



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005865
(43) 공개일자 2024년01월12일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7041837</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년05월06일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년12월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/062338</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/234116
국제공개일자 2022년11월10일</p> <p>(30) 우선권주장
21172722.7 2021년05월07일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
메디진 이뮤노테라피스 게엠바하
독일 플라네그-말틴스트리트 82152 로크하메르 스트라쎄 11</p> <p>(72) 발명자
자일러, 나디아
독일 80538 뮌헨 지그문트슈트라쎄 1
잘페르모저, 멜라니
독일 81379 뮌헨 아이하허슈트라쎄 1
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이윤기</p> |
|--|---|

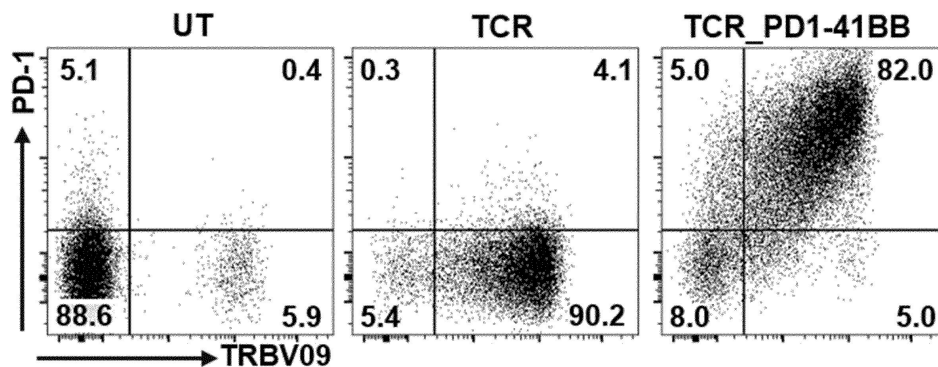
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 PRAME 특이적 T 세포 수용체 및 키메라 공동 자극 수용체의 조합

(57) 요약

본 발명은 FRAME 펩티드 SLLQHLIGL에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR), 및 PD-1 (CD279)로부터 유래된 세포외 도메인 및 4-1BB (CD137)로부터 유래된 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체의 조합에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 상기 TCR 및 키메라 공동 자극 단백질을 포함하는 세포에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 TCR 및 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산, 상응하는 벡터 및 상응하는 핵산 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 그에 따른 제약 조성물에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 의약로서 사용하기 위한 세포 및 핵산 구축물, 특히 암 치료에서 사용하기 위한 TCR에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C12N 5/0636 (2023.05)

A61K 2039/5156 (2023.05)

A61K 2039/5158 (2023.05)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

조머마이어, 다니엘

독일 80638 뮌헨 뇌르들리헤 아우파르츠알레 43

빌데, 수잔네

독일 82110 게르메링 조넨벤토슈트라쎄 5아

페처, 이나

독일 80469 뮌헨 페슈탈로치슈트라쎄 18

뮌르테크, 마야

독일 81669 뮌헨 릴리엔슈트라쎄 75

명세서

청구범위

청구항 1

(A) - 서열식별번호(SEQ ID NO:) 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 체, 및

- 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 체

를 포함하는 PRAME 특이적 TCR; 및

(B) - PD-1로부터 유래된 세포의 도메인을 함유하는 세포의 도메인,

- 막횡단 도메인, 및

- 4-1BB로부터 유래된 세포내 도메인을 함유하는 세포내 도메인

을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체

를 포함하는 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, TCR이 아미노산 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)을 갖는 PRAME 펩티드 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합 형태에 결합할 수 있는 것인 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, HLA-A2가 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04 또는 HLA-A*02:09 코딩 분자인 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 8과 동일하거나, 또는 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9와 동일하거나, 또는 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함하는 것인 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 10의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 11의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함하는 것인 세포.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1로부터 유래된 세포의 도메인을 함유하는 세포의 도메인이 서열식별번호 28의 서열을 포함하고,

4-1BB로부터 유래된 세포내 도메인을 함유하는 세포내 도메인이 서열식별번호 32의 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인이 PD-1로부터 유래되고, 바람직하게는 PD-1로부터 유래된 막횡단 도메인을 함유하는 막횡단 도메인이 서열식별번호 30의 서열을 포함하고, 바람직하게는 키메라 공동 자극 수용체가 서열식별번호 26의 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 8

- 제1항에서 정의된 바와 같은 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 핵산; 및

- 제1항에서 정의된 바와 같은 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 9

- 제1항에서 정의된 바와 같은 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 핵산; 및
- 제1항에서 정의된 바와 같은 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산.

청구항 10

제9항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 11

제8항에 따른 조성물, 제9항에 따른 핵산, 또는 제10항에 따른 벡터를 포함하는 세포.

청구항 12

제1항 내지 제7항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 말초 혈액 림프구 (PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이고, 바람직하게는 세포가 T 세포인 세포.

청구항 13

제1항 내지 제7항 및 제11항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제8항에 따른 조성물, 제9항에 따른 핵산, 및/또는 제10항에 따른 벡터를 포함하는 제약 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 세포, 조성물, 핵산, 및/또는 벡터.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암 치료에서 사용하기 위한 세포, 조성물, 핵산, 및/또는 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PRAME 펩티드 SLLQHLIGL에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR), 및 PD-1 (CD279)로부터 유래된 세포의 도메인 및 4-1BB (CD137)로부터 유래된 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체의 조합에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 상기 TCR 및 키메라 공동 자극 단백질을 포함하는 세포에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 TCR 및 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산, 상응하는 벡터 및 상응하는 핵산 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 그에 따른 제약 조성물에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 의약로서 사용하기 위한 세포 및 핵산 구축물, 특히 암 치료에서 사용하기 위한 TCR에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] PRAME는 다양한 종양, 바람직하게, 흑색종에서 발현되는 종양 연관 항원이다. 추가로, PRAME는 예컨대, 포도막 흑색종과 같은 전이에 대한 독립적인 바이오마커로서 (Fiedl et al., Clin Cancer Res 2016 March; 22(5): 1234-1242) 및 DLBCL에 대한 예후 마커 (Mitsunashi et al., Hematology 2014, 1/2014)로서 기술되었다. 고환을 제외한 정상 조직에서는 발현되지 않는다. 이러한 발현 패턴은 예컨대, MAGE, BAGE 및 GAGE와 같은 다른 고환암 (CT) 항원의 발현 패턴과 유사하다. 그러나, 이러한 다른 CT 항원과 달리, 상기 유전자는 또한 급성 백혈병에서도 발현된다. 코딩된 단백질은 레티노산 수용체의 리프레서 역할을 하며, 이 기능을 통해 암 세포에 성장 이점을 부여할 가능성이 있다. 선택적 스플라이싱을 통해 다중의 전사체 변이체가 생성된다. 삼중 음성 유방암에서의 PRAME 과다발현은 또한 상피 중간엽 이행 유도를 통해 암 세포 운동성을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다 (Al-Khadairi et al., Journal of Translational Medicine 2019; 17: 9). 만성 림프구성 백혈병에서 PRAME

의 결실이 보고되었지만, 유전자가 B 세포에서 발현되지 않고, 결실은 생리적 면역글로불린 경쇄 재배열의 결과이기 때문에 이는 기능적으로 관련이 없다. 기술된 CT 항원 PRAME 특징에 기초하여, 이는 TCR 지시된 세포 기반 면역요법을 사용하여 다양한 타입의 암 치료에 적합한 표적을 구성한다. 이를 위해서는 세포 생성물이 시토키인 방출, 세포독성 및 증식을 포함하여 종양 제거에 필요한 이펙터 기능을 발휘할 수 있도록 하는 항원에 대한 특이성이 높은 TCR이 요구된다.

[0003] TCR 변형 T 세포를 이용한 면역요법의 성공 여부는 표적 항원의 선택 뿐만 아니라, 항원 특이성과 감수성이 높은 TCR의 선택에도 달려 있다. 특히 고형 종양 치료에서 추가적인 도전과제는 TCR 변형 T 세포의 효능, 적합성 및 지속성에 부정적인 영향을 미치는 면역억제성 종양 미세환경 (TME)이다. 억제성 시토키인 및 필수 대사 인자의 고갈 이외에도, T 세포는 TME 중의, T 세포 침윤을 감소시키고, 그를 고갈시키는 억제성 체크포인트 PD-1/PD-L1 축에 직면한다. 결과적으로, TCR 변형 T 세포에 억제성 면역억제성 종양 미세환경을 극복하기 위한 특성을 장착하기 위한 새로운 전략법이 요구된다. 더욱 구체적으로, 높은 특이성으로 PRAME를 표적화하고, 증식, 시토키인 방출 및 세포독성이 증진된 TCR 변형 T 세포가 바람직하다.

발명의 내용

[0004] 이러한 요구를 극복하기 위해, 본 발명은 시토키인 방출, 증식 및 세포독성이 증진되고, PRAME를 표적화하는 고도로 특이적인 T 세포의 생성을 허용하는 본 발명의 높은 결합력 TCR과 키메라 공동 자극 수용체의 조합을 제공한다.

[0005] 따라서, 본 발명의 한 목적은

[0006] (A) - 서열식별번호(SEQ ID NO:) 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 체, 및

[0007] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 체를 포함하는 PRAME 특이적 TCR; 및

[0008] (B) - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인,

[0009] - 막횡단 도메인, 및

[0010] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 포함하는 세포를 제공하는 것이다.

[0011] 사용되는 PRAME 특이적 TCR은 아미노산 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)을 갖는 PRAME 펩티드 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합 형태에 결합할 수 있다. 이는 높은 기능적 결합력 및 유리한 종양 세포 인식 및 사멸 특성을 제공한다. 특히, 본 발명의 TCR은 선행 기술에 개시된 TCR보다 더 높은 기능적 결합력이 있고, 테스트된 종양 세포주를 가장 잘 인식하고, PRAME 양성 종양 세포를 더 효율적으로 용해시킨다. 공동 자극 수용체는 특히 억제 TME에서 억제성 체크포인트 축 PD-1/PD-L1을 역전시켜 T 세포 기능을 개선시킨다. 따라서, 본 발명의 TCR과 키메라 공동 자극 수용체의 조합을 통해 높은 특이성과 증진된 증식, 시토키인 방출 및 세포독성으로 PRAME의 표적화를 개선시킬 수 있다.

[0012] 일부 실시양태에서, PRAME 특이적 TCR은 SLLQHLIGL의 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04 또는 HLA-A*02:09 결합된 형태에 결합할 수 있다. PRAME 에피토프 SLLQHLIGL 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합된 형태에의 결합은 TCR로 형질도입 또는 형질감염된 세포에 의한 IFN-γ 분비를 유도한다.

[0013] 일부 실시양태에서, TCR은 서열식별번호 8과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, TCR은 서열식별번호 8의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함한다. TCR은 서열식별번호 10과 동일하거나, 또는 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 11과 동일하거나, 또는 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함할 수 있다.

[0014] 키메라 공동 자극 수용체는 PD-1로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 키메라 공동 자극 수용체의 서열은 서열식별번호 26의 서열을 포함할 수 있다.

[0015] 따라서, 추가 측면은

- [0016] - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 체, 및
- [0017] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 체를 포함하는 PRAME 특이적 TCR을 코딩하는 핵산; 및
- [0018] - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인,
- [0019] - 막형단 도메인, 및
- [0020] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 한 측면은
- [0022] - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 체, 및
- [0023] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 체를 포함하는 PRAME 특이적 TCR을 코딩하는 핵산; 및
- [0024] - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인,
- [0025] - 막형단 도메인, 및
- [0026] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산에 관한 것이다.
- [0027] 추가 측면은 PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체에 대한 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 핵산 조성물 및/또는 벡터를 포함하는 세포 또한 포함한다.
- [0028] 전형적으로, 세포는 말초 혈액 림프구 (PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 구체적인 실시양태에서, 세포는 T 세포이다.
- [0029] 추가 측면은 본원에 정의된 세포, 조성물, 핵산, 및 벡터를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 추가 측면은 암 치료를 위한 본원에 정의된 세포, 조성물, 핵산, 및 벡터에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0030] **도 1: PD1-41BB의 공동 발현이 TCR 발현 수준을 변화시키지는 않는다.**

CD8+ T 세포를 건강한 공여자로부터 단리시키고, IL-7 및 IL-15의 존재하에 CD3/CD28 항체로 활성화시켰다. 활성화된 세포에 T23.8-2.1-027-004(= TCR) 또는 T23.8-2.1-027-004 및 PD1-41BB의 조합 (= TCR_PD1-41BB)에 대한 서열을 포함하는 레트로바이러스 입자를 형질도입하였다. 동일한 방식으로 제조된 비형질도입된 (=UT) CD8+ T 세포를 대조군으로 사용하였다. TCR- β 체 (TRBV09) 및 PD-1의 항체 염색 및 유세포 분석법에 의한 후속 분석에 의해 트랜스젠의 형질도입 효율 및 발현 수준을 결정하였다.

도 2: TCR-트랜스제닉 T 세포의 기능적 결합력이 PD1-41BB의 공동 발현에 의해 변경되지 않는다

적정량의 SLLQHLIGL (SLL)-펩티드 (10^{-5} M 내지 10^{-10} M)가 로딩된 PD-L1-트랜스제닉 T2 세포와의 공동 배양물 중 IFN- γ 방출로서 TCR-트랜스제닉 T 세포 집단의 기능적 결합력을 측정한다. 최대 IFN- γ 방출의 절반은 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포의 기능적 결합력에 대한 척도로서의 역할을 한다. 좌측 그래프는 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 결정된 절대 IFN- γ 농도값을 보여주는 것이고, 우측 그래프는 상대값의 비선형 회귀 곡선을 보여주는 것이다. PD1-41BB의 공동 발현은 PD-L1 양성 표적 세포에 반응하여 TCR-트랜스제닉 T 세포에서 방출되는 IFN- γ 수준을 증가시키는 반면, 공동 발현이 T 세포의 기능적 결합력은 변경시키지 않는다.

도 3: HLA-A*02 서브타입 인식은 PD1-41BB의 공동 발현에 의해 변경되지 않는다.

TCR-형질도입된 T 세포를 1:1인 E:T 비로 선택된 HLA-A*02 서브-대립유전자 양성 림프모구양 세포주 (LCL; EBV-형질전환된 B 세포)와 함께 시험관내 공동 배양 (20,000개의 T 세포/웰). 10^{-5} M SLL-펩티드로 펄싱된 LCL과의 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN- γ 농도를 결정하였다. PD1-41BB가 존재 또는 부재하는, 형질도입된

TCR-트랜스제닉 T 세포는 A*02:01과 비교하여 유사한 수준으로 HLA-A*02 서브-대립유전자 A*02:02, A*02:04 및 A*02:09에 의해 코딩된 MHC 분자에 의해 제시되는 SLL-펩티드를 인식하였다.

도 4: 잠재적인 펩티드 표적을 벗어난 독성의 성공적인 위험 제거.

잠재적인 표적을 벗어난 독성의 위험을 감소시키기 위해, Expitope 2.0[®]을 사용하여 SLL-펩티드와 비교하여 최대 4개의 아미노산 차이를 나타내는 191개의 부분적으로 상동성인 펩티드 (미스매칭된 (MM) 펩티드)를 선택하였다. 10^{-6} M의 MM 펩티드 또는 SLL-펩티드가 로딩된 PD-L1-트랜스제닉 T2 세포를 사용한 사전 스크리닝 공동 배양에서, TCR-형질도입된 T 세포에 의해 인식된 33개의 MM 펩티드가 확인되었다 (데이터는 제시되지 않음). 에피토프 (펩티드)가 PRAME 음성 표적 세포주 SNB-19의 프로테아좀에 의해 내인적으로 프로세싱될 때, 상기 33개의 MM 펩티드를 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포에 의한 IFN- γ 방출을 유도하는 그의 잠재능에 대해 조사하였다. 최대 5개의 MM 펩티드를 코딩하는 시험관내 전사된 (ivt) RNA를 SNB-19 세포에 전기천공하였다. 사전 스크리닝 공동 배양에서 TCR-트랜스제닉 T 세포에서 가장 높은 IFN- γ 방출을 유도한 MM 펩티드 (MM01, MM26, MM66)를 "미디유전자" 구축물 (~400 bp)로서 개별적으로 시험하였다. 다른 모든 MM 펩티드는 5개의 MM 펩티드를 코딩하는 미니유전자 구축물 (~90 bp/펩티드)로서 시험하였다. SLL 펩티드를 코딩하는 미디유전자 구축물을 양성 대조군으로서 사용하였다. 모든 RNA 구축물은 양성 대조군 TCR에 의해 인식되는 에피토프를 포함하였다. 형질감염된 SNB-19 세포와 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포의 공동 배양 후 20 h째에 IFN- γ 농도를 결정하였다. 검출된 IFN- γ 수준은 세포내 프로세싱된 MM 펩티드의 인식은 없었다는 것을 나타낸다. 따라서, 모든 MM 펩티드는 위험이 제거될 수 있으며, 잠재적인 표적을 벗어난 독성을 유발할 가능성은 없다. 추가로, PD1-41BB의 공동 발현은 TCR 단독으로 관찰된 인식된 MM 펩티드의 패턴을 변경하지 않았다.

도 5: 빈번한 HLA를 포괄하는 LCL 라이브러리 사용으로 표적을 벗어난 독성은 확인되지 않았다.

잠재적인 표적을 벗어난 독성을 평가하기 위해, PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-형질도입된 T 세포를 백인 집단에서 가장 빈번한 HLA-A, -B 및 -C 대립유전자를 포괄하는 36개의 림프모구양 세포주 (LCL)로 이루어진 라이브러리와 함께 공동 배양하였다. 이러한 LCL은 다양한 내인적으로 발현되는 펩티드를 발현하고, 매칭되는 HLA-A2 분자 또는 가장 빈번한 다른 HLA 분자 상에 제시된 내인성 펩티드의 인식으로 인한 잠재적인 교차 반응을 확인하는 데 도움이 된다. LCL과의 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN- γ 농도를 결정하였다. SLL-펩티드가 로딩된 HLA-A*02:01 양성 LCL이 양성 대조군 역할을 하였다. TCR-트랜스제닉 T 세포는 LCL #5와 함께 공동 배양된 경우에만 매우 낮은 수준의 IFN- γ 를 분비하였고, 여기서 낮은 수준의 PRAME 발현은 qPCR로 확인할 수 있었다. 다른 모든 LCL은 트랜스제닉 TCR 또는 PD1-41BB와 조합된 트랜스제닉 TCR을 발현하는 이펙터 T 세포에 의해 인식되지 않았다. 따라서, 상기 안전 모델에서는 어떤 표적을 벗어난 독성도 확인되지 않을 수 있다.

도 6: 정상 세포 패널 사용으로 표적을 벗어난 독성은 확인되지 않았다.

다양한 조직 기원의 정상 세포와의 공동 배양을 통해 중요한 건강한 조직의 잠재적인 표적을 벗어난 인식을 분석하였다. 양성 대조군으로서 정상 세포에 SLL-펩티드를 로딩하였다. 공동 배양 상청액 중 IFN- γ 농도를 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 결정하였다. 건강한 세포의 표적을 벗어난 인식은 관찰되지 않았다. PRAME 양성 성숙한 수지상 세포 (DC)만이 비형질도입된 T 세포의 배경보다 높은 TCR-트랜스제닉 T 세포에서 IFN- γ 방출을 유발한 반면, 성숙한 DC의 전구 세포 (단핵구 및 미성숙 DC)는 T 세포에 의한 IFN- γ 방출을 유발하지 않았다. PD1-41BB를 첨가해도 PRAME 특이적 TCR을 발현하는 T 세포의 안전성 프로파일이 변경되지 않았다. 인간 신장 상피 세포 (HREpC), 인간 신장 피질 상피 세포 (HRCEpC), 신장 근위세뇨관 상피 세포 (RPTEC), 정상 인간 폐 섬유모세포 (NHLF), 인간 조골세포 (HOB), 단핵구 (Mono), 미성숙 DC (iDC), 성숙한 DC (mDC), iCell 심근 세포2 (iCardio).

도 7: PD1-41BB는 PD-L1을 발현하는 종양 세포에 대한 반응으로 IFN- γ 의 특이적 방출을 증진시킨다.

(a) 종양 세포주 중의 PRAME-mRNA 발현 수준을 실시간 정량적 PCR에 의해 결정하고, 하우스키핑 유전자 GUSB에 대해 정규화하였다. (b) PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포를 상이한 수준으로 PRAME 및 PD-L1을 발현하는 다양한 적응증의 HLA-A*02:01 양성 종양 세포주와 함께 공동 배양하였다. PD-L1이 안정적으로 발현될 수 있도록 하기 위해, 일부 종양 세포에 PD-L1을 형질도입하였다 (TD). 추가로, 항체 염색 및 후속 유세포 분석법에 의한 분석을 통해 일부 세포주가 IFN- γ 처리시 유도성 (ind) PD-L1 발현을 보인 반면, 다른 세포주는 IFN- γ 처리가 없었을 때, 이미 어느 정도 수준으로 내인성 PD-L1 발현 (end)을 보이는 것으로 결정되었다. 비형질도입된 T 세포를 대조군으로 사용하였다. 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN- γ 농도를 결

정하였다. PD1-41BB의 공동 발현은 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 IFN- γ 의 방출을 증진시켰다.

도 8: PD1-41BB는 3차원 (3D) 종양 세포 스펜로이드에 대한 특이적인 세포독성 반응을 증진시킨다.

PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포를 상이한 수준의 PRAME 및 PD-L1을 발현하는 HLA-A*02:01 양성 종양 세포주로부터 유래된 3차원 (3D) 종양 세포 스펜로이드와 함께 공동 배양하였다. 종양 스펜로이드에 대한 세포독성은 인큐사이트 줌(Incucyte Zoom)® 또는 S3® 장치를 사용하여 20일 동안 적색 형광 손실에 의해 결정하였고, 이미지는 4시간마다 기록하였다. 3일, 7일, 10일, 13일 및 16일째에 신선한 종양 세포 스펜로이드를 공동 배양 플레이트로 옮겨 놓았다. 종양 세포에 반복적으로 노출되는 챌린지 환경에서 PD1-41BB의 발현은 T 세포의 이펙터 기능과 적합성에 유익한 효과를 나타낸다. 종양 세포 스펜로이드를 이용한 다회의 챌린지 과정에서 PD1-41BB 발현 이펙터 T 세포는 트랜스제닉 TCR만을 단독으로 발현하는 이펙터 T 세포에 비해 종양 세포 성장을 더욱 잘 제어할 수 있다.

도 9: PD1-41BB는 PD-L1을 발현하는 종양 세포에 대한 반응으로 TCR-트랜스제닉 T 세포의 증식을 증가시킨다.

PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포를 1:1의 이펙터 대 표적의 비로 상이한 수준의 PRAME 및 PD-L1을 발현하는 HLA-A*02:01 양성 종양 세포주와 함께 공동 배양하였다. 비형질도입된 T 세포를 대조군으로 사용하였다. 7일 후, 전체 세포 계수로부터 공동 배양에서 T 세포의 X배 확장을 계산하였다. PD1-41BB의 공동 발현은 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 증식 및/또는 생존을 증진시켰다.

도 10: PD1-41BB를 공동 발현하는 T 세포는 생체내에서 강력한 항종양 반응성을 나타낸다.

5×10^6 개의 PD-L1-트랜스제닉 MeIA375 종양 세포를 18마리의 면역결핍 (NOD/Shi-scid/IL-2R γ null) 마우스에 피하로 주사하였다. 1주 후, 마우스를 각각 마우스 6마리로 구성된 3개의 처리군으로 분배하였다. 마우스에 PD1-41BB가 존재하거나 (TCR_PD1-41BB) 또는 부재하는 (TCR) 10×10^6 개의 TCR 양성 세포 (전체 세포 16×10^6 개) 또는 동일한 양의 비형질도입된 T 세포 (UT)를 주사하였다. 종양 부피를 주 2-3회 측정하였다. PD1-41BB를 발현하는 이펙터 T 세포는 생체내에서 종양 세포 성장을 제어할 수 있는 반면, 오직 트랜스제닉 TCR만을 단독으로 발현하는 이펙터 T 세포는 비형질도입된 T 세포와 비교하여 효과를 거의 보이지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명을 바람직한 실시양태들 중 일부와 관련하여 상세하게 기술하기 전에, 하기의 일반적인 정의를 제공한다.
- [0032] 하기에서 예시적으로 설명된 바와 같은 본 발명은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들 없이 적합하게 실시될 수 있다.
- [0033] 본 발명은 특정 실시양태에 관하여 특정 도면을 참조하여 기술되겠지만, 본 발명은 이에 제한되지 않으며, 청구범위에 의해서만 제한된다.
- [0034] "포함하는(comprising)"이라는 용어가 본 설명 및 청구범위에서 사용되는 경우, 다른 요소를 배제하지 않는다. 본 발명의 목적을 위해, "~로 이루어진"이라는 용어는 "~으로 구성된"이라는 용어의 바람직한 실시양태로 간주된다. 이하, 그룹이 적어도 특정 수의 실시양태를 포함하는 것으로 정의되는 경우, 이는 또한 바람직하게는 이러한 실시양태만으로 이루어진 그룹을 개시하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0035] 본 발명의 목적을 위해, "수득된"이라는 용어는 "수득가능한"이라는 용어는의 바람직한 실시양태인 것으로 간주된다. 이하, 예컨대, 항체가 특정 공급원으로부터 수득가능한 것으로 정의될 경우, 이는 또한 상기 공급원으로부터 수득된 항체를 개시하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0036] 단수 명사를 언급할 때 단수 용어, 예컨대 "하나"가 사용되는 경우, 이는 특별히 다른 언급이 없는 한, 상기 명사의 복수를 포함한다. 본 발명의 맥락에서 "약" 또는 "대략"이라는 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 해당 특징의 기술적 효과를 여전히 보장하도록 이해하는 정확도의 차를 나타낸다. 상기 용어는 전형적으로 표시된 수치로부터 $\pm 10\%$, 바람직하게는 $\pm 5\%$ 의 편차를 나타낸다.
- [0037] 기술 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 그의 상식 또는 의미로 사용된다. 특정 용어에 특정한 의미가 전달되는 경우, 용어의 정의는 해당 용어가 사용되는 맥락에서 하기에 제공될 것이다.
- [0038] TCR 배경

- [0039] TCR은 상이한 별개의 두 단백질 쇠, 즉, TCR 알파 (α) 및 TCR 베타 (β) 쇠로 구성된다. TCR α 쇠는 가변 (V), 연결 (J) 및 불변 (C) 영역을 포함한다. TCR β 쇠는 가변 (V), 다양성 (D), 연결 (J) 및 불변 (C) 영역을 포함한다. TCR α 및 TCR β 쇠, 둘 모두의 재배열된 V(D)J 영역은 초가변 영역 (CDR, 상보성 결정 영역)을 함유하고, 그 중 CDR3 영역이 특정 에피토프 인식을 결정한다. TCR α 쇠 및 TCR β 쇠 둘 모두는 C-말단 영역에서 소수성 막횡단 도메인을 함유하고, 짧은 세포질 테일로 끝난다.
- [0040] 전형적으로, TCR은 하나의 α 쇠 및 하나의 β 쇠로 이루어진 이중이량체이다. 상기 이중이량체는 펩티드를 제시하는 MHC 분자에 결합할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 맥락에서, 용어 "가변 TCR α 영역" 또는 "TCR α 가변 쇠" 또는 "가변 도메인"은 TCR α 쇠의 가변 영역을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "가변 TCR β 영역" 또는 "TCR β 가변 쇠"는 TCR β 쇠의 가변 영역을 지칭한다.
- [0042] TCR 유전자좌 및 유전자는 국제 면역유전학(International Immunogenetics, IMGT) TCR 명명법을 사용하여 명명된다 (IMGT 데이터베이스(IMGT Database), [www. IMGT.org](http://www.IMGT.org); 문헌 [Giudicelli, V., et al. IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences, Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006). PMID: 16381979]; [T cell Receptor Factsbook, LeFranc and LeFranc, Academic Press ISBN 0-12-441352-8]).
- [0043] **표적**
- [0044] 키메라 공동 자극 수용체와 조합된 본원에서 제공되는 TCR은 유리하게는 (인간) PRAME로부터 유래된 펩티드 (서열식별번호 1)에 결합할 수 있다. 따라서, 상기 TCR은 PRAME-SLL로도 또한 명명되는, 서열식별번호 1에 제시된 PRAME 펩티드에 대해 특이적이다. 본 발명의 맥락에서 "~에 특이적"이라는 용어는 TCR이 표적에 특이적으로 결합한다는 것을 의미한다. MAPE (종양에서 우선적으로 발현되는 흑색종 항원) 및 OIP4 (OPA-상호작용 단백질 4)로도 또한 지칭되는, PRAME (흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원(Preferentially Expressed Antigen in Melanoma), Uniprot Acc. No. P78395)은 기능이 알려지지 않은 고환암 항원 (CTA)인 것으로 보고되었다. PRAME는 흑색종, 백혈병, 만성 골수성과 연관된 단백질 코딩 유전자이다. 이 유전자와 관련된 유전자 온톨로지 (Gene Ontology: GO) 주석에는 레티노산 수용체 결합이 포함된다. PRAME 단백질은 전사 리프레서로 기능하여 레티노산 수용체 RARA, RARB 및 RARG를 통한 레티노산의 신호 전달을 억제시킨다. 이는 레티노산에 의해 유발된 세포 증식, 분화 및 세포사멸의 정지를 방지한다.
- [0045] 특히, 본 발명은 키메라 공동 자극 수용체, 및 서열식별번호 1에 제시된 PRAME 아미노산 서열 내에 포함된 펩티드에 결합할 수 있는 TCR (표 1 참조)의 조합을 제공한다. "결합할 수 있는"이라는 용어는 상기 펩티드가 상기 TCR에 의해 특이적으로 결합되는 것을 의미한다. "특이적 결합(특이적으로 결합하는)"이라는 용어는 일반적으로 TCR이 그의 항원 결합 부위를 통해 무작위적이고, 관련되지 않은 비표적 항원보다는 그의 의도된 항원성 표적에 더 쉽게 결합한다는 것을 나타낸다. 특히, "특이적으로 결합한다"라는 용어는 그의 항원성 표적에 대한 TCR의 결합 특이성이 비표적 항원에 대한 그의 결합 특이성보다 적어도 약 5배, 바람직하게는 10배, 더욱 바람직하게는 25배, 더욱더 바람직하게는 50배, 가장 바람직하게는 100배 또는 그 초과로 더 클 것이라는 것을 나타낸다. 서열식별번호 1에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 PRAME 펩티드는 또한 본원에서 "항원성 표적" 또는 "SLL 펩티드"로도 지칭된다. 따라서, 서열식별번호 1에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 PRAME 펩티드는 본 발명의 TCR의 표적화된 에피토프이거나, 또는 이를 포함한다.
- [0046] 일반적으로 "에피토프"라는 용어는 결합 도메인이 인식하는 항원, 전형적으로 (폴리-)펩티드 상의 부위를 지칭한다. 그의 가장 넓은 의미에서 "결합 도메인"이라는 용어는 "항원 결합 부위"를 의미하고, 즉, 항원성 표적 상의 특이적인 에피토프와 결합/상호작용하는 분자의 도메인을 특징으로 한다. 항원성 표적은 단일 에피토프를 포함할 수 있지만, 전형적으로 적어도 2개의 에피토프를 포함하고, 항원의 크기, 입체형태 및 타입에 따라 임의 개수의 에피토프를 포함할 수 있다. 일반적으로 "에피토프"라는 용어는 선형 에피토프 및 입체형태적 에피토프를 포함한다. 선형 에피토프는 아미노산 1차 서열에 포함된 인접한 에피토프이고, 전형적으로 적어도 2개 이상의 아미노산을 포함한다. 입체형태적 에피토프는 표적 항원, 특히, 표적 (폴리-)펩티드의 폴딩에 의해 병치된 비인접한 아미노산에 의해 형성된다.
- [0047] 본 발명자들은 본 발명의 TCR에 의해 인식되는 최소 아미노산 서열이 PRAME의 아미노산 서열 (서열식별번호 1)에 상응한다는 것을 발견하였다. 구체적으로, 본 발명의 TCR은 첨부된 실시예에 제시된 바와 같이 아미노산 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1), 또는 그의 HLA-A2 결합된 형태를 포함하거나, 또는 이로 이루어진 아미노산 서

열을 (특이적으로) 인식하는 것으로 나타났다. 이러한 선택적 인식은 오직 몇 안 되는 고정 위치에서만 나타나는, TCR의 인식 모티프를 통해 얻을 수 있다. 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)의 아미노산 LLQ 및 특히 HLI는 이러한 인식 모티프의 일부이다.

[0048] 본 발명의 한 목적은

[0049] (A) - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 채, 및

[0050] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 채를 포함하는 PRAME 특이적 TCR; 및

[0051] (B) - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포외 도메인,

[0052] - 막횡단 도메인, 및

[0053] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 포함하는 세포를 제공하는 것이다.

[0054] **TCR 특이적 서열**

[0055] 따라서, 본 발명의 조합에서 사용된 TCR은

[0056] - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR α 채, 및

[0057] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 채를 포함하거나; 또는

[0058] 일부 실시양태에서, TCR은 TCR이 서열식별번호 8과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역 및 서열식별번호 9와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함하는 것을 포함한다.

[0059] 본원에서 사용되는 바, "적어도 80% 동일한," 특히 "적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는"이라는 것은 아미노산 서열이 기술된 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다는 것을 포함한다.

[0060] 다중 서열들 간의 동일성(%) 결정은 바람직하게 벡터 NTI 어드밴스™ 10(Vector NTI Advance™ 10) 프로그램 (인비트로젠 코퍼레이션(Invitrogen Corporation: 미국 캘리포니아주 칼즈배드))의 AlignX 응용프로그램을 사용하여 달성된다. 상기 프로그램은 수정된 Clustal W 알고리즘을 사용한다 ([Thompson et al., 1994. Nucl Acids Res. 22: pp. 4673-4680]; [Invitrogen Corporation; Vector NTI Advance™ 10 DNA and protein sequence analysis software. User's Manual, 2004, pp.389-662]). 동일성(%) 결정은 AlignX 응용프로그램의 표준 파라미터를 이용하여 수행된다.

[0061] 구체적인 실시양태에서, TCR은 서열식별번호 8의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역 및 서열식별번호 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함한다.

[0062] 실시예에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 TCR은 PRAME, 특히, PRAME 에피토프 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)에 특이적이고, 다른 에피토프 또는 항원에 대해서는 오직 매우 낮은 교차 반응성을 나타낸다.

[0063] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 TCR은 서열식별번호 10과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역 및 서열식별번호 11과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함한다.

[0064] 따라서, 더욱 구체적으로, 일부 실시양태에서, TCR은 서열식별번호 8과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 서열식별번호 9와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역, 서열식별번호 10과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역 및 서열식별번호 11과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함할 수 있다.

[0065] 더욱더 구체적인 실시양태에서, TCR은 서열식별번호 8의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 서열식별번호 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역, 서열식별번호 10의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역 및 서열식별번호 11의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함할 수 있다.

- [0066] 따라서, 구체적인 실시양태에서, TCR은 서열식별번호 24와 동일하거나, 또는 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 TCR α 채, 및 서열식별번호 22와 동일하거나, 또는 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 TCR β 채를 포함할 수 있다.
- [0067] **변형**
- [0068] 일부 실시양태에서, TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체의 아미노산 서열은 하나 이상의 표현형상의 침묵 치환을 포함할 수 있다.
- [0069] "표현형상의 침묵 치환"은 또한 "보존적 아미노산 치환"으로도 명명된다. "보존적 아미노산 치환"의 개념은 통상의 기술자에 의해 이해되고, 바람직하게는 양으로 하전된 잔기 (H, K, 및 R)를 코딩하는 코돈이 양으로 하전된 잔기를 코딩하는 코돈으로 치환되고, 음으로 하전된 잔기 (D 및 E)를 코딩하는 코돈은 음으로 하전된 잔기를 코딩하는 코돈으로 치환되고, 중성 극성 잔기 (C, G, N, Q, S, T, 및 Y)를 코딩하는 코돈은 중성 극성 잔기를 코딩하는 코돈으로 치환되며, 중성 비-극성 잔기 (A, F, I, L, M, P, V, 및 W)를 코딩하는 코돈은 중성 비-극성 잔기를 코딩하는 코돈으로 치환되는 것을 의미한다. 상기 변이는 자발적으로 발생하거나, 또는 무작위 돌연변이 유발에 의해 도입되거나, 또는 유도 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있다. 상기 변화는 상기 폴리펩티드의 본질적인 특성을 파괴하지 않고 이루어질 수 있다. 통상의 기술자는 상기 변이가 리간드 결합 능력을 실질적으로 감소시키거나, 또는 파괴하는지 여부를 결정하기 위해 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 변이체 아미노산 및/또는 그를 코딩하는 핵산을 용이하게 및 통상적으로 스크리닝할 수 있다.
- [0070] 통상의 기술자는 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산 또한 변형될 수 있다는 것을 이해한다. 전체 핵산 서열에서 유용한 변형은 서열의 코돈 최적화를 포함한다. 발현된 아미노산 서열 내에서 보존적 치환을 유도하는 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 변이는 기능에 영향을 미치지 않는 TCR 채의 아미노산 서열의 상보성 결정 및 비-상보성 결정 영역에서 이루어질 수 있다. 일반적으로, CDR3 영역에서는 부가 및 결실이 수행되지 않아야 한다.
- [0071] 본 발명의 일부 실시양태에 따라, TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체의 아미노산 서열은 검출가능한 표지, 치료제 또는 약동학적 변형 모이어티를 포함하도록 변형된다.
- [0072] 검출가능한 표지에 대한 비제한적인 예로는 방사성표지, 형광 표지, 핵산 프로브, 효소 및 조영제가 있다. TCR과 회합될 수 있는 치료제로는 방사성 화합물, 면역조절제, 효소 또는 화학요법제를 포함한다. 치료제는 화합물이 표적 부위에서 천천히 방출될 수 있도록 TCR에 연결된 리포솜에 의해 둘러싸일 수 있다. 이는 체내 수송 중 손상을 막고, 치료제, 예컨대, 독소가 관련 항원 제시 세포에 TCR이 결합된 후 최대 효과를 발휘하도록 할 것이다. 치료제의 다른 예로는 펩티드 세포독소, 즉, 예컨대, 리신, 디프테리아 독소, 슈도모나스 박테리아 외독소 A, DNase 및 RNase와 같은 포유동물 세포를 사멸시키는 능력을 갖는 단백질 또는 펩티드가 있다. 소분자 세포독성제, 즉, 분자량이 700 달톤 미만인, 포유동물 세포를 사멸시키는 능력을 갖는 화합물. 상기 화합물은 세포독성 효과를 가질 수 있는 독성 금속을 포함할 수 있다. 추가로, 상기 소분자 세포독성제는 또한 프로드럭, 즉, 생리학적 조건하에서 붕괴되거나, 또는 전환되어 세포독성제를 방출하는 화합물도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 상기와 같은 작용제로는 예를 들어, 도세탁셀, 젬시타빈, 시스플라틴, 메이탄신 유도체, 라첼마이신, 칼리키아미신, 에토포시드, 이포스파미드, 이리노테칸, 포르피머 소듐 포토프린 II, 테모졸로미드, 토포테칸, 트리메트렉세이트 글루코코네이트, 미토크산트론, 아우리스타틴 E, 빈크리스틴 및 독소루비신; 방사성핵종, 예컨대, 아이오딘 131, 레늄 186, 인듐 111, 이트륨 90. 비스무트 210 및 213, 악티늄 225 및 아스타틴 213을 포함할 수 있다. 방사성핵종의 TCR 또는 그의 유도체와의 회합은 예를 들어, 킬레이트제; 면역증진물질 (immunostimulant)로도 알려진 면역자극제, 즉, 면역 반응을 자극하는 면역 이펙터 분자에 의해 수행될 수 있다. 예시적인 면역자극제로는 시토카인, 예컨대 IL-2 및 IFN- γ , 항-T 세포 또는 NK 세포 결정기 항체 (예컨대, 항-CD3, 항-CD28 또는 항-CD16)를 비롯한, 항체 또는 그의 단편; 항체 유사 결합 특징을 갖는 대안적인 단백질 스캐폴드; 슈퍼항원, 즉, 폴리클로날 T 세포 활성화 및 대량의 시토카인 방출을 초래하는 T-세포의 비-특이적 활성화를 야기하는 항원 및 그의 돌연변이체; 케모카인, 예컨대, IL-8, 혈소판 인자 4, 흑색종 성장 자극 단백질 등, 보체 활성인자; 이중발생 단백질 도메인, 동종이계 단백질 도메인, 바이러스/박테리아 단백질 도메인, 바이러스/박테리아 펩티드가 있다.
- [0073] 치료제는 바람직하게 면역 이펙터 분자, 세포독성제 및 방사성핵종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는 면역 이펙터 분자는 시토카인이다.
- [0074] 약동학적 변형 모이어티는 예를 들어, 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 반복 단위, 적어도 하나의 글리콜 기,

적어도 하나의 시알릴 기, 또는 그의 조합일 수 있다. 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 반복 단위, 적어도 하나의 글리콜 기, 적어도 하나의 시알릴 기의 회합은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다수의 방식으로 야기될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 단위는 TCR에 공유결합으로 연결된다. 본 발명에 따른 TCR은 하나 또는 수 개의 약동학적 변형 모이어티에 의해 변형될 수 있다. 특히, 가용성 형태의 TCR은 하나 또는 수 개의 약동학적 변형 모이어티에 의해 변형된다. 약동학적 변형 모이어티는 치료제의 약동학적 프로파일에 유리한 변화, 예를 들어, 혈장 반감기의 개선, 면역원성의 감소 또는 증진 및 용해도 개선을 달성할 수 있다.

[0075] TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체는 예컨대, 면역원성 감소, 유체역학적 크기 (용액에서의 크기) 용해도 및/또는 (예컨대, 단백질의 가수 분해에 대한 보호 증진에 의한) 안정성 증가 및/또는 혈청 반감기의 연장을 위해 추가의 기능성 모이어티를 부착시킴으로써 변형될 수 있다.

[0076] 다른 유용한 기능성 모이어티 및 변형은 환자의 신체에서 본 발명의 TCR을 보유하는 이펙터 숙주 세포를 차단하는 데 사용될 수 있는 "자살" 또는 "안전 스위치"를 포함한다. 한 예로 문헌 [Gargett and Brown Front Pharmacol. 2014; 5: 235]에 기술되어 있는, 유도성 카스파제 9 (iCasp9) "안전 스위치"가 있다. 간략하면, 이펙터 숙주 세포는 널리 공지된 방법에 의해 이량체화가 예컨대, AP1903/CIP와 같은 소분자 이량체화제 약물에 의존하고, 변형된 이펙터 세포에서 아포토시스의 빠른 유도를 초래하는 카스파제 9 도메인을 발현하도록 변형된다. 상기 시스템은 예를 들어, EP2173869 (A2)에 기술되어 있다. 다른 "자살," 또는 "안전 스위치"에 대한 예는 예컨대, 단순 포진 바이러스(Herpes Simplex Virus) 티미딘 키나제 (HSV-TK), CD20의 발현, 및 항-CD20 항체 또는 myc 태그를 이용한 후속 고갈과 같이 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Kieback et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 15;105(2):623-8).

[0077] 글리코실화 패턴이 변경된 TCR 또한 본원에서 구상된다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이, 글리코실화 패턴은 아미노산 서열 (예컨대, 하기에서 논의되는, 특정 글리코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재) 및/또는 단백질이 생산되는 숙주 세포 또는 유기체에 따라 달라질 수 있다. 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결 중 하나이다. N-연결은 아스파라긴 잔기 측쇄에의 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭한다. 결합 분자의 N-연결 글리코실화 부위의 부가는 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)으로부터 선택되는 하나 이상의 트리-펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다. O-연결 글리코실화 부위는 출발 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 부가 또는 치환함으로써 도입될 수 있다.

[0078] TCR의 글리코실화의 또 다른 수단은 단백질에의 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 사용되는 커플링 모드에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복실 기, (c) 유리 술포히드릴 기, 예컨대, 시스테인의 것, (d) 유리 히드록실 기, 예컨대, 세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예컨대, 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것, 또는 (f) 글루탐인의 아마이드 기에 부착될 수 있다. 유사하게, 탈글리코실화 (즉, 결합 분자에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거)는 예컨대, 트리플루오로메탄술포산에 TCR을 노출시켜 화학적으로, 또는 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 이용하여 효소적으로 달성될 수 있다.

[0079] TCR, 특히, 가용성 형태의 본 발명의 TCR에 약물, 예컨대, 소분자 화합물을 첨가하는 것 또한 구상될 수 있다. 연결은 공유 결합 또는 예컨대, 정전기력과 같은 비공유 결합 상호작용을 통해 달성될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 다양한 링커들이 약물 접합체를 형성하기 위해 이용될 수 있다.

[0080] TCR, 특히, 가용성 형태의 본 발명의 TCR은 각 분자의 확인, 추적, 정제 및/또는 단리를 돕는 추가 도메인 (태그)을 도입하기 위해 추가로 변형될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, TCR α 쇄 또는 TCR β 쇄는 변형되어 에피토프 태그를 포함할 수 있다.

[0081] 에피토프 태그는 본 발명의 TCR에 포함될 수 있는 태그의 유용한 예이다. 에피토프 태그는 특정 항체의 결합을 허용하는 아미노산의 짧은 스트레치이고, 따라서, 가용성 TCR 또는 환자의 신체 내의 숙주 세포 또는 배양된 (숙주) 세포의 결합 및 이동의 확인과 추적을 가능하게 한다. 에피토프 태그, 및 따라서, 태그부착된 TCR의 검출은 다수의 상이한 기술을 이용하여 달성될 수 있다.

[0082] 태그는 추가로 상기 태그에 대해 특이적인 결합 분자 (항체)의 존재하에 세포를 배양하여 본 발명의 TCR을 보유하는 숙주 세포의 자극 및 확장에 이용될 수 있다.

[0083] 일반적으로, TCR은 일부 경우에 표적 항원과 TCR의 친화도 및 오프-속도를 변형시키는 다양한 돌연변이로 변형될 수 있다. 특히, 돌연변이는 친화도를 증가시킬 수 있고/거나, 오프-속도를 감소시킬 수 있다. 따라서, TCR

은 적어도 하나의 CDR 및 그의 가변 도메인 프레임워크 영역에서 돌연변이화될 수 있다.

- [0084] 그러나, 바람직한 실시양태에서, TCR의 CDR은 예컨대, 실시예의 TCR 수용체와 같이 변형 또는 시험관내 친화성 성숙이 이루어지지 않는다. 이는 CDR이 자연적으로 발생된 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 이는 시험관내 친화성 성숙이 TCR 분자에 대한 면역원성으로 이어질 수 있기 때문에 유리할 수 있다. 이는 치료 효과 및 치료를 감소시키거나, 또는 불활성화시키고/거나, 부작용을 유도하는 항-약물 항체의 생산으로 이어질 수 있다.
- [0085] 돌연변이는 하나 이상의 치환(들), 결실(들) 또는 삽입(들)일 수 있다. 상기 돌연변이는 예컨대, 예를 들어, 문헌 [Sambrook, Molecular Cloning - 4th Edition (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press]에 기술되어 있는 중합효소 연쇄 반응, 제한 효소 기반 클로닝, 라이게이션 비의존적 클로닝 절차와 같이, 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 도입될 수 있다.
- [0086] 이론적으로, 내인성 및 외인성 TCR 쌍 간의 쌍형성 오류에 기인하여 교차 반응성의 위험이 있는 예측불가의 TCR 특이성이 발생할 수 있다. TCR 서열의 쌍형성 오류를 피하기 위해, 제조된 TCR 서열은 수개의 상이한 형질도입된 TCR 쌍의 정확한 쌍형성을 효과적으로 증진시키는 것으로 밝혀진 기술로, 무연화되거나, 또는 최소로 무연화된 C α 및 C β 영역을 함유하도록 변형될 수 있다. TCR의 무연화 (즉, 인간 C α 및 C β 영역을 그의 무연 대응물로 교환)는 숙주 세포에서 TCR의 세포 표면 발현을 개선시키기 위해 통상적으로 적용되는 기술이다. 특정 이론에 제한되는 것을 바라지 않으면서, 무연화된 TCR은 CD3 공-수용체와 더욱 효과적으로 회합되고/거나; 우선적으로 서로 쌍을 형성하고, 원하는 항원 특이성의 TCR을 발현하도록 생체외에서 유전적으로 변형된 인간 T 세포 상의 혼합 TCR을 형성하는 경향이 더 작지만, 그의 "원래의" TCR을 여전히 보유하고, 발현하는 것으로 간주된다.
- [0087] 무연화된 TCR의 발현 개선을 담당하는 9개의 아미노산이 확인되었고 (Sommermeyer and Uckert, J Immunol. 2010 Jun 1; 184(11):6223-31), 그의 무연 대응 잔기에 대해 TCR α 및/또는 β 쌍 불변 영역에 있는 하나의 또는 모든 아미노산 잔기를 치환하는 것이 구상된다. 이러한 기술은 "최소 무연화"로도 지칭되고, 세포 표면 발현을 증진시키면서, 동시에 아미노산 서열에서 "외래" 아미노산 잔기의 수를 감소시키고, 이로써 면역원성의 위험을 감소시키는 이점을 제공한다.
- [0088] 일부 실시양태는 TCR α 쌍 및 TCR β 쌍이 링커 서열에 의해 연결되어 있는 단일 쌍 타입의 것인, 본원에 기술된 바와 같은 단리된 TCR에 관한 것이다.
- [0089] 적합한 단일 쌍 TCR 형태는 가변 TCR α 영역에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성되는 제1 세그먼트, TCR β 쌍 불변 영역 세포의 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된, 가변 TCR β 영역에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성되는 제2 세그먼트, 및 제1 세그먼트의 C 말단과 제2 세그먼트의 N 말단을 연결하는 링커 서열을 포함한다. 대안적으로, 제1 세그먼트는 TCR β 쌍 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성될 수 있고, 제2 세그먼트는 TCR α 쌍 불변 영역 세포의 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된, TCR α 쌍 가변 영역 서열에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성될 수 있다. 상기 단일 쌍 TCR은 제1 쌍과 제2 쌍 사이에 이황화 결합을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 링커 서열의 길이 및 이황화 결합의 위치는 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트의 가변 도메인 서열이 실질적으로 천연 T 세포 수용체에서와 같이 상호 배향되도록 하는 것이다. 더욱 구체적으로, 제1 세그먼트는 TCR α 쌍 불변 영역 세포의 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된, TCR α 쌍 가변 영역 서열에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성될 수 있고, 제2 세그먼트는 TCR β 쌍 불변 영역 세포의 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된, TCR β 쌍 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성될 수 있고, 이황화 결합은 제1 쌍과 제2 쌍 사이에 제공될 수 있다. 링커 서열은 TCR의 기능을 손상시키지 않는 임의의 서열일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 맥락에서, "기능성" TCR α 및/또는 β 쌍 융합 단백질은 적어도 실질적인 생물학적 활성을 유지하는, 예를 들어, 아미노산의 부가, 결실 또는 치환에 의해 변형된 TCR 또는 TCR 변이체를 의미하여야 한다. TCR의 α 쌍 및/또는 β 쌍의 경우에, 이는 두 쌍 모두 그의 생물학적 기능, 특히, 상기 TCR의 특정 펩티드-MHC 복합체와의 결합 및/또는 특정 펩티드:MHC 상호작용시 기능적 신호 전달을 나타내는 (비-변형된 α 쌍 및/또는 β 쌍, 또는 본 발명의 또 다른 융합 단백질 α 쌍 및/또는 β 쌍 중 하나를 갖는) TCR을 여전히 그대로 형성할 수 있다는 것을 의미하여야 한다.
- [0091] 구체적인 실시양태에서, TCR은 기능성 TCR α 쌍 및/또는 β 쌍 융합 단백질이 되도록 변형될 수 있고, 여기서 상기 에피토프-태그 길이는 6 내지 15개의 아미노산, 바람직하게는 9 내지 11개의 아미노산 길이이다. 또 다른 실시양태에서, TCR은 기능성 T-세포 수용체 (TCR) α 쌍 및/또는 β 쌍 융합 단백질이 되도록 변형될 수 있고,

여기서 상기 TCR α 쇄 및/또는 β 쇄 융합 단백질은 이격되거나, 또는 일직선으로 직렬로 된 2개 이상의 에피토프-태그를 포함한다. 융합 단백질의 실시양태는 융합 단백질이 그의 생물학적 활성/활성들을 유지하는 ("기능적인") 한, 2, 3, 4, 5개 또는 훨씬 더 많은 에피토프-태그를 함유할 수 있다.

[0092] 본 발명에 따른 기능성 (TCR α 쇄 및/또는 β 쇄 융합 단백질이 바람직하고, 여기서 상기 에피토프-태그는 제한하는 것은 아니지만, CD20 또는 Her2/neu 태그, 또는 다른 통상적인 태그, 예컨대, myc-태그, FLAG-태그, T7-태그, HA (헤마글루티닌)-태그, His-태그, S-태그, GST-태그 또는 GFP-태그로부터 선택된다. myc, T7, GST, GFP 태그는 기존 분자에서 유래한 에피토프이다. 그에 반해, FLAG는 높은 항원성을 위해 디자인된 합성 에피토프 태그이다 (예컨대, 미국 특허 번호 4,703,004 및 4,851,341 참조). myc 태그는 고품질의 시약이 그의 검출을 위해 사용하는 데 이용가능한 바, 바람직하게 사용될 수 있다. 에피토프 태그는 물론 항체에 의한 인식을 넘어서 하나 이상의 추가 기능을 가질 수 있다. 상기 태그의 서열들이 문헌에 기술되어 있으며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0093] 키메라 공동 자극 수용체

[0094] PRAME 특이적 TCR과 조합하여 사용되는 키메라 공동 자극 수용체는

[0095] - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포외 도메인,

[0096] - 막횡단 도메인, 및

[0097] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0098] 본원에서 PRAME 특이적 TCR과 조합하여 사용되는 키메라 공동 자극 수용체는 특히 PD-1 (예컨대, 인간 PD-1)로부터 유래된 세포외 도메인을 함유하는 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 맥락에서, "~로부터 유래된"이라는 용어는 특히 세포외 도메인에 함유된 폴리펩티드가 PD-1 (예컨대, 인간 PD-1)의 적어도 일부, 바람직하게, 각각 PD-1의 세포외 도메인을 포함한다는 것을 의미한다. PD-1로부터 유래된 세포외 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체는 PD-L1, PD-L2 또는 PD-1의 다른 억제성 리간드에 대한 결합 활성을 갖는다. 본원에서 사용되는 바, PD-1"로부터 유래된"이라는 용어는 또한 PD-1 (예컨대, 인간 PD-1)의 천연 서열 또는 그의 일부 (예컨대, 세포외 도메인)와 비교하여 최대 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과인 아미노산이 치환, 결실 및/또는 삽입되는 것을 허용한다.

[0099] 한 실시양태에서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포외 도메인은 서열식별번호 28에 제시된 서열, 또는 서열식별번호 28과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포외 도메인은 서열식별번호 28에 제시된 서열을 포함한다.

[0100] 본 발명의 한 실시양태에서, 키메라 공동 자극 수용체는 인간 또는 무인 PD-1의 세포외 도메인의 아미노산 서열, 예컨대, 서열식별번호 28에 제시된 인간 PD-1과 비교하여 최대 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 치환 (바람직하게, 보존적 또는 고도로 보존적 치환), 결실 및/또는 삽입을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0101] 본원에서 PRAME 특이적 TCR과 조합하여 사용되는 키메라 공동 자극 수용체는 세포외 도메인과 세포내 도메인 사이에 작동가능하게 연결된 막횡단 도메인을 추가로 포함한다. 일반적으로, 막횡단 도메인은 특정 막횡단 도메인으로 제한되지 않는다. 바람직하게, 막횡단 도메인은 융합 단백질을 발현하는 세포 (예컨대, T 세포)의 막에서 융합 단백질의 안정적인 고정을 허용하고, 추가로 각각 PD-L1에의 세포외 도메인의 결합을 허용하고, PD-L1에의 결합 시, 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인으로의 신호 전달을 허용한다.

[0102] 바람직한 실시양태에서, 키메라 공동 자극 수용체의 막횡단 도메인은 PD-1로부터 유래된 막횡단 도메인이다. 한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열식별번호 30에 제시된 서열, 또는 서열식별번호 30과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 막횡단 도메인은 서열식별번호 30에 제시된 서열을 포함한다.

[0103] 본원에서 PRAME 특이적 TCR과 조합하여 사용되는 키메라 공동 자극 수용체는 특히 4-1BB (이는 또한 "41BB"로도 명명)로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인, 바람직하게, 4-1BB (예컨대, 인간 4-1BB)의 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 맥락에서, "~로부터 유래된"이라는 용어는 특히 세포내 도메인에 함유된 폴리펩티드가 4-1BB (예컨대, 인간 4-1BB)의 적어도 일부, 바람직하게, 각각 4-1BB의 세포내 도메인을 포함한다는 것을 의미한다. 4-1BB로부터 유래된 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체는 PD-L1, PD-L2 또는 PD-1의 또 다른 억제성 리간드에 의한 자극시, 키메라 공동 자극 수용체를 발현하지 않는 상응하는 T 세포와 비

교하여, 상기 키메라 공동 자극 수용체를 발현하는 T 세포의 증식률을 증가시킬 수 있고/거나, T 세포의 이펙터 기능을 증가시킬 수 있다 (예컨대, IFN- γ 방출 증가 및/또는 세포독성 증가). 본원에서 사용되는 바, 4-1BB"로부터 유래된"이라는 용어는 또한 4-1BB (인간 또는 뮤린, 바람직하게, 인간 4-1BB)의 천연 서열 또는 그 일부 (예컨대, 세포내 도메인)와 비교하여 최대 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과인 아미노산이 치환, 결실 및/또는 삽입되는 것을 허용한다. 한 실시양태에서, 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인은 서열식별번호 32에 제시된 서열, 또는 서열식별번호 32와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인은 서열식별번호 32에 제시된 서열을 포함한다.

[0104] 본원에서 사용되는 바, "적어도 80% 동일한," 특히 "적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는"이라는 것은 아미노산 서열이 기술된 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다는 것을 포함한다.

[0105] 다중 서열들 간의 동일성(%) 결정은 바람직하게 벡터 NTI 어드밴스™ 10 프로그램 (인비트로젠 코퍼레이션: 미국 캘리포니아주 칼즈배드)의 AlignX 응용프로그램을 사용하여 달성된다. 상기 프로그램은 수정된 Clustal W 알고리즘을 사용한다 ([Thompson et al., 1994. Nucl Acids Res. 22: pp. 4673-4680]; [Invitrogen Corporation; Vector NTI Advance™ 10 DNA and protein sequence analysis software. User's Manual, 2004, pp.389-662]). 동일성(%) 결정은 AlignX 응용프로그램의 표준 파라미터를 이용하여 수행된다.

[0106] **핵산, 핵산 조성물 및 벡터**

[0107] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기술된 PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0108] PRAME 특이적 TCR의 관련 영역 및 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 표 1에 제시되어 있다:

펩티드 seq. SEQ ID NO	뉴클레오티드 seq. SEQ ID NO	설명
2	12	TCR1 α 채 CDR1
3	13	TCR1 α 채 CDR2
4	14	TCR1 α 채 CDR3
5	15	TCR1 β 채 CDR1
6	16	TCR1 β 채 CDR2
7	17	TCR1 β 채 CDR3
8	18	TCR1 α 채 가변 영역
9	19	TCR1 β 채 가변 영역
10	20	TCR α 채 불변 영역
11	21	TCR β 채 불변 영역
22	23	TCR β 가변 채
24	25	TCR α 가변 채

[0109]

[0110] 표 1

[0111] 키메라 공동 자극 수용체의 관련 영역 및 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 표 2에 제시되어 있다:

펩티드 seq. SEQ ID NO	뉴클레오타이드 seq. SEQ ID NO	설명
26	27	PD-1 세포외 도메인, PD-1 막횡단 도메인 및 4-1BB 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체
28	29	PD-1 세포외 도메인
30	31	PD-1 막횡단 도메인
32	33	4-1BB 세포내 도메인

[0112]

[0113]

표 2

[0114]

"핵산 분자"는 일반적으로 천연 공급원으로부터 합성되거나, 수득된 (예컨대, 단리 및/또는 정제된) 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, 비변형된 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 사이에서 발견되는 포스포디에스테르 대신, 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오타이드간 연결, 예컨대, 포스포로아미데이트 연결 또는 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있는, DNA 또는 RNA의 중합체를 의미한다. 바람직하게는 본원에 기술된 핵산은 재조합 핵산이다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "재조합"은 (i) 살아있는 세포에서 복제할 수 있는 핵산 분자에 천연 또는 합성 핵산 세그먼트를 연결하여 살아있는 세포 외부에서 구축된 분자, 또는 (ii) 상기 (i)에 기술된 것의 복제로 생성된 분자를 지칭한다. 본원에서의 목적을 위해, 복제는 시험관내 복제 또는 생체내 복제일 수 있다. 핵산은 관련 기술분야에 공지되거나, 또는 상업적으로 이용가능한 (예컨대, 진스크립트(Genscript), 써모 피셔(Thermo Fisher) 및 유사 회사) 절차를 이용하여 화학적 합성 및/또는 효소적 라이게이션 반응에 기초하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al.]을 참조한다. 핵산은 자연적으로 발생된 뉴클레오타이드, 또는 분자의 생물학적 안정성을 증가시키기 위해 또는 하이브리드화시 형성되는 이중체의 물리적 안정성을 증가시키기 위해 (예컨대, 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘 치환 뉴클레오타이드) 디자인된 다양하게 변형된 뉴클레오타이드 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. 2001] 참조)를 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 핵산은 재조합 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체, 폴리펩티드 또는 단백질 또는 그의 기능성 부분 또는 기능성 변이체 중 어느 것을 코딩하는 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0115]

예를 들어, 본 개시내용 또한 변이체 핵산이 본원에 기술된 TCR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 단리된 또는 정제된 핵산의 변이체를 제공한다. 상기 변이체 뉴클레오타이드 서열은 PRAME, 특히, PRAME 에피토프 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)을 특이적으로 인식하는 기능성 TCR을 코딩한다.

[0116]

예를 들어, 본 개시내용은 또한 변이체 핵산이 본원에 기술된 키메라 공동 자극 수용체와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 단리 또는 정제된 핵산의 변이체를 제공한다. 상기 변이체 뉴클레오타이드 서열은 본원에 기술된 바와 같은 기능성 키메라 공동 자극 수용체를 코딩한다.

[0117]

본원의 다른 곳에서 이미 기술된 바와 같이, TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산은 변형될 수 있다. 전체 핵산 서열에서 유용한 변형은 코돈 최적화일 수 있다. 번역된 아미노산 서열 내에서 보존적 치환을 유도하는 변경이 이루어질 수 있다. TCR과 관련하여, 이러한 변이는 기능에 영향을 미치지 않는 TCR쇄의 아미노산 서열의 상보성 결정 및 비-상보성 결정 영역에서 이루어질 수 있다. 일반적으로, CDR3 영역에서는 부가 및 결실이 수행되지 않아야 한다.

[0118]

또 다른 실시양태는 본원에 기술된 바와 같은 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0119]

벡터는 바람직하게 플라스미드, 셔플 벡터, 파지미드, 코스미드, 발현 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 유전자 요법에서 사용되는 입자 및/또는 벡터이다.

[0120]

"벡터"는 코딩된 폴리펩티드의 합성이 일어날 수 있는 적합한 숙주 세포 내로 핵산 서열을 운반할 수 있는 임의

의 분자 또는 조성물이다. 전형적으로, 및 바람직하게는 벡터는 관련 기술분야에 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 원하는 핵산 서열 (예컨대, 본 발명의 핵산)을 포함하도록 조작된 핵산이다. 벡터는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있고/거나, 리포솜 및 바이러스 입자를 포함한다. 벡터는 플라스미드, 서플 벡터, 파지미드, 코스미드, 발현 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 유전자 요법에서 사용되는 입자 및/또는 벡터일 수 있다. 벡터는 숙주 세포에서 복제를 허용하는 핵산 서열, 예컨대, 복제 기점을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 이상의 선별가능한 마커 유전자 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 유전적 요소를 포함할 수 있다. 벡터는 바람직하게는 본 발명에 따른 핵산의 발현을 허용하는 서열에 작동가능하게 연결된 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터이다.

[0121] 바람직하게는 벡터는 발현 벡터이다. 더욱 바람직하게는 벡터는 레트로바이러스, 더욱 구체적으로, γ -레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터이다.

[0122] 통상의 기술자는 키메라 공동 자극 수용체 서열 및 TCR α 및 TCR- β 채 서열이 하나의 핵산, 예컨대, 하나의 벡터에 포함될 수 있다는 것을 이해한다. 이러한 경우, (문헌 [Szymczak et al.: Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors]에 기술된 바와 같이) 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열, 또는 돼지 테스코바이러스로부터 유래된 2A 펩티드 서열 (P2A) 또는 다른 종으로부터 유래된 2A 펩티드 서열, 예컨대, 토세아 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus) 2A 펩티드 (T2A) 또는 구제역 바이러스 2A 펩티드 (F2A)와 연결되고, 그 결과로 형질도입된 세포 내에서 바이러스 프로모터의 제어하에 단일 메신저 RNA (mRNA) 분자를 발현한다.

[0123] 구체적인 실시양태에서, 세포는 본원에 기술된 바와 같은 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.

[0124] "형질감염" 및 "형질도입"이라는 용어는 상호교환적이고, 외인성 핵산 서열이 숙주 세포, 예컨대, 진핵 숙주 세포에 도입되는 프로세스를 지칭한다. 핵산 서열의 도입 또는 전달은 언급된 방법으로 제한되지 않고, 전기천공법, 미세주사법, 유전자 총 전달법, 리포펙션, 슈퍼펙션, 및 레트로바이러스, 또는 형질도입 또는 형질감염에 적합한 다른 바이러스에 의한 언급된 감염을 비롯한, 다수의 임의의 수단으로 달성될 수 있다는 점에 유의한다. TCR의 클로닝 및 외인적 발현 방법은 예를 들어, 문헌 [Engels et al. (Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. Cancer Cell, 23(4), 516-26. 2013)]에 기술되어 있다. 렌티바이러스 벡터로의 1차 인간 T 세포의 형질도입은 예를 들어, 문헌 [Cribbs "simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells" BMC Biotechnol. 2013; 13: 98]에 기술되어 있다.

[0125] 본원에 기술되고, 제공된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는, 본 발명과 관련하여 기술되고, 제공된 세포는 바람직하게 본 발명의 PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 안정적으로 또는 일시적으로 (예컨대, 안정적으로) (구성적으로 또는 조건부로) 발현할 수 있다. 숙주 세포는 일반적으로 임의의 적합한 핵산 분자 또는 벡터를 사용하여 임의의 방법에 의해 형질도입되거나, 또는 형질전환될 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 상기 기술된 바와 같이 본 발명의 융합 단백질 또는 그의 일부 (예컨대, ECD, TMD, 및/또는 ICD)를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 (예컨대, 레트로바이러스) 벡터로 형질도입된다.

[0126] 일부 실시양태에서, 세포는 말초 혈액 림프구 (PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 세포는 자연 살해 세포, 또는 T 세포일 수 있다. 바람직하게는 세포는 T 세포이다. T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 줄기 세포 유사 기억 T 세포이다.

[0127] 줄기 세포 유사 기억 T 세포 (TSCM)는 CD8+ 또는 CD4+ T 세포의 덜 분화된 서브집단으로, 이는 자가 재생 능력 및 장기간 지속 능력을 특징으로 한다. 일단 상기 세포는 생체내에서 그의 항원을 만나면, 중앙 기억 T 세포 (TCM), 이펙터 기억 T 세포 (TEM) 및 일부 TSCM은 진행이 중단된 상태 그대로 남아있는 최종적으로 분화된 이펙터 기억 T 세포 (TEMRA)로 추가로 분화한다 (Flynn et al., Clinical & Translational Immunology (2014). 상기의 남아있는 TSCM 세포는 생체내에서 지속가능한 면역학적 기억을 구축하는 능력을 나타내고, 따라서, 입양 T 세포 요법에 중요한 T 세포 서브집단으로 간주된다 (Lugli et al., Nature Protocols 8, 33-42 (2013) Gattinoni et al., Nat. Med. 2011 Oct; 17(10): 1290-1297). T 세포 풀을 줄기 세포 기억 T 세포 서브타입으로 한정하기 위해 면역-자기 선별이 사용될 수 있다. 문헌 [Riddell et al. 2014, Cancer Journal 20(2): 141-44]를 참조한다.

[0128] **제약 조성물, 의학적 치료 및 키트**

- [0129] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기술된 바와 같은 PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 포함하거나, 또는 상기 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 세포, 본원에 기술된 바와 같은 PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산, PRAME 특이적 TCR을 코딩하는 핵산 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물, 상응하는 벡터를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0130] 상기 본 발명의 활성 성분은 바람직하게는 상기 제약 조성물에서 허용되는 담체 또는 담체 물질과 혼합된 용량으로 사용되어 질환을 치료하거나, 또는 적어도 완화시킬 수 있다. 상기 조성물은 (활성 성분 및 담체에 추가하여) 충전 물질, 염, 완충제, 안정제, 가용화제 및 최신 기술로 알려진 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0131] "제약상 허용되는"이라는 용어는 활성 성분의 생물학적 활성의 효능을 방해하지 않는 비독성 물질로 정의된다. 담체의 선택은 적용에 따라 달라진다.
- [0132] 제약 조성물은 활성 성분의 활성을 증강시키거나, 또는 치료를 보충하는 추가 성분을 함유할 수 있다. 상기 추가 성분 및/또는 인자는 시너지 효과를 달성하거나, 또는 부작용 또는 원하지 않는 효과를 최소화하는 제약 조성물의 일부일 수 있다.
- [0133] 본 발명의 활성 성분의 제제화 또는 제조 및 적용/약물 치료를 위한 기술은 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA] 최신판에 공개되어 있다. 적절한 적용은 비경구적 적용, 예를 들어, 근육내, 피하, 골수내 주사 뿐만 아니라, 척수강내, 직접 심실내, 정맥내, 결절내, 복강내 또는 종양내 주사이다. 정맥내 주사는 환자에게 바람직한 치료이다.
- [0134] 바람직한 실시양태에 따라, 제약 조성물은 주입 또는 주사에 의한다.
- [0135] 주사가 가능한 조성물은 적어도 하나의 활성 성분, 예컨대, PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 포함하는 확장된 T 세포 집단 (예를 들어, 치료하고자 하는 환자에 대해 자가 또는 동종이계)을 포함하는 제약상 허용되는 유체 조성물이다. 활성 성분은 일반적으로 생리학적으로 허용되는 담체에 용해되거나, 또는 현탁되고, 조성물은 소량의 하나 이상의 비-독성 보조 물질, 예컨대, 유화제, 보존제 및 pH 완충화제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 융합 단백질과 함께 사용하기에 유용한 상기 주사가 가능한 조성물이 통상적이며; 적절한 제제는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0136] 전형적으로, 제약 조성물은 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체를 포함한다.
- [0137] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 세포, 본원에 기술된 바와 같은 조성물, 본원에 기술된 바와 같은 핵산, 및/또는 본원에 기술된 바와 같은 벡터에 관한 것이다.
- [0138] 일부 실시양태는 암 치료에서 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 세포, 본원에 기술된 바와 같은 조성물, 본원에 기술된 바와 같은 핵산, 및/또는 본원에 기술된 바와 같은 벡터에 관한 것이다.
- [0139] 한 실시양태에서, 암은 혈액암 또는 고형 종양이다.
- [0140] 혈액암은 또한 고형 종양을 형성하지 않는 바, 이로써, 신체에 분산되는 혈액 암으로도 명명된다. 혈액암의 예로는 백혈병, 림프종 또는 다발성 골수종이 있다. 고형 종양에는 육종과 암종의 두 가지 주요 유형이 있다. 육종은 예를 들어, 혈관, 뼈, 지방 조직, 인대, 림프관, 근육 또는 힘줄의 종양이다. 구체적인 실시양태에서, 암은 고형 종양이다.
- [0141] 한 실시양태에서, 암은 전립선암, 자궁암, 갑상선암, 고환암, 신장암, 췌장암, 난소암, 식도암, 비소세포 폐암, 폐 선암종, 편평 세포 암종, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 흑색종, 간세포 암종, 두부경부암, 위암, 자궁내막암, 자궁경부암, 결장직장암, 위 선암종, 담관암종, 유방암, 방광암, 골수성 백혈병 및 급성 림프모구성 백혈병, 암종, 육종 또는 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0142] 본원에 기술된 바와 같은 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 공지된 기술에 따른 입양 면역요법을 위한 방법 및 조성물, 또는 본 개시내용에 기초하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 그의 변형에 사용될 수 있다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 세포는 먼저 세포를 그의 배양 배지로부터 수확한 후, 이어서, 세포를 치료 유효량으로 투여에 적합한 배지 및 용기 시스템 ("제약상 허용되는" 담체)에서 세척 및 농축시킴으로써 제제화된다. 적합한 주입 매질은 임의의 등장성 매질 제제일 수 있고, 전형적으로, 생리 식염수, 노르모솔 R(Normosol R) (애보트

(Abbott)) 또는 플라즈마-라이트 A(Plasma-Lyte A) (박스터(Baxter))일 수 있지만, 물 중 5% 텍스트로스 또는 링거 락테이트(Ringer's lactate)도 이용될 수 있다. 주입 매질은 인간 혈청 알부민으로 보충될 수 있다.

[0144] 효과적인 치료를 위한 조성물 중의 세포수는 전형적으로 10개 초과인 세포 및 최대 10^6 개, 최대 10^8 또는 10^9 개의 세포 (및 10^8 또는 10^9 개의 세포 포함)이고, 10^{10} 개 초과인 세포일 수 있다. 세포수는 조성물에 포함된 세포의 유형과 같이 조성물이 의도하는 최종 용도에 따라 달라질 것이다. 본원에서 제공하는 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1 L 이하의 부피이고, 500 ml 이하, 심지어 250 ml 또는 100 ml 이하일 수 있다. 따라서, 바람직한 세포의 밀도는 전형적으로 10^6 개 초과인 세포/ml이고, 일반적으로, 10^7 개 초과인 세포/ml, 일반적으로, 10^8 개 이상의 세포/ml이다. 누적하여 10^9 , 10^{10} 또는 10^{11} 개 이상의 세포로 임상적으로 적절한 개수의 면역 세포를 다회 주입물에 배분할 수 있다. 본원에서 제공하는 제약 조성물은 다양한 형태, 예컨대, 고형, 액체, 분말, 수성 또는 동결건조 형태일 수 있다. 적합한 제약 담체의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 상기 담체 및/또는 첨가제는 종래 방법으로 제제화될 수 있고, 적합한 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 안정화제, 예컨대, 지질, 뉴클레아제 억제제, 중합체 및 킬레이트제가 체내에서의 분해로부터 조성물을 보존할 수 있다. 주사에 의해 투여되는 것으로 의도되는 조성물에는, 계면활성제, 보존제, 습윤화제, 분산화제, 현탁화제, 완충제, 안정제 및 등장화제 중 하나 이상의 것이 포함될 수 있다.

[0145] 본원에서 제공된 PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 바이러스 벡터 입자가 키트로서 패키징될 수 있다. 키트는 임의적으로 예컨대, 사용 지침서, 장치 및 추가의 시약과 같은 하나 이상의 구성 요소 및 예컨대, 튜브, 용기 및 시린지와 같은 방법의 실시를 위한 구성 요소를 포함할 수 있다. 예시적인 키트는 본원에서 제공된 재조합 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산, 재조합 폴리펩티드, 또는 바이러스를 포함할 수 있고, 임의적으로 사용 지침서, 대상체에서 바이러스를 검출하기 위한 장치, 대상체에게 조성물을 투여하기 위한 장치 및 대상체에게 조성물을 투여하기 위한 장치를 포함할 수 있다.

[0146] PRAME 특이적 TCR 및 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 키트 또한 본원에서 고려된다. 관심 서열 (예컨대, 재조합 TCR) 및 임의적으로, 면역 체크포인트 억제제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 코딩하는 바이러스 벡터를 포함하는 키트 또한 본 발명에서 고려된다.

[0147] 본 발명에서 고려되는 키트는 또한 본원에 개시된 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체 중 어느 하나 이상의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하기 위한 방법을 수행하기 위한 키트를 포함한다. 특히, 상기 진단 키트는 본원에 개시된 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 검출하기 위해 딥 시퀀싱을 수행하기 위한 적절한 증폭 및 검출 프라이머 및 다른 연관된 시약의 세트를 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 본원의 키트는 본원에 개시된 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체를 검출하기 위한 시약, 예컨대, 항체 또는 다른 결합 분자를 포함할 수 있다. 진단 키트는 또한 본원에 개시된 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 존재를 결정하거나, 또는 본원에 개시된 TCR 및/또는 키메라 공동 자극 수용체의 존재를 결정하기 위한 지침서를 함유할 수 있다. 키트는 또한 지침서를 함유할 수 있다. 지침서는 전형적으로 키트에 포함된 구성 요소를 설명하는 명백한 표현 및 대상체의 적절한 상태, 적절한 투여량 및 적절한 투여 방법을 결정하는 방법을 포함하는 투여 방법을 포함한다. 지침서는 또한 치료 시간 기간에 걸쳐 대상체를 모니터링하는 것에 관한 가이드를 포함할 수 있다.

[0148] 본원에 제공된 키트는 또한 본원에 기술된 조성물을 대상체에게 투여하기 위한 장치를 포함할 수 있다. 약물 또는 백신을 투여하기 위해 관련 기술분야에 공지된 임의의 다양한 장치가 본원에 제공된 키트에 포함될 수 있다. 예시적인 장치는 피하 주사 바늘, 정맥내 바늘, 카테터, 바늘이 없는 주사 장치, 흡입기 및 예컨대, 점안기와 같은 액체 분배기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, 키트의 바이러스를 투여하기 위한 장치는 키트의 바이러스와 양립가능할 것이며; 예를 들어, 고압 주사 장치와 같은 바늘이 없는 주사 장치는 고압 주사에 의해 손상되지 않은 바이러스를 갖는 키트에는 포함될 수 있지만, 고압 주사에 의해 손상되는 바이러스를 갖는 키트에는 전형적으로 포함되지 않는다.

[0149] 실험

[0150] 실시예 1: PD1-41BB의 공동 발현이 TCR 발현 수준을 변화시키지는 않는다.

[0151] 트랜스제닉 TCR T23.8-2.1-027-004 (= TCR) 및 PD1-41BB와 조합된 TCR (= TCR_PD1-41BB)의 시험 및 특징화를 위한 이펙터 T 세포를 제조하기 위해, CD8+ T 세포를 건강한 공여자로부터 분리시키고, IL-7 및 IL-15의 존재하

에 CD3/CD28 항체로 활성화시켰다. 활성화된 세포에 TCR의 서열 또는 PD1-41BB에 커플링된 TCR 서열을 포함하는 레트로바이러스 입자를 형질도입하였다. 동일한 방식으로 제조된 비형질도입된 (= UT) CD8+ T 세포를 대조군으로 사용하였다. 14일째 TCR-β 채 (TRBV09) 및 PD-1의 항체 염색 및 유세포 분석법에 의한 후속 분석에 의해 트랜스진의 형질도입 효율 및 발현 수준을 결정하였다.

[0152] 분석 결과, 두 구축물 TCR (90.2%) 및 TCR_PD1-41BB (82%), 둘 모두에 높은 형질도입률을 달성할 수 있다는 것이 입증된다 (도 1). PD-1 발현은 비형질도입된 (UT) 이펙터 T 세포 및 TCR-형질도입된 이펙터 T 세포에서는 검출될 수 없다. 그러나, TCR_PD1-41BB-형질도입된 T 세포에의 PD-1 항체의 결합은 트랜스제닉 TCR의 발현과 상관관계가 있는 PD1-41BB의 높은 발현 수준을 나타낸다. PD-41BB의 공동 발현은 트랜스제닉 TCR만을 발현하는 이펙터 T 세포에서 측정된 것과 유사한 TCR 발현 수준을 초래한다. 이는 PD1-41BB 스위치 수용체 및 트랜스제닉 TCR의 공동 발현이 T 세포에서 실현가능하고, 세포 표면에서 등물로 발현된다는 것을 입증한다.

[0153] **실시예 2: TCR-트랜스제닉 T 세포의 기능적 결합력이 PD1-41BB의 공동 발현에 의해 변경되지 않는다.**

[0154] 기능적 결합력은 예컨대, 트랜스제닉 TCR 및 펩티드-MHC 복합체와 같은 개별 비공유 결합 상호작용의 다중 친화성의 축적된 강도를 지칭한다. 따라서, 이펙터 T 세포의 기능적 결합력은 펩티드 감수성의 척도 역할을 한다. 높은 펩티드 감수성을 부여하는 TCR은 더 적은 양의 펩티드를 인식할 수 있다. PD1-41BB 수용체의 공동 발현이 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포의 펩티드 감수성에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해, 필요한 HLA (HLA-A2:01) 둘 모두를 보유하고, PD1-41BB와의 라이게이션을 허용하도록 PD-L1을 과다발현하는 PD-L1-트랜스제닉 T2 세포 (T2_PD-L1)와 함께 공동 배양하였다.

[0155] T2_PD-L1 세포에 적정량의 SLLHLIGL (SLL)-펩티드 (10^{-5} M 내지 10^{-10} M)를 로딩하고, 트랜스제닉 TCR을 발현하지 않거나 (UT), 트랜스제닉 TCR만을 발현하거나 (TCR), 또는 1:1인 E:T로 TCR 및 PD1-41BB의 조합 (TCR_PD1-41BB)을 발현하는 이펙터 T 세포 (20,000개의 세포)와 함께 공동 배양하였다. 공동 배양 후 20 h째에 IFN-γ ELISA를 수행하였고, 이는 T2_PD-L1 세포에 의해 제시되는 상이한 펩티드 농도로 챌린지되었을 때, 이펙터 T 세포의 반응성을 평가하는 역할을 하였다 (도 2). 최대 IFN-γ 방출의 절반은 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포의 기능적 결합력에 대한 척도로서의 역할을 한다. 좌측 그래프에는 절대 IFN-γ 수준이 도시되어 있고, 우측 그래프는 계산된 상대값의 비선형 회귀 곡선을 보여주는 것이다. 절대 IFN-γ 값을 통해 제시된 바와 같이, 트랜스제닉 TCR만을 발현하는 이펙터와 비교하여 PD1-41BB의 공동 발현이 T 세포에 의해 분비되는 IFN-γ의 총량을 증가시킨다. 그러나, 비선형 회귀 곡선은 전체 기능적 결합력이 PD1-41BB 발현과 관계없이 유사하다는 것을 입증한다. 따라서, TCR-트랜스제닉 T 세포의 펩티드 감수성은 심지어 리간드 PD-L1이 존재하는 경우에도 PD1-41BB 스위치 수용체의 공동 발현에 의해 변경되지 않는다.

[0156] **실시예 3: HLA-A*02 서브타입 인식은 PD1-41BB의 공동 발현에 의해 변경되지 않는다.**

[0157] HLA-A2 단백질은 상이한 HLA-A*02 서브-대립유전자 (HLA-A*02:XX)에 의해 코딩될 수 있으며, 그 결과로 약간 상이한 아미노산 서열이 생성된다. HLA-A*02:01의 맥락에서 자신의 동족 펩티드를 인식하는 특이적 TCR이 반드시 또 다른 HLA-A*02 서브-대립유전자에 의해 제시된 펩티드를 인식하는 것은 아니다. 성공적인 TCR 기반 세포 요법에 필요한 유전적 특성을 정의하고, 잠재적으로 환자 코호트를 확장시키기 위해, TCR은 가장 일반적인 HLA-A*02 서브-대립유전자의 맥락에서 특징화된다 (도 3).

[0158] 트랜스제닉 TCR을 발현하지 않거나 (UT), 트랜스제닉 TCR만을 발현하거나 (TCR), 또는 TCR 및 PD1-41BB의 조합 (TCR_PD1-41BB)을 발현하는 T 세포를 1:1인 E:T 비로 선택된 HLA-A*02 서브-대립유전자 (HLA-A*02:XX)를 보유하는 림프모구양 세포주 (LCL; EBV-형질전환된 B 세포)와 함께 공동 배양하였다 (20,000개의 세포/웰). 트랜스제닉 TCR에 의한 인식을 허용하기 위해, LCL에 10^{-5} M SLL-펩티드를 로딩하였다. 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN-γ 농도를 결정하였다.

[0159] TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포는 A*02:01과 유사한 수준으로 HLA-A*02 서브-대립유전자 A*02:02, A*02:04 및 A*02:09에 의해 코딩된 MHC 분자에 의해 제시되는 SLL-펩티드를 인식하였다. 이러한 인식 패턴은 PD1-41BB의 공동 발현에 의해 변경되지 않았으며, 이는 이전 결과와 일치한다. TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포는 PD1-41BB 공동 발현과 상관 없이 4개의 상이한 HLA-A*02 서브-대립유전자의 맥락에서 SLL-펩티드를 인식한다.

[0160] **실시예 4: 잠재적인 펩티드 표적을 벗어난 독성의 성공적인 위험 제거.**

[0161] TCR이 특이적인 펩티드 (예컨대, SLL 펩티드) 뿐만 아니라, 원래 펩티드와 높은 서열 상동성을 공유하는 다른 펩티드도 인식할 때 표적을 벗어난 독성이 발생할 수 있다. 특이적인 펩티드와 높은 서열 유사성을 보이고,

TCR에 의해 인식될 수 있는 가능성이 있는 펩티드 후보를 확인하기 위해 계산 도구, 예컨대, Expitope 2.0[®] [Jaravine V, Mosch A, Raffegerst S, et al. Expitope 2.0: a tool to assess immunotherapeutic antigens for their potential cross-reactivity against naturally expressed proteins in human tissues. BMC Cancer 2017;17(1):892.]이 사용될 수 있다. 상기 도구는 게놈, 트랜스크립토믹 및 프로테오믹 데이터에 기초하여 가장 가능성이 높은 미스매칭 (MM) 펩티드를 예측한다. Expitope 2.0[®] 검색을 적용함으로써, 특이적인 SLL-펩티드와 비교하여 최대 4개의 아미노산 차이를 나타내는 191개의 MM 펩티드를 확인할 수 있었다. 10^{-6} M의 MM 펩티드 또는 SLL-펩티드가 로딩된 PD-L1-트랜스제닉 T2 세포를 사용한 사전 스크리닝 공동 배양에서, TCR-형질도입된 T 세포에 의해 인식된 33개의 MM 펩티드가 확인되었다. 고농도의 펩티드의 외인적 로딩이 반드시 내인적으로 프로세싱되고, 제시된 펩티드의 생리학적 인식으로 해석되는 것은 아니기 때문에, 에피토프 (펩티드)가 PRAME 음성 표적 세포주 SNB-19에서 시험관내 전사된 RNA (ivtRNA)로부터 번역되고, 내인적으로 프로세싱될 때, 33개의 MM 펩티드를 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포에 의한 IFN- γ 방출을 유도하는 그의 잠재능에 대해 조사하였다. 최대 5개의 MM 펩티드를 코딩하는 IvtrNA를 SNB-19 세포에 전기전공하였다. 사전 스크리닝 공동 배양에서 TCR-트랜스제닉 T 세포에서 가장 높은 IFN- γ 방출을 유도한 MM 펩티드 (MM01, MM26, MM66)를 "미디유전자" 구축물 (~400 bp)로서 개별적으로 시험하였다. 다른 모든 MM 펩티드는 5개의 MM 펩티드를 코딩하는 미니유전자 구축물 (~90 bp/펩티드)로서 시험하였다. SLL 펩티드를 코딩하는 미디유전자 구축물을 양성 대조군으로서 사용하였다. 성공적인 ivtRNA 형질감염을 확인하기 위해, 모든 RNA 구축물은 양성 대조군 TCR에 의해 인식되는 에피토프를 포함하였다. 형질감염된 SNB-19 세포와 TCR-트랜스제닉 이펙터 T 세포의 공동 배양 후 20 h째에 IFN- γ 농도를 결정하였다. 형질감염된 모든 SNB-19 세포는 양성 대조군 TCR에 의해 인식되었으며, 이는 통해 형질감염이 성공적으로 이루어졌다는 것을 확인할 수 있었다 (도 4). SLL-펩티드를 코딩하는 ivtRNA 구축물로 형질감염된 SNB-19 세포는 PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포에 의해 인식된 반면, 세포내 프로세싱된 MM 펩티드는 어느 것도 인식되지 못했다. 따라서, 모든 MM 펩티드는 위험이 제거될 수 있으며, 표적을 벗어난 독성을 유발할 가능성이 없다.

[0162] 실시예 5: 빈번한 HLA를 포괄하는 LCL 라이브러리 사용으로 표적을 벗어난 독성은 확인되지 않았다.

[0163] 다른 HLA 알로타입을 갖는 TCR-트랜스제닉 T 세포의 잠재적인 교차 반응성에 대한 정보를 얻기 위해, 백인 집단에서 가장 빈번한 HLA-A, -B 및 -C 대립유전자를 포괄하는 림프모구양 세포주 (LCL) 라이브러리를 표적 세포로 사용하였다. 이러한 LCL은 다양한 내인적으로 발현되는 펩티드를 발현하고, 매칭되는 HLA-A2 분자 또는 가장 빈번한 다른 HLA 분자 상에 제시된 내인성 펩티드의 인식으로 인한 잠재적인 교차 반응성을 확인하는 데 도움이 된다. 특정 HLA 알로타입의 교차 인식이 검출되면 각 HLA 대립유전자를 가진 환자는 임상 연구에서 배제된다. 트랜스제닉 TCR을 발현하지 않거나 (UT), 트랜스제닉 TCR만을 단독으로 발현하거나 (TCR), 또는 TCR 및 PD1-41BB의 조합 (TCR_PD1-41BB)을 발현하는 T 세포를 1:1의 E:T 비로 36개의 상이한 LCL과 함께 공동 배양하였다. 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN- γ 농도를 결정하였다. PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포는 양성 대조군 역할을 하는 SLL-펩티드가 로딩된 HLA-A*02:01 양성 LCL을 인식하였다 (도 5). 외인성 펩티드 로딩 없이 하나의 HLA-A*02:01 LCL과의 공동 배양만이 IFN- γ 의 방출을 가져왔다. 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (qPCR)에 의해 상기 세포주에서 낮은 수준의 PRAME-RNA가 검출될 수 있기 때문에, 약간의 인식은 HLA-A2에 의해 제시된 SLL-펩티드의 표적에 대한 인식일 가능성이 가장 컸다. 다른 LCL 중 어느 것도 트랜스제닉 TCR 또는 PD1-41BB와 조합된 트랜스제닉 TCR을 발현하는 이펙터 T 세포에 의해 인식되지 않았다. 따라서, 매칭되는 HLA-A2 분자 또는 가장 빈번한 다른 HLA 분자 상에 제시된 내인성 펩티드의 인식에 의해 유발된 표적을 벗어난 독성은 검출될 수 없다.

[0164] 실시예 6: 정상 세포 패널 사용으로 표적을 벗어난 독성은 확인되지 않았다.

[0165] 본 실험의 목적은 PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 PRAME 특이적 TCR-트랜스제닉 T 세포에 의해 유발될 수 있는 잠재적인 표적에 대한 독성/비종양 독성, 및 표적을 벗어난 독성을 평가하는 것이다. HLA-A*02:01 양성 1차 정상 세포 및 필수 조직 또는 기관을 나타내는 유도 만능 줄기 세포 (iPS) 유래 세포주를 TCR-형질도입된 T 세포에 의한 인식에 대하여 시험하였다. 개별 표적의 특성에 따라, 세포를 제조업체의 지침에 따른 세포 밀도로 공동 배양을 시작하기 1 내지 7일 전에 시딩하고, 평평한 바닥 웰에서 단층으로 배양하였다. 잠재적인 표적을 벗어난 독성과 표적에 대한 독성/비종양 독성을 구별하기 위해 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (qPCR)에 의해 시험된 모든 정상 세포의 PRAME mRNA 발현을 분석하였다. 10^{-5} M 펩티드가 로딩된 표적 세포는 내부 양성 대조군 (SLL-펩티드)으로서의 역할을 하였다. 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN- γ 농도를 결정하였다. 특이적 SLL-펩티드가 로딩된 모든 정상 세포는 PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포에 의해 인

식되었다 (도 6). 펩티드 로딩 없이 성숙한 수지 세포 (mDC)만이 비형질도입된 세포의 배경보다 높은 IFN- γ 수준을 가져왔다. mDC가 PRAME를 발현하기 때문에, 인식은 HLA-A2에 의해 제시된 SLL-펩티드의 표적에 대한 인식에 기인하는 것이다. 다른 표적 세포 중 어느 것도 트랜스제닉 TCR 또는 PD1-41BB와 조합된 트랜스제닉 TCR을 발현하는 이펙터 T 세포에 의해 인식되지 않았다. 따라서, 내인성 펩티드의 인식에 의해 유발된 표적을 벗어난 독성은 관찰되지 않았다.

[0166] 실시예 7: PD1-41BB는 PD-L1을 발현하는 종양 세포에 대한 반응으로 IFN- γ 의 특이적 방출을 증진시킨다.

[0167] 종양 세포 상의 PD-L1과 T 세포 상의 PD-1의 상호작용은 일반적으로 T 세포 활동을 감소시키는 억제 신호를 유도한다. PD1-41BB는 트랜스제닉 TCR이 그의 동족 펩티드-MHC 복합체에 결합할 때, 상기 신호를 역전시켜 T 세포 반응성을 증가시켜야 한다. TCR-트랜스제닉 T 세포의 반응성에 대해 PD1-41BB 공동 발현이 미치는 영향을 시험하기 위해, PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 이펙터 T 세포를 리간드 PD-L1을 발현하는 종양 세포와 함께 공동 배양하였다. 상기 공동 배양을 위해 상이한 수준으로 특이적 항원 PRAME를 발현하는 다양한 적응증으로부터 유래된 종양 세포를 선택하였다 (도 7a). 종양 세포주 중의 PRAME-RNA 발현 수준을 실시간 정량적 PCR에 의해 결정하고, 하우스키핑 유전자 GUSB에 대해 정규화하였다. 10개의 종양 세포주가 PRAME 발현을 보인 반면, 4개의 종양 세포주에서는 PRAME mRNA의 발현이 검출되지 않았다. 그러나, 상기 4개의 PRAME 음성 종양 세포주는 PD1-41BB 리간드 PD-L1을 발현하고, PD1-41BB가 트랜스제닉 TCR-T 세포의 특이성에 부정적인 영향을 미치지 않도록 하는 음성 대조군 역할을 하였다. PD-L1 발현 수준은 항체 염색 및 후속 유세포 분석법에 의한 분석으로 결정하였다. 안정적으로 발현될 수 있도록 하기 위해, 일부 종양 세포주에 PD-L1을 형질도입하였다 (TD). 일부 종양 세포주는 내인성 (end) PD-L1 발현을 보인 반면, PD-L1의 발현은 IFN- γ 처리를 통해 다른 세포주에서 유도될 수 있다 (ind). 발현을 유도하는 데 사용된 IFN- γ 수준은 그의 항원을 인식하는 특이적 T 세포와의 공동 배양 실험에서 생성된 수준과 유사하였다. 종양 세포에서 내인성 PD-L1 발현 수준은 일반적으로 IFN- γ 처리에 의해 추가로 증가될 수 있다 (end, ind).

[0168] 시토카인 방출에 대해 PD1-41BB 공동 발현이 미치는 영향을 확인하기 위해, PD1-41BB가 존재 또는 부재하는 TCR-트랜스제닉 T 세포를 상이한 수준의 PRAME 및 PD-L1을 발현하는 선택된 HLA-A*02:01 양성 종양 세포주와 공동 배양하였다 (도 7b). 비형질도입된 (UT) T 세포를 대조군으로 사용하였다. TCR-트랜스제닉 T 세포 및 종양 세포를 1:1의 E:T 비로 공동 배양하고 (20,000개 세포), 공동 배양 후 20 h째에 ELISA에 의해 IFN- γ 농도를 결정하였다. PD1-41BB의 공동 발현은 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 IFN- γ 의 방출을 증진시켰으며, 이는 PD1-41BB의 공동 발현이 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 T 세포 반응성을 개선시킨다는 것을 시사하는 것이다. 동시에, PD-L1 발현을 보이는 PRAME 음성 종양 세포는 인식되지 않으며, 이는 PD1-41BB의 공동 발현이 TCR-트랜스제닉 T 세포의 특이성에 영향을 주지 않는다는 것을 입증한다. 시토카인 방출 증가는 오직 트랜스제닉-TCR T 세포가 특이적 PRAME 항원을 인식할 때에만 관찰된다.

[0169] 실시예 8: PD1-41BB는 3D 종양 세포 스펜로이드에 대한 특이적인 세포독성 반응을 증진시킨다.

[0170] PD1-41BB 공동 발현이 세포독성에 대해 유의한 효과를 미치는지 여부를 확인하기 위해, TCR-트랜스제닉 T 세포를 PD-L1 양성 3D 종양 세포 스펜로이드와 공동 배양하였다 (도 8). 상기 3차원 종양 세포 스펜로이드는 고정 종양에 대한 시험관내 모델 역할을 하여야 한다. 실시예 7에 도입된 종양 세포 패널로부터, 상이한 수준의 PRAME 발현을 나타내고, 적색 형광 단백질 (NucLight-Red)을 발현한 3개의 HLA-A*02:01 양성 종양 세포주를 선택하였다. 종양 스펜로이드에 대한 세포독성은 인큐사이트 줌® 또는 S3® 장치를 사용하여 20일 동안 적색 형광 손실에 의해 결정하였고, 이미지는 4시간마다 기록하였다. PD1-41BB 공동 발현이 T 세포 적합성 및 회복력에 미치는 영향을 조사하기 위해, 3일, 7일, 10일, 13일 및 16일째에 신선한 종양 세포 스펜로이드를 공동 배양 플레이트로 옮겨 놓았다. 종양 세포에 반복적으로 노출되는 이러한 챌린지 환경에서 PD1-41BB의 발현은 T 세포의 이펙터 기능과 적합성에 유의한 효과를 나타낸다. 종양 세포 스펜로이드를 이용한 다회의 챌린지 과정에서 PD1-41BB 발현 이펙터 T 세포는 트랜스제닉 TCR만을 단독으로 발현하는 이펙터 T 세포에 비해 종양 세포 성장을 더욱 잘 제어할 수 있다. 추가로, PRAME 음성 PD-L1 양성 종양 세포는 PD1-41BB 발현과 무관한 트랜스제닉-TCR T 세포에 의해 표적화되지 않았다. 따라서, PD1-41BB 공동 발현 T 세포는 엄격하게 항원 의존성을 유지하는 반면, PD-L1 양성 3D 종양 세포 스펜로이드에 대한 특이적인 세포독성 반응은 증진된다.

[0171] 실시예 9: PD1-41BB는 PD-L1을 발현하는 종양 세포에 대한 반응으로 TCR-트랜스제닉 T 세포의 증식을 증가시킨다.

[0172] PD1-41BB를 공동 발현하는 TCR-트랜스제닉 T 세포의 이펙터 기능 및 회복력 증가는 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 증진된 시토카인 방출 및 세포독성에 의해 결정하였다 (실시예 7, 8). 특히, 종양 세포 스펜로이드

드를 사용한 다회에 걸친 셀링지 후에도 종양 세포를 더욱 잘 제어한다는 것은 T 세포의 더욱 우수한 생존 또는 증식과도 연관될 수 있는 억제 종양 세포 환경에서 T 세포 적합성이 증가되었다는 것을 시사하는 것이다. PD1-41BB 스위치 수용체에 포함된 4-1BB 신호전달 도메인은 T 세포의 증식률을 증가시키는 공동 자극을 제공하는 것으로 공지되어 있다 (Choi et al., 4-1BB signaling activates glucose and fatty acid metabolism to enhance CD8+T cell proliferation; 2017). PD1-41BB가 그의 리간드인 PD-L1과 상호작용할 때, 이러한 T 세포 확장 증가 또한 관찰될 수 있는지 여부를 조사하기 위해, TCR-트랜스제닉 T 세포를 상이한 수준의 PRAME 항원을 발현하는 PD-L1 양성 종양 세포와 공동 배양하였다 (도 9). TCR-트랜스제닉 T 세포 및 HLA-A*02:01 양성 종양 세포주를 1:1의 E:T로 공동 배양하고, 비형질도입된 T 세포 (UT)를 대조군으로 사용하였다. PD-L1 양성 종양 세포와의 공동 배양에서 T 세포의 X배 확장을 결정하기 위해, 세포를 7일째에 수확하고, MACSquant® X 분석기 (MACSQuant® X Analyzer)를 사용하여 전체 세포 계수를 결정하였다. 유세포 분석법 기반 세포 계수를 통해 공동 배양물에 여전히 존재할 수 있는 T 세포와 종양 세포를 쉽게 구별할 수 있었다. 예상대로, 확장에 필요한 특정 TCR 자극이 없기 때문에 비형질도입된 T 세포는 PRAME 양성 종양 세포에 대한 반응으로 증식하지 않았다. 트랜스제닉 TCR-T 세포는 특이적 항원 PRAME의 수준에 의존하는 것처럼 보이는 방식으로 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 증식한다. PD1-41BB의 공동 발현은 또한 항원 수준에 의존하는 방식으로 또한 트랜스제닉 TCR만을 단독으로 발현하는 T 세포와 비교하여 PD-L1 양성 종양 세포에 대한 반응으로 증식 및 생존을 증진시켰다. 따라서, TCR-트랜스제닉 T 세포에서 PD1-41BB의 발현은 증식률을 개선시키고, 억제성 PD-L1 수용체를 함유하는 셀링지 종양 세포 환경에서 더욱 우수한 세포 생존에 기여한다.

[0173] 실시예 10: PD1-41BB를 공동 발현하는 T 세포는 생체내에서 강력한 항종양 반응성을 나타낸다.

[0174] PD1-41BB의 공동 발현은 시험관내 검정에서 TCR-트랜스제닉 T 세포의 항종양 이펙터 기능을 증가시켰다. 생체내에서도 또한 TCR-트랜스제닉 T 세포에 대한 이러한 PD1-41BB의 긍정적인 효과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 면역결핍 (NOD/Shi-scid/IL-2R γ null) 마우스 및 PRAME/HLA-A*02:01 양성 흑색종 세포주 Me1A375를 이용하여 마우스 모델을 개발하였다. 고형 종양의 면역억제성 환경을 모방하기 위해, Me1A375 세포에 PD-L1을 형질도입하였다. 5×10^6 개의 PD-L1-트랜스제닉 Me1A375를 피하 주사한 후 1주째에 마우스에서 촉진되는 종양이 발생하였다. 이 시점에서 마우스를 각각 마우스 6마리로 구성된 3개의 처리군으로 분배하였다. 마우스에 PD1-41BB가 존재하거나 (TCR_PD1-41BB) 또는 부재하는 (TCR) 10×10^6 개의 TCR 양성 세포 (전체 세포 16×10^6 개) 또는 동일한 양의 비형질도입된 T 세포 (UT)를 주사하였다. 종양 부피를 주 2-3회 측정하였다. 종양 부피가 1000 mm³를 초과하는 마우스를 희생시켰다. 비형질도입된 T 세포로 처리된 마우스의 종양은 빠르게 성장하였고, T 세포 주사 후 2-4주 이내에 최대 종양 부피에 도달하였다 (도 10). 트랜스제닉 TCR만을 발현하는 이펙터 T 세포는 종양 성장에 거의 영향을 미치지 않았다. PD1-41BB를 공동 발현하는 T 세포만이 종양을 거부할 수 있었고, 처리 후 3.5주 후에 종양은 없었다. 상기 데이터는 강력한 시험관내 항종양 반응성을 보이는 PRAME 특이적 TCR과 PD1-41BB의 조합을 통해 생체내 모델에서 공격적으로 성장하는 종양 세포를 제거할 수 있는 고도로 효율적인 T 세포를 생성할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

[0175] 본 출원은 하기 항들을 추가로 포함한다:

[0176] 제1항: (A) - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 채, 및

[0177] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 채를 포함하는 PRAME 특이적 TCR; 및

[0178] (B) - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인,

[0179] - 막횡단 도메인, 및

[0180] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 포함하는 세포.

[0181] 제2항: 제1항에 있어서, TCR이 아미노산 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)을 갖는 PRAME 펩티드 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합 형태에 결합할 수 있는 것인 세포.

[0182] 제3항: 제2항에 있어서, HLA-A2가 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04 또는 HLA-A*02:09 코딩 분자인 세포.

- [0183] 제4항: 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1) 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합된 형태에의 결합이 TCR로 형질도입 또는 형질감염된 세포에 의한 IFN- γ 분비를 유도하는 것인 세포.
- [0184] 제5항: 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 8과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함하는 것인 세포.
- [0185] 제6항: 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 8의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함하는 것인 세포.
- [0186] 제7항: 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 10과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 11과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함하는 것인 세포.
- [0187] 제8항: 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 10의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 11의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함하는 것인 세포.
- [0188] 제9항: 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인이 서열식별번호 28의 서열을 포함하는 것인 세포.
- [0189] 제10항: 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인이 서열식별번호 32의 서열을 포함하는 것인 세포.
- [0190] 제11항: 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 막형단 도메인이 PD-1로부터 유래된 것인 세포.
- [0191] 제12항: 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 막형단 도메인이 서열식별번호 30의 서열을 포함하는 것인 세포.
- [0192] 제13항: 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 공동 자극 수용체가 서열식별번호 26의 서열을 포함하는 것인 세포.
- [0193] 제14항:
- [0194] - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 채, 및
- [0195] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 채를 포함하는 PRAME 특이적 TCR을 코딩하는 핵산; 및
- [0196] - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인,
- [0197] - 막형단 도메인, 및
- [0198] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물.
- [0199] 제15항:
- [0200] - 서열식별번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 T 세포 수용체 (TCR) α 채, 및
- [0201] - 서열식별번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, 서열식별번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 및 서열식별번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 TCR β 채를 포함하는 PRAME 특이적 TCR을 코딩하는 핵산; 및
- [0202] - PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포의 도메인,
- [0203] - 막형단 도메인, 및
- [0204] - 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 공동 자극 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산.
- [0205] 제16항: 제14항에 있어서, 또는 제15항에 있어서, TCR이 아미노산 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1)을 갖는

PRAME 펩티드 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합 형태에 결합할 수 있는 것인 조성물, 또는 핵산.

- [0206] 제17항: 제16항에 있어서, HLA-A2가 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04 또는 HLA-A*02:09 코딩 분자인 조성물, 또는 핵산.
- [0207] 제18항: 제14항 및 제16항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 SLLQHLIGL (서열식별번호 1) 또는 그의 일부, 또는 그의 HLA-A2 결합된 형태에의 결합이 TCR로 형질 도입 또는 형질감염된 세포에 의한 IFN- γ 분비를 유도하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0208] 제19항: 제14항 및 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 8과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0209] 제20항: 제14항 및 제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 8의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 TCR β 영역을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0210] 제21항: 제14항 및 제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 10과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 11과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0211] 제22항: 제14항 및 제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, TCR이 서열식별번호 10의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR α 영역, 및 서열식별번호 11의 아미노산 서열을 갖는 불변 TCR β 영역을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0212] 제23항: 제14항 및 제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포외 도메인이 서열식별번호 28의 서열을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0213] 제24항: 제14항 및 제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 4-1BB로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 세포내 도메인이 서열식별번호 32의 서열을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0214] 제25항: 제14항 및 제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인이 PD-1로부터 유래된 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0215] 제26항: 제14항 및 제16항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1로부터 유래된 폴리펩티드를 함유하는 막횡단 도메인이 서열식별번호 30의 서열을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0216] 제27항: 제14항 및 제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 공동 자극 수용체가 서열식별번호 26의 서열을 포함하는 것인 조성물, 또는 핵산.
- [0217] 제28항: 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.
- [0218] 제29항: 제14항 및 제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 핵산, 또는 제28항에 따른 벡터를 포함하는 세포.
- [0219] 제30항: 제1항 내지 제13항 및 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 말초 혈액 림프구 (PBL) 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)인 세포.
- [0220] 제31항: 제1항 내지 제13항 및 제29항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 T 세포인 세포.
- [0221] 제32항: 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제14항 및 제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 핵산, 및/또는 제28항에 따른 벡터를 포함하는 제약 조성물.
- [0222] 제33항: 제20항에 있어서, 제약 조성물이 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 것인 제약 조성물.
- [0223] 제34항: 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제14항 및 제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 및/또는 제28항에

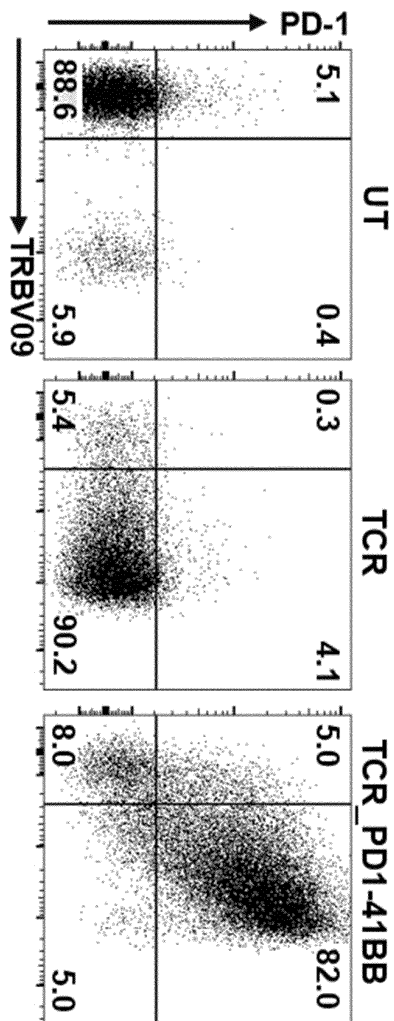
있어서, 의약으로서 사용하기 위한, 세포, 세포, 조성물, 핵산, 및/또는 벡터.

[0224] 제35항: 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제14항 및 제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 및/또는 제28항에 있어서, 암 치료에서 사용하기 위한, 세포, 세포, 조성물, 핵산, 및/또는 벡터.

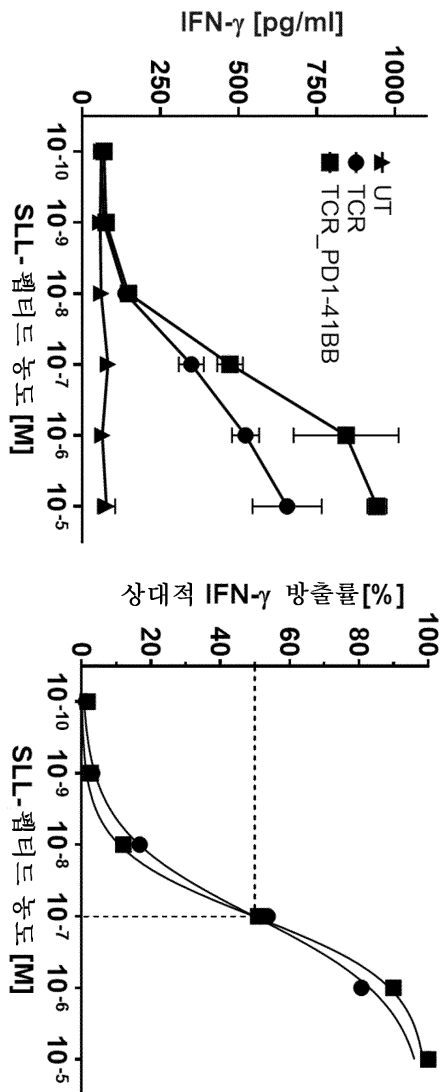
[0225] 제36항: 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제14항 및 제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제15항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 및/또는 제28항에 있어서, 암 치료에서 사용하기 위한 것으로, 여기서 암이 바람직하게 흑색종, 방광 암종, 결장 암종, 및 유방 선암종, 육종, 전립선암, 자궁암, 포도막암, 포도막 흑색종, 편평 두부경부암, 윤활막 암종, 유잉 육종, 삼중 음성 유방암, 갑상선암, 고환암, 신장암, 췌장암, 난소암, 식도암, 비소세포 폐암, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 흑색종, 간세포 암종, 두부경부암, 위암, 자궁내막암, 결장직장암, 담관암종, 유방암, 방광암, 골수성 백혈병 및 급성 림프모구성 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게, 여기서 암이 NSCLC, SCLC, 유방암, 난소암 또는 결장직장암, 육종 또는 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 세포, 세포, 조성물, 핵산, 및/또는 벡터.

도면

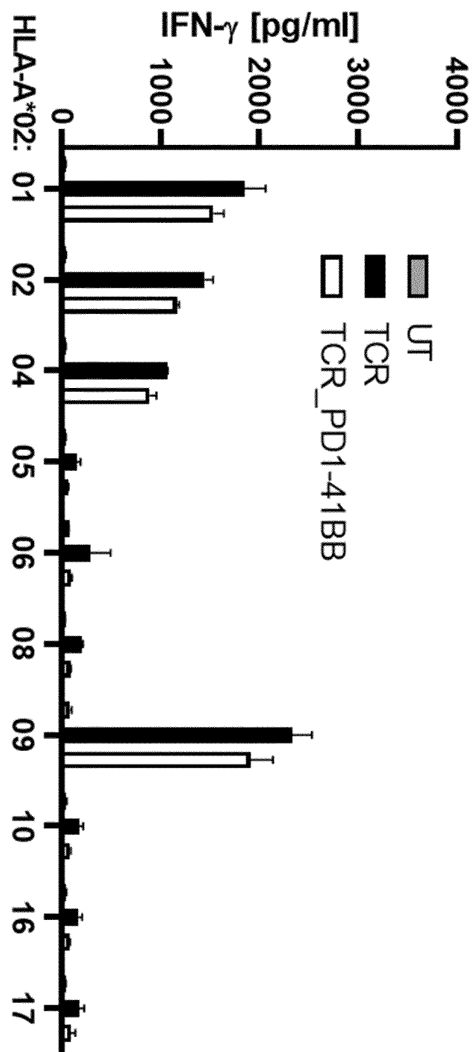
도면1



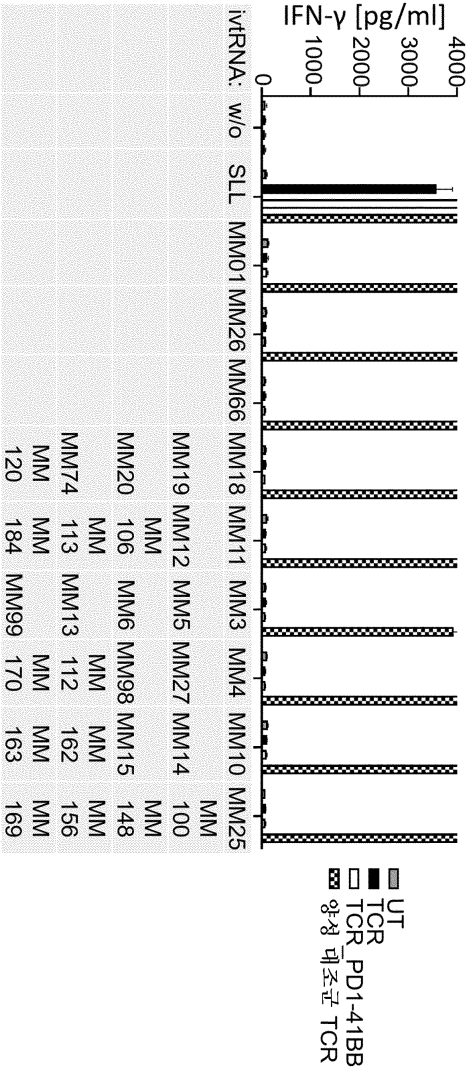
도면2



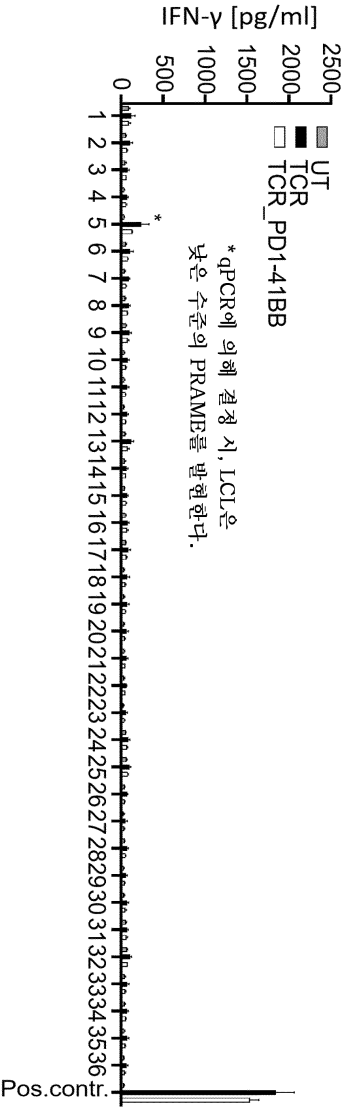
도면3



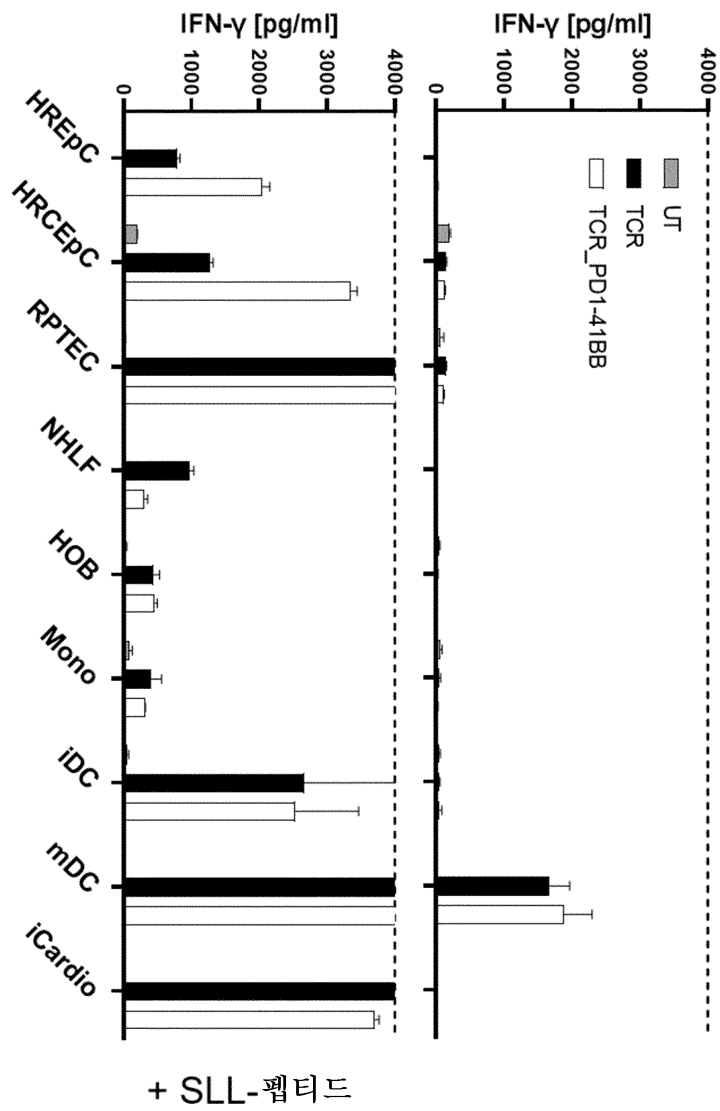
도면4



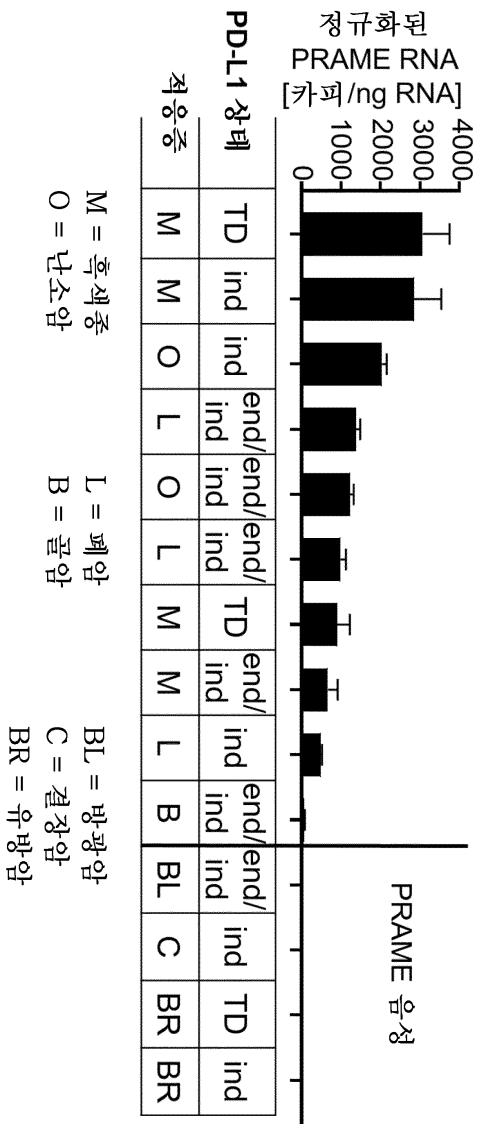
도면5



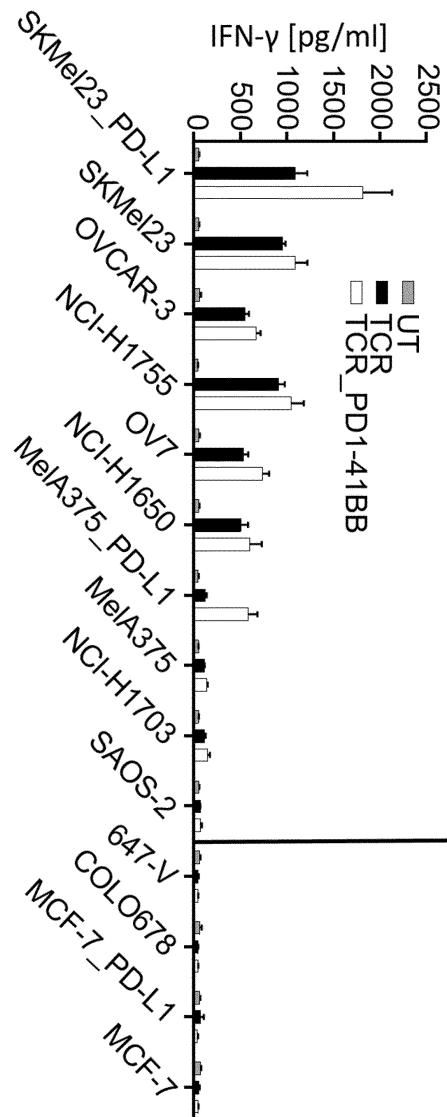
도면6



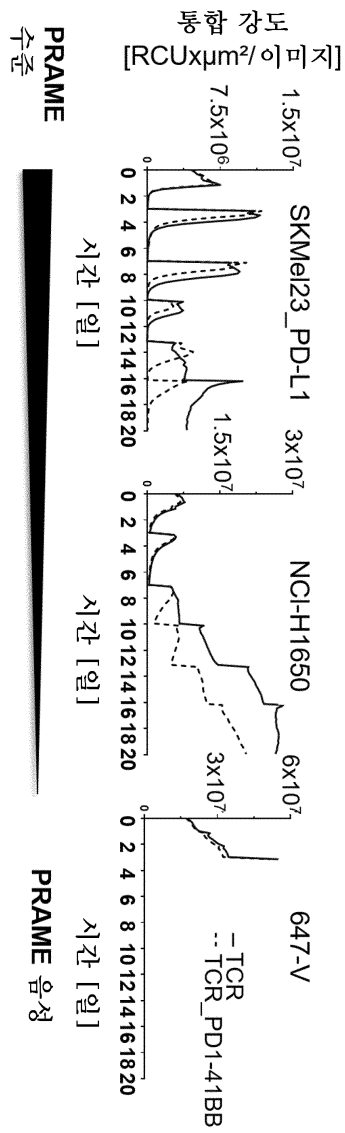
도면7a



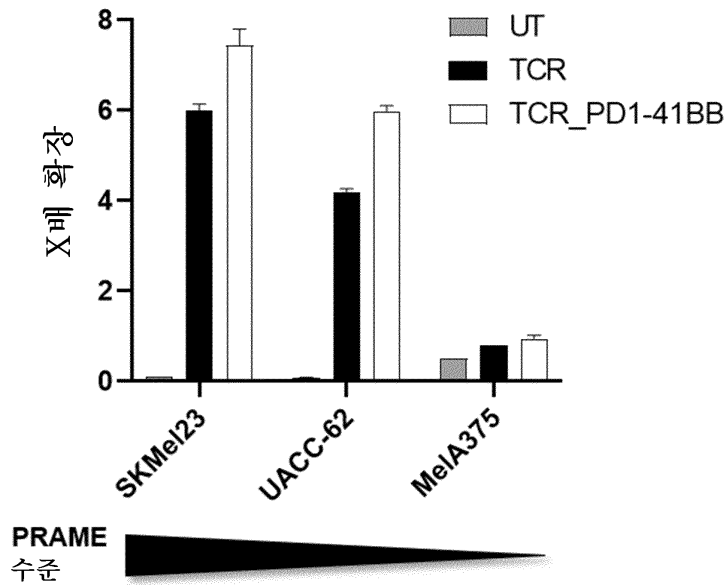
도면7b



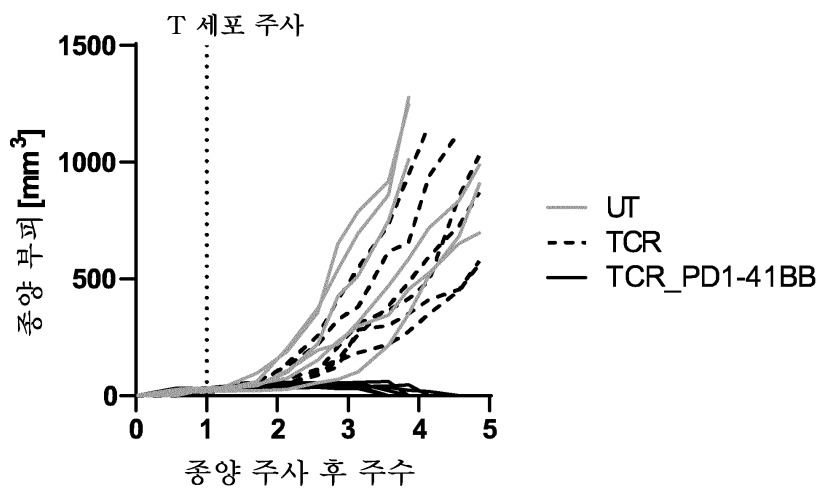
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Medigene Immunotherapies GmbH

<120> Combination PRAME specific T cell receptors and chimeric co-stimulatory receptor

<130> M11754W0

<150> EP21172722.7

<151> 2021-05-07

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ser Ile Phe Asn Thr

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Leu

1 5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Cys Ala Gly Leu Ala Asp Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe

1 5 10 15

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Ser Gly Asp Leu Ser

1 5
 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 6
 Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu

1 5
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 7
 Cys Ala Ser Ser Val Trp Ala Ser Gly Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10 15
 <210> 8
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 8
 Met Leu Leu Glu His Leu Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp
 1 5 10 15
 Val Ser Gly Gln Gln Leu Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln
 20 25 30

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

Ser Ile Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly Leu Ala Asp

100 105 110

Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Ser Val Lys Pro Asn

130

<210> 9

<211> 133

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Trp Ala Ser Gly Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr

115 120 125

Arg Leu Thr Val Thr

130

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Ca

<400> 10

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

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

Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 11

<211> 179

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Cb

<400> 11

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

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

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

165 170 175
 Ser Arg Gly

<210> 12
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> CDR1_a
 <400> 12
 agcatattta acacc
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> CDR2_a
 <400> 13
 ttatataagg ctggtgaatt g

15

21

<210> 14
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> CDR3_a
 <400>
 14
 tgtgccggcc tggccgatta cggcggctct cagggaatc tgatcttc 48
 <210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> CDR1_b
 <400> 15
 tctggagacc tctct 15
 <210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> CDR2_b
 <400> 16
 tattataatg gagaagag 18
 <210> 17
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> CDR3_b
 <400> 17
 tgtgcctcta gcgtgtgggc ctctggcggc tacgagcagt atttt 45
 <210> 18
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> Va

<400> 18

atgctgctgg aacatctgct gatcatcctg tggatgcagc tgacctgggt ttccggccag 60

cagctgaatc agagccctca gagcatgttc atccaagaag gcgaggacgt ttccatgaat 120

tgcaccagca gcagcatctt caacacctgg ctgttgtaca agcaggaccc tggcgaagga 180

ccagtgtgc tgatgcctt gtacaaagcc ggcgagctga ccagcaacgg cagactgaca 240

gcccagtctg gcattaccgg gaaggacagc ttctgaaca tctccgccag cattccctcc 300

gacgtgggca tctatctttg tgccggcctg gccgattacg gcggtctca gggaaatctg 360

atcttcggca agggcaccaa gctgagcgtg aagcccaac 399

<210> 19

<211> 399

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Vb

<400> 19

atgggcttca gactgctgtg ctgcgtggcc ttttgtctgc ttggagccgg acctgtggat 60

agcggcgcta cccagacacc taagcacctg atcacagcca caggccagcg cgtgaccctg 120

agatgttctc ctagaagcgg cgacctgagc gtgtactggt atcagcagtc tctggaccag 180

ggcctgcagt tctgatcca gtactacaac ggcgaggaaa gagccaaggg caacatcctg 240

gaacggttca gcgccagca gttcccagat ctgcacagcg agctgaacct gagcagcctg 300

gaactgggag atagcgcctt gtacttctgt gcctctagcg tgtgggcctc tggcggctac 360

gagcagtatt ttggccctgg caccagactg accgtgacc 399

<210> 20

<211> 420

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Ca

<400> 20

attcagaacc ccgatcctgc cgtgtaccag ctgagagaca gcaagagcag cgacaagagc 60

gtgtgcctgt tcaccgactt cgacagccag accaacgtgt cccagagcaa ggacagcgac 120

gtgtacatca ccgacaagac cgtgtctggac atcgcgagca tggacttcaa gagcaacagc 180

gccgtggcct ggtccaacaa gagcgatttc gctgcgcca acgccttcaa caacagcatt 240

atccccgagg acacattctt cccagctcc gatgtgcctt gcgacgtgaa gctgggtggaa 300

aagagcttcg agacagacac caacctgaac ttccagaacc tgtccgtgat cggcttcaga 360
atcctgctgc tgaaggtggc cggcttcaac ctgctgatga cactgagact gtggtccagc 420
<210> 21
<211> 537
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> Cb
<400> 21
gaggatctga agaacgtgtt cccacctgag gtggccgtgt tgcagccttc taaggccgag 60
attgcccaca cacagaaagc cacactcgtg tgtctggcca cggcttcta tcccgatcac 120
gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtcag cacagatccc 180
cagcctctga aagaacagcc cgctctgaac gacagccggt actgtctgag cagcagactg 240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc agaaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300
tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc caggacagag ctaagcccgt gacacagatc 360
gtgtctgccg aagcttgggg cagagccgat tgtggcatca ccagcagatc ttaccaccag 420
ggcgtgctga gcgccacat cctgtatgag atcctgctgg gcaaagccac tctgtacgcc 480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggatag cagaggc 537
<210> 22
<211> 312
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> TCRb
<400> 22
Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15
Gly Pro Val Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr
20 25 30
Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp
35 40 45
Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe
50 55 60
Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu

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

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

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

 Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Arg Ser Tyr His
 260 265 270
 Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
 275 280 285
 Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met
 290 295 300
 Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 305 310
 <210> 23

<211> 936

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> TCRb

<400> 23

atgggcttca gactgctgtg ctgcgtggcc ttttgtctgc ttggagccgg acctgtggat	60
agcggcggtta cccagacacc taagcacctg atcacagcca caggccagcg cgtgaccctg	120
agatgtttctc ctagaagcgg cgacctgagc gtgtactggg atcagcagtc tctggaccag	180
ggcctgcagt tctgatcca gtactacaac ggcgaggaaa gagccaaggg caacatcctg	240
gaacggttca ggcgccagca gttcccagat ctgcacagcg agctgaacct gaggcagcctg	300
gaactgggag atagcgccct gtacttctgt gcctctagcg tgtgggcctc tggcggtctac	360
gagcagtatt ttggccctgg caccagactg accgtgaccg aggatctgaa gaacgtgttc	420

ccacctgagg tggccgtgtt cgagccttct aaggccgaga ttgccacac acagaaagcc	480
acactcgtgt gtctggccac cggcttctat cccgatcacg tggaactgtc ttggtgggtc	540
aacggcaaag aggtgcacag cggcgtcagc acagatcccc agcctctgaa agaacagccc	600
gctctgaacg acagccggtta ctgtctgagc agcagactga gagtgtccgc caccttctgg	660
cagaacccca gaaaccactt cagatgccag gtgcagttct acggcctgag cgagaacgat	720
gagtggaccg aggacagagc taagcccgtg acacagatcg tgtctgccga agcttggggc	780
agagccgatt gtggcatcac cagcagatct taccaccagg gcgtgctgag cgccaccatc	840

ctgtatgaga tctgtctggg caaagccact ctgtacgccg tgctgggtgc tgccctgggtg	900
ctgatggcca tggtaagcg gaaggatagc agaggc	936

<210> 24

<211> 273

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> TCRA

<400> 24

Met	Leu	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Trp	Met	Gln	Leu	Thr	Trp
1					5				10						15
Val	Ser	Gly	Gln	Gln	Leu	Asn	Gln	Ser	Pro	Gln	Ser	Met	Phe	Ile	Gln
					20				25						30

Glu Gly Glu Asp Val Ser Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn

35 40 45

Thr Trp Leu Trp Tyr Lys Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Gln Phe Gly Ile Thr Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala

85 90 95

Ser Ile Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly Leu Ala Asp

100 105 110

Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Ser Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser

260 265 270

Ser

<210> 25

<211> 819

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> TCRA

<400> 25

atgctgctgg aacatctgct gatcatcctg tggatgcagc tgacctgggt ttccggccag 60

cagctgaatc agagccctca gagcatgttc atccaagaag gcgaggacgt ttccatgaat 120

tgcaccagca gcagcatctt caacacctgg ctgtggtaca agcaggaccc tggcgaagga 180

ccagtgtctg tgatecctt gtacaaagcc ggcgagctga ccagcaacgg cagactgaca 240

gcccagttcg gcattaccgg gaaggacagc ttctgaaca tctccgccag cattccctcc 300

gacgtgggca tctatttttg tgccggcctg gccgattacg gcggtctca gggaaatctg 360

atcttcggca agggcaccaa gctgagcgtg aagcccaaca ttcagaaccc cgatcctgcc 420

gtgtaccagc tgagagacag caagagcagc gacaagagcg tgtgcctgtt caccgacttc 480

gacagccaga ccaacgtgtc ccagagcaag gacagcgacg tgtacatcac cgacaagacc 540

gtgctggaca tgcggagcat ggacttcaag agcaacagcg ccgtggcctg gtccaacaag 600

agcgatttgc cctgcgcca cgccttcaac aacagcatta tccccgagga cacattcttc 660

cccagctccg atgtgccctg cgacgtgaag ctggtggaaa agagcttcga gacagacacc 720

aacctgaact tccagaacct gtccgtgac ggcttcagaa tctgctgct gaaggtggcc 780

ggcttcaacc tgctgatgac actgagactg tggtcacg 819

<210> 26

<211> 233

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> PD1-41BB

<400> 26

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

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

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

195 200 205
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 210 215 220
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

225 230

<210> 27

<211> 699

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> PD1-41BB

<400> 27

atgcaaatc ctcaagctcc ttggcctgtc gtgtgggccg ttctgcaact tggatggcgg

60

cctggctggg tcttgactc tcttgacaga ccttggaatc ctccaacatt cagccccgct 120

ctgctgggtg ttaccgaggg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc 180

gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc 240

gcctttctcg aggatagatc tcagcccggc caggactgcc ggttcagagt tacacagctg 300

cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca 360

tatctgtgcg gcgccatttc tctggccctt aaggctcaga tcaaagagag cctgagagcc 420

gagctgagag tgacagaaag acgggccgaa gtgccacag ctacccttc accttctcca 480

agacctgccg gccagtcca gacactggtc gtgggagttg ttggcggact gctgggatct 540

ctggtgctgc ttgtttgggt gctcggctg atcaagcggg gcagaaagaa gctgctgtac 600

atcttcaagc agcccttcac gcggccctg cagaccacac aagaggaaga tggctgctcc 660

tgcagattcc ccgaggaaga agaaggcggc tgcgaactc 699

<210> 28

<211> 170

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 28

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

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

115 120 125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val

165 170

<210> 29

<211> 510

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> PD1 ECD

<400> 29

atgcaaattc ctcaagctcc ttggcctgtc gtgtgggccg ttctgcaact tggatggcgg 60
cctggctggt tcttggaact tcctgacaga ccctggaatc ctccaacatt cagccccgct 120
ctgctggttg ttaccgaggc cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc 180
gagagcttcg tgcagaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc 240
gcctttcctg aggatagatc tcagcccggc caggactgcc ggttcagagt tacacagctg 300

cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggccg gaagaaacga cagcggcaca 360
tatctgtgcg gcgccatttc tctggcccct aaggctcaga tcaaagagag cctgagagcc 420
gagctgagag tgacagaaag acgggccgaa gtgccacacag ctcacccttc accttctcca 480
agacctgccg gccagttcca gacactggtc 510

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 30

Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp

1 5 10 15

Val Leu Ala Val Ile

20

<210> 31

<211> 63
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> PD1 TM
 <400> 31
 gtgggagttg ttggcggact gctgggatct ctggtgctgc ttgtttgggt gctcgccgtg 60
 atc 63
 <210> 32
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 32
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40
 <210> 33
 <211> 126
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> 41BB_ICD
 <400> 33
 aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ccttcatgcg gcccgtgcag 60
 accacacaag aggaagatgg ctgctcctgc agattccccg aggaagaaga aggcggtgc 120
 gaactc 126