



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월29일

(11) 등록번호 10-2379955

(24) 등록일자 2022년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7018153

(22) 출원일자(국제) 2017년12월06일

심사청구일자 2019년06월24일

(85) 번역문제출일자 2019년06월24일

(65) 공개번호 10-2019-0084316

(43) 공개일자 2019년07월16일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/081745

(87) 국제공개번호 WO 2018/104407

국제공개일자 2018년06월14일

(30) 우선권주장

10 2016 123 893.7 2016년12월08일 독일(DE)

62/497,895 2016년12월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

PLoS Computational Biology, Vol. 11, No. 7,
e1004244 (2015. 7. 17.)*

국제공개공보 WO2014/083173(2014.06.05.)*

J. Biol. Chem., Vol.290, No.48,
pp.29106-29119(2015. 11. 27.)

WO2014083173 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이메텍스 바이오테크놀로지스 게엠베하

독일 72076 투빈겐 파울-울리히-스트라쎄 15

(72) 발명자

봉크 세바스티안

독일 72074 튀빙겐 게르트루트-보이머-스트라쎄
19/1

마우러 도미니크

독일 72116 뢰싱겐 플라이네르베크 7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 허주형

(54) 발명의 명칭 **짜짓기가 향상된 T 세포 수용체**

(57) 요약

본 발명은 변형된 T 세포 수용체(TCR) α 또는 β 사슬, 또는 이를 포함하는 이중이합체에 관한 것으로서, 상기 변형된 α 또는 β 사슬의 가변 도메인에서 IMGT 번호매김에 따른 위치 44의 아미노산이 원하는 사슬의 짜짓기를 향상시키기 위해 또 다른 적절한 아미노산으로 치환된다.

대표도 - 도1a

	TRBV: 인간	TRBV6-5		TRAV: 인간	TRAV6-6					
FR1-BMGT	1	1	asn	N	1	0	arg	ALA	A	
	2	2	gln	ALA	A	2	1	cys	GLN	Q
	3	3	gln	GLY	G	3	2	thr	SER	S
	4	4	gln	VAL	V	4	3	gln	VAL	V
	5	5	asn	THR	T	5	4	asn	THR	T
	6	6	cys	GLN	Q	6	5	cys	GLN	Q
	7	7	asn	THR	T	7	6	cys	LEU	L
	8	8	asn	PRO	P	8	7	gln	ASP	D
	9	9	asn	LYS	K	9	8	arg	SER	S
	10	10	thr	PRO	P	10	9	asn	GLN	Q
	11	11	cys	GLN	Q	11	10	gln	VAL	V
	12	12	gln	VAL	V	12	11	asn	PRO	P
	13	13	cys	LEU	L	13	12	gln	VAL	V
	14	14	asn	LYS	K	14	13	thr	PRO	P
	15	15	asn	THR	T	15	14	gln	GLU	E
	16	16	gln	GLY	G	16	15	gln	GLU	E
	17	17	cys	GLN	Q	17	16	gln	ALA	A
	18	18	arg	SER	S	18	17	asn	PRO	P
	19	19	asn	MET	M	19	18	gln	VAL	V
	20	20	asn	THR	T	20	19	gln	GLU	E
	21	21	cys	LEU	L	21	20	cys	LEU	L
	22	22	cys	GLN	Q	22	21	arg	ARG	R
	23	23	gln	CYS	C	23	22	gln	CYS	C
	24	24	gln	ALA	A	24	23	asn	ASN	N
	25	25	cys	GLN	Q	25	24	asn	TYR	Y
	26	26	gln	ASP	D	26	25	asn	SER	S
	27	27	asn	MET	M	27	26	gln	SER	S
	28	28	asn	ASN	N	28	27	thr	SER	S
	29	29	asn	HIS	H	29	28	gln	VAL	V
	30	30	gln	GLU	E	30	29	asn	SER	S
	31	31	asn	TYR	Y	31	30	gln	VAL	V
	32	32	asn	TYR	Y	32	31	asn	TYR	Y
	33	33	-	-	-	33	-	-	-	-
	34	34	-	-	-	34	-	-	-	-
	35	35	-	-	-	35	-	-	-	-
	36	36	-	-	-	36	-	-	-	-
	37	37	-	-	-	37	-	-	-	-
	38	38	-	-	-	38	-	-	-	-

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

프리제 옌스

독일 72144 두슬링겐 래르헨베크 11

바그너 클라우디아

독일 72074 튀빙겐 뉘르팅거 스트라세 32

알텐 레오니

독일 72076 튀빙겐 바이스도른베크 14 아파르터망
161

호프가르트 프란치스카

독일 72070 튀빙겐 슈바르츠로허 스트라세 64

페르버 마티아스

프랑스 75010 파리 뒤편 드 파라디 1

명세서

청구범위

청구항 1

변형된 α 사슬 및 변형된 β 사슬, 또는 그 단편 또는 유도체를 포함하는 재조합 T 세포 수용체 (TCR) 이중이합체로서,

(i) 상기 TCR은 항원-주조직 적합 복합체(MHC)에 결합하는 능력을 유지하고,

(ii) 상기 α 및 β 사슬의 변형이 α Q44R / β Q44D; α Q44D / β Q44K; 및 α Q44K / β Q44D로 구성되는 군으로부터 선택되는 위치 44의 치환에서 선택되고,

(iii) 상기 TCR의 α 사슬이 서열 식별 번호 1 또는 3의 서열의 구조를 영역을 포함하는 가변 도메인 서열을 포함하고, 상기 TCR의 β 사슬이 서열 식별 번호 2 또는 4의 서열의 구조를 영역을 포함하는 가변 도메인 서열을 포함하는,

재조합 TCR 이중이합체.

청구항 2

제1항에 따른 재조합 TCR 이중이합체를 인코딩하는 핵산 분자의 하나 이상을 포함하는 플라스미드 또는 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 따른 재조합 TCR 이중이합체를 인코딩하는 핵산 분자의 하나 이상 또는 상기 핵산 분자의 하나 이상을 포함하는 플라스미드 또는 발현 벡터를 사용하여, 시험대상자로부터 얻은 T 세포를 형질도입 또는 형질주입시키는 것을 포함하는, 변형된 T 세포의 준비 방법.

청구항 4

제3항의 방법에 따라 생성된 변형된 T 세포.

청구항 5

제4항에 있어서,

자가 T 세포 치료를 필요로 하는 시험대상자에 대한 이러한 치료에서의 사용을 위한, 변형된 T 세포.

청구항 6

제4항에 있어서,

종양성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환을 앓거나 이의 발병 위험이 있거나 이를 진단받은, 치료를 필요로 하는 시험대상자에게 상기 변형된 T 세포를 포함하는 제제를 투여하는 것을 포함하는 상기 시험대상자의 치료에서의 사용을 위한, 변형된 T 세포.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 TCR이 MHC에 의해 제시된 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 항원이 종양 연관 항원(TAA)의 에피토프로부터 선택되는, 재조합 TCR 이중이합체.

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 변형된 T 세포 수용체(TCR) 알파(α) 또는 베타(β) 사슬 또는 이를 포함하는 이중이합체에 관한 것으로서, 상기 변형된 α 또는 β 사슬의 가변 도메인에서 IMGT 번호매김에 따른 위치 44의 아미노산이 원하는 사슬과의 짝짓기를 향상시키기 위해 또 다른 적절한 아미노산으로 치환된다.

배경 기술

- [0002] 적응성 면역 체계는 항체, B 세포 그리고 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포로 구성된다. 이것들은 특정 면역원성 표적에 대해 고도로 특이적인 반응을 가능하게 한다. T 세포 수용체(TCR)는 이황화물로 연결된 막 고정된 이중이합체 단백질이며, 정상적으로 T 세포의 표면에 불변 $CD3$ 사슬 분자가 있는 복합체의 일부로서 발현되는 고도의 가변 α 및 β 사슬로 구성된다. TCR 이중이합체의 형성의 과정에서 중요한 한 단계를 "짝짓기"로 부른다. 짝지어진 수용체를 발현하는 T 세포를 $\alpha:\beta$ (또는 $\alpha\beta$) T 세포라고 부르지만, 소수의 T 세포가 $\gamma\delta$ T 세포로 부르는 가변 감마(γ) 및 델타(δ) 사슬에 의해 형성되는 교대 수용체를 발현한다.
- [0003] TCR은 T 세포의 표면에 위치하며, 항원 수용체 분자로서 항원 제시 세포(APC)의 표면에 있는 구조적 적합 복합체(MHC)에 의해 T 세포에 대해 제시되고 적절히 처리된 항원의 인식에 대한 책임이 있으므로 T 세포의 활성화 및 항원에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0004] TCR의 각 사슬은 두 개의 세포의 도메인으로 구성된다. 가변(V) 영역 및 불변(C) 영역 모두 역평행 β 시트를 형성하는 면역글로불린 상위계열(IgSF)에 속한다. 불변 영역은 세포 막의 근위에 위치하며, 막횡단 영역과 짧은 세포질 꼬리가 그 뒤를 따르는 반면, 가변 영역은 항원 제시 세포의 펩티드/MHC 복합체에 결합한다.
- [0005] TCR α 사슬 및 β 사슬 모두의 가변 도메인 각각에 세 개의 과가변 또는 상보성 결정 영역(CDR)이 있으며, 이것은 항원 결합 부위를 형성한다. β 사슬의 가변 영역은 소위 과가변(HV4)이라는 추가의 영역을 가지며 이것은 정상적으로 항원에 접촉하지 않으므로 CDR로 간주되지 않는다. 중요하게는 두 사슬의 CDR 1 및 2는 배자계열 인

코딩된 반면 CDR3 α 및 β 는 대개 비템플릿 인코딩의 체세포 재조합에 의해 생성된다(Davis & Bjorkman 1988). 인간에서 TCR 분자의 다양성은, 합침으로써 CDR3 길이 및 서열의 최종 다양성을 성취하는 47개 V α 및 54개 V β 서열로 구성되는 조합의 $\alpha\beta$ 짝짓기에 의해 성취된다.

- [0006] α 사슬의 CDR1 또한 항원성 펩티드의 N-말단 부분과 상호작용하는 것으로 나타났지만 CDR3이 상기 처리된 항원의 인식을 맡은 주 CDR이고, β 사슬의 CDR1은 상기 펩티드의 C-말단 부분과 가끔씩만 상호작용한다(Cole et al., 2009).
- [0007] CDR2는 대부분 MHC를 인식하는 것으로 생각된다. β 사슬의 HV4 영역은 항원 인식에 참여하는 것으로 생각되지 않으며 소위 초항원과 상호작용하는 것으로 나타났다(Li et al., 1998). 대부분 MHC에 결합하는 CDR1 및 CDR2 그리고 항원성 펩티드에 결합하는 CDR3의 일상적으로 수용되는 인식 체계에도 불구하고, 일부 연구에서는 모든 CDR 영역들이 가끔 항원과 MHC 모두와 상호작용할 수 있음을 밝혀 TCR에 의한 항원 인식의 진정한 복잡성을 드러냈다(Burrows et al., 2010, Roomp et al., 2011).
- [0008] 입양 전달 접근방식이 암 요법의 기전을 사용하기 위해 개발되었으며(Rosenberg et al., 1988), 이로써 종양 특이적 T 세포 수용체(TCR)의 α 및 β 사슬을 인코딩하는 유전자가 형질도입된 T 세포가 환자에서 항종양 면역성을 매개한다. 최근에 이 접근방식이 많은 관심의 중심이 되고 있다. 한 전략으로서, TCR 유전자 요법에서 환자에게 자가 T 세포를 공급하며, 이 세포는 유전자삽입 TCR 사슬으로써 유전적으로 조작된다. 이 기법은 암과 종양의 치료에 대한 유망한 접근방식을 제공한다. 이를 위해서, 특이적 항원-MHC 복합체를 검출/결합하는 TCR α 및 β 사슬이 환자에서 채취한 야생형 T 세포로 클로닝된다. 그 다음 유전자삽입 T 세포가 시험관 내 증식되며, 예를 들어 종양에 대한 면역 반응을 제공하기 위해 증식된 세포를 다시 환자에게 돌려준다.
- [0009] 실질적으로, 이에 따라 생산된 유전자삽입 T 세포가 야생형 α 및 β 사슬을 가진 야생형 TCR 그리고 해당되는 재조합 항원-MHC 복합체에 특이적인 α 및 β 사슬을 가진 유전자 삽입 TCR 모두를 발현한다. 야생형 α 및 β 사슬 그리고 유전자삽입 α 및 β 사슬 모두 대개는 여전히 서로 교차 짝짓기가 가능하다(Shao et al., 2010). 이러한 바람직하지 않은 가능성을 "TCR 틀린 짝짓기"라고 하며, TCR(유전자) 요법의 분야에서 문제로 인식된다.
- [0010] 유전자삽입 TCR α 또는 β 사슬과 내인성 TCR β 또는 α 사슬 사이의 틀린 짝짓기와 잘못된 짝짓기는 TCR $\alpha\beta$ 이질이합체의 표면 발현 감소를 초래하며, 이는 또한 변형된 T 세포의 기능적 결합성을 감소시킨다. 더욱이 높은 IL-2 조건하에서 팽창되고 짝짓기가 틀린 TCR을 발현하는 T 세포가 전임상 모형에서 이식편대 숙주 질환(GvHD)을 유도하는 것으로 나타났다(Bendle et al., 2009).
- [0011] 치료용 T 세포의 기능적 결합성 강화를 위해서 유전자삽입 TCR α 및 β 짝짓기의 최적화를 위한 일부 전략들이 논의되었으며, 한 예가 Govers et al.(2010)이다.
- [0012] 이러한 가능성 가운데 틀린 짝짓기를 피할 전략은 다음과 같다:
- [0013] 1. 귀과화 TCR: 이 접근방식에서는, 인간 TCR α 및 β 불변 사슬이 상응하는 귀과 도메인에 의해 대체된다. 인간 및 쥐의 TCR-C 도메인은 높은 수준의 상동성을 보이지만, 작은 차이가 TCR/CD3 상호작용의 안정성에 영향을 미치며 따라서 TCR 표면 발현 수준에 영향을 미친다.
- [0014] 2. 시스테인 변형 TCR: 이 접근방식에서는 구조적으로 유리한 위치에서 시스테인 아미노산을 도입하며, 따라서 추가의 이황화 다리의 형성을 허용하고 두 TCR 사슬 간의 올바른 짝짓기를 촉진시킨다. 예를 들어 TCR α 불변 사슬의 T48C 및 TCR β 불변 사슬의 S57C의 특정 부위 돌연변이가 두 개의 사슬간 결합에 의해 연결된 TCR 이중이합체를 초래했다(즉, 도입된 이황화 다리 및 내인성 막횡단 이황화 다리(α 불변 도메인에서 위치 번호 95 그리고 β 불변 도메인에서 위치 번호 131)).
- [0015] 3. 도메인 교환: 불변 도메인이 종양 특이적 T 세포 수용체의 α 사슬과 β 사슬 사이에 교환되며, 이에 따라 도메인 교환된(ds)TCR을 생성한다. 올바르게 짝짓기될 때, 이 dsTCR 사슬은 CD3 단백질의 모집, T 세포 표면상의 발현, 및 표적 항원과의 참여 시 기능적 T 세포 반응의 매개에 필요한 모든 도메인을 보유한다. 이와 반대로, dsTCR 사슬 하나와 야생형 TCR 사슬 하나를 포함하는 짝짓기가 틀린 TCR은 CD3 모집, 내보내기, 및 신호전달에 필요한 주요 도메인이 결핍되므로 해로운 자가면역의 매개가 불가능하다.
- [0016] 4. 배타적 TCR 이중이합체: 이 접근방식에서는, 입체적 및 정전기적 힘을 이용하여 TCR α 도입유전자와 β 도입유전자 사이의 올바른 짝짓기를 원활하게 하며 동시에 외인성 및 내인성 TCR α 사슬과 β 사슬 사이의 짝짓기를 억제한다. 한 예에서 요구되는 정전기 전하의 변화를 획득하고 그에 따라 상호 늑-인투-홀(knob-into-hole) 구성을 생성하기 위해(이것은 이차 및 삼차 구조를 최소한 왜곡시킨다고 주장), S85R를 α 불변 도메인에

그리고 R88G를 β 불변 도메인에 도입하는 특정 부위 돌연변이가 사용된다.

- [0017] 5. 각 TCR 사슬이 CD3 ζ 분자에 융합된 키메릭 TCR-CD3 ζ 사슬의 사용.
- [0018] 6. 유연한 펩티드 링커를 사용하여 정의된 TCR의 V α 가 β 사슬에 융합된 단쇄 TCR의 사용.
- [0019] 7. 내인성 TCR의 발현을 녹다운시키기 위해 shRNA 서열 또는 아연 핑거 뉴클레아제의 사용.
- [0020] 또 다른 접근방식이 O'Shea et al.(1993)에 의해 제안되었으며, 이종이합체 상태에서의 유리한 정전기 상호작용으로 인하여 서로 짝지을 수 있었던 "벨크로"라 부르는 한 쌍의 펩티드를 설계했다. 이 저자들은 두 펩티드가 격리된 형태로 현저히 접하지 않았으며, 혼합될 때 우선적으로 관여하여 안정한 평행의 나선 코일 이종이합체가 형성됨을 보여주었다. 이 접근방식은 또한 용해성 TCR의 생성을 위해 Chang et al.(1994)에 의해 적용되었으며, 펩티드를 절단된 α 및 β 사슬에 각각 융합할 때 이종이합체 복합체가 선호되었다.
- [0021] WO 2014/153470 A2에서는 표적화된 과열에 의해 TCR 유전자를 변형하기 위해 뉴클레아제(아연 핑거 뉴클레아제 또는 TAL 뉴클레아제)를 사용함으로써 TCR 유전자를 변형하는 방법 및 조성물을 공개한다.
- [0022] WO 2014/083173은 면역 요법, 구체적으로 입양 T 세포 이전에서 유해 반응의 위험 감소를 제공하는 신규 T 세포 수용체의 생성 방법에 관한 것이다.
- [0023] WO 2016/071343 A1은 입양 세포 요법(ACT), 특히 T 림프구의 이전에서 변형된 T 세포 수용체(TCR) 및 그 사용에 관한 것이다. TCR은 올바른 TCR 사슬 짝짓기를 선호하는 돌연변이를 갖는 α 및 β 사슬의 막형단 영역에서 돌연변이된다.
- [0024] 위의 접근방식들은 유망하지만, 외인성 TCR의 적합한 발현 등 몇몇 장애물에 의해 그 임상적 영향이 방해받았다. 불충분한 임상적 반응은 여전히 다수의 문제가 해결되어야 함을 나타낸다. T 세포의 기능적 결합성이 TCR 친화성 및 발현되는 TCR 분자 수 둘다에 의해 주로 결정되므로, 두 가지 중요한 접근방식을 사용하여 TCR 조작 세포에서 이러한 생물물리학적 물성을 향상시키는 데 많은 노력을 투입했다. (a) TCR 친화성 향상 및 (b) TCR 발현 강화. TCR 친화성의 향상을 위해, 고친화성 수용체의 선택이나 돌연변이에 의해 이전된 수용체의 친화성 강화를 위해 시도했다. 대안적으로, 형질전환된 세포의 표면에서 TCR 숫자를 증가시키기 위해 다양한 접근방식이 고안되었다. 여기에는 발현 벡터의 제작, 코돈 최적화 TCR 서열의 사용, 글리코실화 부위의 제거, 및 도입된 TCR 사슬의 짝짓기 향상이 포함된다.
- [0025] 그러므로 TCR의 틀린 짝짓기를 효과적으로 회피하기 위한 접근방식을 제공할 필요가 여전히 존재한다. 이러한 추가의 접근방식은 도입이 쉬우며 짝짓기가 틀린 TCR 이종이합체의 발생률을 효율적으로 감소시켜야 하는 반면, 올바르게 짝짓기된 TCR 이종이합체, 즉 각각 변형된 T 세포에서 유전자삽입 α 및 β 사슬 쌍의 풍부함을 증가시켜야 한다. 또한 TCR 사슬 및 숙주 T 세포에 대한 최소한의 조작을 요구하는 방법이 바람직할 것이다.

발명의 내용

- [0026] 이 목적과 추가의 목적들은 본 발명에 따른 방법 및 수단에 의해 해결된다.
- [0027] 본 발명의 첫 양태에 따라, 항원-MHC 복합체에 결합하는 능력을 유지하는 변형된 T 세포 수용체(TCR) α 또는 β 사슬, 또는 그 단편 또는 유도체가 제공되며, 상기 변형된 α 또는 β 사슬의 가변 영역에서, Q 또는 IMGT 번호매김에 따른 위치 44에 있는 다른 모든 아미노산이 또 다른 적절한 아미노산으로 치환된다. 다음에도 나와 있는 바와 같이, 적절한 아미노산이 변형된 대로 TCR α 및 β 사슬의 짝짓기 특이성을 유지하는 반면, 바람직하지 않은 α 또는 β 사슬, 예를 들어 변형되지 않은 사슬과의 짝짓기를 감소시킨다.
- [0028] 위치 44는 FR2 영역에 위치하기 때문에, 이것은 TCR 결합 부위의 표적과 직접 접촉하지 않는 것으로 알려져 있다. 그러므로 위치 44에서의 치환이 특정한 표적 에피통 인식에 중대하지 않고/않거나 이를 방해하지 않을 것이라고 가정한다.
- [0029] 본 발명에 따른 아미노산은 생명체에서 사용되는 20가지 α -아미노산(L-아미노산)으로부터 선택이 가능하다. "적절한" 아미노산에는 이 아미노산들(즉, 생명체에서 사용되는 20가지 α -아미노산 및 L-아미노산) 그리고 "특별한" 아미노산(예: β -아미노산 또는 D-아미노산) 또는 변형된 아미노산이 포함되어야 한다. 바람직하기로는 생명체에서 사용되는 20가지 α -아미노산이다.
- [0030] TCR α 사슬 및 β 사슬에서 아미노산 잔기들의 번호매김은 IMGT 표준에 따른 것으로 이는 Lefranc et al.(2001)에 공개되어 있다. IMGT 표준이란 TCR α 및 β 가변 사슬을 포함하여 면역글로불린 분자에서 아미노

산 잔기에 모호하지 않은 번호를 지정하는 보편적인 규칙의 체계이다. IMGT 번호매김(굵은 글꼴)과 Kabat 번호매김의 비교는 도 1a ~ 도 1c를 참조한다. 도 1b에서, α 사슬(TRAV) 및 β 사슬(TRBV)의 Q44는 회색으로 표시되어 있다. IMGT 표준에 따른 번호매김이 도 1a ~ 도 1c에서 볼 수 있는 바와 같은 특히 CDR 서열의 공백으로 인하여 TCR 가변 도메인의 주어진 아미노산 서열에 대한 정통(naive) 번호매김으로부터 이탈할 수 있다.

- [0031] IMGT 번호매김에 따른 Q44는 구조를 2(FR2) 영역에서 고도로 보존되는 잔기이며, TRAV2, TRAV24, TRAV29/DV5 및 TRAV40을 제외한 거의 모든 TCR α 사슬에 의해 공유되고 또한 TRBV14를 제외한 모든 TCR β 유전자에 의해 공유된다(Lefranc et al., 2001, Strong et al., 1999). 더욱이 Q44는 매우 흔히 WYXQ를 포함하는 4 AA 모티프의 일부이며, 여기서 X는 예를 들어 R, V, K 또는 Q이다(Lefranc et al., 2001).
- [0032] Knies et al.(2016)에 의하면 벌크 내인성 TCR α/β -양성 T 세포를 위한 안전한 입양 면역요법을 성취하기 위해 최적화된 단일 사슬 TCR(scTCR)이 잔존하는 TCR 틀린 짝짓기를 억제한다고 기술하고 있다. 잔존하는 틀린 짝짓기의 방지는 V α -도메인과 3-도메인 scTCR에서 V β 에 밀접한 링커의 3'-꼬리 사이에 설계된 새로운 인공 이황화물 결합에 의해 성취되었다.
- [0033] Hoffmann et al.(2015)은 V α /V β 상대적 각도 및 유연성에 중점을 두는 결합 및 비결합 TCR 분자의 구조적 특성에 대한 체계적 생물정보학 분석을 기술하고 있다. 그 결과는 몇 가지의 뚜렷한 V α /V β 각도 기반 구조적 클러스터들의 관찰이 가능하며 결합 TCR보다 비결합 TCR에 대한 더 커다란 각도 유연성이 존재하므로 이러한 신호 전달의 각도의 중요성을 잘 보여주었다. 고유한 회전의 중심이 확인되었으며 이 점 주위의 핵심 영역이 V α 및 V β 모두의 위치 44에 매우 근접한 V α 도메인과 V β 도메인 사이의 중앙에 위치한다.
- [0034] 본 발명의 맥락 상 치환은 예를 들어, 인코딩 DNA 또는 cDNA의 특정 부위 돌연변이유발 또는 무작위 돌연변이유발과 같은 단백질 돌연변이유발, 또는 CRISPR Cas, TALEN, ZFN, Argonaute(NgAgo) 또는 CRISPR Cpf1과 같은 게놈 편집 기술의 표준 방법에 의해 생성이 가능하다. 더욱이 이러한 치환은 단순히 인코딩 유전자, cDNA 또는 mRNA의 합성에 의해 실행될 수 있다. 요즈음 서비스 제공자는 주어진 서열의 핵산 합성을 제공한다.
- [0035] 부위 특이적 아미노산 치환을 유도하는 무작위 돌연변이유발 또는 특정 부위 돌연변이유발의 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며 예를 들어 Labrou et al.(2010)과 Trehan et al.(2016)에 공개되어 있다.
- [0036] 주어진 아미노산 서열을 변형시키는 게놈 편집의 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며(예: CRISPR Cas, TALEN, ZFN, Argonaute(NgAgo) 또는 CRISPR Cpf1), 예를 들어 Maeder 및 Gersbach(2016)에 공개되어 있다. 유전자 합성의 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며 예를 들어 Hughes et al.(2011)에 공개되어 있다. 이러한 참조문헌의 공개는 여기에 전문이 참조문헌으로 포함된 것으로 간주해야 한다.
- [0037] 위에서 논의한 바와 같이, 일부 선행 기술의 방법에서는 쥐과의 불변 도메인의 도입에 의한 TCR α 및/또는 β 사슬의 변형을 제안한다. 이 접근방식은 비인간 서열에 기인하는 면역원성의 증가에 따른 위험이 있으며, 이것은 본 발명의 방법 및 생성물에 의해 회피된다.
- [0038] 더욱이 본 발명자들은 위치 44 치환이 표적 펩티드와의 결합에 대해 중간 정도의 영향을 가질 수 있음(즉, 표적 항원/MHC 복합체에 대한 친화성)을 보여주며, 이것은 α 및 β 가변 도메인의 3차 구조에서 Q44가 CDR에 의해 형성되는 영역으로부터 최대로 원위에 위치함으로 인한 것으로 보인다.
- [0039] 한 실시양태에 따르면, 변형된 α 사슬 및 β 사슬은 확인되고/되거나 분리된 각각의 변형되지 않은 수용체와 비교해서 자신의 불변 도메인에서 및/또는 자신의 막횡단 도메인에서 어떠한 치환도 갖고 있지 않다. 불변 도메인은 TCR α 사슬과 β 사슬 사이에 크며 고도로 보존된 경계면을 함유하기 때문에, 가변 도메인에서의 위치 대체와 비교해서 짝짓기 거동, 안정성 및 면역원성의 측면에서 약간의 변형이라도 그 영향을 피하는 것이 어려울 것이다.
- [0040] 한 실시양태에 따르면, 위치 44 치환을 가진 α 사슬이 가변 도메인에서 위치 44가 적절한 아미노산에 의해 치환되는 T 세포 수용체(TCR) β 사슬과 바람직하게 짝짓는다. 마찬가지로 또 다른 실시양태에서, 위치 44 치환을 가진 β 사슬이 위치 44가 적절한 아미노산에 의해 치환되는 가변 도메인에서 T 세포 수용체(TCR) α 사슬과 바람직하게 짝짓는다.
- [0041] 그러므로 청구된 치환을 지닌 제2의 이종 또는 유전자삽입 TCR을 발현하도록 변형된 T 세포에서, 유전자삽입 α 사슬과 내인성 β 사슬 또는 그 반대의 틀린 짝짓기가 감소되거나 심지어는 회피된다.
- [0042] 그러한 방식으로 올바르게 짝지어진 유전자삽입 TCR α/β 이종이합체의 풍부함 증가가 성취될 수 있으며, 이것은 변형된 T 세포의 전체 결합성을 향상시키고 이식편대 숙주 질환의 유도와 같은 이상반응을 피한다(Bendle et

al, 2009).

- [0043] 상기 재조합 T 세포 수용체(TCR)의 한 실시양태에 따르면, 적어도 α 또는 β 사슬에서 가변 도메인의 위치 44에 존재하는 아미노산이 Q, R, D, E, K, L, W 및 V로 구성되는 군으로부터 선택된 하나의 아미노산에 의해 치환된다.
- [0044] 추가적인 한 실시양태에 따르면, α 사슬이 서열 식별 번호 1 또는 3에 대해 95%의 서열 동일성을 공유하는(갖는) 서열의 적어도 구조를 영역을 포함하는 가변 도메인 서열을 가지되 Q 또는 그 가변 도메인의 위치 44에서 발생하는 다른 모든 아미노산이 여기서 공개된 또 다른 적절한 아미노산에 의해 치환되거나, β 사슬이 서열 식별 번호 2 또는 4에 대해 적어도 95%의 동일성을 공유하는(갖는) 서열의 구조를 영역을 포함하는 가변 도메인 서열을 가지되 Q 또는 그 가변 도메인의 위치 44에서 발생하는 다른 모든 아미노산이 여기서 공개된 또 다른 적절한 아미노산에 의해 치환된다.
- [0045] 바람직하게, 상기 α 또는 β 사슬이 각각 서열 식별 번호 1 또는 3 또는 서열 식별 번호 2 또는 4에 대해 적어도 96%, 더 바람직하게는 적어도 97%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 98%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 99% 또는 가장 바람직하게는 100%의 서열 동일성을 공유하는(갖는) 적어도 구조를 포함하는 가변 도메인 서열을 갖는다.
- [0046] 서열 식별 번호 1은 TCR R7P1D5(TRA5라고도 알려져 있음, Lefranc et al., 2001)의 TCR α 사슬 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다. 서열 식별 번호 2는 R7P1D5(TRBV12-4라고도 알려져 있음, Lefranc et al., 2001)의 TCR β 사슬 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다. R7P1D5가 미국 비정규 출원 62/308,944에 공개되어 있으며, 그 내용이 여기에 참조문헌으로 포함되어 있다. R7P1D5는 예를 들어 항원 제시 세포의 MHC에 결합 시 "MAG-003"으로 부르는 펩티드에 결합한다. MAG-003은 다음의 일반 공식 I에 따른 아미노산 서열을 포함한다:
- [0047] $X_1X_2LEHVVRX_3$
- [0048] 상기 식에서,
- [0049] X_1 은 아미노산 K 및 Y로부터 선택되며,
- [0050] X_2 는 아미노산 V, L 및 A로부터 선택되고,
- [0051] X_3 은 V, L, A 및 I로부터 선택된다.
- [0052] 서열 식별 번호 3이 TCR α 사슬의 가변 도메인 TRAV 8-6의 아미노산 서열을 보여준다(Lefranc et al., 2001). 서열 식별 번호 4가 TCR β 사슬의 가변 도메인 TRBV 6-5의 아미노산 서열을 보여준다(Lefranc et al., 2001).
- [0053] 도 1 및 도 3에서, 서열이 IMGT 번호매김으로 표시되는데, 이것은 서열 목록에서 해당 서열의 정통 번호매김으로부터 이탈한 것임에 유의한다. 도 3에서 구부러진 밑줄은 IMGT 번호매김에서 간주되는 공백을 나타내며, 이것은 아미노산 잔기가 차지하지 않는다. Q44는 첨부된 서열 목록으로부터 유도될 수 있는 번호매김을 지칭하는 것이 아니라 도 1 및 도 3에서와 같이 IMGT 번호매김을 지칭하는 것으로 이해해야 한다.
- [0054] α 및 β 사슬(TRA5 및 TRBV12-4)을 갖는 R7P1D5 그리고 TRAV 8-6 및 TRBV 6-5가 본 발명의 맥락에서 사용이 가능한 단 네 개의 TCR 가변 도메인의 예이다. 다른 TRAV 및 TRBV 하위군들은 IMGT 웹사이트에 나와 있다. TRAV 및 TRBV가 특히 CDR 서열의 적절한 적응에 의해 다른 표적 에피토프/MHC 복합체에 대한 특이성을 채택할 수 있음에 유의한다.
- [0055] 또한 위에서 언급된 서열들의 신호 서열 없이 나와 있으며, 때때로 그 서열 데이터베이스가 약간 이탈하는 서열을 보여주는 것에 유의한다. 예를 들면, Uniprot 데이터베이스에서 TRAV8-6에는 서열 식별 번호 3 그리고 도 1에 나타난 N-말단 A가 결여된 반면, TRBV6-5에는 서열 식별 번호 4 그리고 도 1에 나타난 N-말단 N 및 A가 결여되어 있다.
- [0056] 본 발명의 재조합 T 세포 수용체(TCR) 이중이합체의 또 다른 실시양태에 따르면, TCR은 다음 목록에서 선택된 바람직한 치환 쌍들의 하나를 포함한다:
- [0057] α Q44D / β Q44R; α Q44R / β Q44D; α Q44E / β Q44K; α Q44K / β Q44E; α Q44D / β Q44K; α Q44K / β Q44D; α Q44E / β Q44R; α Q44R / β Q44E; α Q44L / β Q44W; α Q44W / β Q44L; α Q44V / β Q44W; 및 α Q44W / β Q44V;
- [0058] α W44D / β Q44R; α W44R / β Q44D; α W44E / β Q44K; α W44K / β Q44E; α W44D / β Q44K; α W44K / β Q44D;

α W44E / β Q44R; α W44R / β Q44E; α W44L / β Q44W; α W44 / β Q44L; α W44V / β Q44W; 및 α W44 / β Q44V;

[0059] α H44D / β Q44R; α H44R / β Q44D; α H44E / β Q44K; α H44K / β Q44E; α H44D / β Q44K; α H44K / β Q44D; α H44E / β Q44R; α H44R / β Q44E; α H44L / β Q44W; α H44W / β Q44L; α H44V / β Q44W; 및 α H44W / β Q44V;

[0060] α K44D / β Q44R; α K44R / β Q44D; α K44E / β Q44K; α K44 / β Q44E; α K44D / β Q44K; α K44 / β Q44D; α K44E / β Q44R; α K44R / β Q44E; α K44L / β Q44W; α K44W / β Q44L; α K44V / β Q44W; 및 α K44W / β Q44V;

[0061] α E44D / β Q44R; α E44R / β Q44D; α E44 / β Q44K; α E44K / β Q44E; α E44D / β Q44K; α E44K / β Q44D; α E44 / β Q44R; α E44R / β Q44E; α E44L / β Q44W; α E44W / β Q44L; α E44V / β Q44W; 및 α E44W / β Q44V;

[0062] α Q44D / β R44; α Q44R / β R44D; α Q44E / β R44K; α Q44K / β R44E; α Q44D / β R44K; α Q44K / β R44D; α Q44E / β R44; α Q44R / β R44E; α Q44L / β R44W; α Q44W / β R44L; α Q44V / β R44W; 및 α Q44W / β R44V;

[0063] α W44D / β R44; α W44R / β R44D; α W44E / β R44K; α W44K / β R44E; α W44D / β R44K; α W44K / β R44D; α W44E / β R44; α W44R / β R44E; α W44L / β R44W; α W44 / β R44L; α W44V / β R44W; 및 α W44 / β R44V;

[0064] α H44D / β R44; α H44R / β R44D; α H44E / β R44K; α H44K / β R44E; α H44D / β R44K; α H44K / β R44D; α H44E / β R44; α H44R / β R44E; α H44L / β R44W; α H44W / β R44L; α H44V / β R44W; 및 α H44W / β R44V;

[0065] α K44D / β R44; α K44R / β R44D; α K44E / β R44K; α K44 / β R44E; α K44D / β R44K; α K44 / β R44D; α K44E / β R44; α K44R / β R44E; α K44L / β R44W; α K44W / β R44L; α K44V / β R44W; 및 α K44W / β R44V;

[0066] α E44D / β R44; α E44R / β R44D; α E44 / β R44K; α E44K / β R44E; α E44D / β R44K; α E44K / β R44D; α E44R / β R44E; α E44L / β R44W; α E44W / β R44L; α E44V / β R44W; 및 α E44W / β R44V.

[0067] 위에서, 예를 들어 " α Q44R / β Q44D"는 예를 들면, α 사슬의 가변 도메인에서 Q44가 R에 의해 치환되는 반면 β 사슬의 가변 도메인에서 Q44가 D에 의해 치환되는 것을 의미한다.

[0068] 상기 재조합 T 세포 수용체(TCR) 이중이합체의 바람직한 실시양태에 따르면,

[0069] a) 가변 도메인에서 위치 44에 Q 또는 다른 모든 적절한 아미노산을 가진 비변형 β 사슬과 비교하여 변형된 α 사슬이 바람직하게는 변형된 β 사슬과 짝짓기하고/하거나,

[0070] b) 가변 도메인에서 위치 44에 Q 또는 다른 모든 적절한 아미노산을 가진 비변형 β 사슬과 비교하여 변형된 α 사슬이 바람직하게는 변형된 β 사슬과 짝짓기한다.

[0071] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 위의 기술에 따른 변형된 T 세포(TCR) α 또는 β 사슬을 인코딩하는 핵산 분자 및/또는 위의 기술에 따른 재조합 T 세포 수용체(TCR) 이중이합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 상기 하나 이상의 인코딩 핵산 분자와 동작가능하게 연결된 촉진자, 및/또는 상기 하나 이상의 인코딩 핵산 분자와 동작가능하게 연결된 신호 서열 중 적어도 하나를 추가로 포함한다.

[0072] 이 신호 서열은 α 또는 β 사슬을 T 세포의 세포 표면으로 향하게 하는 신호를 인코딩하며, 이것은 α 및 β 사슬의 세포의 외부 표면에 표시된 상태에서 막횡단 도메인에 의해 고정된다. 다른 α 및 β 사슬 가변 도메인 아형에 대한 신호 서열이 당업계에 공개되어 있다.

[0073] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 위에 명시된 핵산 분자의 적어도 하나를 포함하는 플라즈미드 또는 벡터가 제공된다.

[0074] 한 실시양태에서, 상기 벡터가 바람직하게 바이러스 벡터이며, 바람직하게 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터이다. α 또는 β T 세포 수용체(TCR) 유전자를 바이러스 벡터를 지닌 T 세포로 형질도입하는 방법은 예를 들면 Pogulis 및 Pease(1998) 또는 Zong et al.(2010)에 공개되어 있다. 유전자를 인간 T 세포 안으로 이전하는 렌티바이러스 벡터의 사용은 Verhoeven et al.(2009)에 공개되어 있다.

[0075] 또 다른 한 실시양태에서, 상기 벡터는 피기백(piggyback) 또는 슬리핑 뷰티(sleeping beauty)와 같은 트랜스포존을 포함하며, 이것은 또한 해당되는 핵산을 T 세포 안으로 이전시킬 수 있다. T 세포의 유전적 공학을 위한

트랜스포존의 사용 방법은 예를 들어 Huang et al.(2008)에 공개되어 있다.

- [0076] 또 다른 실시양태에서는, T 세포가 예를 들어 전기천공의 수단에 의해 α 및 β 사슬을 인코딩하는 하나 이상의 RNA를 예를 들어 도입하는 수단에 의해 일시적으로 형질주입시킬 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어 Kim 및 Eberwine(2010)에 공개되어 있다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 변형된 T 세포의 준비 방법이 제공되며, 상기 방법은, 시험대상자로부터 T 세포의 획득 그리고 본 발명에 따른 하나 이상의 핵산 분자 또는 본 발명에 따른 플라스미드 또는 벡터를 사용한 상기 T 세포의 형질도입 또는 형질주입의 단계를 포함한다.
- [0078] 바람직한 실시양태에서, 상기 T 세포는 HLA 대립형질 음성 공여자로부터 획득된 것이다. 예를 들어, 변형된 T 세포가 HLA-A*02 혈청형 APC에 의해 제시되는 항원을 검출하는 것을 의미한다면, 변형되어야 하는 출처는 바람직하게 HLA-A*02 혈청형 음성 공여자로부터 획득된다. 그러한 방식으로 내인성 TCR과 표적 항원/MHC 복합체의 교차 반응성이 감소되거나 심지어 회피된다.
- [0079] 바람직하게, 이러한 방식으로 획득된 변형된 T 세포는 상기 시험대상자의 자가 T 세포 치료에 적합하다.
- [0080] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 기술에 따른 재조합 T 세포 수용체(TCR) 이중이합체의 α 및 β 사슬을 인코딩하는 핵산 조합을 지니는 변형된 T 세포가 제공된다.
- [0081] 다른 실시양태에서, 상기 세포는 상기 기술에 따른 방법에 의해 준비되었다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 비종양성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환을 앓거나 발병의 위험이 있고/있거나 이의 진단을 받은 환자의 치료를 위해 상기 기술에 따른 변형된 T 세포의 사용이 제공되며, 그 사용은 상기 변형된 T 세포를 포함하는 제제를, 이를 필요로 하는 환자에게 제공 또는 투여하는 것을 포함한다.
- [0083] 대안적으로, 상기 기술에 따른 변형된 T 세포를 사용하는 비종양성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환을 앓거나 발병의 위험이 있고/있거나 이의 진단을 받은 환자의 치료 방법이 제공되며, 그 방법은 상기 변형된 T 세포를 포함하는 제제를, 이를 필요로 하는 환자에게 제공 또는 투여하는 것을 포함한다.
- [0084] 이 맥락에서, 항원 제시 세포의 MHC에 의해 제시되는 항원의 검출을 위해, 해당되는 변형된 TCR 또는 해당되는 T 세포의 특이성이 α 및 β 사슬의 가변 도메인에서 CDR 서열에 의존함을 이해하는 것이 중요하다.
- [0085] Løset et al.(2014)에서 기술된 바와 같이, 특정 항원-MHC 복합체에 대한 T 세포 수용체는 T 세포와 관련된 파지 디스플레이로부터 얻을 수 있다. 이러한 접근 방식에서는, α 및 β 사슬의 가변 도메인에서의 Q44 치환이 파지 디스플레이의 기반을 형성하는 라이브러리의 모든 구성원에서 성취하는 것이 가능하거나, 이후에 즉, 특정 항원-MHC 복합체를 검출하는 특정 TCR이 발견된 이후에 도입하는 것이 가능하다.
- [0086] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 상기 기술에 따른 사용, 방법, T 세포 또는 T 세포 수용체(TCR) 이중이합체가 제공되는 데, 여기서 T 세포 수용체에 의해 검출되는 MHC 복합체에 의해 제시되는 항원은 암 특이적 종양 관련 항원(TAA) 펩티드 에피토프로부터 선택된다. 이러한 펩티드는 당업계에서 알려져 있으며, 한 예로서 본 실시예에 사용되는 펩티드 MAG-003이 포함된다. 이러한 펩티드는 예를 들어 에피토프 데이터베이스(<http://www.iedb.org/>)와 같은 문헌에서 찾을 수 있거나, WO 2016/177784; WO 2016/170139; WO 2016/156230; WO 2016/156202; WO 2016/146751; WO 2016/102272; WO 2016/107740; WO 2015/193359; WO 2015/169945; WO 2015/063302; WO 2015/018805; WO 2012/069462; WO 2012/079878; WO 2012/038463; WO 2011/151403; WO 2011/128448; WO 2011/113882; WO 2011/113872; WO 2011/113819; WO 2011/073215; WO 2010/037514; WO 2009/138236; WO 2007/028574; WO 2007/028573; WO 2006/114307; WO 2005/116051; WO 2005/076009; WO 2004/085461; WO 03/100432; WO 03/102023; WO 2009/015843; WO 2009/015842; WO 2009/015841; WO 2016/202963; WO 2016/207164; WO 2017/001491; WO 2017/005733; WO 2017/021527; WO 2017/036936; WO 2017/060169; WO 2017/060201; WO 2017/097602; WO 2017/097699; WO 2017/108345; 또는 WO 2017/009400(이들은 모두 공개된 펩티드에 대하여 참조문헌으로 포함됨)에서 공개된 바와 같은 것이 바람직하다.
- [0087] 본 발명은 도면과 앞의 기술을 통해 상세히 예시되고 설명되었지만, 그러한 예시와 설명은 예시적 또는 본보기로서 간주해야 하며 제한적이지는 안 된다. 본 발명은 공개된 실시양태로 제한되지 않는다. 청구된 발명의 실시 및/또는 도면, 공개 내용 및 첨부된 청구항의 연구에 있어서 공개된 실시양태에 대한 기타의 변동 내용은 당업자에 의해 이해와 작용이 가능하다.
- [0088] 또한 기술된 장치와 방법이 달라질 수 있으므로 본 발명은 이 장치의 특정한 구성 부품이나 구조적 특징 또는

기술된 조성물 또는 기술된 방법의 공정 단계들로 제한되지 않는 것으로 이해해야 한다. 또한 여기서 사용된 용어는 특정한 실시양태의 기술의 목적만을 위한 것이며 제한적인 의도가 없는 것으로 이해해야 한다. 특정한 조치들이 서로 다른 종속 청구항에서 인용되었다는 단순한 사실은 이러한 조치들의 조합이 이점을 위해 사용될 수 없다는 것을 나타내지 않는다. 청구항에서의 일체의 참조 신호를 그 범위를 제한하는 것으로 해석해서는 안 된다. 명세서와 첨부된 특허청구범위에서 사용된 단수형에는 그 맥락이 분명하게 달리 구술하지 않는 한 단수 및/또는 복수의 지칭물을 포함하는 것임을 유의해야 한다. 더욱이, 특허청구범위에서 "포함하는"이란 단어는 기타의 요소들 또는 단계들을 배제하지 않는다. 특정한 조치들이 서로 다른 종속 청구항에서 인용되었다는 단순한 사실은 이러한 조치들의 조합이 이점을 위해 사용될 수 없다는 것을 나타내지 않는다. 더욱이 수지에 의해 범위가 정해지는 매개변수 범위가 주어진 경우, 그 범위는 그러한 한도값을 포함하는 것으로 간주됨을 이해해야 한다.

[0089] 더욱이 여기서 공개된 실시양태들은 서로 관계가 없는 개별적 실시양태로서 이해해야 함을 의미하지 않는다는 것을 이해해야 한다. 한 실시양태에서 논의된 특징들은 여기서 나타난 다른 실시양태들과 관련하여 공개되는 것을 의도한다. 한 경우에서 어떠한 특정한 특징이 한 실시양태에서는 공개되지 않았으나 다른 실시양태에서 공개된다면, 당업자는 그것이 상기 특징이 상기의 다른 실시양태에서는 공개하려고 하지 않았음을 반드시 의미하는 것이 아님을 이해할 것이다. 당업자는 상기 특징을 다른 실시양태를 위해서도 공개하는 것이 본 출원서의 요지이며, 또한 단순히 명료성의 목적을 위해 그리고 명세서의 분량을 관리할 수 있도록 유지하기 위해 그렇게 하지 않았음을 이해할 것이다.

[0090] 여기서 공개된 모든 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로 표기되어 있다. 모든 공개된 핵산 서열은 5'→3'으로 표기된다. 본 발명의 목적 상, 여기서 인용된 모든 참조문헌은 전문이 포함된다. 이것은 특히 표준 또는 일상적 방법을 공개하는 선행 문서들에 대한 것이다. 이러한 경우 참조문헌에 의한 포함은 충분히 가능케하는 공개의 제공과 장황한 반복의 회피가 그 주된 목적이다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1a ~ 1c는 TCR α 사슬 및 β 사슬의 가변 도메인에서 아미노산 잔기의 번호매김을 보여준다. 도면은 Lefranc et al.(2003)에서 취하여 변형한 것이다. 서열은 TRAV8-6(유전자 ID: 28680)(α 사슬) 그리고 TRBV6-5(유전자 ID: 28602)(β 사슬)의 예에 대하여 나와 있다. α 사슬 및 β 사슬에서 아미노산 잔기의 번호매김은 Kabat 번호매김에 비하여 IMGT 표준(굵은 글꼴)에 따른다. 도 1b에서, α 사슬(TRAV) 및 β 사슬(TRBV)의 Q44는 회색 밑바탕으로 표시되어 있다. IMGT 번호매김에 따른 Q44는 구조틀 2(FR2) 영역에서 고도로 보존된 잔기이며 모든 TCR 유전자들의 약 80%에 의해 공유되는 것으로서(Strong et al., 1999), 1G4(pdb ID: 2BNR(Chen et al., 2005)); TRAV8-6(유전자 ID: 28680)(α 사슬) 및 TRBV6-5(유전자 ID: 28602)(β 사슬) 및 R7P1D5(TRAV5 및 TRBV12-4 포함, Lefranc et al., 2001)가 포함된다. Q44는 매우 흔히 WYXQ를 포함하는 4 AA 모티프의 일부이며, X는 일체의 아미노산으로서, 예를 들어 R, V 또는 K이다. W41은 TCR α 및 β 사슬에서 더욱 많이 보존된다(95 % 초과)(Strong et al., 1999).

도 2a는 TCR 1G4의 가변 도메인에서 α Q44/ β Q44의 구조적 모티프를 보여준다(pdb ID: 2BNR(Chen et al., 2005)). 도 2b는 가상 환경(*in silico*)에서 이중 돌연변이체를 보여주며, 1G4 TCR 결정 구조에 근거한다. 본 발명자들은 입체 및/또는 전하 대칭을 깨면서 야생형 α Q44/ β Q44 쌍으로부터 높은 수준의 분자적 접촉(극성 또는 무극성)을 유지하는 잠재적 쌍을 수동으로 선택하여 조작했다. 그 돌연변이체들은 UCSF 키메라(Chimera)로 생성되었다(Pettersen et al., 2004). 모든 도면에 걸쳐, TCR α 및 β 사슬은 각각 진한 청색 및 청록색 리본으로 나타낸다. 관심 대상의 결사슬들은 자홍색으로 강조표시되며 모든 중원자가 나와 있다.

도 3은 TCR 변이체 R7P1D5 α 및 β 사슬(TRAV5 및 TRBV12-4)의 서열을 보여주며, MHC; TRAV8-6(α 사슬 가변 도메인); 그리고 TRBV6-5(β 사슬 가변 도메인)에 결합 시 MAG-003으로 부르는 펩티드를 검출한다. 회색 밑바탕은 구조틀 영역 FR1, FR2 및 FR3에 대하여 CDR1, CDR2 및 CDR3의 대략의 위치를 표시한다. 볼 수 있는 것처럼, Q44는 FR2에 위치한다. Q44가 TRAV8-6 및 TRBV6-5와 마찬가지로 다른 TCR 변이체에서도 보존됨에 유의한다. 후자의 경우, Q44가 WYXQ를 포함하는 4 AA 모티프의 R7P1D5 부분 내에 있다. 표적이 되는 해당 항원에 따라, CDR 서열은 물론 변동할 수 있다.

도 4a 및 4b는 선택된 가상 환경(*in silico*)에서 조작된 돌연변이체에 대하여 계산된 돌연변이 에너지를 보여준다. 이중 돌연변이가 TRAV/TRBV 경계면에서 유래하는 형상 및/또는 전하 보완에 대해 선택된다. 도 4a는 충전된 아미노산(D, E, K, R)의 선택을 보여주며 도 4b는 중성 아미노산(W, V, L)의 선택을 보여준다. 본 발명자들은 제안된 각각의 상보성 돌연변이 쌍에 대하여, 이중 돌연변이체(녹색) 그리고 각 개별 단일 돌연변이체(주황색)

을 시험하여 조작된 사슬과 야생형 사슬의 짝짓기를 모방했다. 0.5 kcal/mol을 초과하는 돌연변이 에너지는 탈 안정화, -0.5 kcal/mol 미만의 돌연변이 에너지는 안정화, 그리고 -0.5 내지 0.5 kcal/mol의 돌연변이 에너지는 중립(적색 선들 사이 - 소프트웨어 기본 매개변개)인 것으로 각각 간주된다. 돌연변이를 1G4 TCR(Chen et al., 2005)의 가변 도메인 상에서 수행했으며, Discovery Studio(Dassault Systèmes, BIOVIA, 2017) 및 Spassov 및 Yan(2013)이 기술한 돌연변이 에너지 알고리즘이 사용되었다.

도 5는 TCR R7P1D5 야생형 및 돌연변이체 변이체의 α 및 β 사슬 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포에 대한 MAG-003(예시적 펩티드): HLA-A*02 사합체 또는 NYESO1-001(대조 펩티드):HLA-A*02 사합체 염색을 각각 보여준다. R7P1D5는 MHC에 결합 시 MAG-003 펩티드를 검출하지만 NYESO1은 검출하지 못한다. 모의 전기천공된 CD8+ T 세포 (TCR 없음)가 대조의 역할을 했다. 공여자(왼쪽 패널: 공여자 A, 오른쪽 패널: 공여자 B).

도 6은 TCR R7P1D5 야생형 및 돌연변이체 변이체의 α 및 β 사슬 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포의 HLA-A*02 맥락에서 예시적 펩티드인 MAG-003과의 IFN 방출을 보여준다. 모든 돌연변이체 변이체(α Q44R / β Q44D, α Q44E / β Q44K, α Q44K / β Q44E, α Q44D / β Q44K, α Q44K / β Q44D, α Q44E / β Q44R)는 변형되지 않은 R7P1D5 야생형과 비교할 때 향상된 MAG-003 인식을 나타낸다.

도 7에서, PRAME-004 특이적 TCRs R11A 및 R17A 그리고 이들의 상응하는 α 44K/ β 44E 돌연변이체 변이체가 렌티 바이러스 이전을 통해 인간 T 세포 안으로 형질도입되었다. TCR 형질도입된 T 세포의 활성도를 PRAME-004 펩티드의 감소하는 농도로 적재된 T2 세포와의 공동배양에 의해 평가했다. 돌연변이체 TCR R11KEA를 변형되지 않은 R11 TCR과 비교할 때 엄청나게 향상된 PRAME-004 인지를 나타낸다.

도 8에서, PRAME-004 특이적 TCR R17A 및 R11A 그리고 이들의 상응하는 44K/44E 돌연변이체 변이체(R11KEA)가 렌티바이러스 이전을 통해 T 세포 안으로 형질도입되었다. 종양 세포주 A375 및 U2OS를 발현하는 PRAME-004에 대한 형질도입된 T 세포의 세포독성은 IncuCyte 이미징 시스템을 통해 평가했다. MAG-003 특이적 TCR을 대조로 사용했다(A375 및 U2OS 또한 MAG-003을 발현한다). 돌연변이체 TCR R11KEA는 변형되지 않은 R11A TCR과 비교했을 때 PRAME-004 양성 세포주의 사멸 증가를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

특히 CDR 서열의 공백으로 인해 TCR 가변 도메인의 주어진 아미노산 서열에 대한 IMGT 표준에 따른 번호매김이 정통 번호매김으로부터 이탈할 수 있음에 유의하며, 이는 도 1a ~ 1c에서 볼 수 있다. 이것은 예를 들어 TRAV8-6와 TRBV6-5에 적용되며, 여기에서 물결 모양의 밑줄은 아미노산 잔기가 있지는 않지만 IMGT 번호매김에서 고려되는 공백을 나타낸다. 이러한 서열은 예시적으로만 제공되며, 바람직하더라도 특정한 실시양태에 대한 청구를 제약해서는 안 된다. 이것은 본 발명의 가르침이 다른 TCR α 및 β 사슬 또는 특히 CDR에서 특히 가변 도메인에서 다른 서열을 갖는 TCR α β 이중이합체에 적용될 수 있음을 의미한다.

더욱이 본 발명의 가르침이 바람직하게는 다른 표적 항원/MHC 복합체에 결합하는 다른 TCR α 및 β 사슬 또는 TCR α β 이중이합체에도 적용될 수 있으며, 이것은 자연적 Q44 아미노산을 포함하는 때만 아니라 바람직하게는 WYXQ 모티프를 포함할 때에도 그러하다. 표적이 되는 항원에 따라, CDR 서열이 변동될 수 있다.

일반적으로 T 세포 수용체 클로닝 및 발현의 방법이 Walchli et al.(2011)에 공개되어 있다. 무작위 돌연변이유발 또는 부위 특이적 아미노산 치환을 초래하는 특정 부위 돌연변이유발은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Labrou(2010) 및 Trehan et al.(2016)에 공개되어 있다.

주어진 아미노산 서열의 변형을 위한 게놈 편집의 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며(예: CRISPR Cas, TALEN, ZFN, Argonaute(NgAgo) 또는 CRISPR Cpf1), 예를 들어 Maeder 및 Gersbach(2016)에 공개되어 있다. 유전자 합성의 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며 예를 들어 Hughes et al.(2011)에 공개되어 있다. 이러한 참조문헌의 공개는 참조문헌에 그 전문이 포함된다.

가상 환경(In silico)의 방법

본 발명자들은 1G4 TCR(pdb ID : 2BNR(Chen et al., 2005))의 가변 도메인을 육안으로 검사하여 α 44/ β 44 모티프에 대한 돌연변이의 쌍을 수동으로 선택했으며, 이는 입체 및/또는 전하 대칭을 깨면서 높은 수준의 분자 접촉(극성 또는 무극성)을 잠재적으로 유지한다. 돌연변이 쌍을 (i) 그 쌍의 총 전하가 0이 되도록, (ii) 두 개의 아미노산이 잠재적으로 양호한 형상 보완을 보여주고/주거나 수소 결합 및/또는 염 다리를 형성하도록 그리

고 (iii) 두 개의 아미노산이 각각 다른 분자량을 가지도록(즉, 하나는 큰 아미노산이며 다른 하나는 작은 아미노산) 선택했다. Discovery Studio 소프트웨어(Dassault Systèmes, BIOVIA, 2017)를 사용하여 조작된 위치가 TCR의 $\alpha\beta$ 짝짓기에 미치는 영향을 더욱 조사했다. 돌연변이 에너지를 Spassov et al.(Spassov and Yan, 2013)에 의해 기술된 알고리즘을 사용하여 계산한 다음 항체의 가상 환경 설계를 수행했다. 돌연변이 에너지는 야생형 모티프 $\alpha Q44/\beta Q44$ 와 비교하여 돌연변이의 영향을 반영할 것으로 기대된다. 본 발명자들은 이중 돌연변이체 그리고 야생형 사슬과 짝지어진 단일 돌연변이체 각각을 시험했다:

- [0099] - 이중 돌연변이체의 경우, 그 돌연변이 에너지가 중립이거나 안정화될 것으로 기대되었다.
- [0100] - 야생형 사슬과 짝지어진 단일 돌연변이체의 경우, 그 돌연변이 에너지가 두 개 가운데 적어도 하나에 대해 탈 안정화될 것으로 기대되었다.
- [0101] 인간 일차 CD8+ T 세포를 RNA 없이(TCR 없음) 또는 야생형 형태(R7P1D5 TCR 야생형) 또는 돌연변이체 형태(R7P1D5 TCR $\alpha Q44D/\beta Q44R$)의 펩티드 특이적(예를 들어 MAG-003, 예를 들어 Wu et al., Scandinavian journal of immunology, 74:6, 2011 Dec, 561-7페이지에 공개된 펩티드 "p286") T 세포 수용체 사슬 α 및 β 를 인코딩하는 동일한 양의 RNA로 전기천공하여, TCR 가변 도메인에 Q44D 돌연변이를 그리고 TCR β 가변 도메인에 Q44R 돌연변이를 포함시켰다. 하룻밤 동안 배양 후 T 세포를 MAG-003:HLA-A*02 사합체의 결합(도 5, 위쪽 열) 그리고 관련되지 않은 펩티드 NYESO1-001:HLA-A*02 대조 사합체의 결합(도 5, 아래쪽 열)에 대해 분석했다(펩티드 NYESO-001; 상기한 에피토프 데이터베이스에서 에피토프 ID 59283). 사합체 양성 T 세포의 비율이 두 명의 개인 공여자에 대해 나와 있다(도 5, 왼쪽 패널: 공여자 A, 오른쪽 패널: 공여자 B).
- [0102] 종양 특이적 TCR- α 및 TCR- β 사슬을 인코딩하는 TCR R7P1D5를 분리하여 건강한 공여자의 T 세포에서 증폭시켰다. 건강한 공여자의 세포를 이전에 기술된 방법(Walter et al., 2003)에 따라 시험관 내에서 자극했으며, 표적 특이적 세포는 HLA-A*02 다합체를 사용하여 분류한 단일 세포로서 차후 TCR 분리에 사용되었다. TCR 서열은 예를 들어 다음에 기술된 바와 같은 표준 방법에 의해 5' RACE를 통해 분리했다: Molecular Cloning 실험실 설명서, 제4판, Green and Sambrook. TCR R7P1D5의 α 및 β 가변 영역을 추가의 기능적 특성화를 위해 시퀀싱과 클로닝을 실행했다. TCR R7P1D5는 HLA-A*02 양성 공여자로부터 유래한다.

[0103] 인용된 참조문헌

Davis MM, Bjorkman PJ T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. (1988). 334(6181), 395–402.

Cole DK et al. Germ line-governed recognition of a cancer epitope by an immunodominant human T-cell receptor. (2009). 284(40), 27281–27289.

Li H et al. Structure-function studies of T-cell receptor-superantigen interactions. (1998). 163, 177–186.

Burrows SR Hard wiring of T cell receptor specificity for the major histocompatibility complex is underpinned by TCR adaptability. (2010). 107(23), 10608–10613.

Roomp K Domingues FS (2011). Predicting interactions between T-cell receptors and MHC-peptide complexes. Mol Immunol 48: 553–562.

Rosenberg SA et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin- 2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N Engl J Med 319: 1676–1680.

Shao H et al. TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer. (2010). 37(8), 3951–3956.

Lefranc MP et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp. Immunol. (2003) 27, 55-77.

Lefranc MP et al. The T cell receptor facts book. (2001).

Bendle GM et al. Preclinical development of T cell receptor gene therapy. Curr. Opin. Immunol. (2009). 21, 209–214.

Pogulis RJ, Pease LR. A retroviral vector that directs simultaneous expression of α and β T cell receptor genes. Hum Gene Ther. (1998) Oct 10;9(15): 2299-304.

Zhong S et al. Retroviral Transduction of T-cell Receptors in Mouse T-cells J Vis Exp. (2010); (44): 2307.

Wälchli S et al. A Practical Approach to T-Cell Receptor Cloning and Expression. PLOS ONE (2011) 6(11): e27930.

O'Shea EK et al. Peptide "Velcro": design of a heterodimeric coiled coil. (1993). 3(10), 658–667.

Chang HC et al. A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. (1994). 91(24), 11408–11412.

[0104]

Varriale S et al. An evolutionary conserved motif is responsible for immunoglobulin heavy chain packing in the B cell membrane. (2010).

Govers C et al. T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends Mol Med.* (2010) Feb;16(2):77-87.

Løset GA et al., Phage Display Engineered T Cell Receptors as Tools for the Study of Tumor Peptide–MHC Interactions. *Front Oncol* (2014); 4: 378.

Hughes RA et al. Gene synthesis: methods and applications. *Methods Enzymol.* (2011); 498: 277-309.

Labrou NE. Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr Protein Pept Sci.* (2010) Feb;11(1):91-100.

Trehan A et al. REPLACR-mutagenesis, a one-step method for site-directed Scientific Reports (2016) 6, Article number: 19121.

Maeder ML & Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy* (2016); 24 3, 430–446.

Verhoeven E et al. Lentiviral vector gene transfer into human T cells. *Methods Mol Biol.* 2009;506:97-114.

Huang X et al. Sleeping Beauty Transposon-mediated Engineering of Human Primary T Cells for Therapy of CD19+ Lymphoid Malignancies. *Molecular Therapy* (2008); 16 3, 580–589.

Kim TK & Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Aug; 397(8): 3173–3178.

Chen, JL et al. (2005). Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(8), 1243–1255.

Pettersen EF et al. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.

Spassov VZ & Yan L (2013). pH-selective mutagenesis of protein-protein interfaces: in silico design of therapeutic antibodies with prolonged half-life. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(4), 704–714.

Cohen CJ et al. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8878-86.

Cohen CJ et al. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res.* 2007 Apr 15;67(8):3898-903.

Voss RH et al. Molecular design of the Calpha-beta interface favors specific pairing of introduced TCRalpha-beta in human T cells. *J Immunol.* 2008 Jan 1;180(1):391-401.

Walter et al. (2003) *J Immunol.*, Nov 15;171(10):4974-8.

Knies et al. An optimized single chain TCR scaffold relying on the assembly with the native CD3-complex prevents residual mispairing with endogenous TCRs in human T-cells. *Oncotarget.* 2016 Apr 19; 7(16): 21199–21221.

Thomas Hoffmann et al. Quantitative Analysis of the Association Angle between T-cell Receptor Vα/Vβ Domains Reveals Important Features for Epitope Recognition. *PLOS*, July 17, 2015, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004244>.

[0105]

[0106]

도면

도면1a

	TRBV: 인간 TRBV6-5			TRAV: 인간 TRAV8-6		
FR1-IMGT	1	1	aat ASN N	1	0	agc ALA A
	2	2	get ALA A	2	1	cag GLN Q
	3	3	ggt GLY G	3	2	tct SER S
	4	4	gtc VAL V	4	3	gtg VAL V
	5	5	act THR T	5	4	acc THR T
	6	6	cag GLN Q	6	5	cag GLN Q
	7	7	acc THR T	7	6	ctt LEU L
	8	8	cca PRO P	8	7	gac ASP D
	9	9	aaa LYS K	9	8	agc SER S
	10	10	ttc PHE F	10	9	caa GLN Q
	11	11	cag GLN Q	11	10	gtc VAL V
	12	12	gtc VAL V	12	11	cct PRO P
	13	13	ctg LEU L	13	12	gtc VAL V
	14	14	aag LYS K	14	13	ttt PHE F
	15	15	aca THR T	15	14	gaa GLU E
	16	16	gga GLY G	16	15	gaa GLU E
	17	17	cag GLN Q	17	16	gcc ALA A
	18	18	agc SER S	18	17	cct PRO P
	19	19	atg MET M	19	18	gtg VAL V
	20	20	aca THR T	20	19	gag GLU E
	21	21	ctg LEU L	21	20	ctg LEU L
	22	22	cag GLN Q	22	21	agg ARG R
	23	23	tgt CYS C	23	22	tgc CYS C
	24	24	gcc ALA A	24	23	aac ASN N
	25	25	cag GLN Q	25	24	tac TYR Y
	26	26	gat ASP D	26	25	tca SER S
CDR1-IMGT	27	27	atg MET M	27	26	tcg SER S
	28	28	aac ASN N	28	27	tct SER S
	29	29	cat HIS H	29	28	gtt VAL V
	30	30	gaa GLU E	30	29	tca SER S
	31	* 31	tac TYR Y	31	30	gtg VAL V
	32	*	- - -	32	* 31	tat TYR Y
	33		- - -	33	*	- - -
	34		- - -	34	*	- - -
	35		- - -	35		- - -
	36		- - -	36		- - -
	37		- - -	37		- - -
	38		- - -	38		- - -

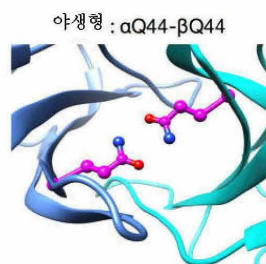
도면1b

	TRBV 인간		TRBV6-5			TRAV 인간		TRAV8-6		
FR2-IMGT	39	32	atg	MET	M	39	32	ctc	LEU	L
	40	33	tcc	SER	S	40	33	ttc	PHE	F
	41	34	tgg	TRP	W	41	34	tgg	TRP	W
	42	35	tat	TYR	Y	42	35	tat	TYR	Y
	43	36	cga	ARG	R	43	36	gtg	VAL	V
	44	37	caa	GLN	Q	44	37	caa	GLN	Q
	45	38	gac	ASP	D	45	38	tac	TYR	Y
	46	39	cca	PRO	P	46	39	ccc	PRO	P
	47	40	ggc	GLY	G	47	40	aac	ASN	N
	48	41	atg	MET	M	48	41	caa	GLN	Q
	49	42	ggg	GLY	G	49	42	gga	GLY	G
	50	43	ctg	LEU	L	50	43	ctc	LEU	L
	51	44	agg	ARG	R	51	44	cag	GLN	Q
	52	45	ctg	LEU	L	52	45	ctt	LEU	L
	53	46	att	ILE	I	53	46	ctc	LEU	L
CDR2-IMGT	54	47	cat	HIS	H	54	47	ctg	LEU	L
	55	48	tac	TYR	Y	55	48	aag	LYS	K
	56	49	tca	SER	S	56	* 49	tat	TYR	Y
	57	50	gtt	VAL	V	57	* 50	tta	LEU	L
	58	51	ggt	GLY	G	58	* 51	tca	SER	S
	59	52	gct	ALA	A	59	* 52	gga	GLY	G
	60	53	ggt	GLY	G	60		-	-	-
	61	54	atc	ILE	I	61		-	-	-
	62		-	-	-	62		-	-	-
	63		-	-	-	63		-	-	-
FR3-IMGT	64		-	-	-	64		-	-	-
	65		-	-	-	65		-	-	-
	66	55	act	THR	T	66	* 53	tcc	SER	S
	67	56	gac	ASP	D	67	* 54	acc	THR	T
	68	57	caa	GLN	Q	68	* 55	ctg	LEU	L
	69	58	gga	GLY	G	69	* 56	gtt	VAL	V
	70	59	gaa	GLU	E	70	* 57	gaa	GLU	E
	71	60	gtc	VAL	V	71	* 58	agc	SER	S
	72	61	ccc	PRO	P	72	* 59	atc	ILE	I
	73	* 62	-	-	-	73	*	-	-	-
	74	* 63	aat	ASN	N	74	* 60	aac	ASN	N
	75	* 64	ggc	GLY	G	75	61	ggt	GLY	G
	76	65	tac	TYR	Y	76	62	ttt	PHE	F
	77	66	aat	ASN	N	77	63	gag	GLU	E

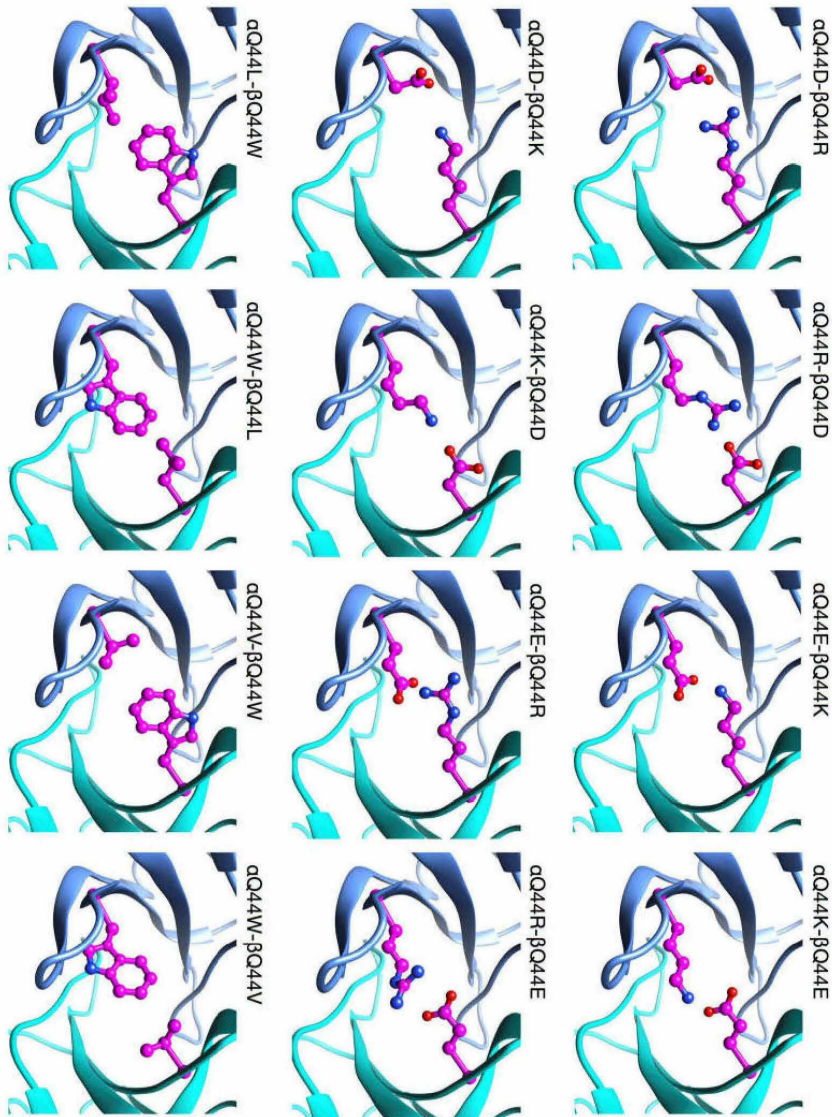
도면1c

TRBV 인간			TRBV6-5			TRAV: 인간			TRAV8-6		
CDR3-IMGT	78	67	gtc	VAL	V	78	64	gct	ALA	A	
	79	68	tcc	SER	S	79	65	gaa	GLU	E	
	80	69	aga	ARG	R	80	66	ttt	PHE	F	
	81	70	tca	SER	S	81	67	aac	ASN	N	
	82		-	-	-	82	68	aag	LYS	K	
	83	71	acc	THR	T	83	69	agt	SER	S	
	84	72	aca	THR	T	84	70	caa	GLN	Q	
	85	73	gag	GLU	E	85	71	act	THR	T	
	86	74	gat	ASP	D	86	72	tcc	SER	S	
	87	75	ttc	PHE	F	87	73	ttc	PHE	F	
	88	76	cgc	PRO	P	88	74	cac	HIS	H	
	89	77	ctc	LEU	L	89	75	ttg	LEU	L	
	90	78	agg	ARG	R	90	76	agg	ARG	R	
	91	79	ctg	LEU	L	91	77	aaa	LYS	K	
	92	80	ctg	LEU	L	92	78	ccc	PRO	P	
	93	81	tgc	SER	S	93	79	tca	SER	S	
	94	82	gct	ALA	A	94	80	gtc	VAL	V	
	95	83	gct	ALA	A	95	81	cat	HIS	H	
	96	84	ccc	PRO	P	96	82	ata	ILE	I	
	97	85	tcc	SER	S	97	83	agc	SER	S	
	98	86	cag	GLN	Q	98	84	gac	ASP	D	
	99	87	aca	THR	T	99	85	acg	THR	T	
	100	88	tct	SER	S	100	86	gct	ALA	A	
	101	89	gtg	VAL	V	101	87	gag	GLU	E	
	102	90	tac	TYR	Y	102	88	tac	TYR	Y	
	103	91	ttc	PHE	F	103	89	ttc	PHE	F	
	104	92	tgt	CYS	C	104	90	tgt	CYS	C	
	105	93	gcc	ALA	A	105	91	gct	ALA	A	
	106	94	agc	SER	S	106	92	gtg	VAL	V	
	107	95	agt	SER	S	107	93	agt	SER	S	
	108	96	tat	TYR	Y						
	109	97	-	-	-						

도면2a

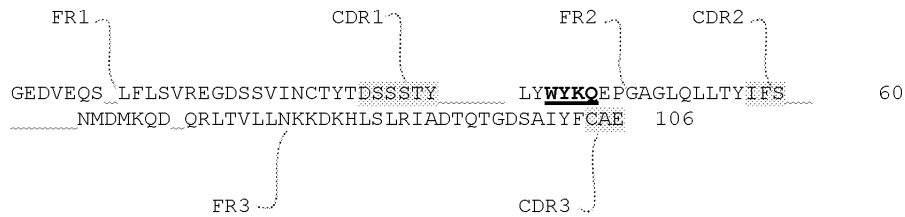


도면2b



도면3

서열 식별 번호 1: R7P1D5의 TCR 알파 사슬 가변 도메인(TRA V5)



서열 식별 번호 2: R7P1D5의 TCR 베타 사슬 가변 도메인(TRB V12-4)

DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDY LFWYRQTMMRGLELLIYFNNIV 60

P IDDSGMPEDRFSKMP_NASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS 106

서열 식별 번호 3: TRAV 8-6의 TCR 알파 사슬 가변 도메인

AQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVSVY LFWYVQYPNQGLQLLKYLSG 60

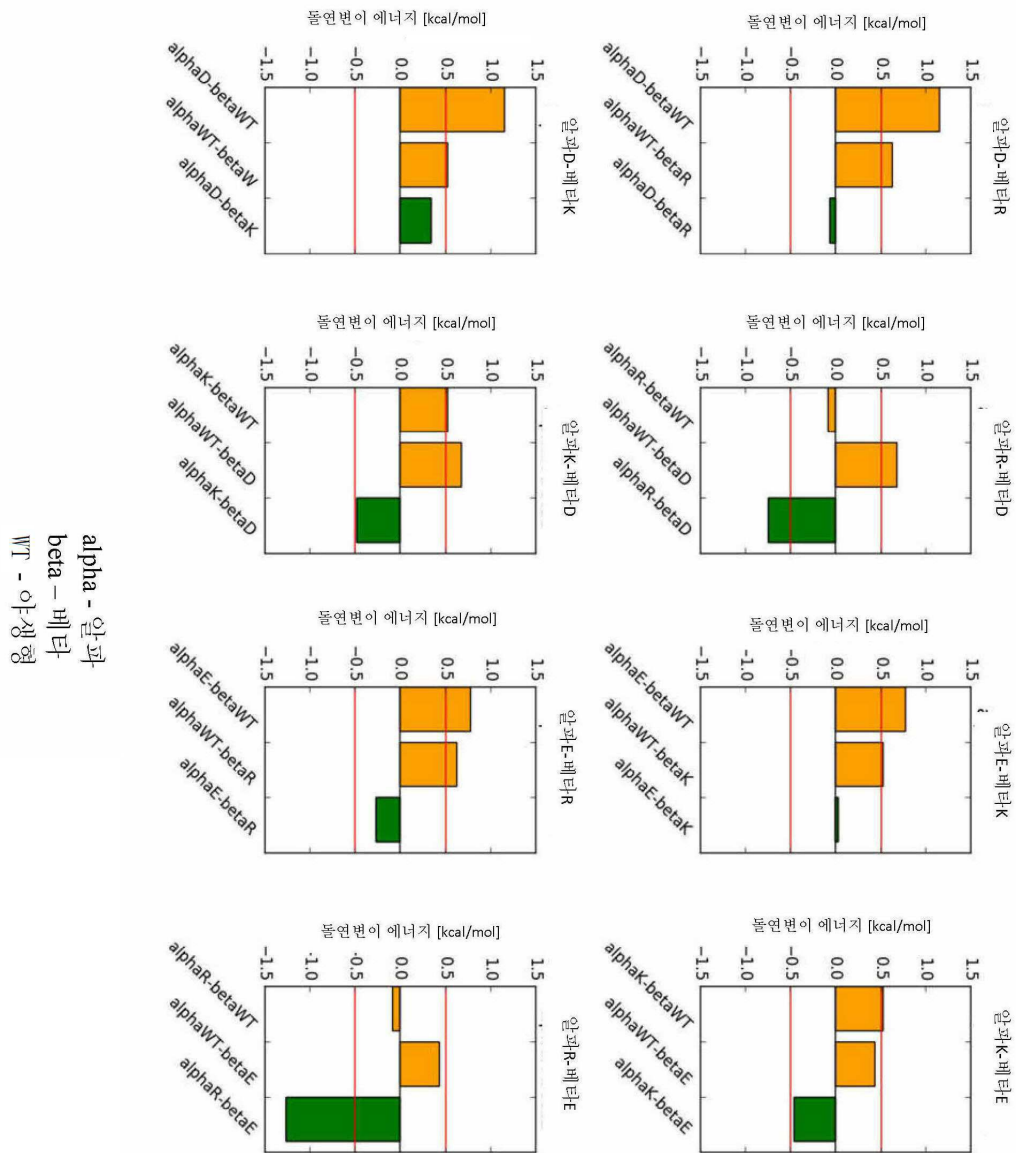
STLVESI_NGFEEAFNKSQTSFHLRKPSVHISDTAEYFCAVS 107

서열 식별 번호 4: TRBV 6-5의 TCR 베타 사슬 가변 도메인

NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEY MSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAG 60

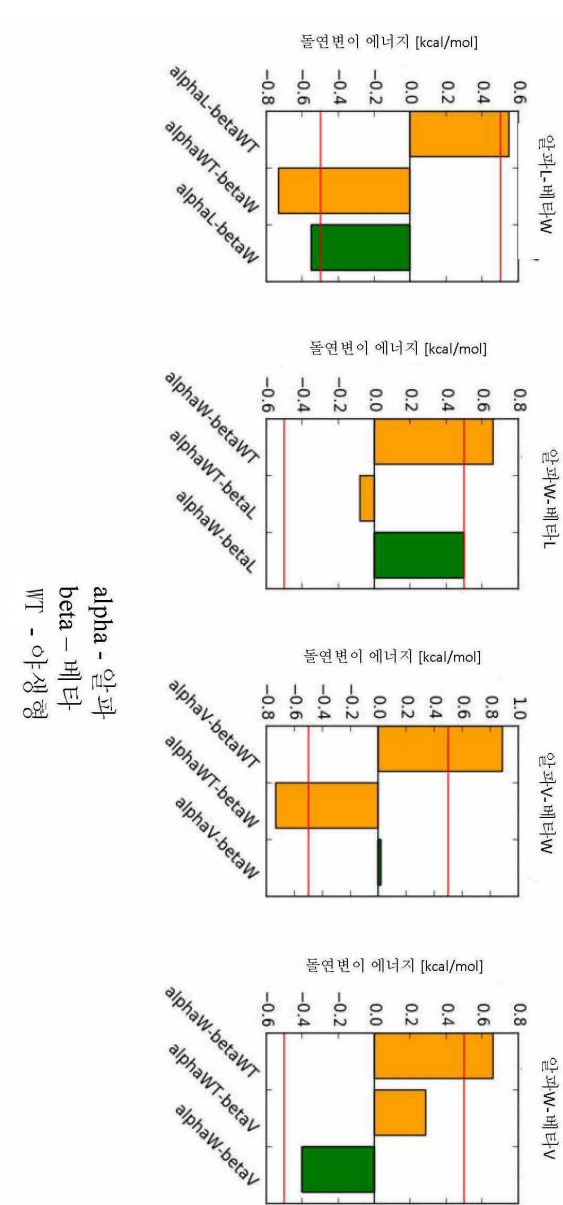
I TDQGEVP_NGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSY 108

도면4a

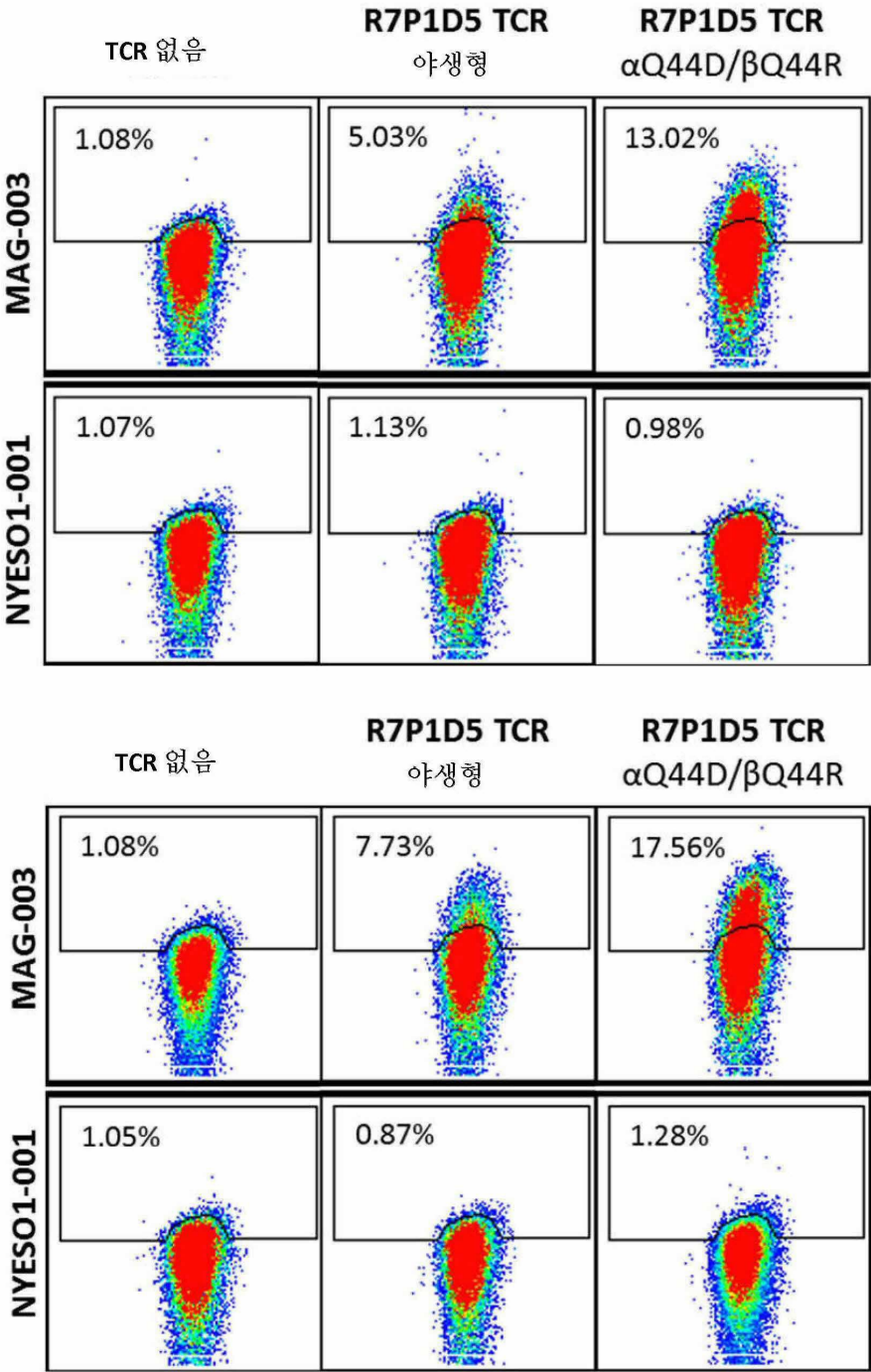


alpha - 알파
beta - 베타
WT - 야생형

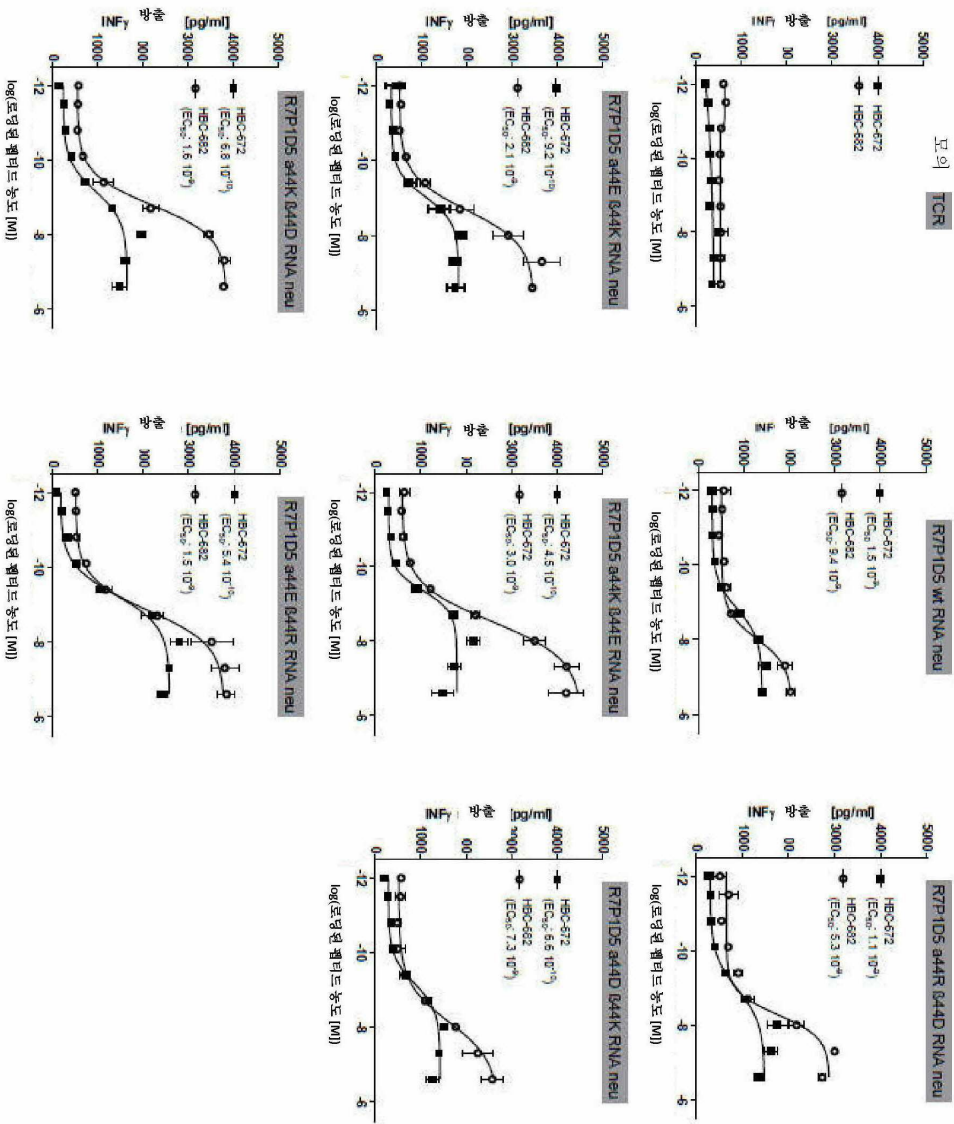
도면4b



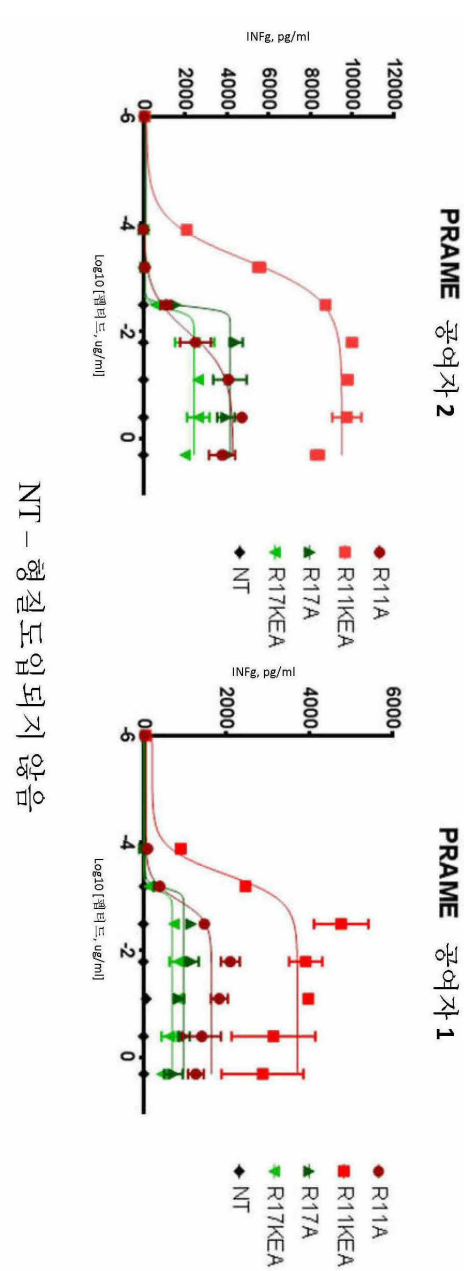
도면5



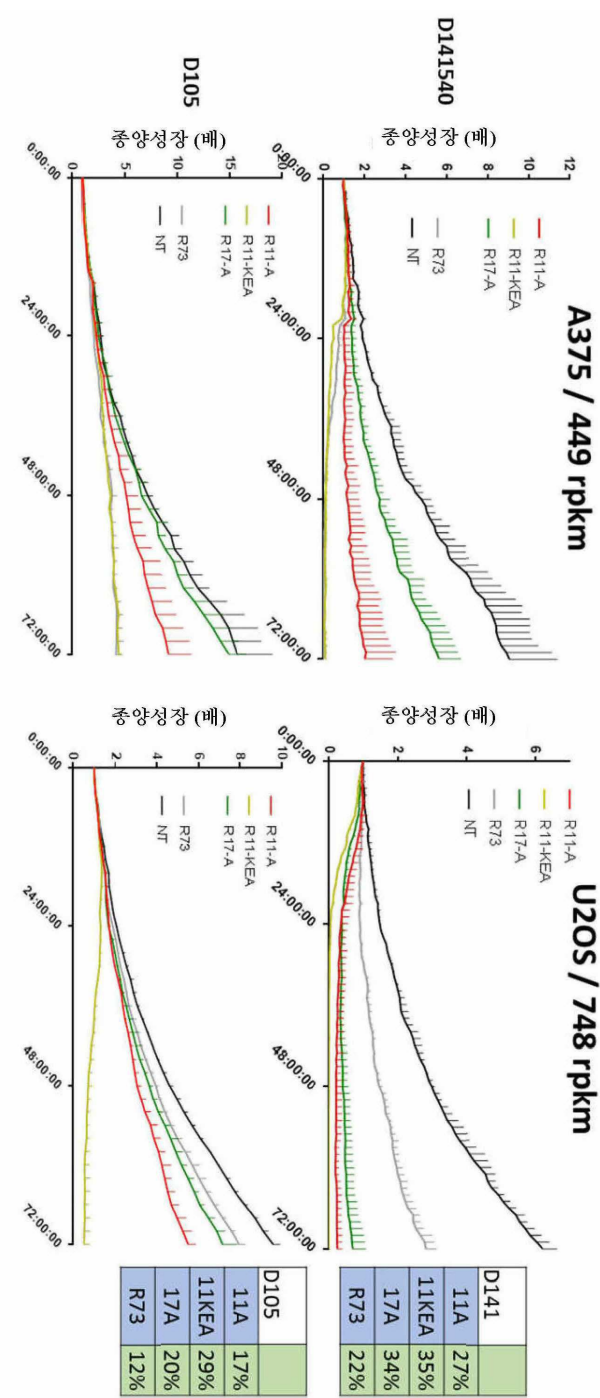
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Immatics Biotechnologies GmbH
- <120> T cell receptors with improved pairing
- <130> I33005W0
- <140> PCT/EP2017/081745

<141> 2017-12-06

<150> DE 10 2016 123 893.7

<151> 2016-12-08

<150> US 62/497,895

<151> 2016-12-08

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> TCR alpha chain variable domain of R7P1D5 (TRAV5)

<400> 1

Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp
1 5 10 15

Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu
20 25 30

Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Ile Phe Ser Ile Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
50 55 60

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
65 70 75 80

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
85 90

<210> 2

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> TCR beta chain variable domain of R7P1D5 (TRBV12-4)

<400> 2

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly
1 5 10 15

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

<210> 3

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223

> TCR alpha chain variable domain of TRAV 8-6

<400> 3

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

<210> 4

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> TCR beta chain variable domain of TRBV 6-5

<400> 4

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

1 5 10 15
Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

 20 25 30
Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

 35 40 45
Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

 50 55 60
Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser

65 70 75 80
Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr

 85 90 95