ionestyrken til løsningen tilstrekkelig. Proteinløsningen ble deretter filtrert gjennom et 1,5 μ m celluloseacetatfilter og satt på en POROS 50HQ-anionbytterkolonne (8 ml volum) Protein ble eluert med en lineær 25 0-500 mM NaCl-gradient. HLA-A2-peptidkompleks eluerte ved omtrent 250 mM NaCl, og toppfraksjoner ble samlet, en cocktail av proteaseinhibitorer (Calbiochem) ble tilsatt og fraksjonene ble avkjølt på is.

Biotinyleringsmerkede HLA-komplekser ble bufferbyttet i 10 mM tris pH 8,1, 5 mM NaCl ved å benytte en rask avsaltingskolonne fra Pharmacia som var balansert i den 30 samme bufferen. Rett etter eluering ble de proteininneholdende fraksjonene avkjølt på is, og proteaseinhibitorcocktail (Calbiochem) ble tilsatt. Biotinyleringsreagenser ble deretter tilsatt: 1 mM biotin, 5 mM ATP (bufret til pH 8), 7,5 MgCl₂ og 5 μ g/ml BirA-enzym (renset i overensstemmelse med O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Blandingen ble deretter tillatt å inkubere ved romtemperatur over natt.

35 Biotinylerede HLA-komplekser ble rensert ved å benytte gelfiltreringskromatografi. En Superdex 75 HR 10/30-kolonne fra Pharmacia ble forhåndsbalansert med filtrert PBS og en 1 ml av biotinyleringsreaksjonsblandingen ble påsatt, og kolonnen ble utviklet med PBS ved 0,5 ml/min. Biotinylerede HLA-komplekser eluerte som en enkelt topp ved omtrent 15 ml. Fraksjoner som inneholdt protein ble slått sammen, avkjølt på is og proteaseinhibitor-

coctail ble tilsatt. Proteinkonsentrasjon ble bestemt ved å benytte en coomassiebindings-analyse (PerBio) og like volumer av biotinylerte HLA-komplekser ble lagret frosset ved -20 °C. Streptavidin ble immobilisert ved hjelp av standard aminkoblingsfremgangsmåter.

Interaksjoner mellom A6 tax scTCR inneholdende en ny interkjedebinding og dens ligand/MHC-kompleks eller en irrelevant HLA-peptidkombinasjon, produksjon av hvilke er beskrevet ovenfor, ble analysert på en BIAcore 3000 surface plasmon resonance (SPR) biosensor. SPR måler endringer i refraktiv indeks uttrykt i responsenheter (RU) nær en sensoroverflate i en liten flowcelle, et prinsipp som kan bli benyttet for å påvise reseptorligandinteraksjoner og for å analysere deres affinitet og kinetiske parametere.

Probeflowcellene ble klargjort ved å immobilisere de individuelle HLA-peptidkompleksene i separate flowceller via binding mellom biotinet, kryssbundne på β 2m og streptavidin som har blitt kjemisk kryssbundet til den aktiverte overflaten på flowcellene. Analysen ble deretter utført ved å passere scTCR over overflatene i de ulike flowcellene ved en konstant strømningsrate, og måle SPR-responsen ved å utføre dette. Injeksjoner av løselig scTCR ved konstant strømningsrate og ulike konsentrasjoner over peptid-HLA-komplekset ble benyttet for å definere bakgrunnsresonansen. Verdiene på disse kontrollmålingene ble trukket fra verdiene som ble oppnådd med spesifikt peptid-HLA-kompleks og benyttet for å beregne bindingsaffiniteter uttrykt som dissosieringskonstanten, K_d (Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2. utgave) 1979, Clarendon Press, Oxford).

BIAcore analysen av scDiS A6 TCR viste at dette molekylet bandt spesifikt til sin relaterte ligand (HLA-A2-tax) med en k_d på $12,4 \pm 1,62 \mu\text{M}$.

P a t e n t k r a v

1. Enkeltkjede-T-celle reseptor (scTCR),
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter

5 et α -segment som utgjøres av en TCR- α -kjedes variabel region sekvens fusjonert med N-terminalen til en TCR- α -kjedes konstant region ekstracellulærsekvens,

et β -segment som utgjøres av en TCR- β -kjedes variabel region fusjonert med N-terminalen til en TCR- β -kjedes konstant region ekstracellulærsekvens, og

en linkersekvens som binder sammen C-terminalen til α -segmentet med N-

10 terminalen til β -segmentet, eller vise versa,

hvor konstant regionens ekstracellulærsekvenser til α - og β -segmentene er bundet sammen med en disulfid-binding mellom cysteinrester som er substituert for:

Thr 48 i ekson 1 av TRAC*01 og Ser 57 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

Thr 45 i ekson 1 av TRAC*01 og Ser 77 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

15 Tyr 10 i ekson 1 av TRAC*01 og Ser 17 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

Thr 45 i ekson 1 av TRAC*01 og Asp 59 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01;

eller

Ser 15 i ekson 1 av TRAC*01 og Glu 15 i ekson 1 av TRBC1*01 eller TRBC2*01.

der lengden til linkersekvensen og posisjonen til disulfid-bindingen er slik at variabel
20 region sekvensene til α - og β -segmentene er gjensidig orientert, vesentlig som i native $\alpha\beta$ -T-cellerreseptorer.

2. scTCR ifølge krav 1, hvor (a) α -segmentet er den variable regionen på en TCR fusjonert med N-terminalen på det ekstracellulære domenet til α -kjedens konstante region på
25 en TCR- α -kjede, og/eller (b) β -segmentet er den variable regionen på en TCR- β -kjede fusjonert med en N-terminalen til det ekstracellulære domenet på den konstante regionen til en TCR- β -kjede.

3. scTCR ifølge krav 1 eller krav 2, hvor konstant region ekstracellulærsekvensene som
30 er til stede i α - og β -segmentene tilsvarer konstant regionene på α - og β -kjedene i en nativ TCR trunkert på deres C-terminale ende, slik at cysteinrestene som danner den native interkjede disulfid-bindingen i TCRen er ekskludert.

4. scTCR ifølge krav 1 eller krav 2, hvor konstant region ekstracellulærsekvensene som
35 foreligger i α - og β -segmentene tilsvarer konstant regionene i α - og β -kjedene til en nativ TCR der cysteinrestene som danner den native interkjede disulfid-bindingen, er substituert med en annen aminosyrerest.

5. scTCR ifølge krav 4, hvor nevnte cysteinrester er substituert med serin eller alanin.

6. scTCR ifølge ethvert av de foregående krav, hvor linkersekvensen har formelen -P-AA-P-, der P er prolin og AA representerer en aminosyresekvens der aminosyrene er glysin og serin.

5

7. scTCR ifølge ethvert av de foregående krav, hvor linkersekvensen binder sammen C-terminalen på α -domenet og N-terminalen på β -domenet.

8. scTCR ifølge krav 7, hvor linkersekvensen består av fra 26 til 41 aminosyrer.

10

9. scTCR ifølge krav 7, hvor linkersekvensen består av 29, 30, 31 eller 32 aminosyrer.

10. scTCR ifølge krav 7, hvor linkersekvensen består av 33, 34, 35 eller 36 aminosyrer.

15

11. scTCR ifølge krav 7, hvor linkersekvensen er -PGGG-(SGGGG)₅-P-, der P er prolin, G er glysin og S er serin.

12. scTCR ifølge krav 7, hvor linkersekvensen er -PGGG-(SGGGG)₆-P-, der P er prolin, G er glysin og S er serin.

20

13. scTCR ifølge ethvert av de foregående krav, hvor en uparet cysteinrest som er til stede i nativ TCR- β -kjede ikke er til stede.

14. scTCR ifølge ethvert av de foregående krav, hvor TCR- α - og - β -kjedenes variabel region sekvenser som er til stede i α - og β -segmentene sammen tilsvarer det funksjonelle, variable domenet i en første TCR, og TCR- α - og - β -kjedenes konstant region ekstracellulærsekvenser som er til stede i α - og β -segmentene, tilsvarer de i en andre TCR, der den første og den andre TCR stammer fra samme art.

25

15. scTCR ifølge ethvert av kravene 1 til 13, hvor TCR- α - og - β -kjedenes variabel region- sekvenser som er til stede i α - og β -segmentene, sammen tilsvarer det funksjonelle, variable domenet i en første TCR, og TCR- α - og - β -kjedenes konstant region ekstracellulærsekvenser som er til stede i α - og β -segmentene, tilsvarer de i en andre TCR, der den første og den andre TCR stammer fra samme art.

30

16. scTCR ifølge krav 15, hvor TCR- α - og - β -kjedenes variabel region sekvenser som er til stede i α - og β -segmentene, sammen tilsvarer det funksjonelle, variable domenet i en human TCR, og TCR- α - og - β -kjedenes konstant region ekstracellulærsekvenser som er til stede i α - og β -segmentene, tilsvarer de i en muse-TCR.

35

17. scTCR ifølge krav 1 til 14, hvor TCRen er en som binder et peptid-MHC-kompleks.

18. scTCR ifølge krav 17, hvor TCRen er en som binder et CD1-antigenkompleks.

5

19. scTCR ifølge krav 1 til 14, hvor TCRen er en som binder et superantigen eller et peptid-MHC/superantigen-kompleks.

20. Multivalent T-celle reseptor (TCR)-kompleks,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et flertall av scTCRer ifølge ethvert av de foregående krav.

21. scTCR ifølge ethvert av kravene 1 til 19 eller et kompleks ifølge krav 20, hvor den er kovalent bundet til et terapeutisk middel.

15

22. scTCR ifølge ethvert av kravene 1 til 19 eller 21 eller et flertall derav, hvor den er bundet til en partikkel eller kule.

23. Preparat,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en scTCR ifølge ethvert av de foregående krav og en farmasøytisk akseptabel bærer.

24. Fremgangsmåte for å påvise en TCR-ligand som er valgt fra MHC-peptidkomplekser, CD1-antigenkomplekser, superantigener og MHC-peptid/superantigen-komplekser,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å: tilveiebringe en scTCR ifølge ethvert av kravene 1 til 19 eller et flertall derav, kontakte scTCRen med TCR-liganden og påvise binding av scTCRen til liganden.

25. Fremgangsmåte for å identifisere en inhibitor av interaksjonen mellom en scTCR ifølge ethvert av kravene 1 til 19, eller et flertall derav, og en TCR-ligand som er valgt fra MHC-peptidkomplekser, CD1-antigenkomplekser, superantigener og MHC-peptid/superantigen-komplekser,

30 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å kontakte scTCRen med en scTCR-ligand-bindingspartner i nærvær av, og i fravær av, en testforbindelse og bestemme hvorvidt nærværet av testforbindelsen reduserer binding av scTCRen til TCR-liganden, der en slik reduksjon blir tatt som bevis på at en inhibitor er identifisert.

35

26. Fremgangsmåte for å identifisere en potensiell inhibitor av interaksjonen mellom en scTCR ifølge ethvert av kravene 1 til 19, eller et flertall derav, og en TCR-ligand som er valgt

fra MHC-peptidkomplekser, CD1-antigenkomplekser, superantigener og MHC-peptid/-superantigen-komplekser,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å kontakte scTCRen eller scTCR-ligand-bindingspartneren med en testforbindelse og bestemme hvorvidt testforbindelsen binder til

5 scTCRen og/eller TCR-liganden, der en slik binding blir tatt som bevis på at en potensiell inhibitor er identifisert.

27. Nukleinsyre-molekyl,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en sekvens som koder for en scTCR ifølge ethvert

10 av kravene 1 til 19, eller en sekvens som er komplementær dertil.

28. Vektor,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et nukleinsyre-molekyl ifølge krav 27.

SEQUENCE LISTING

<110> Avidex Ltd
 Jakobsen, Bent K
 Glick, Meir

<120> RECEPTORS

<130> 18/MG

<140> PCT/GB2003/04310

<141> 2003-10-03

<150> GB0223399.7

<151> 2002-10-09

<150> GB0302604.4

<151> 2002-02-05

<150> GB0304064.9

<151> 2002-02-22

<150> US60/475784

<151> 2002-05-06

<160> 41

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> scTCR Linker

<400> 1

Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro
			20					25					30

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser
1				5					10					15	

Met	Asp	Phe	Lys
			20

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
 1 5 10 15

Met Arg Ser Met
 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys
 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser
 1 5 10 15

Val Cys Leu Phe
 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu
 1 5 10 15

Lys Glu Gln Pro
 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser
1				5					10					15	

Ala	Thr	Phe	Trp
			20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His
1				5					10					15	

Thr	Gln	Lys	Ala
			20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
1				5					10					15	

Gln	Pro	Ala	Leu
			20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile
1				5					10					15	

Ser	His	Thr	Gln
			20

<210> 11

<211> 91

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Pro	Tyr	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro
1				5					10					15	

Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 20 25 30

Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys
 35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile
 50 55 60

Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro
 85 90

<210> 12

<211> 126

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
 1 5 10 15

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

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45

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

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
 65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
 85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
 100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 115 120 125

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala
 1 5 10 15

Met Asp Ser Lys

20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
 1 5 10 15

Met Lys Ala Met
 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

Tyr Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Asp Ser
 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys
 1 5 10 15

Leu Phe Thr Asp
 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17

Asn Gly Arg Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
 1 5 10 15

Lys Glu Ser Asn
 20

<210> 18
 <211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser
1 5 10 15

Ala Thr Phe Trp
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn
1 5 10 15

Lys Gln Lys Ala
20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Arg Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu
1 5 10 15

Ser Asn Tyr Ser
20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile
1 5 10 15

Ala Asn Lys Gln
20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22
 cacagacaaa tgtgtgctag acat 24

 <210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 23
 atgtctagca cacatttgtc tgtg 24

 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 24
 cagtggggtc tgcacagacc c 21

 <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 25
 ggggtctgtgc agaccccact g 21

 <210> 26
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer
 <400> 26
 ccaaggccat atgcagaagg aagtggagca gaactct 37

 <210> 27
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 27
 ttgggccccgc cggatccgcc cccgggggaa ctttctgggc tgggg 45

<210> 28
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 28
 tcccccgggg gcggatccgg cgggcccaac gctggtgtca ctcag 45

 <210> 29
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 29
 gggaagctta gtctgctcta ccccaggcct cg 32

 <210> 30
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 30
 ccgggggtgg ctctggcggt ggcggttcag gcggtggcg 39

 <210> 31
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 31
 gatccgccac cgctgaacc gccaccgcca gagccaccc 39

 <210> 32
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 32
 gcggatccgg cggtggcggt tcgggtggcg gtggctc 37

 <210> 33

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 33
 gtgggcccgc caccgcctga gccaccgcca cccgaacc 38

<210> 34
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> scTCR Linker

<400> 34

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Pro
 35

<210> 35
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc . 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat .120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atgggtgacaa agaagatgga .180
 aggttttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc .240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttgagg cagggaccca gggtgtggtc accccagata tccagaaccc tgaccctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 36
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60
 aactgcagtg gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagacca 120
 ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgtc caggctgctg 240
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
 gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360
 aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctccacacc 420
 caaaaggcca cactgggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
 tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagaccgcga gccctcaag 540
 gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
 accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaaccgtca cccagatcgt cagcgccgag 720
 gcctggggta gagcagacta a 741

<210> 37
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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	Ser	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	Thr	Thr	Asp	Ser
				85					90					95	

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 165 170 175

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

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

<210> 38

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro
 165 170 175
 Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190
 Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205
 His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 39
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA encoding scTCR linker

<400> 39
 cccgggggtg gctctggcgg tggcggttca ggcggtggcg gatccggcgg tggcggttcg 60
 ggtggcgggtg gctcaggcgg tggcggggccc 90

<210> 40
 <211> 1446
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sc DiS TCR

<400> 40
 atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180
 aggttttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420

gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagtcccc cgggggtggc tctggcgggtg gcggttcagg cggtggcgga 660
 tccggcgggtg gcggttcggg tggcgggtggc tcaggcgggtg gcgggcccac cgctgggtgtc 720
 actcagaccc caaaattcca ggtcctgaag acaggacaga gcatgacact gcagtgtgcc 780
 caggatatga accatgaata catgtcctgg tatcgacaag acccaggcat ggggctgagg 840
 ctgattcatt actcagttgg tgctgggtatc actgaccaag gagaagtccc caatgggtac 900
 aatgtctcca gatcaaccac agaggatttc ccgctcaggc tgctgtcggc tgctccctcc 960
 cagacatctg tgtacttctg tgccagcagg ccgggactag cgggagggcg accagagcag .1020
 tacttcgggc cgggcaccag gctcacggtc acagaggacc tgaaaaacgt gttcccaccc 1080
 gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 1140
 gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg 1200
 aaggaggtgc acagtggggt ctgcacagac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc 1260
 aatgactcca gatacgctct gagcagccgc ctgaggggtct cggccacctt ctggcaggac 1320
 ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg 1380
 acccaggata gggccaaacc cgtcacccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 1440
 gactaa 1446

<210> 41
 <211> 481
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>
 <223> sc DiS TCR

<400> 41

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	Ser 50	Ile	Tyr	Ser	Asn	Gly 55	Asp	Lys	Glu	Asp	Gly 60	Arg	Phe	Thr	Ala
Gln 65	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser 70	Gln	Tyr	Val	Ser	Leu 75	Leu	Ile	Arg	Asp	Ser 80
Gln	Pro	Ser	Asp	Ser 85	Ala	Thr	Tyr	Leu	Cys 90	Ala	Val	Thr	Thr	Asp 95	Ser
Trp	Gly	Lys	Leu 100	Gln	Phe	Gly	Ala	Gly 105	Thr	Gln	Val	Val	Val 110	Thr	Pro
Asp	Ile	Gln 115	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala 120	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg 125	Asp	Ser	Lys
Ser	Ser 130	Asp	Lys	Ser	Val	Cys 135	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe 140	Asp	Ser	Gln	Thr
Asn 145	Val	Ser	Gln	Ser	Lys 150	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr 155	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys 160
Val	Leu	Asp	Met 165	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys 170	Ser	Asn	Ser	Ala	Val 175	Ala
Trp	Ser	Asn 180	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys 185	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn 190	Asn	Ser
Ile	Ile 195	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe 200	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser 205	Ser	Pro	Gly
Gly 210	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 215	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 220	Ser	Gly	Gly	Gly
Gly 225	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 230	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 235	Pro	Asn	Ala	Gly	Val 240
Thr	Gln	Thr	Pro	Lys 245	Phe	Gln	Val	Leu	Lys 250	Thr	Gly	Gln	Ser	Met 255	Thr
Leu	Gln	Cys	Ala 260	Gln	Asp	Met	Asn	His 265	Glu	Tyr	Met	Ser	Trp 270	Tyr	Arg
Gln	Asp	Pro 275	Gly	Met	Gly	Leu	Arg 280	Leu	Ile	His	Tyr	Ser 285	Val	Gly	Ala
Gly 290	Ile	Thr	Asp	Gln	Gly	Glu 295	Val	Pro	Asn	Gly	Tyr 300	Asn	Val	Ser	Arg
Ser 305	Thr	Thr	Glu	Asp	Phe 310	Pro	Leu	Arg	Leu	Leu 315	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser 320
Gln	Thr	Ser	Val	Tyr 325	Phe	Cys	Ala	Ser	Arg 330	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly 335	Gly
Arg	Pro	Glu	Gln 340	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly 345	Thr	Arg	Leu	Thr	Val 350	Thr	Glu
Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser

355					360					365					
Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala
370						375						380			
Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly
385				390						395				400	
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
				405				410						415	
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg
		420						425						430	
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln
435						440						445			
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg
450						455				460					
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala
465				470						475				480	
Asp															

1/8

Figure 1a

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagccatt
gcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctgttacaga
caatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatataactccaatggtgacaaa
gaagatggaagggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgtctc
atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgcccgttacaactgac
agctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttggtggtcaccacagatc
cagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtct
gtctgcctattcacgattttgattctcaaacaatgtgtcacaaagtaaggattct
gatgtgtatatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagc
aacagtgtgtggcctggagcaacaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaac
aacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcctaa

Figure 1b

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtggtgccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcgacaa
gaccagggcatggggctgagggctgattcattactcagttggtgctggtatcactgac
caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
ctcagggtgctgtcgggtgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcggggccgggcaccagggtcacg
gtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttc
taccgccaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
gtctgcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatac
gctctgagcagccgcctgaggggtctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccac
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcgagagaatgacgagtggaccaggat
agggccaaaccggtcaccacagatcgtcagcgccgaggcctgggggtagagcagactaa

2/8

Figure 2a

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLLIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
GAGTQVVVTP DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
DVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS
PESS *

Figure 2b

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG
RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VCTDPQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD *

3/8

P	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G
CCC	GGG	GGT	GGC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGT	TCA	GGC	GGT	GGC	GGA
GGG	CCC	CCA	CCG	AGA	CCG	CCA	CCG	CCA	AGT	CCG	CCA	CCG	<u>CCT</u>

S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G
TCC	GGC	GGT	GGC	GGT	TCG	GGT	GGC	GGT	GGC	TCA	GGC	GGT	GGC
<u>AGG</u>	CCG	CCA	CCG	CCA	AGC	CCA	CCG	CCA	CCG	AGT	CCG	CCA	CCG

G	P
GGG	CCC
CCC	GGG

Figure 3

4/8

Figure 4

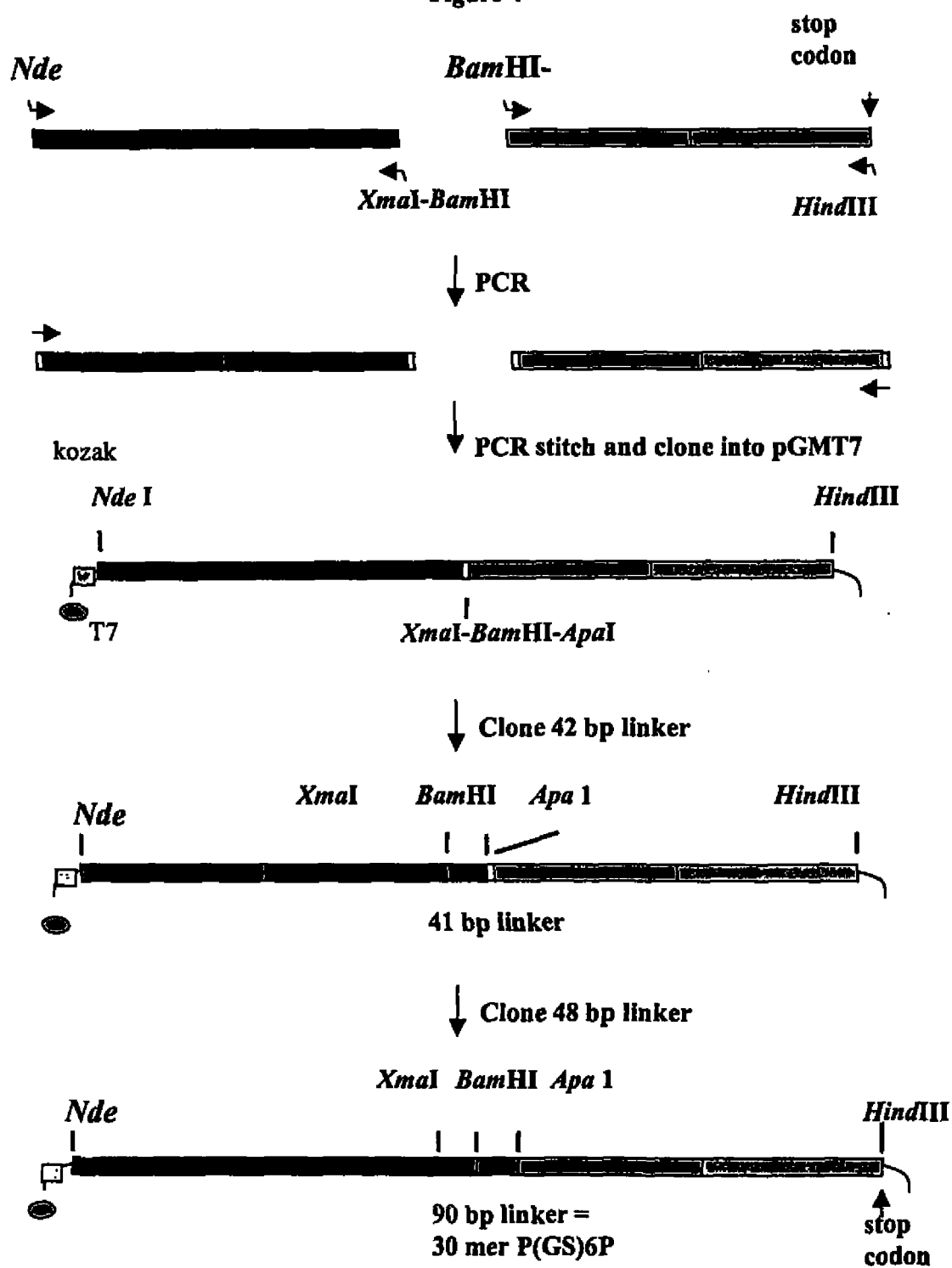


Figure 5a

atgcagaagggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggt
acagacaataattctgggaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaaagccagccagtatgt
ttctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgttacaaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggaccaggttgtg
gtcaccaccagatatccagaacccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaaacaaatg
tgtcacaaaagtaaggattctgattgtgtatatcacagacaaaatgtgtgctagacatgaggtctataggacttcaagagcacaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctga
ctttgcatgtgcaaacgcccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagccccagaaagtcccccggggtggtctggcggttcagggttcaggcggt
ggcggtatccggcggtggcggttcgggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggt
tgacactggcagtggtccccaggtatgaaccatgaatacatgtccctggtatcgacaagacccagggcatggggtgaggtgattcattactcagttggtgctggtatcac
tgaccaaggagaagtcccccaatggctacaaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgcctcaggtgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctgt
gccagagggcggtgactagcgggagggcgaccagagcagtgacttccggcgccgaccaggtcacggtcacagaggaacctgaaaaacgtgttccccccgaggtcgctg
tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacaccccaaaagccacactggtgtgcctggccacaggttctaccccagaccagtgagctggtgggtgaatgg
gaaggaggtgcacagtggtgtgcacagaccccgagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatcacgctctgagcagccgctgaggttctcggccacc
ttctggcaggaccccccaaccacttccgctgtcaagttccagttctacgggctctcggagaatgacagagtggacccaggtaggggccaaacccgtcacccagatcgtca
gcgccgagggcctgggttagagcagactaa

Figure 5b

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGR
FTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAVTTDSWGKLQFGAGTQVVVTPDIQNPDPAV
YQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSKSDSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKS
DFACANAFNNSIIPEDTFFSPESPSSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPNAGVT
QTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGA GITDQGEVPNG
YNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPLAGGRPEQYFGPGLTRLTVTEDLKNVFP
EVAVFEPSEAEISHTKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL
NDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRCCVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR
AD Stop

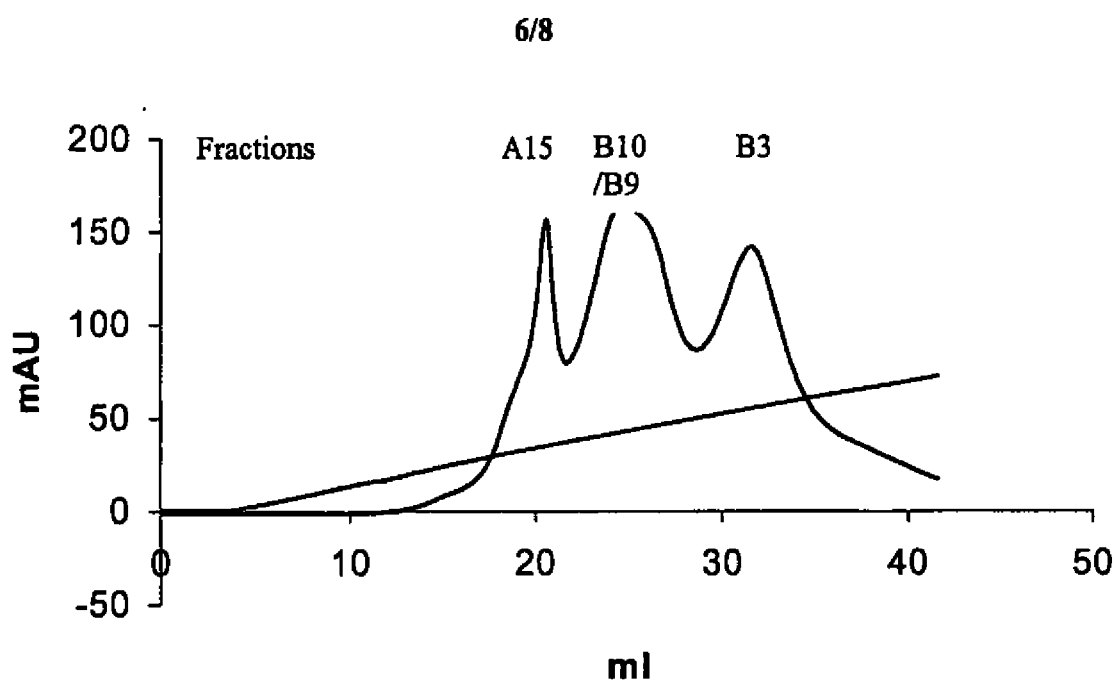


Figure 6

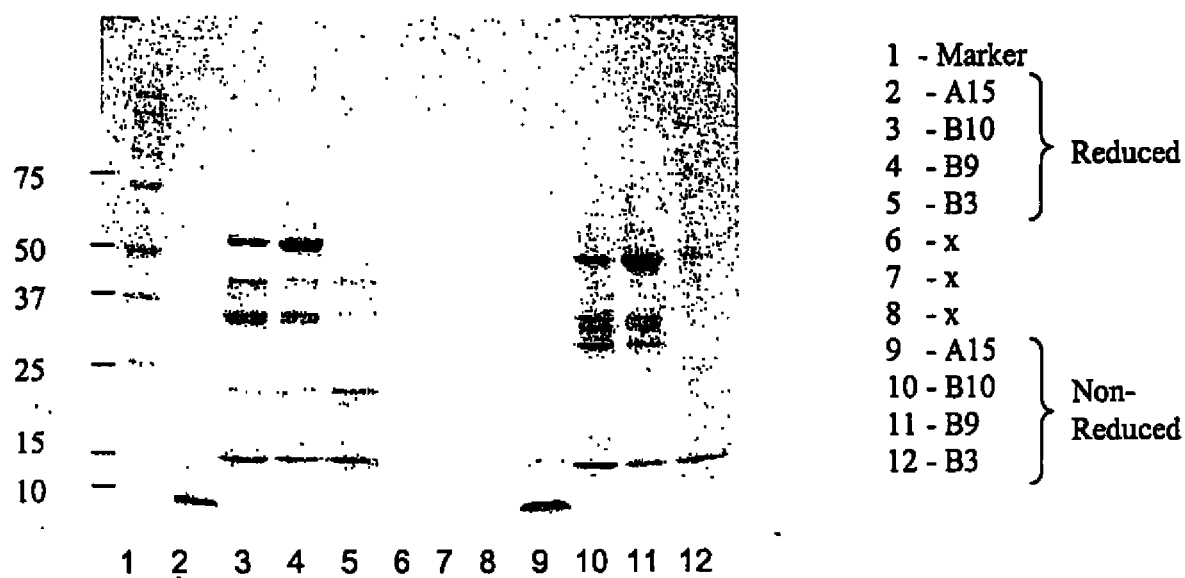


Figure 7

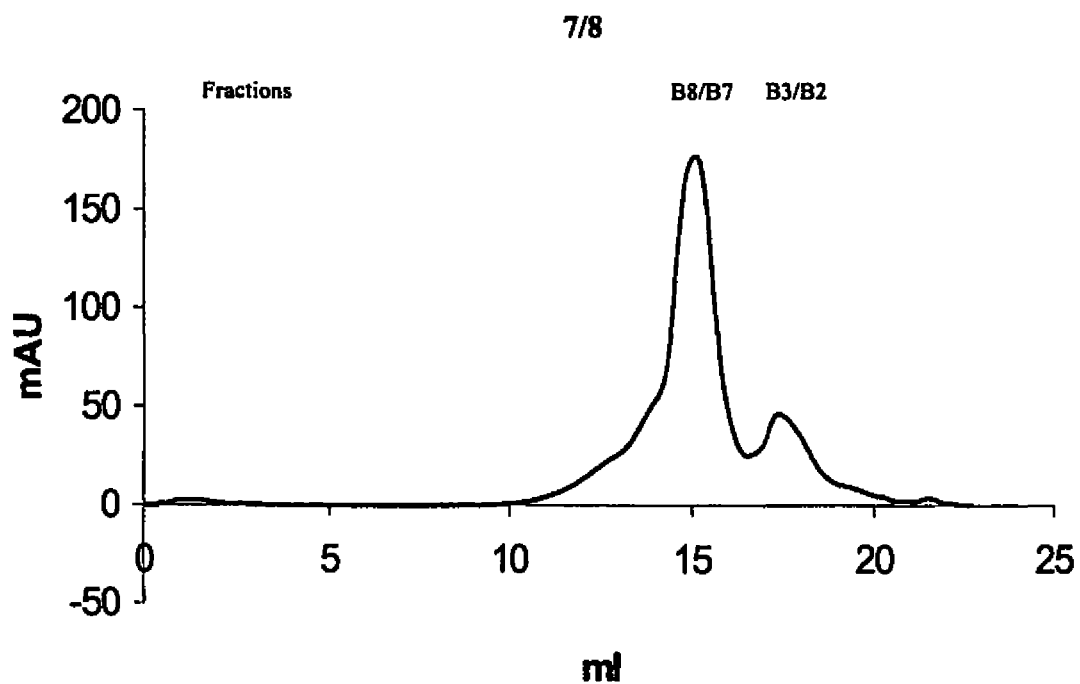


Figure 8

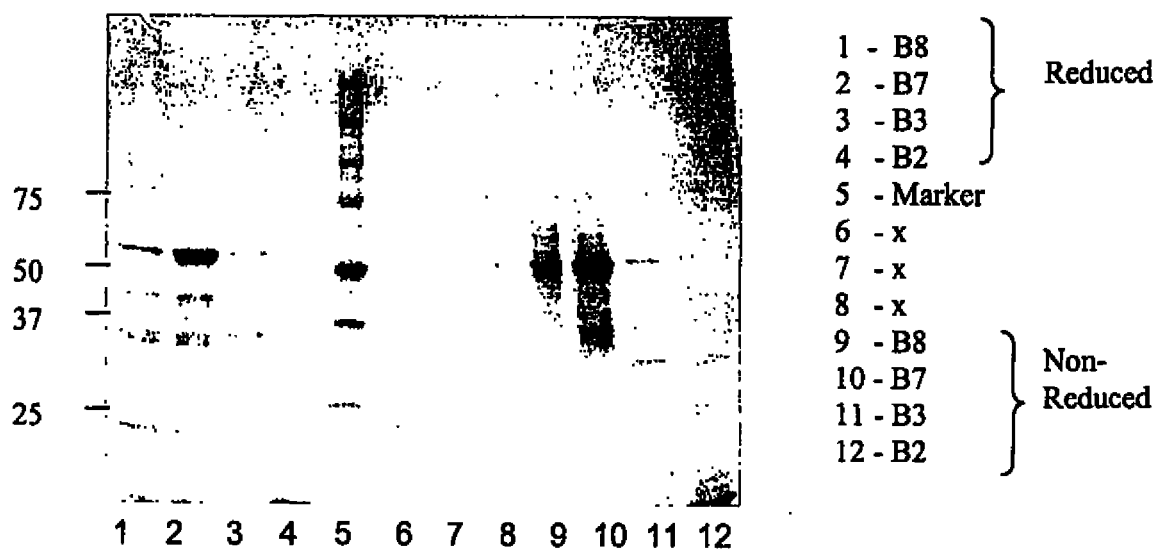


Figure 9

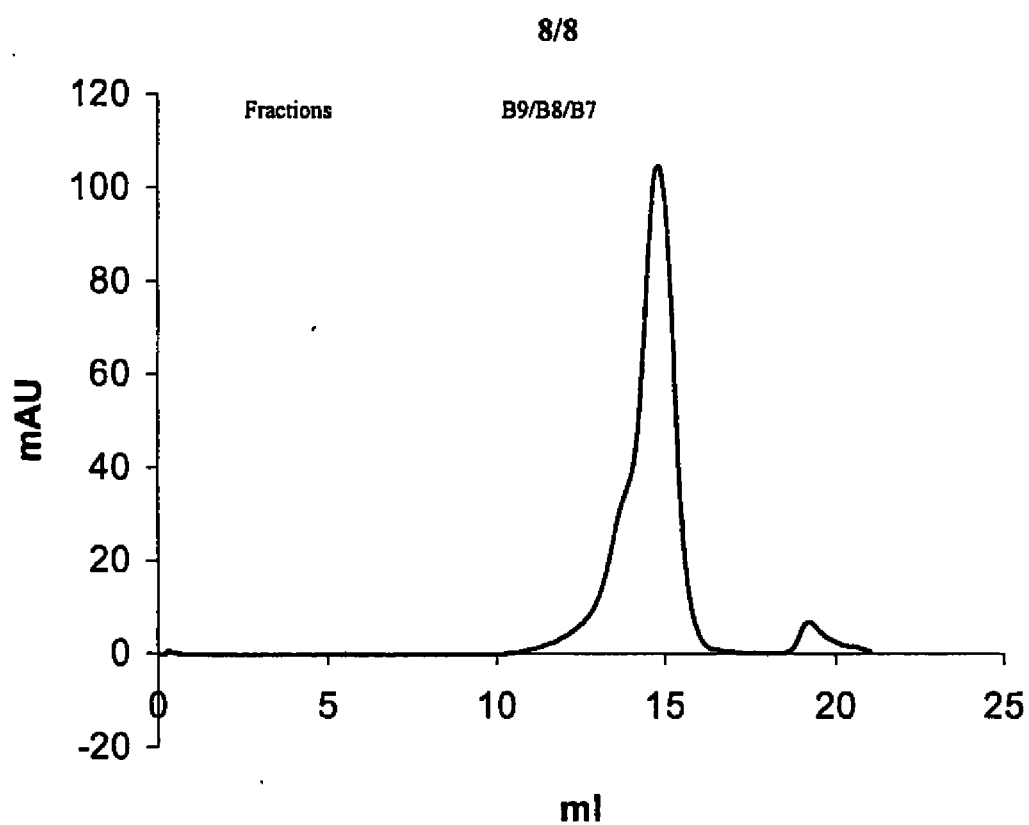


Figure 10

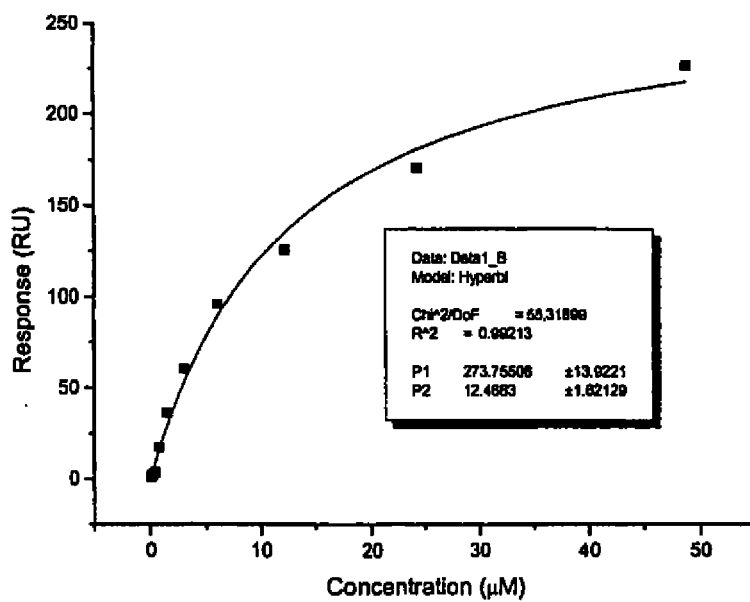


Figure 11