

(72) 발명자

카드, 김벌린, 에프.

미합중국, 플로리다 33025, 웹브로크 파인스, 1120
에스더블유 87에비뉴

주, 시아오윤

미합중국, 플로리다 33176, 마이애미, 10300 에스
더블유 118스트리트

특허청구의 범위

청구항 1

MHC 복합체의 콘텍스트(context)에서 세포 또는 조직에 제시된(presented) 펩티드 항원을 포함하는 세포 또는 조직을 시험관 내에서(in vitro) 또는 생체 외에서(ex vivo) 탐지하는 방법으로서, 이 때, 상기 펩티드 항원은 내재성 항원이고, 다음의 단계를 포함하는 방법.

- a) 인공적 수준의 상기 펩티드 항원을 표시하도록 조작되지 않은 세포 또는 조직을, 하나 이상의 가용성 TCR 분자 또는 그 기능성 단편(functional fragment)과, 상기 제시된 펩티드 항원 및 상기 가용성 TCR 또는 단편 간에 특이적 결합 복합체를 형성하는 조건 하에서 접촉시키는 단계,
- b) 상기 제시된 펩티드 항원에 결합하지 않은 가용성 TCR 분자 또는 단편을 제거하기에 적합한 조건 하에서, 상기 세포 또는 조직을 세척하는 단계; 및
- c) 상기 제시된 펩티드 항원을 포함하는 상기 세포 또는 조직을 표시하는(indicative of) 것으로서 상기 특이적 결합 복합체를 탐지하는 단계.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 세포 또는 조직을 하나 이상의 차단제(blocking agent)와 추가로 접촉시키는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 세포 또는 조직을 단계 a) 이전에 상기 차단제와 접촉시켜서 상기 가용성 TCR 또는 단편 및 상기 세포 간의 비-특이적 결합을 감소시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 차단제는 과산화물(Peroxide), 혈청 단백질, 항체, 또는 그들의 단편인 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 방법은, 상기 복합체에 결합된 상기 가용성 TCR 또는 단편과 경쟁하고 특이적으로 결합하는 조건 하에서, 상기 복합체를 경쟁적 MHC 분자 또는 그 단편과 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 본질적으로 모든 상기 가용성 TCR 또는 단편이 경쟁적 MHC 분자 또는 그 단편에 결합하여 경쟁 복합체(competition complex)를 형성하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 방법은 상기 경쟁 복합체를 탐지하고 상기 MHC 분자 또는 상기 가용성 TCR의 결합 특이성을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 MHC 분자 또는 단편은 단일-쇄인 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 상기 세포 또는 조직을 하나 이상의 변성제(denaturing agent)와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 방법은 상기 세포 또는 조직을 단계 a) 이전에 상기 변성제와 접촉시키고 상기 세포 또는 조직을 변성(고정(fixing))시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 복수의 세포 또는 조직을 어레이(array)에 위치시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 방법은 세포 또는 조직을 포함하는 상기 어레이의 각 요소에서 수행되는 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 방법은 상기 어레이의 각 요소에서 실질적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 15

청구항 12에 있어서, 단계 c)는 상기 어레이를 스캔하고 상기 특이적 결합 복합체의 존재를 나타내는 영상 신호를 발생하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 단계 c)는 사용자에게 실시간으로 상기 신호를 출력하고 선택적으로 상기 영상 신호의 저장된 영상을 색인화(indexing)하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 세포에 존재하는 펩티드 항원의 양은 약 100,000 카피 미만인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 세포에 존재하는 펩티드 항원의 양은 약 400 카피 미만인 방법.

청구항 19

청구항 1에 있어서, 상기 펩티드 항원은 종양-관련 펩티드 항원인 방법.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 상기 세포 또는 조직은 현탁되는 방법.

청구항 21

청구항 1에 있어서, 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 하나 이상의 단일-쇄 TCR을 포함하는 방법.

청구항 22

청구항 1에 있어서, 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 탐지가능하게-라벨되는 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 탐지가능한 라벨은 비오틴(biotin), 스트렙타비딘(streptavidin), 효소 또는 이것의 촉매적으로 활성인 단편, 방사핵종, 나노입자, 상자성 금속 이온, 또는 형광성, 인광성(phosphorescent), 또는 화학발광성 분자인 방법.

청구항 24

청구항 21에 있어서, 상기 단일-쇄 TCR 또는 단편은 하나 이상의 공유결합된 사이토킨을 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 공유결합된 사이토킨을 포함하는 단일-쇄 TCR 또는 그 단편인 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 단일-쇄 TCR 또는 단편은 인터루킨-2(IL-2)를 인코딩하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 27

청구항 21에 있어서, 상기 단일-쇄 TCR 또는 단편은 하나 이상의 공유결합된 면역글로빈 도메인을 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 공유결합된 면역글로빈 도메인을 포함하는 단일-쇄 TCR 또는 그 단편인 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 단일-쇄 TCR 또는 단편은 IgG1 도메인을 인코딩하는 서열 또는 그 단편을 포함하는 방법.

청구항 30

청구항 1에 있어서, 상기 MHC 복합체는 HLA-A2 제한인 방법.

청구항 31

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 상기 가용성 TCR 또는 단편과 상기 펩티드 항원을 포함하지 않는 세포 사이의 결합을 탐지하는 조절을 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

청구항 1에 있어서, 상기 제시된 펩티드 항원은 p53(aa 149-157) 또는 p53(aa 264-272)인 방법.

청구항 33

삭제

청구항 34

청구항 1에 있어서, 상기 세포 또는 조직은 종양 세포 또는 조직인 방법.

청구항 35

대상(subject) 내의 종양 세포 또는 조직을 탐지하기 위한 약학적 조성물에 있어서, 이 때, 상기 세포 또는 조직은 MHC 복합체의 콘텍스트에서 상기 세포 또는 조직에 제시되는 종양-관련 펩티드 항원을 포함하고,

a) 상기 제시된 펩티드 항원 및 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편 사이에 특이적 결합 복합체를 형성하는 조건 하에서 대상에게 투여하기 위한 가용성 TCR 분자 또는 그 기능성 단편 및

b) 이에 의해, 상기 제시된 종양-관련 펩티드 항원을 포함하는 종양 세포 또는 조직을 표시하는 것으로서 특이적 결합 복합체를 탐지하는,

약학적 조성물.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 하나 이상의 단일-쇄 TCR을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 37

청구항 35에 있어서, 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 탐지가능하게 라벨되는 약학적 조성물.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 탐지가능한 라벨은 비오틴, 스트렙타비딘, 효소 또는 이것의 촉매적으로 활성인 단편, 방사핵종, 나노입자, 상자성 금속 이온, 또는 형광성, 인광성, 또는 화학발광성 분자인 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2003년 11월 10일자로 출원된, 발명의 명칭 “가용성 TCR 분자 및 이용 방법” 인 미국 가출원번호 제 60/518,790호에 대한 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 전체로 도입된다.

[0002] 본 발명은 MHC 또는 HLA 복합체의 콘텍스트(context)에 제시되는 펩티드 항원을 포함하는 세포 또는 조직을 탐지하는 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 암 세포를 탐지하는 매우 감도 좋은 방법의 제공을 포함하는 넓은 범주의 적용을 가진다.

[0003] 본 발명에 대한 자금제공이 미국 국립보건원으로부터 부여번호:1R43CA88615-01 및 1R43CA105816-01에 의해 미합중국 정부에서 일부 제공되었다. 따라서, 미합중국 정부는 여기에 청구된 본 발명에 대해 일정한 권리를 갖는다.

배경기술

[0004] 면역치료가 암을 치료하는 유망한 접근법이라는 인식이 증가하고 있다. 인터루킨-2(IL-2)와 같은 사이토키인으로 치료하는 것을 포함한 다양한 전략이 제안되어 왔다. IL-2는 T 및 B 세포, 단핵세포, 마크로파지, 림포킨 활성화 살상 세포(LAK), 및 NK 세포[10,40]를 포함하는 다양한 면역 세포 유형에 강한 영향을 준다.

- [0005] 효능 증가를 돕기 위해 종양 부위에 사이토킨을 집중시키는 것이 제안되어왔다. 종래의 방법은 종양 내로 사이토킨 또는 상기 사이토킨을 코딩하는 유전자의 직접 주입, 또는 종양 항원 특이적 항체에 융합시킴에 의한 사이토킨의 표적 전달을 포함한다. 그러나, 이러한 방법들은 결점을 가지고 있다.
- [0006] 예를 들면, 대부분의 직접 주입 방법은 특히 종양이 일반적으로 작은(미세 전이) 때인 암의 초기 단계에서는 이용하기 어렵다. 또한, 상기 방법은 보통 치료적인 성공을 별로 보장할 수 없으면서 노동-집약적이다. 이러한 점은 많은 환자들의 치료를 비실용적이고 비용이 많이 들게 한다.
- [0007] 항체-사이토킨 융합 구조물이 암을 치료하는 접근에서 이용되어 왔다. 그러나, 상기 방법은 항체가 제한된 결합 스펙트럼을 가진다는 점에서 제한적이다. 즉, 항체는 단지 특정 세포 표면 항원만을 인식할 수 있다. 불행하게도, 많은 종양 항원은 항체 인식에 대해 적절하게 나타나는 것이 아니며, 그 때문에 항체에 근거한 접근법의 가능성이 제한된다. 또한, 많은 종양 특이적 항원은 세포 유형 특이적 단백질의 비정상 발현으로부터 유도된다는 보고가 있다. 이러한 것은 오직 소수의 암 유형들에만 존재한다. 이러한 결점은 항체 근거 치료의 가능성을 더욱 제한한다.
- [0008] p53 단백질은 세포 주기의 G1/S 상에서 비정상 세포를 저지함으로서 작용하는 것으로 보고된 세포내 종양 억제 인자이다. 상기 단백질의 과잉 발현은 인간의 많은 악성종양에 대한 중요한 종양 표지자(tumor marker)인 것으로 여겨지며, 또한 그것은 광범위한 스펙트럼의 표적된 종양 면역 치료에 있어서 우수한 표적이라는 인식이 있다. p53 단백질은 구조적 적합 복합체 단백질(MHC)의 콘텍스트에서 통상 세포 표면에 표시된다. 상기 단백질 복합체는 T-세포 수용체들(TCRs)의 결합 표적으로 알려져 있다.[49].
- [0009] 펩티드를 함유하는 MHC/단백질 복합체를 탐지하기 위해 특정 TCR들을 이용하는 시도들이 있었다(Epel et al.,2002; Holler et al.,2003; Lebowitz et al.,1999; Plaksin et al.,1997; Wataya et al.,2001; O'Herron et al.,1997). 그러나, 이들 및 관련된 방법들은 중대한 단점이 있다.
- [0010] 예를 들어, 많은 상기 방법들은 TCR 구조물이 다량체를 형성할(즉, 다수의 TCR 카피를 갖는 것을 의미함) 것을 필요로 하는데, 이는 펩티드 항원과 펩티드 항원의 결합을 인공적으로 높이기 위한 것으로 생각된다. 표적(항원을 제시하는) 세포는 종종 상기 방법에 의해 상대적으로 많은 양의 펩티드 항원을 발현하도록 조작된다. 때때로 펩티드 항원의 밀도는 세포당 $10^4 \sim 10^5$ 의 복합체일 정도로 높다(Wataya et al.,2001). 상기와 같은 높은 펩티드 항원 밀도는 TCR에 의한 결합 및 탐지를 용이하게 하는 것으로 여겨진다. 그러나, 이러한 수준의 펩티드 항원은 인공적이며, 대부분의 종양-관련 항원(TAA)을 포함하는 MHC/펩티드 항원 복합체의 수준보다 통상적으로 훨씬 높다. 일부 TAA들에 있어서는, 세포당 약 50HLA/펩티드 복합체보다 낮게 나타난다(Pascolo et al.,2001; Schirle et al.,2000). 그래서, 이전의 방법들은 모든 TAA는 아니더라도 대부분을 탐지하는데 감도가 충분하지 않다는 인식이 있어 왔다.
- [0011] 특정 TCR들을 특정 펩티드 항원을 발현하는 세포를 탐지하는데 이용하는 시도들이 있었다. 항체에 근거한 많은 방법과 같이, 이러한 접근들은 펩티드 항원을 탐지하는 감도가 충분하지 않거나, 상기 항원을 완전하게 탐지하는데 실패했다.
- [0012] 예를 들어, Holler et al.(2003)는 MHC/펩티드 복합체와 반응하는 것으로 보고된 특정 가용성 TCR의 개발을 보고했다. 이 TCR들은 항원으로 인공적으로 "적재된(loaded)" 세포로 그 항원을 탐지할 수 있었지만, 이 분자들은 종양 세포상의 내재성(endogenous) 항원은 탐지할 수 없었다. Holler et al.은 항원이 세포당 600 카피(copy)보다 낮은 밀도로 존재하는 경우, TCR 근거한 방법들은 항원을 탐지하는데 충분히 감도가 좋거나 믿을만하지 않

다고 결론지었다.

[0013] TCR에 근거한 특수한 방법들이 MHC 분자들의 콘텍스트에서 바이러스 펩티드를 탐지하는데 이용되어 왔다.(Strominger, et al., W09618105). 그러나, 이러한 것들 및 관련된 방법들은 단점이 있다. 예를 들면, 바이러스 감염은 종종 예외적으로, 세포당 >1000 내지 >10⁵의 복합체에 이르는, 높은 밀도의 MHC/펩티드 복합체를 만드는 것으로 일반적으로 인식되고 있다. Herberts et al., 2001; van Els et al., 2000 참조. 그래서 대부분의 다른 펩티드 항원 탐지 방법들처럼, 바이러스 항원을 탐지하는 TCR 근거한 접근들은 탐지 방법을 구동하기 위해 지금껏 상대적으로 많은 항원 표적에 의존하고 있다.

[0014] 비록 일부 TCR 근거한 방법들이 상대적으로 많은 양의 펩티드 항원을 탐지하는데 이용되고 있다고는 하지만, 상기 방법들은, TCR이 사이토킨, IgG1과 같은 면역글로빈 도메인, 비오틴(biotin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin) 등의 다른 분자에 융합되어 작동하는지는 덜 분명하다. 즉, 특히 낮은 밀도의 TAA가 분석될 필요가 있을 때 결과로 생긴 융합 분자가 TCR 펩티드 결합 홈(groove)에 어떻게 강한 영향을 줄 것인지 확신할 수 없다. TCR 펩티드 결합 홈에 작은 뒤틀림(distortion)은, 상대적으로 많은 양의 펩티드 항원이 분석될 예정인 경우에 반드시 문제 있는 것은 아니지만, TAA 결합 특이성 및 선택성을 감소시킬 수 있다. TCR 펩티드 결합 홈 기능에서 작은 변화 역시 낮은 TAA 밀도를 보이는 암세포의 탐지를 위태롭게 할 수 있다.

[0015] 특히 펩티드 항원이 저밀도로 존재할 때 감도 좋고, 선택적이며 또한 재현성 있게 TAA를 탐지하는 방법을 가지는 것은 유용할 것이다. 만일 상기 방법이 탐지가능한 라벨(label)에 융합된 것들 또는 사이토킨과 같은 분자를 포함하는 다양한 가용성 TCR들과 함께 사용될 수 있다면 특히 유용할 것이다.

발명의 상세한 설명

[0016] 본 발명은 일반적으로 MHC 또는 HLA 복합체의 콘텍스트(context)에 있는 세포 또는 조직에 제시되는 펩티드 항원을 포함하는 세포 또는 조직을 탐지하는 방법을 특징으로 한다. 한 실시태양에서, 본 발명은 다음 단계의 적어도 하나 및 바람직하게는 모두를 포함한다:

[0017] a) 세포 또는 조직과 적어도 하나의 가용성 TCR 분자 또는 그 기능성 단편을, 상기 제시된 펩티드 항원 및 상기 가용성 TCR 또는 단편(fragment) 간에 특이적 결합 복합체를 형성하는 조건 하에서 접촉시키는 단계,

[0018] b) 상기 제시된 펩티드 항원에 결합하지 않은 가용성 TCR 분자나 단편을 제거하기에 적합한 조건 하에서 상기 세포 또는 조직을 세척하는 단계; 및

[0019] c) 상기 제시된 펩티드 항원을 포함하는 세포 또는 조직을 표시하는 것으로서 상기 특이적 결합 복합체를 탐지하는 단계.

[0020] 바람직한 실시에서, 본 발명은 세포 또는 조직에 있는 약 100,000 카피 미만, 바람직하게는 약 100에서 약 800 카피와 같이 약 1,000 카피 미만의 펩티드 항원의 양을 탐지하는 것에 이용된다.

[0021] 본 발명의 용도는 몇 가지 장점을 갖는다. 예를 들면, 본 발명은 매우 감도가 우수하고 매우 저-밀도의 내재성 펩티드를 함유하는 것들을 포함하는 MHC/펩티드 복합체, 특히 조작되지 않은 종양 세포에 제시되는 종양-관련 펩티드 항원을 탐지하고 임의로 수량 평가하는 데 이용할 수 있다. 반대로, MHC/펩티드 복합체를 탐지하는 종전의 방법은 상대적으로 더 높은 밀도의 복합체를 탐지할 수 있는 것으로 보고되었다.

[0022] 또한, 본 발명은 조직배열(histoarray), 예를 들면 중앙 조직배열에서 통상 발견되는 것들과 같은 고정된 세포 및 조직을 탐지하고 임의로 수량 평가하는 데 이용할 수 있다. MHC/펩티드 복합체를 탐지하는 능력(종종 "염색(staining)"으로 불림)은, 특히 환자로부터 얻은 세포, 조직 또는 기타 생물학적 샘플을 고정하는 전형적인 인장소인 임상적 또는 기타 의료적 세팅에 유익하다. 이에 반해, 비공유 결합된 펩티드는 조직 가공 단계에서 통상 소실되기 때문에 많은 종전의 TCR-근거한 탐지법은 고정된 조직을 수용할 수 없다.

[0023] 본 발명은 또한 추가적인 이점을 제공한다. 예를 들면, 본 방법은 단량체 및/또는 다량체 가용성 TCR 분자의 사용에 유연하고 적합한 것으로 계획된 것이다. 불행하게도, 과거의 실시는 제한된 유연성과 감도를 가진 다량체 TCR의 사용에 매우 의존했다. 특히, 그러한 다량체 TCR은 붕괴 또는 응집의 잠재성, 표적 부위에 대한 접근성 부족, 면역원성의 증가 및 제거 때문에 생체 내 화상진찰(imaging)에 이용하기 어려웠다.

[0024] 본 발명의 실시는 세포 표면상의 MHC/펩티드 복합체의 콘텍스트에 제시되는 내재성 펩티드 항원을 탐지하는 능력을 제공함으로써 당업계에서 오랫동안 필요로 했던 것에 초점을 둔 것이다. 본 방법은 세포 활동, 병리 및 감염을 모니터링하는 것을 보조하는 것과 같은 다양한 중요한 용도를 갖는다. 예를 들면, 본 발명에 의해 세포 또는 조직상의 내부 중앙-관련 펩티드 항원의 탐지는 암의 존재/정도를 탐지하고 임의로 수량 평가하는 수단을 제공할 수 있다. 과거의 실시는 암세포 표면상의 단백질 항원을 탐지하는 진단용 도구로서 종종 항체에 의존했었다. 그러나, 항체는 일반적으로 세포-막 단백질의 탐지에는 제한된다. 또한, 항체에 의한 탐지는 순환 내로 항원 발산 또는 항원성 단백질의 분비에 의해 종종 손상된다. 항체는 또한 제한된 표적 인식을 갖는다. 본 발명의 실시는 표적 펩티드 항원을 탐지하기 위해 가용성 TCR 및 그 단편을 이용한 고감도이고 믿을만한 탐지 방법을 제공함으로써 이러한 것들 및 기타 어려움을 예방한다.

[0025] 본 발명의 상기 용도 및 이점들은 생체 내(예를 들면, 화상진찰 또는 진단 방법으로서) 또는 시험관 내(예를 들면, 조직배열 또는 FACS 분석에서)를 포함하는 다양한 세팅의 펩티드 항원을 탐지하는데 적용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 측면들을 아래에서 상세히 설명한다.

실시예

[0049] 검토한 것과 같이, 본 발명은 일반적으로 MHC 복합체의 콘텍스트(context)에서 펩티드 항원을 제시하고, 이 항원을 포함하는 세포 또는 조직을 탐지하는 방법에 관한 것이다. 한 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 조직과 적어도 하나의 가용성 TCR 분자 또는 그 기능성 단편을, 제시된 펩티드 항원 및 가용성 TCR 또는 단편(fragment) 간에 특이적 결합 복합체를 형성하는 조건 하에서 접촉시키는 것; 상기 제시된 펩티드 항원에 결합하지 않은 가용성 TCR 분자나 단편을 제거하기에 적합한 조건 하에서 상기 세포 또는 조직을 세척하는 것; 및 제시된 펩티드 항원을 포함하는 세포 또는 조직을 표시하는 것으로서 상기 특이적 결합 복합체를 탐지하는 것을 포함한다.

[0050] 일반적으로, 본 발명의 가용성 TCR의 제조는 여기에 기재된 과정 및 인식된 재조합 DNA 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 플라스미드 DNA의 제조, 제한 효소에 의한 DNA 분할, DNA의 결합(ligation), 세포 내로 DNA의 도입, 세포 배양, 및 발현된 단백질의 분리 및 정제는 공지된 기술이다. 일반적으로 Sambrook et al. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2d ed.1989); 및 Ausubel et al.(1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 참조.

[0051] 다양한 가용성 TCR 구조물의 일반적인 구조 및 그것을 제조하고 이용하는 방법은 출원중인 미합중국 특허 출원 제08/813,781호 및 제08/943,086호에 기재되어 있다.

- [0052] 예를 들어, 특정 가용성 TCR은 V α 쇄의 적어도 하나 및 바람직하게는 양자의 막횡단(transmembrane) 서열이 삭제된 헤테로다이머(heterodimer)이다. 그러나 편의를 위해, 출원중인 특허출원 제08/813,781호 및 제08/943,086호에 의해 보고된 것과 같은 단일- α ("sc-") 구조물을 사용하는 것이 종종 바람직할 것이다.
- [0053] 간단히 언급하면, 단일- α ("sc-") TCR 분자는 적당한 펩티드 링커 서열을 통해 공유결합으로 연결된 V- α 및 V- β 쇄를 포함한다. 예를 들면, 상기 V- α 쇄는 V- α 쇄의 C-말단 및 V- β 쇄의 N-말단에 융합된 적당한 펩티드 링커 서열을 통해 상기 V- β 쇄에 공유로 연결될 수 있다. sc-TCR 융합 단백질의 V- α 및 V- β 쇄는 일반적으로 길이 약 200 내지 400 아미노산이며, 바람직하게는 길이 약 300 내지 350의 아미노산이고, 자연적으로 발생하는 TCR의 V- α 및 V- β 쇄에 대해 최소한 90%가 동일하고, 바람직하게는 100%가 동일할 것이다. 용어 "동일한"은 V- α 또는 V- β 쇄의 아미노산이 대응하는 자연적으로 발생하는 TCR V- β 또는 V- α 쇄와 100% 상동(homologous)인 것을 의미한다.
- [0054] 특허출원 제08/943,086호에 기재된 바와 같이, sc-TCR 분자의 V- α 쇄는 V- β 쇄의 C-말단에 융합된 C- β 쇄 또는 그 단편을 추가로 포함할 수 있다. 또한, V- α 쇄는 V- α 쇄의 C-말단 및 펩티드 링커 서열의 N-말단에 융합된 C- α 쇄 또는 그 단편을 포함할 수 있다. 일반적으로, C- β 쇄 단편을 포함하는 상기 융합 단백질에서, 상기 단편은 대략 50 내지 130 아미노산의 길이를 가질 것이고, C- β 쇄의 마지막 시스테인 잔기(마우스에서 127 위치 또는 인간에서 131 위치에)를 통상적으로 포함하지 않을 것이다. C- α 쇄를 포함하는 상기 융합 단백질에 대해서, 길이는 대략 1 내지 90 아미노산 사이에서 변화될 수 있다(즉, C- α 쇄는 마지막 시스테인에 이르지만 포함하지는 않음). 예를 들어, 한 실시형태에서, 융합 단백질은 아미노산 1 내지 72에서 시작하는 약 1 내지 72 아미노산 사이에 C- α 쇄 단편을 포함한다. 다른 실시형태에서, C- α 쇄 단편은 첫 번째 내지 22(류신) 아미노산에서 시작하는 약 1 내지 22 아미노산 사이에 있다. C- α 쇄 단편은 일반적으로 두 개의 시스테인 잔기를 포함하는 C_{α90} 변이체 및 하나의 시스테인 잔기를 포함하는 C_{α72} 변이체를 제외하면 어떠한 시스테인 잔기도 포함하지 않는다. 대부분의 경우, C- α 및 C- β 쇄 길이의 선택은 선택된 특성의 V쇄 및 가용성 융합 분자의 계획된 용도를 포함하는 몇 가지의 파라미터에 의해 안내된다.
- [0055] 또한 특허출원 제08/943,086호에 기재된 바와 같이, 본 발명의 추가적인 sc-TCR 단백질은 예를 들면, 두 펩티드 링커 서열을 포함하며, 여기서 제1 펩티드 링커 서열은 V- α 쇄의 C-말단 및 V- β 쇄의 N-말단 사이에 융합된다. V- β 쇄의 C-말단은 C- β 쇄 단편의 N-말단에 융합될 수 있다. 제2 펩티드 링커 서열은 이후 V- β 쇄 또는 C- β 쇄 단편의 C-말단에 또는, 필요에 따라, 이후에 설명하는 태그(tag) 분자에 융합된다. 다른 설명된 실시형태에서는, sc-TCR 단백질은 V- β 쇄 또는 그들의 C- β 쇄 단편의 C-말단과 V- α 쇄의 N-말단이 공유결합으로 연결된 적당한 펩티드 링커를 통해 V- β 쇄를 V- α 쇄에 융합하여 만들어질 수 있다.
- [0056] 본 발명에 의한 가용성 TCR 단백질은 하나 이상의 융합된 단백질 태그를 포함할 수 있다. 상기 태그가 "탐지가 가능한(detactable)" 실시형태에서, 상기 가용성 TCR은 "탐지가 가능하게 라벨된(detactably-labeled)"으로 언급될 것이다. 예를 들면, 가용성 융합 단백질에 관해서, 단백질 태그는 sc-TCR V- β 쇄(또는 C- β 쇄 단편)의 C-말단에 융합될 수 있다. 필요에 따라, 출원중인 특허출원 제08/943,086호에 의해 보고된 것, 및 또한 하기의 실시예에서 상세히 설명한 것과 같이 상기 가용성 TCR 단백질은 면역글로빈쇄에 융합될 수 있다.
- [0057] 본 발명과 함께 이용될 바람직한 가용성 융합 단백질은 완전히 기능성이고 가용성이다. 용어 "완전히 기능성인(fully functional)" 또는 유사한 용어는 융합 단백질이 특이적으로 리간드와 결합하는 것을 의미한다. 상기 특이적 결합을 탐지하기 위한 분석은 본 명세서에 기재되어 있고, 웨스턴 블로팅과 같은 표준 면역블로트(immunoblot) 기술을 포함한다. 상기 가용성 TCR의 기능성 단편은 웨스턴 블로트 또는 표면 플라즈마 공명 분석에 의해 측정시, 대응하는 전체 길이 TCR의 적어도 70%, 바람직하게는 약 80% 내지 90% 또는 그 이상의 친화성으로 항원에 결합할 수 있다.

- [0058] 적당한 TCR쇄의 핵산 및 단백질 서열이 개시되어 있다. 예를 들면 *Fundamental Immunology*, (1993) 3rd Ed. W. Paul, Ed. Rsen Press Ltd. New York; 및 Kabat, E.A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.) Public Health Services, National Institutes of Health 참조. 또한 출원중인 특허출원 제08/813,781호와 제08/943,086호 및 다음의 실시예들을 참조.
- [0059] 본 발명의 특정 실시형태에서, 본 방법은 또한 세포 또는 조직을 적어도 하나의 차단제(blocking agent)와 접촉시키는 것을 포함한다. 접촉 단계는 가용성 TCR 또는 단편 및 세포 사이의 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 단계 a)의 이전, 도중 또는 이후를 포함하여 본 방법의 어떠한 시점에서든 수행될 수 있다. 본 발명은 과산화물, 혈청 단백질, 항체 또는 그들의 항원-결합 단편 등의 거의 어떠한 표준 차단제를 함께 사용해도 적합하다.
- [0060] 특정 실시형태에서는, 탐지될 세포 또는 조직상의 MHC 복합체에 대한 TCR의 결합 특이성을 확인하는 것이 종종 유용할 것이다. 그러한 경우, 본 발명은 복합체에 결합된 가용성 TCR 또는 단편과 경쟁하고 특이적으로 결합하는 조건 하에서 특이적 복합체(가용성 TCR 및 세포 또는 조직상에 존재하는 MHC 복합체 사이에 형성된)를 경쟁적 MHC(또는 HLA) 분자 또는 그들의 단편에 접촉하는 것을 또한 포함할 수 있다. 다양한 적당한 MHC 분자가 기재되어 있다.
- [0061] 본 방법의 한 실시형태에서, 가용성 TCR 또는 단편의 특이적 결합은 경쟁적 MHC 분자 또는 그들의 단편을 첨가함에 의해 감소하거나 또는 본질적으로 제거되고, 그리하여 가용성 TCR 또는 단편은 경쟁적인 MHC 분자 또는 그 단편과 결합하여 경쟁 복합체(competition complex)를 형성한다. 본 방법의 한 특정 실시형태에서, 경쟁적 MHC 분자는 가용성 TCR에 대해, 0.01 내지 1000 배(fold) 사이, 또는 바람직하게는 1 내지 100 배 몰 과량의 농도 범위로 첨가된다. 다른 실시형태에서, 경쟁적 MHC 분자는 가용성 TCR의 특이적 결합을 감소시키기에 충분한 단일 농도(즉, 가용성 TCR에 대해 1-배, 10 배, 또는 100-배 몰 과량)로 첨가된다. 필요에 따라, 상기 경쟁 복합체는 탐지될 수 있고, MHC 분자 또는 가용성 TCR 분자의 결합 특이성은 종래의 방법의 하나 또는 조합에 의해 결정될 수 있다. 특정 MHC 분자 또는 단편은 단일-쇄일 수 있지만 대부분의 경우 미합중국 특허 제5,869,270; 6,309,645호; 및 출원중인 특허출원 번호 제09/848,164호에 기재된 것과 같은 가용성 헤테로다이머의 분자들일 것이다. 또한 추가적인 기재에 대해 PCT 출원 PCT/US95/09816호, 및 하기에 제공된 실시예를 참조한다. 전형적인 MHC 분자 또는 단편은 펩티드 항원으로 적제될 것이다.
- [0062] 또한 본 발명을 실시하는데 이용할 수 있는 기타 가용성 TCR 및 MHC 분자와 관련하여 다음의 공개된 미합중국 특허 공개공보를 참조한다: 20020198144; 20020091079; 20020034513; 20030171552; 20030144474; 20030082719; 및 상기 공보에 인용된 참고문헌들.
- [0063] 결합 특이성의 확인이 요구되는 전형적인 방법에서, TCR 분자 또는 단편은 하나 이상의 태그로 탐지가능하게 라벨된다. 적절한 태그는 EE 또는 상업적으로 입수가능한 단일클론 항체에 의해 특이적으로 결합된 myc 에피토프를 포함한다. 일반적으로, 항체, 예를 들면 단일 클론 항체에 의해 특이적으로 결합할 수 있는 다양한 종류의 에피토프들은 단백질 태그로 기능할 수 있다. 다른 적당한 합성 기질들은 분자들과 특이적으로 결합할 수 있는 결합된 항체를 가진 것들을 포함한다. 추가로 태그들은 엔테로키나아제, 제 Xa 인자, 뱀독 또는 트롬빈 분열 부위를 가진 것들을 포함한다. 예를 들면, PCT 공개공보 제W096/13593호를 참조한다.
- [0064] TCR 분자 또는 단편을 탐지가능하게 라벨하는 기타 적당한 태그들은 비오틴(biotin), 스트렙타비딘(streptavidin), 예를 들면 식물 또는 박테리아 기원의 세포 독소, 즉 디프테리아 독소(DT), 시가(shiga) 독소, 아브린, 콜레라 독소, 리신, 사포린, 슈도모나스 엑소톡신(PE), 미국자리공(pokeweed) 항바이러스 단백질, 또는 겔로닌과 같은 식물 또는 박테리아 기원의 세포 독소를 포함한다.

[0065] 상기 독소의 생물학적으로 활성인 단편은 본 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 DT A쇄 및 리신 A쇄를 포함한다. 또한, 독소는 예를 들어 포스포리파아제 효소(예를 들어 포스포리파아제 C)와 같은 세포 표면에서 활성인 시약일 수 있다. 예를 들면 주효인자(effector) 또는 태그를 포함하는 단백질을 제조하고 이용하는 것과 관련하여 기재된 것으로 Moskaug, et al. *J.Biol. Chem.* 264, 15709(1989); Pastan, I. et al. *Cell* 47, 641, 1986; Pasten et al., *Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents*, *Ann. Rev.Biochem.* 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, *Pharmac. Ther.*, 25, 355(1982); PCT공개공보 제WO94/29350호; PCT공개공보 제WO 94/04689호; 및 미합중국 특허 제5,620,939호를 참조한다. 비오틴 수용체 기능을 수행하는 태그의 예는 BirA 태그이고, Bekett, D. et al. *Protein Sci.* 1999 Apr; 8(4):921-9에 기재되어 있다. 하기의 실시예들에 추가로 기재되어 있는 것과 같이, BirA 태그 서열은 TCR 분자에 포함되어 단백질의 비오틴화(biotinylation)를 촉진할 수 있다. 추가로, 태그는 예를 들면, 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토티렉세이트, 아드리아마이신, 블레오마이신 또는 시스플라틴과 같은 치료요법 약제일 수 있다.

[0066] 또한, 태그는 요오드-131, 이트륨-90, 레늄-188, 요오드-123, 인듐-111, 테크네튬-99m, 갈륨-67, 탈륨-201, 또는 비스무트-212와 같은 진단 또는 영상화 연구에 적당한, 방사핵종 또는 킬레이트일 수 있다. 사용된 방사핵종 중에서, 베타-방사체 및 알파-방사체 또한 사용될 수 있지만, 감마-방사체, 양전자-방사체, x-선 방사체, 및 형광-방사체가 위치선정(localization)에 적당하다. 본 발명의 방법에 대한 기타 적당한 방사성 동위원소는 여기에 한정되는 것은 아니지만, 카드뮴-109, 악티늄-225, 악티늄-227, 아스타틴-211, 요오드-125, 요오드-126, 요오드-133, 디스프로슘-165, 디스프로슘-166, 비스무트-212, 비스무트-213, 브롬-77, 인듐-113m, 갈륨-67, 갈륨-68, 루테튬-95, 루테튬-97, 루테튬-101, 루테튬-103, 루테튬-105, 수은-107, 수은-203, 레늄-186, 레늄-188, 텔루르-99m, 텔루르-121m, 텔루르-122m, 텔루르-125m, 툴륨-165, 툴륨-167, 툴륨-168, 불소-18, 은-111, 백금-197, 팔라듐-109, 구리-67, 인-32, 인-33, 이트륨-90, 스칸듐-47, 사마륨-153, 루테튬-177, 로듐-105, 프라세오디뮴-142, 프라세오디뮴-143, 프로메튬-149, 테르븀-161, 홀름-166, 금-198, 금-199, 코발트-57, 코발트-58, 크로뮴-51, 철-59, 셀레늄-75, 및 이테르븀-169를 포함한다. 상기 방사핵종은 바람직하게는 10-5,000kev 범위, 더욱 바람직하게는 50-1,500kev, 가장 바람직하게는 50-500kev를 방사한다.

[0067] 적당한 양전자 방사체 및 기타 유용한 방사핵종은, 여기에 한정되는 것은 아니지만, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ⁵¹Mn, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶²Zn, ⁶³Zn, ⁷⁰As, ⁷¹As, ⁷²As, ⁷⁶Br, ⁸²Rb, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁴mTc, ¹¹⁰In, ¹²⁰I, ¹²⁴I, ¹²²Xe, ¹²⁸Ba, ¹³¹Ba, ⁷Be, ²⁰⁴Bi, ²⁰⁵Bi, ²⁰⁶Bi, ¹⁴C, ³⁶Cl, ⁴⁸Cr, ⁵¹Cr, ¹⁵⁵Eu, ¹⁵³Gd, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ³H, ^{115m}In, ¹⁸⁹Ir, ^{191m}Ir, ¹⁹²Ir, ¹⁹⁴Ir, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ^{119m}Os, ⁴²K, ²²⁶Ra, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ^{82m}Rb, ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁷²Se, ¹⁰⁵Ag, ²²Na, ²⁴Na, ⁸⁹Sr, ³⁵S, ³⁸S, ¹⁷⁷Ta, ⁹⁶Tc, ²⁰¹Tl, ²⁰²Tl, ¹¹³Sn, ¹¹⁷mSn, ¹²¹Sn, ¹⁶⁶Yb, ¹⁷⁴Yb, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ⁶²Zn 및 ⁶⁵Zn을 포함한다.

[0068] 적당한 킬레이트는, 여기에 한정되는 것은 아니지만, 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DPTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 1-치환된 1,4,7,-트리카복시메틸 1,4,7,10 테트라아자시클로도데칸 트리아세트산(DO3A), 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 및 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA)을 포함한다. 추가의 킬레이팅 리간드는 에틸렌비스-(2-히드록시-페닐글리신)(EHPG) 및 5-Cl-EHPG, 5Br-EHPG, 5-Me-EHPG, 5-t-Bu-EHPG, 및 5sec-Bu-EHPG 포함하는, 그 유도체들; 벤조디에틸렌트리아민 펜타아세트산(벤조-DPTA) 및 디벤조-DPTA, 페닐-DPTA, 디페닐-DPTA, 벤질-DPTA, 및 디벤질-DPTA를 포함하는 그 유도체들; 비스-2(히드록시벤질)-에틸렌-디아민디아세트산(HBED) 및 그들의 유도체; 적어도 3개, 더욱 바람직하게는 적어도 6개의 탄소원자, 및 적어도 2개의 헤테로원자(산소 및/또는 질소)를 함유하는 거대고리형 화합물 류이고, 여기서 거대고리형 화합물은 하나의 고리, 또는 헤테로 고리 원소에서 서로 결합된 2 또는 3개의 고리로 이루어질 수 있으며, 예를 들면 벤조-DOTA, 디벤조-DOTA, 및 벤조-NOTA, 여기서 NOTA는 1,4,7-트리아자시클로노난 N, N', N'-트리아세트산, 벤조-TETA, 벤조-DOTMA, 여기서 DOTMA는 1,4,7,10-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라(메틸 테트라아세트산), 및 벤조-TETMA, 여기서 TETMA는 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-(메틸 테트라아세트산); 1,3-프로필렌디아민테트라아세트산(PDTA) 및 트리에틸렌테트라아민헥사아세트산(TTHA)의 유도체; 1,5,10-N, N', N'-트리스(2,3-디히드록시벤조일)-트리카테콜레이트

(LICAM) 및 1,3,5-N, N', N''-트리스(2,3-디히드록시벤조일)아미노메틸벤젠(MECAM)의 유도체를 포함한다.

[0069] 기타 적당한 태그는 폴리히스티딘, 형광 라벨, 화학발광 라벨, 핵 자기 공명 활성 라벨, 발색단(chromophore) 라벨, 양전자 방사 X-선 단층촬영("PET") 스캐너에 의해 탐지할 수 있는 양전자 방사 동위원소, 베타-갈락토시다아제 및 홍당무피록시다아제를 포함하는 피록시다아제와 같은 효소적 표지, 나노입자, 상자성 금속이온, 조영제(contrast agent) 또는 항원성 태그를 포함한다.

[0070] 적당한 형광 라벨은, 여기에 한정되는 것은 아니지만, ¹⁵²Eu 라벨, 플루오레세인 라벨, 이소티오시아네이트 라벨, 로다민 라벨, 피코에리트린 라벨, 피코시아닌 라벨, 알로피코시아닌 라벨, o-프탈데히드(phthaldehyde) 라벨, 텍사스 레드 라벨, 플루오레스카민(fluorescamine) 라벨, 란타니드 포스포(lanthanide phosphor) 라벨, 형광 단백질 라벨, 예를 들면 그린 형광 단백질(GFP) 라벨, 또는 양자 도트(quantum dot) 라벨을 포함할 수 있다. 화학발광 라벨의 예로는 루미날 라벨, 이소루미날 라벨, 방향성 아크리디늄 에스테르 라벨, 이미다졸 라벨, 아크리디늄 염 라벨, 옥살레이트 에스테르 라벨, 루시페린 라벨, 루시페라아제 라벨, 에퀴린 라벨 등을 포함한다.

[0071] 적당한 상자성 금속 이온은, 여기에 한정되는 것은 아니지만, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Gd³⁺, Eu³⁺, Dy³⁺, Pr³⁺, Cr³⁺, Co³⁺, Fe³⁺, Ti³⁺, Tb³⁺, Nd³⁺, Sm³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, Pa⁴⁺, 및 Eu²⁺를 포함한다.

[0072] 이용할 수 있는 효소 표지는 효소 활성 또는 효소 기질을 쉽게 탐지할 수 있는 어떠한 것이라도 포함한다. 상기 효소들은 말레이트 탈수소효소, 포도상구균 핵산분해효소, 델타-5-스테로이드 이성화효소, 알콜 탈수소효소, 아글리세올 포스페이트 탈수소효소, 트리오스 포스페이트 이성화효소, 피록시다아제, 알칼리성 포스포다아제, 아스파라기나아제, 글루코스 산화효소, 베타-갈락토시다아제, 리보핵산분해효소, 우레아제, 카탈라아제, 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소, 글루코아밀라아제, 아세틸콜린 에스테라아제, 루시페라아제, 및 DNA 중합효소를 포함한다.

[0073] 적당한 나노입자는, 여기에 한정되는 것은 아니지만, 고체 콜로이드성 입자, 덴드리머, 리포솜, 미셀, 세라믹 입자, 알루미늄 캡슐, 에멀전화 왁스 또는 브리즈(Brij) 72 입자, 강자성 입자, 금 또는 은 입자, 폴리락트산-글리콜산(poly(lactic-co-glycolic)acid), 폴리글리콜산, 폴리 D- 또는 L-락트산, 폴리카프로락톤 또는 혈청 알부민을 포함하는 생분해성 입자 및 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리스틸렌, 폴리아크릴아미드, 또는 폴리(부틸 시아노아크릴레이트) 또는 그 유도체들을 포함하는 입자를 포함한다. 본 발명의 적용의 일부에서, 폴리에틸렌 글리콜, 다당류, 폴리펩티드, 지질, 실리카 등과 같은 제제로 코팅된 나노입자가 이용될 수 있다. 상기 코팅된 나노입자는 개선된 흡수성, 생체이용률, 조직 분배, 조직 교차 반응성, 독성, 약물 동력학/역학, 또는 종양 위치 결정(localization)을 갖는다. 표적 리간드를 나노입자에 부착하는 방법은 기재되어 있으며 가용성 TCR-근거한 시약에 적용될 수 있다(예를 들면, Nob et al. 2004. J Pharm Sci.93:1980-92 참조).

[0074] 본 발명의 가용성 TCR은 단량체 및 다량체 TCR을 포함한다. 다량체 TCR 분자는 TCR 단백질이 다량체화(multimerization)를 용이하게 하는 폴리펩티드 도메인 또는 태그에 융합된 것을 포함한다. 상기 도메인은 면역 글로빈, 류신 지퍼(leucine zipper), 및 단백질 이량체화를 용이하게 하는 헬릭스-턴-헬릭스(helix-turn-helix) 및 배럴-배럴 모티프를 포함한다. 상기 태그는 항체-결합 에피토프, 스트렙타비딘-결합 펩티드, 6xHis 모티프, 비오틴 리가아제 표적 모티프 등을 포함한다. 다량체 TCR 분자는 또한 화학적으로 교차결합된 반응성 아미노산 또는 다당류를 통해 생성된 것들을 포함한다. 상기 아미노산(또는 다당류)은 TCR 구조 고유의 것일 수 있고, 유전자 변형을 통해 첨가될 수도 있다. 다량체 TCR 분자는 또한 여기에서 기재한 것과 같은 탐지가능한 라벨을 포함할 수 있거나 또는 포함할 수 없는 다른 분자(또는 분자들)에 부착되어 생성된 것들을 포함한다. 상기 부착 분자는, 기재한 바와 같이, 스트렙타비딘, 비오틴, 항체, 단백질 A 또는 단백질-, 지질-, 및 다당류-코팅되거나, 코팅되지 않은 비즈(beads), 나노입자, 고체-상 표면, 어레이(array), 기질을 포함하는 골격

(scaffold)을 포함한다. 예를 들면, 탐지가 가능한 라벨이 비오틴인 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 TCR 분자를 다량체화하기 위해 TCR 분자를 스트렙타비딘과 조합하는 것을 추가로 포함한다.

[0075] 여기에 기재된 어떠한 태그들이라도 본 발명의 방법에서 사용된 가용성 TCR 의 탐지가 가능한 라벨로서 이용될 수 있으며, 특히 관심 대상이 되는 펩티드 항원을 발현하는 세포 또는 조직을 탐지하는데 이용될 수 있다는 것이 인정될 것이다.

[0076] 본 발명의 목적은 세포 또는 조직을 "고정(fix)"하기에 충분한 변성제(denaturing agent)와 접촉된 세포 또는 조직을 이용하여 수행하는 펩티드 항원 탐지 방법을 제공하는 것이다. 상기 제제(agent)의 예들은 당업계에 공지이고 포름알데히드(포르말린), 글루타르알데히드, 메탄올, 프로판올, 등과 같은 알콜, 및 벤젠 및 자일렌과 같은 유기 용매를 포함한다. 논의된 바와 같이, 세포 또는 조직이 고정되어 있는 경우라도 본 발명의 방법이 실질적으로 세포 상의 MHC 분자 및 동종의(cognate) 펩티드 항원 간의 상호작용을 방해하는 것은 아니라는 것을 발견했다. 따라서, 본 발명은 고정된 세포 또는 조직에 이용될 수 있으며, 그래서 구조적 완전성을 유지하는 것을 돕고 본 방법의 신뢰도를 향상시킨다.

[0077] 따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은 추가로 세포 또는 조직을 적어도 하나의 변성제와 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 접촉은 단계 a) 및 세포 또는 조직의 변성(고정)을 포함하는 거의 어떤 때라도 수행될 수 있다.

[0078] 또한, 논의한 바와 같이, 본 발명은 조직배열(histoarray)로 당업계에서 언급되는 것과 같은 배열에서 세포 또는 조직의 이용에 적합하다. 즉, 본 발명은 반복 방식으로 세포 또는 조직 샘플(진료소에서 접하는 것들과 같은)을 스크린하는 데 요구되는 감도와 신뢰성을 갖고 있다. 많은 상기 배열은 미합중국 특허 번호 제 6,466,690; 4,384,193; 6,602,661; 6,594,432; 6,566,063; 6,406,840; 6,246,785호; 및 거기에 인용된 참고문헌들에 기재된 것들과 같이 당업계에 공지이다.

[0079] 따라서, 한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 복수의 세포 또는 조직을 어레이(array)에 위치시키는 것을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 세포 또는 조직은 종양 세포를 포함하는(또는 구성하는) 것으로 알려졌거나, 추정되는 것이다. 본 방법은 세포 또는 조직을 포함하는 어레이의 각 요소에서 수행될 수 있다. 경우에 따라, 본 방법은 어레이의 각 요소에서 실질적으로 동시에 수행된다. 한 실시형태에서, 본 방법의 단계 c)는 어레이의 스캔 및 특이적 결합 복합체의 존재를 나타내는 영상 신호의 발생을 추가로 포함한다. 필요에 따라, 상기 단계는 사용자에게 실시간으로 신호를 출력하고 선택적으로 영상 신호의 저장된 영상을 색인화하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명은 종양-관련 펩티드 항원 또는 TAA로 언급된 것들을 포함하는 다양한 펩티드 항원을 탐지하는데 사용될 수 있다. 세포 또는 조직은 본 방법에 따라 현탁되거나(suspended), 반-현탁되거나, 고정될 수 있다.

[0081] 논의한 바와 같이, 가용성 TCR 분자 또는 단편은 적어도 하나의 단일-쇄 TCR 을 포함할 수 있거나, 또는 막횡단(transmembrane) 도메인을 제거하기 위해 재조합하여 조정된 것과 같은 헤테로다имер 구조물일 수 있다. 출원중인 제08/813,781 및 08/943,086호 특허출원 및 하기 실시예를 참조한다. 상기 가용성 TCR 분자 또는 단편은 비오틴, 스트렙타비딘, 효소 또는 촉매적으로 활성인 그들의 단편, 방사핵종, 형광, 인광성(phosphorescent), 또는 화학발광 분자로 라벨링하는 것을 포함하여 여기서 약속한 바와 같은 전략의 하나 또는 조합에 의해 탐지가능하게 라벨될 수 있다. 예들로는 잘 알려진 그린(또는 적색) 형광 단백질 또는 그 단편을 포함한다.

[0082] 특정 실시형태에서, 가용성 TCR은 분자가 적어도 하나의 사이토킨과 공유결합된 단일-쇄 TCR이다. 상기 사이토킨의 예들로는, 여기에 한정되는 것은 아니지만, IL-2와, GM-CSF, IFN γ , IFN- α 등과 같은 콜로니 자극 인자를

포함한다. 한 예로, 가용성 TCR 분자 또는 단편은 적어도 하나 및 바람직하게는 하나의 공유결합된 사이토킨 또는 그 단편을 포함하는 단일-쇄 TCR이다.

[0083] 특정의 다른 변형에서, 가용성 TCR은 적어도 하나의 공유결합된 면역글로불린 도메인 또는 그 단편을 포함하는 단일-쇄 TCR 또는 단편이다. 일부 실시형태에서 단일-쇄 TCR 또는 단편은 IgG1 도메인 또는 단편을 포함하는 서열에 융합된다.

[0084] 또 다른 실시형태에서, MHC 복합체는 HLA-A2 제한이다.

[0085] 본 방법에, 예를 들면, 가용성 TCR 또는 단편과 펩티드 항원을 포함하지 않는 세포 사이의 어떠한 결합을 탐지하는 것에 의한 조절을 포함하는 것이 종종 유용할 것이다.

[0086] 본 발명에 이용할 특정 펩티드 항원은 p53(aa149-157) 또는 p53(aa 264-272)을 포함한다.

[0087] 본 발명의 방법은 생체 내, 생체 외, 또는 시험관 내에서 수행할 수 있다.

[0088] 예를 들어, HLA 타이핑(HLA typing)(예를 들어, A.K. Abbas, Cellular and Molecular Immunology, 328 페이지 (W.B. Saunders Co.1991) 참조)은 본 발명과 함께 실행될 수 있다. 생체 내 화상진찰(imaging) 적용을 위해, 가용성 TCR은 바람직하게는 포유동물 및 TCR 또는 그 단편의 결합에 대해 공지의 공정에 의해 스캔된 대상에게 투여될 수 있는 방사핵종(예를 들면, 125I, 32P, 99Tc) 또는 기타 탐지가능한 태그를 포함한다. 포유동물의 상기 분석은 예를 들면 면역계 질환을 수반한 APC의 이상 발현(undesired expression) 및 암을 포함하는 많은 질환의 진단 및 치료를 보조할 수 있다.

[0089] 본 발명은 또한 종양을 가지거나 또는 종양을 가진 것으로 의심되는 대상에서 종양-관련 펩티드 항원을 가진 종양의 생체 내 화상진찰에 이용할 수 있다. 이러한 방법의 실행에서, 종양 상의 펩티드/MHC 복합체의 콘텍스트에 있는 종양-관련 펩티드 항원에 특이적으로 결합하는 탐지가능하게 라벨된 가용성 TCR 분자 또는 그 단편을 포함하는 조성물이 대상에게 투여된다. 조성물은 종양 부위에 축적되는데 충분한 시간 동안 생체 내 투여된다. 축적된 조성물은 그 후 종양을 화상진찰할 수 있도록 탐지된다.

[0090] TCR을 포함하는 조성물은 유전자자리(locus)에 비경구로(정맥 내로, 근육 내로, 피하조직 내로, 종양 내로 등과 같은) 및/또는 관심 대상이 되는 조직, 기관 또는 세포에 대한 접근을 제공하는 경로에 의해 투여될 수 있다. 다른 적용에서, TCR을 포함하는 조성물은 비강 내로, 경구로 또는 경피로 투여될 수 있다.

[0091] 가용성 TCR의 축적된 조성물은 다양한 수단에 의해 탐지될 수 있다. 이러한 것으로는 종래의 신틸레이션 카메라, 감마 카메라, 직선구동형 스캐너(rectilinear scanner), PET 스캐너, SPECT 스캐너, MRI 스캐너, NMR 스캐너, 초음파 기기, X-선 기기, 발광(luminescence) 화상진찰 시스템, 및 형광 화상진찰 시스템으로 구성된 그룹으로부터 선택된 탐지기에 의한 탐지를 포함한다.

[0092] 본 발명의 화상진찰 방법은 일부 적용에서 종양 세포 또는 조직의 탐지를 개선할 수 있는 프리타게팅(pretargeting) 방법을 추가로 포함한다. 이러한 접근은 다-단계 프로토콜을 이용한다. 예를 들면, 표적 TCR은 아비딘 또는 비오틴의 어느 하나와 접합하고, 그 후 예를 들면, 주사에 의해 투여되고, 관심 대상이 되는 종양에 집중된다. 이어서, 라벨을 가진, 비오틴 또는 아비딘의 어느 하나(어느 것이 표적 항체에 결합되었는지에 의

존)는 주사되고 각각 아비딘 또는 비오틴에 결합함에 의해 1차 항체의 부위에 집중된다. 선택적으로 상호작용하는 분자의 다른 쌍은 비오틴/스트렙타비딘 분자를 치환할 수 있다. 몇몇의 프리타게팅 접근은 TCR-근거 체제를 프리타겟하는데 이용될 수 있는 항체(Chang et al 2002. Mol. Cancer Therap. 1:553-563)로 개발됐다.

[0093] 본 발명은 또한 형광 활성 세포 분류(FACS)와 관련한 적용에 채택할 수 있다. FACS는 가용성 TCR 또는 그 단편과 표적 세포 사이의 상호작용을 탐지하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 가용성 TCR은 표준 방법에 따라 비오틴화(biotinylated)되고, 스트렙타비딘-피코에리트린(PE)과 조합되어, 예를 들어 라벨된 sc-TCR 사량체를 형성할 수 있다. 그러나, 진술과 같이 다량체화는 종종 필요하지 않을 것이다. FACS는 T2 세포 및 종양 세포주와 같은 가용성 TCR 및 적절한 표적 세포의 상호작용을 정성적으로(qualitatively) 측정하는데 이용될 수 있다.

[0094] 다음의 관심 대상이 되는 예들은 유전학적으로 인간 IL-2에 연결된, p53 아미노산 잔기 264-272에 이르는 변이 없는 p53 펩티드를 인식하는 가용성 단일쇄 HLA-A2.1 제한된 TCR을 포함하는 신규 융합 단백질의 구조 및 특성을 보여준다. 펩티드 적재된 HLA-A2에 대한 상기 분자의 TCR 부위의 펩티드 특이적 결합 및 상기 분자의 IL-2부위의 특이적 IL-2 수용체 결합 능력 및 생물활성(bioactivity)을 조사하였다. 관심 대상이 되는 예들은 이러한 유형의 TCR 근거한 융합 단백질이 항체 근거한 표적화된 종양 치료의 대안 또는 항체 근거한 면역사이토킨과 같은 다른 표적화된 종양 치료에 대한 첨가로 기능할 수 있음을 보여준다. 표적 종양에 대한 구별되고 다른 접근은 첨가적이거나 또는 상승효과의 항종양 효과를 입증할 수 있다.

[0095] 관심 대상이 되는 예들은 또한 HLA-A2.1의 콘텍스트에서 인간 p53 펩티드(aa 264-272)를 인식하는 가용성의 3 도메인 마우스 scTCR의 구조 및 발현을 보여준다. 상기 3 도메인 scTCR은 높은 수준으로 발현되고 포유동물 세포로부터 분비되는 가용성 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 산출하는 인간 IL-2에 융합된다. 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 TCR 부위는 MHC-제한된, 펩티드 특이적 항원 결합 특성을 보유하고, IL-2 부위는 IL-2 수용체에 결합하며 생물학적으로 활성이다. 또한, 관심 대상이 되는 예들은 추가로 이러한 융합 단백질이 표적 및 작동 세포(effector cell)를 접합할 수 있고, 마우스에서 바람직한 약물 동력학을 나타내며, 표적 종양 세포에 결합할 수 있고, 또한 항-종양 효과를 갖는 것을 보여준다. 따라서, 가용성 scTCR 융합 단백질은 표적의 면역치료에 대해서 항원의 다른 레퍼토리에 대한 접근을 제공할 것이며, 이것은 항체 근거한 면역 치료에 의해 인식될 수 없다. TCR-근거한 치료는 항체 근거한 치료의 대안 또는 다른 표적된 종양 치료에 대한 유용한 첨가로 작용할 것이다.

[0096] 본 발명에 기재된 것은 가용성 TCR이 펩티드 항원에 대해 충분한 친화도를 가져서 우수한 탐지를 허용하는 것을 보여준다. 특히, 264scTCR의 친화도는 조작되지 않은 종양 세포에 결합하는 것과 표적 및 작동 세포를 유효하게 접합하기에 충분하다.

[0097] 종양 치료를 위해 사이토킨의 전신 투여를 둘러싼 보고된 문제점은 혈청의 짧은 반감기 및 이러한 단백질의 독성이다. 중요하게도, 본 발명의 264scTCR/IL-2 융합 단백질은 외견상(apparent) 약 3시간의 혈청 반감기를 가지고 혈액 중에 그대로 남아 있는 것으로 보인다. 그러므로, 264scTCR/IL-2 융합 단백질은 IL-2의 반감기를 효과적으로 증가시키고 혈액 중에서 그대로 생존하여, 면역 조절에 의한 암 치료에 대한 새로운 제제임을 시사하고 있다. 관심 대상이 되는 예에서 사용된 것보다 높은 투여량에서, 본 발명의 융합 단백질의 혈청 반감기는 [3,25,37,38]로 증가할 것이고, 그것에 의해 종양에 대한 분자의 효능은 더욱 개선된다.

[0098] 종양 부위에 집중된 IL-2는 국부 T-세포 및 기타 IL-2 반응 세포를 활성화하고, 그것에 의해 종양의 부위에 작동 세포를 보강한다는 인식이 있다. 그러므로, 종양의 부위에 IL-2를 집중시키는 것에 의해, 본 발명의 TCR 융합 분자는 다양한 T-세포 클론의 활성화 및 증식뿐만 아니라 NK 세포 또는 기타 선천적인 면역계의 일원의 활성화를 포함한 원기왕성한 면역 반응을 강력하게 하는 것을 도울 수 있다. 상기 다방면에 걸친 항-종양 반응은 원발종양(primary tumor) 및 원격전이(distant metastasis)에 대해 더욱 효과적일 것이다.

- [0099] 테이터는 TCR 및 사이토킨을 포함하는 생물학적으로 활성인 이관능성 분자를 구성하는 것이 가능하다는 것을 보여준다. 이러한 융합 단백질은 종양 세포에 결합하고, 표적 및 작동 세포의 접합을 조정할 수 있고, 적당한 약물동력학적 특성을 가진다. p53 외에도, 상향조절되고 종양 상 MHC의 콘텍스트에 존재하는 다른 유전자 제품들 또는 바이러스 감염된 세포들이 본 발명의 TCR-근거한 면역 치료에 대한 표적으로 이용될 수 있다. 추가로, GM-CSF, IFN γ , 또는 IFN- α 와 같은 다른 면역조절 분자들도 TCR에 연결되어 항-종양 또는 항-바이러스 반응에 대한 다른 작동 세포를 활성화할 수 있다. 이러한 신규 TCR 융합은 암 및 바이러스 감염의 치료에 대한 면역치료학의 새로운 부류를 형성할 것이다.
- [0100] 용어 "특이적 결합" 또는 유사한 용어는 다른 분자와 결합하여, 특정 결합 쌍을 형성하는 본 명세서에 개시된 분자를 의미한다. 그러나, 이 분자는 기술분야에 공지된 웨스턴 블로팅 ELISA, RIA, 운동 이동 분석(mobility shift assay), 효소-면역 분석, 경쟁적(competitive) 분석, 포화 분석 또는 다른 단백질 결합 분석에 의해 결정된 다른 분자를 인식하거나 결합하지 않는다. 일반적으로, Ausubel, et al. *supra*; Harlow and Lane in, *Antibodies: Laboratory Manual*(1988) 을 참조하고, 참조 문헌은 분자들 사이의 특이적 결합을 탐지하는 방법의 예에 대하여 인용된다.
- [0101] TCR을 기술하는 의미로서의 용어 "완전한 가용성" 또는 유사한 용어는 그것이 수성 버퍼, 예를 들어 세포 배지로부터 낮은 관성력(G-force) 원심분리 하에서 쉽게 침전되지 않음을 의미한다. 또한, sc-TCR 융합 단백질은 음이온 또는 비이온성 세정제의 낮은 농도 또는 제로 농도에서 약 5-37 $^{\circ}$ C 초과 온도 및 중성 또는 중성 근처의 pH에서 융합 단백질이 수용액으로 잔류한다면 가용성이다. 이들 조건하에서, 가용성 단백질은 종종, 예를 들어 약 10 내지 50 스베드베르그(svedberg) 단위 미만의 침강 값을 갖는다. 본 명세서에서 언급된 수용액은, 전형적으로 약 5-9의 pH 범위 이내, 및 약 2 mM 및 500 mM 사이의 이온 강도 범위의 pH를 설정하는 버퍼링 화합물을 갖는다. 때로는, 프로테아제 억제제 또는 온화한 비이온성 세정제가 첨가되고 필요에 따라 소 혈청 알부민(BSA)과 같은 담체 단백질이 수mg/ml로 첨가될 수 있다. 예시적인 수성 버퍼에는 표준 포스페이트 버퍼된 염수, 트리스 버퍼된 염수, 또는 기타 공지된 버퍼 및 세포 배지 체제를 포함한다.
- [0102] 하기 비-제한적인 실시예는 본 발명의 예시이다.
- [0103] 실시예 1 - TCR 융합 단백질 구조물의 생성
- [0104] 3개의 도메인을 포함하는, 인간 IL-2에 융합된 p53 펩티드 항원에 대해 특이적인 HLA-A2.1 제한된 마우스 TCR 융합 단백질을 만들었다. 상기 TCR 융합 단백질 구조물에 대해, 인간 p53(aa 264-272) 펩티드에 대해 특이적인 TCR을 생산하는 마우스 T 세포 클론에서 분리된 RNA로부터 V α 및 V β /C α 영역을 RT-PCR에 의해 생성하였다. TCR α 쇄(V α 3)의 가변 영역의 카르복시-말단 끝을 유연한 링커(G $_4$ S) $_4$ [21] 를 통해 V β (V β 3)의 N-말단에 융합하여 TCR의 항원 결합 부위를 생성하였다. V β 도메인에 직접 연결된, C β 도메인은 최종 시스테인의 바로 앞의 아미노산 잔기에서 절단하여, 막횡단 및 세포질 도메인을 제거하고, 가용성 단일-쇄 TCR 분자를 생성하였다(도 1A 및 1B). 인간 IL-2를 짧은 링커(아미노산 서열 VNAKTTAPSVYPLAPV; 서열 번호:1)를 통해 TCR 부위에 융합하였다. EE 태그(아미노산 서열 EEEEEYMPME; 서열 번호:2)를 융합 분자의 IL-2 부위의 바로 아래쪽에 삽입하여 필요에 따라 항-EE 태그 mAb[11]에 의해 TCR/IL-2 융합 단백질을 탐지하도록 했다. 포유동물 세포 발현은 CMV 프로모터에 의해 구동되며, 분비는 항체 경쇄 리더에 의해 지시되며, 선택은 G418 내성에 의해 수행됐다.
- [0105] 도 1을 다음과 같이 더 자세히 설명한다. 1A) 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 도메인 구조의 개략적으로 나타냄. 1B) 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 아미노산 서열(1B). 융합 단백질의 각 도메인에 대한 아미노산 수는 도면에 나타내었다.

- [0106] 실시예 2 - 포유동물 세포에서 TCR/IL-2 융합 단백질의 발현
- [0107] 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 특징화하기 위해 264scTCR/IL-2 구조물로 CHO-K1 세포에 안정하게 감염시켰다. 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 분비하는 안정한 감염체(transfectant)를 Material and Methods에 기재된 ELISA 분석을 이용하여 선택하였다. 이러한 ELISA에 대한 양성 신호는 감염된 세포가 항-마우스 TCR 및 항-인간 IL-2 항체 양자에 의해 인식될 수 있는 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 분비하는 것을 나타내고 분비된 264scTCR/IL-2가 감염된 세포에 적당히 모여서 접혀 있고 또한 세포로부터 분비될 때 손상되지 않은 채 남아있음을 시사한다.
- [0108] 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 세포 상청액(supernate)으로부터 면역친화 크로마토그래피에 의해 대략 1.8mg/1 상청액의 수율로 정제하였다. 정제된 융합 단백질은 SDS-PAGE 및 쿠마시(Coomassie) 염색을 하였다. 환원 또는 비-환원 중 어느 하나의 조건 하에서, 현저히 염색된 밴드는 약 60kDA(도 2)에서 이동하였고, 이것은 이러한 단백질에 대해 예측된 분자 질량과 일치하며 세포로부터 분비될 때 예상치 못한 분자내 이황화 결합 없이 융합 단백질이 손상되지 않은 채 남아있음을 나타낸다. 비환원 겔에서 더 큰 밴드는 융합 단백질의 이량체 형태일 수 있다. 이러한 결론은 더 큰 밴드가 융합 단백질의 질량의 대략 두 배의 겔보기 분자 질량을 갖고, 이러한 밴드가 환원 조건 하에서 융합 단백질의 크기로 감소된다는 관찰에 근거한다. 상기 데이터는 감염된 CHO 세포가 기대하는 분자 질량의 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 생산하고, 그것이 가용성 융합 단백질로서 적당히 접히고, 모이고, 분비되는 것을 나타낸다.
- [0109] 도 2를 다음과 같이 더 자세히 설명한다. CHO 세포는 264scTCR/IL-2 발현 벡터로 안정하게 감염시켰다. 분비된 융합 단백질을 면역친화 크로마토그래피에 의해 정제하였고, 도면의 가장 위에서 도시한 것과 같이 환원 또는 비-환원 중 어느 하나의 조건 하에서 SDS-PAGE를 하였다. SDS-PAGE 겔은 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다.
- [0110] 실시예 3 - 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 TCR 부위의 MHC/펩티드 결합 능력
- [0111] 264scTCR/IL-2 융합 단백질이 펩티드 적재된 MHC에 결합하는 능력을 유동 세포 분석기로 측정하였다. T2 세포는 p53(aa264-272) 또는 p53(aa 149-157)(대조군) 펩티드로 적재되었고, 264scTCR/IL-2 융합 단백질로 염색하였다. 항-TCR C β mAb 또는 항-IL-2 탐지 항체 중 어느 것으로 탐지했을 때 p53(aa264-272)로 적재된 세포는 264scTCR/IL-2로 양성으로 염색됐다(도 3A 및 3B). p53(aa 149-157)대조군 펩티드로 적재된 세포는 항-TCR C β mAb 또는 항-IL-2 탐지 항체 중 어느 것으로 도 염색되지 않았다. p53(aa 149-157) 적재된 T2 세포가 염색되지 않았던 것이 p53(aa 149-157) 펩티드가 HLA-A2에 결합하는 능력이 없음에 기인한 것이 아님을 입증하기 위해서, 펩티드 없이, p53(aa 149-157), 또는 p53(aa264-272) 펩티드 적재된 T세포를 BB7.2 α -HLA-A2 단일 클론 항체로 염색하였다. 양쪽 p53 펩티드로 적재된 세포는 펩티드 없이 적재된 세포보다 더 강하게 염색되었고, 두 펩티드 모두 HLA-A2 분자에 결합할 수 있음을 시사한다(도 3C). T2는 또한 IL-2 수용체에 대해 염색되었고, IL-2 수용체를 발현하지 않는 것으로 발견됐다; 그러므로, 이러한 데이터는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 결합이 융합 단백질의 TCR 성분에 의해 조정된다는 것을 나타낸다. T2 세포가 대조군 펩티드로 적재되었을 때 융합 단백질에 의해 염색되지 않은 것 또한 염색이 TCR 성분에 의해 조정되고, 염색이 적절한 펩티드에 대해서 특이적이라는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 TCR 부위가 HLA-A2의 콘텍스트에서 그 특이적 펩티드를 인식할 수 있음을 나타낸다.
- [0112] 도 3을 다음과 같이 더 자세히 설명한다. T2 세포는 p53(aa264-272) 펩티드(회색 선) 또는 p53(aa 149-157) 펩티드(검은 선)로 적재하였고, 3A)264scTCR/IL-2 융합 단백질 및 항-TCR C β mAb 또는 3B)264scTCR/IL-2 융합 단백질 및 항-IL-2 mAb 중 어느 것으로 염색하였다. 3C) p53(aa264-272) 펩티드(진한 회색 선)로, p53(aa 149-157) 펩티드(얇은 회색 선)로 적재된, 또는 펩티드 적재 없는(검은 선) T2 세포를 항-HLA-A2 BB7.2mAb에 이어 FITC 라벨된 염소 항-마우스 IgG로 염색하였다. 어두운 피크는 염색되지 않은 T2 세포이다.
- [0113] 실시예 4 - 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 IL-2 부위의 IL-2 수용체 결합 능력
- [0114] 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 IL-2 부위의 IL-2 수용체 결합 능력을 유동 세포 분석기로 관찰하였다. 일차 마우스(primary mouse) 비장세포를 분리하고 rIL-2 및 항-CD3으로 자극하여 T세포 모세포(blast)를 생성하였다.

IL-2 수용체를 발현하는 자극된 비장세포는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 존재 하에서만 p53(aa264-272) 적체된 HLA-A2 사량체(tetramer)와 함께 양성으로 염색되었다(도 4A). 유사하게, 구조적으로 IL-2 수용체를 발현하는, CTLL-2 마우스 세포독성 T 림프구는, 264scTCR/IL-2 융합 단백질로는 양성으로 염색되었지만, 264scTCR/카파 융합 단백질로는 염색되지 않았다(도 4B). CTLL-2 세포를 α -인간 CD25 차단 항체 또는 동형 대조군 항체에 이어 264scTCR/IL-2로 배양했을 때, 세포가 차단 항체와 함께 배양한 경우 염색은 상당히 감소했으나, 동형 대조군 항체와 배양한 경우 그렇지 않았다. 264scTCR/마우스 카파 κ 융합 단백질 또는 IL-2 수용체 차단 항체와 함께 배양된 CTLL-2 세포로부터의 신호의 부족은 이러한 세포의 염색이 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 IL-2 부위에 의해 조정되는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 IL-2 부위가 IL-2 수용체에 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0115] 도 4를 다음과 같이 더 자세히 설명한다. 4A):마우스 비장세포를 IL-2 및 항-CD3 ϵ mAb으로 자극하고 이어서 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 존재(회색 선) 또는 부재(검은 선) 중 배양하였다. 결합된 융합 단백질은 PE 라벨된 HLA-A2 p53(aa 264-272) 사량체로 탐지되었다. 4B): CTLL-2 세포를 α -인간 CD25 차단 항체 또는 동형 대조군 항체에 이어 264scTCR/IL-2 또는 264scTCR/카파 융합 단백질과 함께 배양하였다. 결합된 융합 단백질은 PE 라벨된 α -TCR-V β 3 항체로 탐지되었다. 어두운 피크는 염색되지 않은 CTLL-2 세포이다. 검은 선 : 264scTCR/IL-2 만으로 염색된 CTLL-2 세포. 회색 점선 : 대조군 항체에 이어서 264scTCR/IL-2와 함께 배양된 CTLL-2 세포. 옅은 회색 선 : α -인간 CD25 차단 항체에 이어서 264scTCR/IL-2와 함께 배양된 CTLL-2 세포. 진한 회색 선 : 264scTCR/카파 융합 단백질로 염색된 CTLL-2 세포. 검은 파선 : α -TCR-V β 로 염색된 CTLL-2 세포.

[0116] 실시예 5 - 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 생물학적 활성

[0117] 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 IL-2 부위의 생물학적 활성을 입증하기 위해서, IL-2 의존성 CTLL-2 세포를 264scTCR/IL-2 또는 재조합 IL-2 중 어느 것과 함께 다양한 농도에서 배양하고, 세포 생육성을 WST-1을 이용하여 평가하였다. 도 5A에서 보는 바와 같이, CTLL-2 세포의 성장을 지지하는 rIL-2 또는 264scTCR/IL-2의 능력은 투여량 의존성이며, 여기서는 재조합 IL-2 또는 264scTCR/IL-2 어느 것이라도 더 높은 투여량에서 더 많은 세포 증식이 있었다. 또한 재조합 IL-2 또는 264scTCR/IL-2 어느 것의 등가의 물량을 사용한 경우 세포 증식이 유사한 수준이었다. 특이성에 대한 추가의 대조군으로서, CTLL-2 세포를 α -인간 CD25 차단 항체 또는 동형 대조군과 함께 264scTCR/IL-2로 배양하였다. 배양액 중 차단 항체가 포함된 경우에, 증식은 차단 항체의 두 농도에서 상당히 감소하였지만, 대조군 항체의 어떠한 농도에서도 CTLL-2 세포의 증식은 영향받지 않았다(도 5B). 이러한 데이터는 264scTCR/IL-2의 IL-2 부위가 시험관 내에서 재조합 IL-2와 유사한 생물학적 활성을 가지며, 융합 단백질의 증식 활성은 분자의 IL-2 부위에 의존함을 나타낸다.

[0118] 같은 기원의 MHC/펩티드에 대한 264scTCR의 해리 상수는 표면 플라즈마 공명 탐지를 이용하여 생리적인 조건에서 대략 10^{-7} M임을 발견하였다.

[0119] 도 5를 다음과 같이 더 자세히 설명한다. 5A): CTLL-2 세포를 264scTCR/IL-2(실선) 또는 재조합 IL-2(점선)와 함께 도면의 아래쪽에 나타낸 바와 같이 다양한 농도에서 배양하였다. 5B): CTLL-2 세포를 도면의 아래쪽에 나타낸 바와 같이 α -인간 CD25 차단 항체 또는 동형 대조군 항체와 함께 264scTCR/IL-2로 배양하였다. 세포 생육성을 배양에 의해 WST-1으로 측정하고, 흡광도를 450nm에서 읽었다. Cab+5 : 5 μ g 대조군 항체; Cab+50 : 50 μ g 대조군 항체; Bab+5 : 5 μ g 차단 항체; Bab+50 : 50 μ g 차단 항체;

[0120] 실시예 6 - 264scTCR/IL-2 융합 단백질에 의해 조정된 세포의 접합

[0121] 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 유용한 특성은 각각 TCR 및 사이토킨 부위를 통해, 표적 및 작동 세포를 접합하는 능력일 것이다. 264scTCR/IL-2 융합 단백질이 효과적으로 세포를 접합할 수 있는지를 입증하기 위해서, T2세포를 p53(aa264-272) 펩티드 또는 p53(aa 149-157) 펩티드로 적체하고 이어서 디히드로에티디움(HE)으로 라벨했다. CTLL-2 세포를 칼세인 AM으로 라벨하고 상기 두 라벨된 세포 집단을 혼합하고 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 존재 또는 부재 중 배양하였다. 샘플들은 유동 세포 분석기로 분석하였다. 두 세포 집단을 264scTCR/IL-

2 융합 단백질 없이 배양한 경우(도 6A 및 6B) 또는 T2 세포를 대조군 펩티드로 적재하고 264scTCR/IL-2 융합 단백질 존재 중 CTLL-2 세포와 함께 배양한 경우(도 6C), 이중으로 염색된 세포 창(cell window)으로 떨어진 대략 0.46%만의 전체 집단과 함께(도 6A, 6B, 및 6C, 영역 2) 각각 전체 집단의 대략 45%를 나타내면서(도 6A, 6B, 및 6C, 영역 1 및 3) 세포는 유동 세포 분석 히스토그램 상 두 현저한 집단으로 남았다. 그러나, T2 세포를 p53(aa264-272) 펩티드로 적재하고 264scTCR/IL-2 융합 단백질 존재 중 CTLL-2 세포와 함께 배양한 경우(도 6D), 전체 집단의 4.1%를 나타내면서, 이중으로 염색된 세포 집단이 출현하며(도 6D, 영역 2, 접합된 세포), 이는 T2 세포가 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 통해 CTLL-2 세포에 접합되었음을 시사한다.

[0122] 도 6을 다음과 같이 더 자세히 설명한다. T2 세포를 p53(aa 264-272)(6B 및 6D) 또는 p53(aa 149-157)(대조군) 펩티드(6A 및 6C)로 적재하고 이어서 HE으로 라벨했다. CTLL-2 세포를 칼세인 AM으로 라벨하였다. 라벨된 세포를 혼합하고 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 존재(6C 및 6D) 또는 부재(6A 및 6B) 중 배양하였고, 샘플들은 유동 세포 분석기(flow cytometry)에 의해 분석하였다. 이용된 적재된 펩티드, 및 융합 단백질의 존재 또는 부재를 포함하는 분석 조건은 각각의 히스토그램 바로 아래에 나타났다. 단일 염색된 영역은 1 및 3으로 표시되고, 이중으로 염색된 세포 집단은 2로 표시된다.

[0123] 실시예 7 - 마우스에서 264scTCR/IL-2의 약물 동력학

[0124] 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 약물 동력학을 BALB/c 마우스에서 측정하였다. 마우스에 정맥내로 주사하였고 혈청 샘플을 다양한 시점에서 수집했다. 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 혈청 수준을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 항-TCR mAb 포획/항-IL-2 Ab 탐지(도 7A), 항-TCR mAb 포획/항-TCR mAb 탐지(도 7B), 또는 항-IL-2 mAb 포획/항-IL-2 다클론 Ab 탐지(도 7C)를 이용하여 ELISA 탐지를 수행하여, 융합 단백질이 생체 내에서 변형되거나, 분열되었는지를 측정했다. 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 주사한 마우스는 눈에 띄는 독성의 징후를 보이지 않았다. 이러한 분석에서, 264scTCR/IL-2의 0.75 내지 2.5 μ g/ml의 최대 농도는 사용된 ELISA 형식에 의존하여 1.6 내지 3.0 시간의 길보기 혈청 반감기로 탐지되었다. 자유 IL-2의 보고된 혈청 반감기가 겨우 약 5분이기 때문에[6], 이러한 데이터는 융합 단백질이 생체 내에서 분열되지 않지만 대신 혈액 중에서 상대적으로 긴 시간동안 손상되지 않고 남아있음을 나타낸다. 이러한 연구에서 측정된 264scTCR/IL-2의 반감기에서의 적은 변이성은 거의 틀림없이 ELISA 분석의 감도에서의 차이에 기인한 것이다.

[0125] 도 7을 다음과 같이 더 자세히 설명한다. BALB/c 마우스에 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 주사하였고 혈청 샘플을 주사 후 15분 및 30분, 1, 4, 8 및 24시간에서 수집했다. 264scTCR/IL-2의 혈청 농도를 다음 형식을 이용하여 ELISA에 의해 측정하였다: 7A): 항-TCR mAb 포획/항-IL-2 Ab 탐지; 7B): 항-TCR mAb 포획/항-TCR mAb 탐지; 및 7C): 항-IL-2 mAb 포획/항-IL-2 Ab 탐지.

[0126] 실시예 8 - 264scTCR/IL-2로 종양 세포 염색

[0127] 264scTCR/IL-2 융합 단백질이 만약 그 표적 종양 세포를 인식하고 결합할 수 있다면 유용할 것이다. 264scTCR/IL-2가 종양 세포에 결합할 수 있는지를 실험하기 위해서, HLA-A2.1 및 p53 양자를 발현하는, A375 인간 흑색종 세포를 264scTCR/IL-2 또는 TCR/IL-2 융합 단백질과 무관한 3C8로 염색하였다. 264scTCR/IL-2로 배양한 세포는 탐지 항체로 양성으로 염색된 반면(도 8), 융합 단백질로 배양하지 않은 세포 및 3C8로 배양한 세포는 H57-597 탐지 항체로 염색되지 않았다. 이 결과는 264scTCR/IL-2 융합 단백질이 그 표적 종양 세포를 인식하고 결합할 수 있으며 생체 내에서 항-암 치료에 유용하다는 것을 의미한다.

[0128] 도 8을 다음과 같이 더 자세히 설명한다. A375 인간 흑색종 세포를 융합 단백질 없이(검은 파선), 5 μ g의 3C8 TCR/IL-2 융합 단백질(대조군)(점선), 또는 5 μ g의 264scTCR/IL-2 융합 단백질(검은 실선)로 배양하고 H57-597 mAb로 염색하였다. 염색되지 않은 세포는 어두운 부분으로 나타난다.

[0129] 실시예 9 - 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 항-종양 효과

- [0130] 264scTCR/IL-2 융합 단백질이 생체 내에서 항-종양 효과를 갖는지를 측정하기 위하여, 실험적 전이 분석을 수행하였다. 암컷 무흉선 누드 마우스에 전이성 높은 A75 인간 흑색종 서브클론(subclone)인, A375-C15N을 주사하고, 264scTCR/IL-2 또는 재조합IL-2의 다양한 투여량으로 처치하였다. 종양 세포 주사 후 42일에, 폐 결절(nodule)을 세었다. 264scTCR/IL-2 및 재조합IL-2 양자는 투여량 의존성으로 폐 전이를 감소시켰다(도 9). 그러나, 모든 투여량에서 264scTCR/IL-2 융합 단백질로는 폐 전이가 더 많이 감소하였으며, 이는 종양에 대해 사이토킨을 타게팅하는 것이 암 치료에 더 큰 효과를 제공할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0131] 264scTCR/IL-2 또는 재조합 IL-2 융합 단백질로 처치한 마우스는 눈에 띄는 독성의 징후를 보이지 않았다. 양 처치는 폐 전이의 감소를 가져왔다; 그러나, 모든 투여량에서 264scTCR/IL-2로 처치한 것은 재조합 IL-2보다 더 효과적이었다.
- [0132]
- [0133] 도 9를 다음과 같이 더 자세히 설명한다. 암컷 무흉선 누드 마우스에 전이성 높은 A375-C15N 세포를 주사하고, 264scTCR/IL-2, 재조합IL-2 또는 PBS로 처치하였다. 종양 세포 주사 후 42일에, 폐를 제거하여, 폐 결절을 세었고, 또한 PBS 처치된 대조군 그룹에 대해서 폐 결절의 평균 수를 도시하였다.
- [0134] 실시예 10 - 단량체 및 다량체 264scTCR 융합 단백질에 의해 펩티드-적재된 T2 세포의 염색의 유동 세포 분석기 분석
- [0135] 다양한 264scTCR 융합 단백질의 단량체 및 다량체 형태를 제조하여 T2 세포에 대한 결합을, 하기의 단락 11 및 12의 방법에 기재된 유동 세포 분석기로 분석하였다. 도 10에서 도시된 바와 같이, 결과는 264scTCR 융합 단백질이 p53(aa149-157)-적재된 세포(도 10A)보다 p53(aa264-273)-적재된 T2 세포(도 B)를 더 많이 염색했음을 입증한다. 도면에서, 염색되지 않은 T2 세포는 히스토그램에서 라벨된 T2 149 비염색.001로 나타나고; 2차 시약(H57-PE)으로 염색된 p53(aa149-157)- 및 p53(aa264-273)- 적재된 T2 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "T2 149 H57.002" 및 "T2 264 H57.009"로 나타나고; 다량체 264scTCR/IL-2에 이어 H57-PE로 염색된 p53(aa149-157)- 및 p53(aa264-273)- 적재된 T2 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "T2 149 IgG H57.003" 및 "T2 264 IgG H57.010"로 나타나고; 264scTCR/IL-2에 이어 H57-PE로 염색된 p53(aa149-157)- 및 p53(aa264-273)- 적재된 T2 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "T2 149 IL2 H57.004" 및 "T2 264 IL2 H57.011"로 나타나고; 단량체 264scTCR/trunIgG1에 이어 H57-PE로 염색된 p53(aa149-157)- 및 p53(aa264-273)- 적재된 T2 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "T2 149 trun H57.005" 및 "T2 264 trun H57.012"로 나타나고; 단량체 264scTCR/BirA에 이어 H57-PE로 염색된 p53(aa149-157)- 및 p53(aa264-273)- 적재된 T2 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "T2 149 BirA H57.006" 및 "T2 264 BirA H57.013"로 나타난다. 이러한 결과로부터 관찰된 염색이 펩티드-특이적임을 확인할 수 있다.
- [0136] 264scTCR의 단량체 형태는 어느 정도로 염색할 수 있다. 예를 들면, 264scTCR/trunIgG 형태로 염색한 것에 대한 평균 채널 형광(mean channel fluorescence; MCF)은 p53(aa149-157)- 적재된 세포에 대해 10.95부터 p53(aa264-273)-적재된 세포에 대해 55.34까지 증가했다. 유사하게, 264scTCR/BirA 형태에 대한 MCF는 p53(aa149-157)-적재된 세포에 대해 13.41부터 p53(aa264-273)-적재된 세포에 대해 95.14까지 증가했다. 264scTCR의 다량체 형태는 펩티드-적재된 T2 세포를 보다 많은 정도로 특이적으로 염색할 수 있다. 예를 들면, 264scTCR/IgG1 형태에 대한 MCF는 p53(aa149-157)- 적재된 세포에 대해 119부터 p53(aa264-273)-적재된 세포에 대해 863까지 증가했다.
- [0137] 실시예 11 - 264scTCR 융합 단백질에 의한 종양 세포의 염색
- [0138] 종양 세포를 염색하는 264scTCR 시약의 능력을 또한 실험하였다. 배양된 A375 세포를 PBS(pH7.4)에서 10mM EDTA로 분리하고, 세척 버퍼로 두 번 세척하였다. 세포 염색을 4 μ g 264scTCR/IgG1 융합 단백질을 이용하여 23°C에서 45분 동안 수행하였다. 세포를 한 번 세척하고 염소 항-인간 IgG Fc(항 IgG-FITC)의 3 μ g FITC-접합된 F(ab')₂

단편으로 염색하였다. 두 번 세척한 후, 염색된 세포를 재현탁하고, FACScan 상에서 분석하였다. 항 IgG-FITC 단독으로 염색된 A375 세포를 대조군으로 하였다.

[0139] 도 11A와 관련하여, 이러한 분석의 결과는 A375 종양 세포가 264scTCR/IgG1 융합 단백질로 염색될 수 있음을 보여준다. 이 패널에서(11A), 항 IgG-FITC 단독 또는 264scTCR/IgG1에 이어 항 IgG-FITC로 염색된 A375 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "A375-FITC.005" 및 "A375-264FITC.006"으로 나타난다. 최적 염색 조건의 특성을 나타내기 위해 A375 종양 세포를 이용한 추가적인 실험을 수행했다. 예를 들면, 2차 시약으로서 FITC-접합된 항체 대신 PE-접합된 항-인간 IgG 항체(항-IgG-PE)(도 11B) 또는 PE-접합된 H57 mAb(도 11D)를 이용하였다. 도 11B에서, 항 IgG-PE 단독 또는 264scTCR/IgG1에 이어서 항 IgG-PE로 염색된 A375 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "A375-PE.007" 및 "A375-264.PE.008"로 나타난다. 도 11D에서, 항 H57-PE 단독 또는 264scTCR/IgG1에 이어서 H57-PE로 염색된 A375 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "A375-H57PE.009" 및 "A375-264.H57PE.010"으로 나타난다. 각각의 경우에서, 264scTCR/IgG1은 A375 종양 세포를 염색하였다. 스트렙타비딘-PE(SA-PE)로 다량체를 형성한 비오틴화된 264scTCR/BirA 또한 A375 세포를 염색하기 위해 이용되었고(도 11C), 스트렙타비딘-PE 단독으로 염색된 세포에 비교해 증가된 염색을 보였다. 도 11C와 관련하여, SA-PE 단독 또는 SA-PE와 복합체를 형성한 비오틴화된 264scTCR/BirA로 염색된 A375 세포는 각각, 히스토그램에서 라벨된 "A375-SAPE.001" 및 "A375-264BtnSAPE.002"로 나타난다.

[0140] 실시예 12 - 유동 세포 분석기로 탐지된 264scTCR 융합 단백질에 의한 고정된 세포의 염색

[0141] 논의한 바와 같이, 보존된 또는 "고정된" 샘플에서 MHC/펩티드 복합체를 탐지하는 능력은, 특히 환자로부터 얻은 세포, 조직 또는 기타 생물학적 샘플을 고정하는 전형적인 장소인 임상적 또는 기타 의료적 세팅에 유익하다. 그러나, MHC/펩티드 복합체는 3개의 분리된 폴리펩티드 쇄로 구성된 세포 표면 항원을 나타내므로, MHC/펩티드 복합체의 구조의 보존이 전형적인 고정 방법에 따른 가용성 TCR에 의한 탐지에 대해 손상되지 않고 충분히 남아있을지가 불확실하다. 가용성 TCR 염색이 고정된 세포 상에서 수행될 수 있는지를 평가하기 위해서, 펩티드-적재된 T2 세포 및 조작되지 않은 A375 종양 세포를 유동 세포 분석기로 분석하였다. 배양된 A375 세포를 PBS(pH7.4)에서 10mM EDTA로 분리하고, 세척 버퍼로 두 번 세척하였다. T2 세포를 50 μM p53(aa264-272)와 함께 3시간 동안 배양하고, 세척 버퍼로 두 번 세척하였다. 양 세포 타입을 3.7% 포르말데히드로 5분 동안 고정하고 두 번 세척하였다. 세포 염색을 20 μg의 HLA-A2.1/p53(aa264-272) 사량체의 존재 또는 부재중에서 4 μg 264scTCR/IgG1 또는 CMVscTCR/IgG1 융합 단백질을 이용하여 23°C에서 45분 동안 수행하였다. 세포를 한 번 세척하고 염소 항-인간 IgG Fc의 3 μg FITC-접합된 F(ab')₂ 단편으로 염색하였다. 두 번 세척한 후, 염색된 세포를 재현탁하고, FACScan 상에서 분석하였다.

[0142] 도 12A와 관련하여, 결과는 CMVscTCR/IgG1("A375F-CMV.005"로 라벨된 히스토그램)으로 염색한 것은 배경 위에 탐지되지 않은 반면, 264scTCR/IgG1 융합 단백질이 포르말데히드-고정된 A375 세포를 염색하였음("A375F-264.006"로 라벨된 히스토그램)을 보여준다. CMV 펩티드는 A375 세포 상에서 존재하지 않기 때문에, CMVscTCR/IgG1 대조군 시약의 사용은 TCR 또는 IgG1 도메인과 종양 세포 사이의 어떤 비-특이적 상호작용의 측정을 제공한다. 264scTCR/IgG1 융합 단백질 및 CMVscTCR/IgG1 대조군 사이의 종양 세포 염색에서의 차이점을 결정함에 의해, 이러한 방법은 고정된 종양 세포 샘플의 표면상 종양 항원 제시 수준의 직접 측정을 허용한다.

[0143] 264scTCR/IgG1 융합 단백질로 염색한 A375 세포가 TCR-특이적인 것을 확인하기 위해서, HLA-A2.1/p53(aa264-272) 사량체를 차단 시약으로 이용하였다. 264scTCR/IgG1 융합 단백질로 A375 세포를 염색하는 것은 HLA-A2.1/p53(aa264-272)변이성 차단 시약의 첨가에 의해 감소하였고("A375F-264TET.264.008"로 라벨된 히스토그램), 또한 264scTCR/IgG1이 종양 세포에 특이적으로 결합할 수 있음을 나타낸다. 기대와 같이, 264scTCR/IgG1로 염색된 A375 세포에 HLA-A2.1/pCMV 변이성 시약의 첨가는 264scTCR/IgG1 시약의 특이적 염색에 어떠한 효과도 갖지 않았다("A375F-264TET.CMV.007"로 라벨된 히스토그램). 유사한 결과가 펩티드-적재된 T2 세포에서 관찰되었다(도 12B).

- [0144] 이러한 결과는 단량체 및 다량체 가용성 TCR 제제가 MHC 복합체의 콘택스트에서 펩티드를 제시하는 세포를 특이적으로 염색할 수 있음을 입증한다. 또한, 가용성 TCR 시약은 MHC 복합체의 콘택스트에서 종양 항원을 제시하는 비고정 및 고정된 종양 세포를 특이적으로 염색할 수 있다. 또한 가용성 TCR 시약에 의한 세포의 특이적 염색은 가용성 TCR 시약을 결합하는 완전한 MHC 분자의 첨가에 의해 감소될 수 있다. 대조군 염색 반응에서의 가용성 TCR 시약에 대해서 1 내지 100 배 몰 과량의 완전한 MHC 분자는 가용성 TCR 염색의 비-특이적 결합 성분에 대비해 특이적 결합 성분(예를 들어 펩티드-MHC에 결합)을 구별하는데 특히 유용하다. 비-특이적 및 특이적 가용성 TCR 결합의 다른 정도를 보일 수 있는 다른 세포 및 조직의 염색과 비교할 때 이것은 적절한 것이다. 예를 들면, 다른 샘플에서(세포 또는 조직) 가용성 TCR의 비-특이적 결합 간의 변이성은 대조군 염색 반응에서 적당한 완전한 MHC 분자를 사용하지 않고 특이적 가용성 TCR 결합의 정도를 결정하는 것을 매우 어렵게 한다.
- [0145] 실시예 13 - 면역형광 현미경분석에 의해 탐지된 264scTCR 융합 단백질에 의한 고정된 세포의 염색
- [0146] HLA-A2 및 p53 발현에 따라서 다양한 몇 가지 세포주(예를 들어, A375, HT29 및 Saos2)를 분석을 위해 선택하고, 264scTCR/IgG1 융합 단백질 또는 대조군 융합 단백질 CMVscTCR/IgG1으로 염색하였다. 세포를 덮개 유리에서 24시간 동안 배양하고, 이어서 3.7% 포름알데히드로 5분간 고정하고 세척 버퍼(PBS 중 0.5% BSA 및 0.1% 소듐 아지드)로 두 번 세척하였다. BSA는 비특이적 단백질 결합을 감소시키는 차단 제제를 나타낸다. 세포는 5%의 염소 혈청(normal goat serum;NGS)을 함유하는 200 μ l PBS에서 10 μ g 264scTCR/IgG1 또는 CMVscTCR/IgG1 융합 단백질로 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 염색하였다. NGS는 비특이적 결합을 감소시키는 차단 제제를 나타낸다. 세포를 두 번 세척하고 염소 항-인간 IgG Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)의 3 μ g FITC-접합된 F(ab')₂ 단편으로 염색하였다. 세포를 두 번 세척하고, 이어서 평형 버퍼(Molecular Probes, Eugene, OR)로 한 번 세척하였다. 덮개 유리를 글리세롤 버퍼(Molecular Probes, Eugene, OR)에서 항-페이드(anti-fade) 시약으로 유리 슬라이드에 올려놓고 네일 오일(nail oil)로 밀봉했다. 슬라이드를 SPOT RT 카메라 및 SPOT RT 소프트웨어 v3.2(Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI)와 함께 니콘 epi-형광 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 기록하였다.
- [0147] HLA-A2 염색에 대하여, 고정된 세포를 5% 염소 혈청(NGS)을 함유하는 200 μ l PBS에서, 10 μ g의 마우스 항-인간 HLA-A2 항체인 BB7.2로 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 염색하였다. 세포를 두 번 세척하고 염소 항-마우스 IgG Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)의 4 μ g FITC-접합된 F(ab')₂ 단편으로 염색하였다. 세포를 두 번 세척하고, 이어서 평형 버퍼(Molecular Probes, Eugene, OR)로 한 번 세척하였다. 덮개 유리를 올려놓고 상기의 기재와 같이 기록하였다.
- [0148] p53 염색에 대하여, 고정된 세포를 20분 동안 0.2% 트린톤(Trinton)X-100과 함께 투과하고, 이어서 5% 염소 혈청(NGS)을 함유하는 200 μ l PBS에서, 10 μ g의 마우스 항-p53 항체인 PAb122로 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 염색하였다. 세포를 두 번 세척하고 염소 항-마우스 IgG Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)의 4 μ g FITC-접합된 F(ab')₂ 단편으로 염색하였다. 세포를 두 번 세척하고, 이어서 평형 버퍼(Molecular Probes, Eugene, OR)로 한 번 세척하였다. 덮개 유리를 올려놓고 상기의 기재와 같이 기록하였다.
- [0149] 도 13에서 보는 바와 같이, A375 세포는 HLA-A2 및 p53에 대해 양성으로 염색되었고, HT29는 p53에 대해 양성으로 염색되었으나 HLA-A2에 대해서는 염색되지 않고, Saos2 세포는 HLA-A2에 대해서 양성으로 염색되었으나 p53에 대해서는 염색되지 않았다. 264scTCR/IgG1로 한 면역형광 염색은 오직 A375 세포에 대해서 탐지되었고, 어떠한 세포도 CMVscTCR/IgG1으로는 양성으로 염색되지 않았다. 이러한 결과는 264scTCR 시약으로 양성 염색하는 것에 대해 HLA-A2 및 p53의 존재가 필요하다는 것을 확인하는 것이다. 어떤 종양 세포주에서 비-특이적 CMVscTCR/IgG1 시약 또는 HLA-A2 및 p53 항원이 발현되지 않는 경우의 264scTCR 시약으로는 어떠한 배경 염색도 관찰되지 않았다.
- [0150] 실시예 14 - 264scTCR 융합 단백질을 이용한 정량 염색

- [0151] 펩티드-적재된 T2 세포를 결합할 수 있는 264scTCR 복합체의 수를 측정하였다. T2 세포를 다양한 양의 p53(aa264-272)과 함께 3시간 동안 배양하고, 이어서 세척 버퍼로 두 번 세척하였다. 세포 염색을 3.7 μ g의 264scTCR/BirA-스트렙타비딘-PE-사양체를 이용하여 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 수행하였다. 두 번 세척한 후, 염색된 세포를 재현탁하고, FACScan 상에서 분석하였다. 선택적으로, 세포 염색을 3.76 μ g의 264scTCR/IgG1 융합 단백질을 이용하여 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 수행하였다. 세포를 한 번 세척하고, 3 μ g의 PE-접합된 항-인간 IgG 항체로 염색하였다. 두 번 세척한 후, 염색된 세포를 재현탁하고, FACScan 상에서 분석하였다.
- [0152] 이러한 분석의 결과는 264scTCR/BirA 사양체에 대해서도 14 및 264scTCR/IgG1 융합체에 대해서도 15에 나타내었다. p53 펩티드의 증가량에 따른 염색 수준의 증가가 264scTCR/BirA 사양체 및 264scTCR/IgG1 융합체 모두에 대해서 발견되었다. 세포를 염색하는 복합체의 수를 정량하기 위해서, 염색된 세포 상의 형광 강도의 수준을 비드(QuantibRITE PE beads; BD Biosciences)당 PE 분자의 수를 알고 있는 측정 비드(calibration bead)의 형광 강도와 비교하고, 그리하여 유동 세포 분석기를 이용하여 PE-염색된 세포를 정량하는 수단을 제공하였다.
- [0153] 264scTCR/BirA 사양체 및 264scTCR/IgG1 융합체에 대한 펩티드의 다양한 농도의 복합체/세포의 계산된 수를 도 16에 도시하였다. 결과는 겨우 400 scTCR 복합체의 결합이 염색된 세포 상에서 탐지될 수 있었음을 나타낸다. 또한, 264scTCR/IgG1 융합체에 이어 PE-접합된 항-인간 IgG 항체로 염색하는 것은 264scTCR/BirA 사양체에 서 보인 것에 비해 염색에서 약 4-10 배 증가를 가져왔다. 이러한 증가는 가능하게는 항체 및/또는 동일한 264scTCR/IgG1 융합과 반응하는 복합 항체에 대한 높은 수준의 PE-접합의 결과이다.
- [0154] 앞서 말한 것으로부터 상기에 기재된 것과 같은 TCR 결합을 정량적으로 탐지하는 방법은 희소한 항원의 탐지를 최적화하는데 유익할 것으로 평가될 것이다. 상기 방법은 종양 세포에 결합하는 264scTCR 시약을 탐지하는데 적용되었다. 세포는 기재한 바와 같이 제조되었고 다양한 양의 264scTCR/BirA-스트렙타비딘-PE 사양체로 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 염색하였다. 세포를 두 번 세척하고, 염색된 세포를 재현탁하고, FACScan 상에서 분석하였다. 선택적으로, 세포 염색을 다양한 양의 264scTCR/IgG1 융합 단백질로 23 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 수행하였다. 세포를 한 번 세척하고, 2.5 μ g의 PE-접합된 H57 항체로 염색하였다. 두 번 세척한 후, 염색된 세포를 재현탁하고, FACScan 상에서 분석하였다.
- [0155] 각각의 경우, 세포를 염색한 복합체의 수는 염색된 세포의 형광 강도의 수준을 비드당 PE 분자의 수를 알고 있는 측정 비드(calibration bead)의 형광 강도와 비교하여 측정하였다. 도 17A 및 17B는 264scTCR 시약의 양을 증가시키면서 A375 종양 세포를 염색한 것을 나타낸다. 도 18 및 19는 264scTCR/BirA 및 264scTCR/IgG1 시약의 양을 증가시키면서 각각 3개의 종양 세포주(A375, HT29 및 Saos2)에 대해서 관찰된 염색의 정량을 나타낸다. HLA-A2/p53 양성인 A375 종양 세포주는 두 시약으로 모두 염색되었으며, HT29(HLA-A2-음성) 및 Saos2(p53-음성)보다 2-5 배 더 많은 264scTCR 시약과 결합하였다. 또한, 264scTCR 시약의 양이 증가함에 따라 A375 세포의 특이적 염색이 증가하였다. 500 정도의 염색된 복합체의 분별 탐지는 A375 세포의 염색을 다른 종양 세포주의 염색과 비교하여 측정할 수 있다. 이러한 정량적인 염색 연구의 결과는 세포당 단지 300-500 정도의 HLA-A2/펩티드 복합체에 대한 264scTCR 시약의 특이적 결합을 쉽게 탐지할 수 있음을 나타낸다. 또한, 이러한 염색 반응의 감도는 다른 TCR 및 2차 시약의 이용으로 증가되고, 최적화될 수 있다.
- [0156] 실시예 15 - 264scTCR 융합 단백질에 의한 조작되지 않은 종양 조직의 면역조직화학 염색
- [0157] 피하 종양을 생성하기 위해서, A375 인간 흑색종 세포(1×10^6)를 누드 마우스의 왼쪽 어깨에 피하로 주사하였다. 종양이 500mm³까지 자라게 하고 마우스를 안락사시켰다. 종양을 피개(overlying) 피부와 함께 절개하고 중성의 완충 포르말린으로 밤새 고정하였다. 전이 폐 결절의 생성을 위해, MDA-MB-231 세포(1×10^6)를 누드 마우스의 측면의 꼬리 정맥으로 주사하고, 전이 폐 결절이 발육하도록 하였다. 18일 후, 마우스를 안락사시키고, 폐를 제거하고 중성의 완충 포르말린에서 고정하였다. 고정된 조직을 70%, 90%, 95%, 100%(두 번) 에탄올에서 순차적인 30분 배양에 이어 자일렌에서 두 번의 30분 배양에 의해 탈수하였다. 이어서 조직을 파라핀에 함

몰시킴고 5 μ m 절편을 제조하고 현미경 슬라이드 위에 놓았다.

- [0158] 면역조직화학 염색을 위해서, 절편을 자일렌에서 각각 5분 동안 두 번 행구고 100%(두 번), 95%, 및 85% 에탄올에서 각 2분 동안 순차적인 배양으로 다시 수화하였다. PBS로 2번의 5분 세척 및 증류수로 한 번의 5분 세척 후, 슬라이드를 3% H₂O₂에서 5분 동안 배양하여 내재성 퍼옥시다아제를 비활성화시키고 이어서 증류수에서 한 번 5분 세척하였다. 슬라이드를 항원 재생 용액(Dako)에 넣고 20분 동안 97°C로 가열했다. 슬라이드를 20분 동안 상온에서 항원 재생 용액에서 냉각하고 PBS에서 두 번 5분 세척하였다.
- [0159] 비-HRP 라벨된 2차 시약을 사용한 경우, 슬라이드는 아비딘/비오틴 차단 용액에서 배양하고(각 용액에서 10분) PBS에서 두 번 5분 세척하였다. 슬라이드는 상온에서 30분 동안 PBS에서 1% 염소 혈청(NGS)에서 차단하였다. 상기 차단 단계는 2차 염소 항체 제제의 비-특이적 상호작용에 기인한 배경 염색을 감소시키는데 필요하다. 그 후 10 μ g(1% NGS에서 100 μ l당)의 264scTCR/IgG1 융합 단백질 또는 대조군 CMVscTCR/IgG1 융합 단백질의 존재 또는 부재중에서 슬라이드를 상온에서 45분 동안 배양하였다. PBS에서 두 번 5분 세척 후, 슬라이드를 상온에서 45분 동안 염소-항 인간 IgG Fc γ 의 1.6 μ g(1% NGS에서 200 μ l당) HRP-라벨된 F(ab')₂ 단편으로 염색하였다. 슬라이드를 PBS로 각각 5분 동안 두 번 세척하였다. 슬라이드를 밝은 배경이 나타날 때까지 DAB 용액(Dako)에서 배양하였다. 슬라이드를 수도물에서 행구고 15초 동안 헤마톡실린에서 대비염색하였다. 수도물로 세척한 후, 슬라이드를 각각 3분 동안 100% 에탄올의 3개 조(bath) 및 자일렌의 3개 조에서 행구고 퍼마운트(Permount;Fisher)로 봉입하였다. 염색한 조직의 수준은 광학현미경에 의해 평가하고, SPOT RT 카메라 및 SPOT RT 소프트웨어 v3.2(Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI)로 기록하였다.
- [0160] A375 종양 절편을 이용한 전형적인 면역조직화학 분석을 도 20 및 21에 도시한다. 결과는 CMVscTCR/IgG1 융합 단백질 또는 2차 항체 단독에 비교해 264scTCR/IgG1 융합 단백질로 배양되었을 때 A375 종양 절편이 훨씬 더 강하게(예를 들어, 더 어둡게 착색된 것으로 나타남) 염색되었다는 것을 보였다. CMVscTCR/IgG1 융합 단백질로 관찰된 배경 염색은 다음의 인간 IgG1 항체에 이어 HRP-라벨된 항-인간 IgG 항체 배양에서 보인 그것에 필적하고, 이것은 배경 염색이 IgG 도메인과 조직 절편의 상호작용 때문일 것임을 나타낸다. 또한, 264scTCR/IgG1 융합 단백질에 의한 마우스 간질(stromal) 조직의 염색은 동일 절편에 존재하는 A375 종양 조직에서 보인 염색보다 매우 적었다. 이러한 결과는 인간 종양 샘플의 특성을 기술하는데 전형적으로 이용되는 면역조직화학 방법에 의해 264scTCR 시약이 고정된 인간 종양 조직 절편을 특이적으로 염색할 수 있음을 나타낸다.
- [0161] 실시예 16 - 264scTCR 융합 단백질로 종양 조직배열(histoarray)의 면역조직화학 염색
- [0162] 인간 종양 조직배열은 상업적인 출처로부터 또는 Tissue Array Research Program(NCI)로부터 얻어진다. 염색을 위해, 조직배열 슬라이드를 자일렌에서 각각 5분 동안 두 번 행구고 100%(두 번), 95%, 및 85% 에탄올에서 각 2분 동안 순차적인 배양으로 다시 수화하였다. PBS로 2번의 5분 세척 및 증류수로 한 번의 5분 세척 후, 슬라이드를 3% H₂O₂에서 5분 동안 배양하여 내재성 퍼옥시다아제를 비활성화시키고, 이어서 증류수에서 한 번 5분 세척하였다. 슬라이드를 항원 재생 용액(Dako)에 넣고 20분 동안 97°C로 가열했다. 슬라이드를 20분 동안 상온에서 항원 재생 용액에서 냉각하고 PBS에서 두 번 5분 세척하였다. 비-HRP 라벨된 2차 시약을 사용한 경우, 슬라이드는 아비딘/비오틴 차단 용액에서 배양하고(각 용액에서 10분) PBS에서 두 번 5분 세척하였다. 슬라이드는 상온에서 30분 동안 PBS에서 1% 염소 혈청(NGS)에서 차단하고, 이어서 264scTCR/IgG1 융합 단백질 또는 CMVscTCR/IgG1 융합 단백질(또는 다른 비-결합 scTCR 시약)의 존재 또는 부재중에서 슬라이드를 상온에서 45분 동안 배양하였다.
- [0163] PBS에서 두 번 5분 세척 후, 슬라이드를 상온에서 45분 동안 2차 시약(HRP-라벨된 염소 항-인간 IgG 또는 비오틴화된 항-TCR C β 항체)에서 배양하였다. 슬라이드를 PBS로 각각 5분 동안 두 번 세척하였다.
- [0164] 만일 비-HRP 2차 시약을 사용한 경우, 슬라이드는 상온에서 15분 동안 스트렙타비딘 퍼옥시다아제 용액으로 배

양하고, PBS로 두 번 5분 세척하였다. 선택적으로, scTCR/BirA-스트렙타비딘 퍼록시다아제 시약을 전술한 시약 대신 염색 시약으로 사용할 수 있다.

[0165] 슬라이드를 밝은 배경이 나타날 때까지 DAB 용액(Dako)에서 배양하였다. 슬라이드를 수도물에서 헹구고 15초 동안 헤마톡실린에서 대비염색하였다. 수도물로 세척한 후, 슬라이드를 각각 100% 에탄올의 3개 교체(change) 및 자일렌의 3개 교체에서 헹구고 이어서 퍼마운트(Fisher)로 봉입하였다. 염색한 조직의 수준은 광학현미경에 의해 평가하고, 예를 들면 SPOT RT 카메라 및 SPOT RT 소프트웨어 v3.2(Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI)로 촬영하였다.

[0166] HLA-A2 및 p53을 발현하는 종양은 CMVscTCR 융합 단백질에 비해 264scTCR 융합 단백질로 배양했을 때 차별되게 염색될 것으로 기대된다. 조직배열이 융합 단백질 없이 배양되었을 때 염색은 거의 안되거나 또는 안될 것으로 예상된다. 또한, HLA-A2 및/또는 p53에 대해 음성인 종양 조직은 HLA-A2/p53-양성 종양 조직에 비해 264scTCR 융합 단백질로 감소된 염색을 보일 것으로 예상된다. 이것은 종양의 유형이 어떤 것인지, 및 그들의 상대적인 비율에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있으며, 264scTCR 융합 단백질에 의해 인식될 수 있고, 264scTCR 근거한 치료로 주어진 유형의 종양을 치료하는데 권한만한 결정을 돕는다.

[0167] 실시예 17 - 형광 TCR 시약으로 생체 내 종양의 화상진찰(imaging)

[0168] GFP(그린 형광 단백질) 또는 Luc(개똥벌레 루시페라아제)에 융합된 264scTCR을 생성하기 위해 발현 벡터를 제조하였다. 이러한 벡터는 IgG1 유전자 단편을 GFP 또는 Luc 코딩 서열로 치환함에 의해 본 명세서에 기재된 264scTCR/IgG1 발현 벡터로부터 생성할 수 있다. 이러한 코딩 서열의 출처는 상업적으로 입수가능하다(예를 들면, GFP 유전자에 대해서는 pEGFP-C1(Clontech), 및 Luc 유전자에 대해서는 pSP-Luc(Promega)). 상기 벡터들은 표준 PCR법에 의해 적당한 DNA 서열을 분리하기 위해 주형으로 사용된다. GFP 및 Luc에 융합된 대조군 TCR(예를 들어, CMVscTCR)에 대한 발현 벡터는 동일한 방법으로 생성할 수 있다. 일부 적용에서, 이러한 발현 벡터는 CHO 세포와 같은 세포를 감염시키는데 사용될 수 있고, 그 결과로 발현된 단백질은 여기에 기재된 바에 따라 정제된다.

[0169] 이러한 정제된 단백질은 생체 내에서 종양을 화상진찰하기 위해 사용된다. HLA-A2 및 p53 발현에 따른 다양한 인간 종양 세포는 피하조직으로 또는 정맥내로 투여될 수 있으며 종양 및 전이 폐 결절은 상기 실시예 15에서 기재한 것과 같이 발육하도록 한다. scTCR/Luc 융합체에 대해서는, 마우스에 scTCR/Luc 융합 단백질의 양을 증가시키면서 정맥 내로 주사하였다. 융합 단백질이 전신으로 순환하기 위한 충분한 시간이 흐른 후, 마우스에 100 μl PBS에서 루시페라아제에 대해서 2.0mg의 D-루시페린 기질을 복강 내로 주사하고, 이어서 120 μl/20g 체중의 PBS에서 실라진(3mg/ml) 및 케타민(7mg/ml)으로 마취하였다. scTCR/GFP 융합체에 대해서는, 마우스에 scTCR/Luc 융합 단백질의 양을 증가시키면서 정맥 내로 주사하였다. 융합 단백질이 전신으로 순환하기 위한 충분한 시간이 흐른 후, 마우스를 전술한 바와 같이 PBS에서 실라진(3mg/ml) 및 케타민(7mg/ml)으로 마취하였다.

[0170] 생체 내 종양 탐지를 위해, 마취된 마우스를 NightOwl LB 981 Molecular Light Imager안에 놓았다. 화상진찰은 두-단계 공정 및 WinLight 소프트웨어(Berthold Technologies, Oak RidgeTN)를 이용하여 수행하였다. 먼저, 15ms 노출을 사용하여 흑백 사진 영상을 얻고, 배경 감산(background subtraction)과 함께 5-분 광자 융합(photon integration) 주기를 사용하여 형광 영상을 얻었다. 형광 영상은 형광 강도를 컬러화하기 위해 소프트웨어에서 처리하고, 설명을 위해 흑백 영상 위에 깔았다. 일부의 경우 마우스를 희생시키고 종양의 크기, 위치 및 성질(예를 들어, 항원 양성 또는 음성)을 결정하기 위해 병리적 평가를 수행하였다. 다른 조직에 비해 HLA-A2/p53 양성 종양 세포를 함유한 종양 부위에서 264scTCR/Luc 또는 264scTCR/GFP 시약의 선별적 탐지를 입증하는 화상진찰 연구의 결과는 scTCR 시약이 생체 내에서 종양을 특이적으로 탐지할 수 있음을 나타낸다.

[0171] 추가로, CMVscTCR/Luc 또는 CMVscTCR/GFP(대조군) 시약의 결과에 비해 HLA-A2/p53 양성 종양 세포를 함유한 종

양 부위에서 264scTCR/Luc 또는 264scTCR/GFP 시약의 선별적 탐지를 입증하는 결과는 또한 상기 scTCR 시약이 생체 내에서 종양을 특이적으로 탐지할 수 있음을 나타낼 것이다. HLA-A2-음성 또는 p53-음성 종양 세포를 함유하는 종양 부위에 대한 결과에 비해 HLA-A2/p53 양성 종양 세포를 함유한 종양 부위에서 264scTCR/Luc 또는 264scTCR/GFP 시약의 선별적 탐지를 입증하는 화상진찰 결과는 또한 상기 scTCR 시약이 생체 내에서 종양을 특이적으로 탐지할 수 있음을 나타낸다.

[0172] 실시예 18 - 방사선 라벨된 TCR로 생체 내 종양의 화상진찰(imaging)

[0173] 또다른 실시형태에서, 264scTCR 융합 단백질을, 예를 들어 ¹³¹I로 직접 요오드화(iodination)에 의해 방사선 라벨하였다. 요오드화는 표준 방법을 사용하여 수행하였다. HLA-A2 및 p53 발현에 따라 다양한 인간 종양 세포는 피하조직으로 또는 정맥내로 주입하고 종양 또는 전이 폐 결절을 전술과 같이 발육하도록 한다. 마우스에 정맥내로 또는 복강내로 방사선 라벨된 264scTCR 융합 단백질을 주사하고 방사선 라벨된 264scTCR 융합 단백질의 주사 후 예를 들어 1, 2, 4, 8, 및 12시간 및 1 내지 14일에서 화상진찰하였다. 전신 스캔을 위해서, 마우스를 100mg/kg 소듐 펜토바르비탈(pentobarbital)로 마취시키고 예를 들면 마이크로 컴퓨터에 연결된 4mm 핀홀 분광기로 맞춘 광각 Sopha DSX 카메라로 화상진찰하였다. 다른 조직에 비해 종양 부위에서 방사선뉴클레오티드-라벨된 264scTCR 시약의 선별적 탐지를 입증하는 화상진찰 연구로부터의 결과는 상기 방사선 라벨된 scTCR 시약이 생체 내에서 종양을 특이적으로 탐지하는데 유용하다는 것을 나타낸다.

[0174] 다음의 재료 및 방법을 실시예에서 개략적으로 설명한 실험을 수행하기 위해 필요에 따라 이용하였다.

[0175] 1. 재료

[0176] A2.1 264 CTL 클론 #5를 HLA-A2.1 트랜스제닉 마우스[49]에서 생성된 인간 p53 264-272 펩티드에 대해 특이적인 CTL주(CTL line)로부터 제한 희석 클로닝[50]에 의해 유도하였다. CHO.K1 중국 햄스터 난소, Jurkat 인간 림프구, CTLL-2 마우스 세포독성 T 림프구, T2 인간 림프모구(lymphoblast), A375 인간 흑색종, H57-597 하이브리도마, 및 BB7.2 하이브리도마 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)(Rockville, MD)로부터 입수하였다. T2 인간 림프모구 세포들은 HLA-A2.1에 대해서 양성이지만 TAP 1 및 2 단백질을 결함 있으며, 이러한 것이 그들로 하여금 외인성 펩티드[2]로 이어져 적재될 수 있는 빈 MHC 분자들을 표시하도록 한다. A375 인간 흑색종 세포주는 우리 실험실에서 HLA-A2.1 및 p53 양자에 대해 실험하였고, 두 항원에 대해 양성임이 밝혀졌다. H57-597 하이브리도마는 마우스 TCR β 불변 영역(constant region)에서 에피토프를 인식할 수 있는 단일클론 항체를 생산하고, BB7.2 하이브리도마는 HLA-A2의 알파 2 도메인 상 에피토프를 특이적으로 인식할 수 있는 BB7.2 단일클론 항체를 생산한다. 인간 흑색종 세포주 A375의 고 전이성 서브클론, A375-C15N은, 생체 내 전이 연구에 대해서만 사용되며, 이전에 보고된 것과 같이 유지되었다[53]. 약물 동력학 연구에서 ELISA에 이용된 제조업 인간 IL-2 및 비오턴화된 항-인간 IL-2 다클론 항체는 R&D Systems, Inc.(Minneapolis, MN)으로부터 구매했다. 항 TCR Cβ mAb H57-597, 항-마우스 TCR Vβ3 mAb, 항-마우스 CD3ε mAb, 항-인간 IL-2 mAb, 항-인간 CD25 차단 항체 및 동형 대조군 항체, 및 FITC 라벨된 염소 항-마우스 IgG는 Pharmingen(San Diego, CA) 으로부터 입수하였다. 다른 언급이 없다면, 모든 세포 배양 배지 및 첨가제들은 CellGro(Herndon, VA) 로부터 구매하고, 모든 세포 배양 재료는 Nunc(Rochester, NY)로부터 구매하였다. 모든 마우스는 Harlan Labs(Indianapolis, IN)로부터 구매하였다.

[0177] 2. 세포 배양

[0178] 모든 세포주는 37°C 및 5% CO₂에서 10% 가열 비활성화된 FBS, 2mM L-글루타민, 및 1mg/ml G418(트랜스펙트된 CHO 세포에 대해서만)로 보충된 IMDM으로 구성된 완전한 배양 배지에서 유지하였다. CTLL-2 세포는 9U/ml 제조업 인간 IL-2의 첨가와 함께 동일한 배지에서 유지하였다. A375-C15N 세포는 10% 가열 비활성화된 FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신(Life Technologies)과 함께 RPMI-1640에서 유지하였다.

[0179] BALB/c 마우스로부터 무균으로 절개된 비장을 나일론 그물망(mesh screen)을 통해 가압하고 배양 배지로 세척하여 마우스 비장 세포를 분리하였다. 적혈구를 2분 동안 게이 용액(Gey's solution)으로 용해시키고 배양 배지의

첨가에 의해 용해(lysis)를 중지시켰다. 단일 세포 침전물을 두 번 세척하고, 배양 배지에서 mL당 2.5×10^6 세포에서 재현탁하고 50 μ M 2-ME, 100 IU/mL 제조함 인간 IL-2, 및 50ng/ml 항-마우스 CD3 ϵ mAb를 함유하는 완전한 배양 배지에서 배양하였다.

[0180] 3. 구조물

[0181] 프라이머-올리고뉴클레오티드 프라이머를 마우스 T세포 및 인간 IL-2 유전자의 서열 조화 또는 보충으로부터 합성하였다.

KC228: 5'-GAGGTGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGTCAGTGACGCAGC-3';

(서열 번호 :3)

KC229: 5'-GAGGTGACTAGTGTCTGGCTTTATAATTAG-3'; (서열 번호 :4)

PRIB4: 5'-GGGGGGCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTCAGACTC-3'; (서열 번호:5)

KC176: 5'-GAGGTGGAGCCCCGGGTCTGCTCGGCCCCAGGC-3'; (서열 번호 :6)

ET-TCRF1: 5'-CCCACCGGTCAGTCAGTGACGCAGCCC-3'; (서열 번호 :7)

KC-170: 5'-GTGGAGTTCGAAAAGGTGACTTACGTTTGTCTGCTCGGCCCCAG-3'; (서열 번호 :8)

KC231:5'-CGATAAGTGTACTTACGTTTTTCATTATTCCATCGGCATGTACTCTTCTTCCTCTCG-3'; (서열 번호 :9)

KC208:5'-GTGGAGATCGATAAGTGTACTTACGTTTTTCATTATCGCGATCCGGAGTTAACGTCTGCTCGGCCCCAG-3'; (서열 번호 :10)

KC327B: 5'-TAGGTGTCCGGAGCACCTACTTCAAGTTCTAC-3'; (서열 번호 :11)

KC328B: 5'-TAGGTGTCCGGAAGTTAGTGTGAGATGATG-3'; (서열 번호 :12)

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; (서열 번호 :13)

C α HYB: 5'-GCTGTCCTGAGACCGAGGATCTTTTAACTG3'; (서열 번호 :14)

C β HYB: 5'-TTGTTTGTGTTGCAATCTGTGCTTTTGATGG-3'. (서열 번호 :15)

[0182]

[0183] TCR 유전자를 T 세포 클론 A2.1 264#5로부터 클론하였다. 상기 T세포 클론 로부터 유도된 단일쇄 TCR을 264scTCR로 정한다. 폴리(A)⁺RNA를 마이크로패스트 트랙(MicroFast Track) 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 세포로부터 추출하고, 이중 가닥 cDNA를 제조하고 마라톤 cDNA 증폭(Amplification) 키트(Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하여 이중 가닥 아답터 올리고뉴클레오티드에 결합하였다. V α 및 V β 구획을 확인하기 위해서, A2.1 264#5 cDNA 제품(preparation) 및 전술한 프라이머 AP2(아답터 DNA에 대해서 특이적) 및 C α HYB (α 쇄의 불변 도메인에 대해서 특이적)또는 C β HYB(β 쇄의 불변 도메인에 대해서 특이적)를 이용하여 5'-RACE PCR을 수행하였다. TA 클로닝 키트(Invitrogen)를 사용하여 PCT 단편을 pCR2.1 벡터로 클론하고, 서열을 M13 전방(forward) 및 후방(reverse) 프라이머를 사용하여 결정하였다. 프라이머 KC228 및 KC229를 사용하여 T 세포 수용체 V α 쇄를 증폭하여 *SfiI/SpeI* 단편을 제조하고, V β C β 쇄를 프라이머 RRIB4 및 KC176을 사용하여 증폭하여 *XhoI/XmaI* 단편을 생성하였다. C β 쇄는 전체 길이 C β 쇄의 아미노산 127에서 시스테인 잔기의 바로 앞을 절단하였다. *SfiI/SpeI* V α 쇄 단편을, 원래의 TCR 삽입 대신, 관계없는 TCR을 인코딩하는 E.Coli 발현 벡터인 pKC60을 절단하는 *SfiI/SpeI*로 서브클론하였다. 이어서 *XhoI/XmaI* V β C β 단편을 이 벡터의 *XhoI/XmaI* 축약으로 결합하여 가용성의 3 도메인의 264scTCR을 인코딩하는 벡터를 얻었다. 프라이머 ET-TCRF1 및 KC170을 사용하여 이 구조물로부터 상기 3 도메인의 T 세포 수용체를 증폭하여 *AgeI/ClaI* DNA 단편을 생성하였으며, 이어서 상기 단편을 KC231 및 KC208과 함께 PCR에 대한 주형으로 사용하여 *AgeI/HpaI* 단편을 제조하였다.

[0184] 인간 IL-2 코딩 서열은 Mini Total RNA 키트(Qiagen, Valencia CA) 및 Qiashredder(Qiagen, Valencia CA)를 이용하여 Jurkat 세포로부터 분리된 전체 RNA로부터 RT-PCR에 의해 클론되었다. 프라이머 KC328B를 사용하여 역전

사를 수행하고, 프라이머 KC327B 및 KC328B를 사용하여 PCR을 수행하여 *BspEI/NruI* 인간 IL-2 단편을 제조하였다. *BspEI/NruI* IL-2 단편을, 융합 단백질의 항체 부위 대신 관계없는 TCR/항체 융합 단백질을 인코딩하는 클로닝 벡터인 p149B1SP를 절단하는 *BspEI/NruI*로 클론하였다. IL-2 변형 벡터를 *AgeI* 및 *HpaI*로 절단하고 전술한 *AgeI/HpaI* 264scTCR 단편을 그것에 결합하였다. 결국, *AgeI/ClaI* 264scTCR/IL-2 융합 단백질 단편을, 벡터에서 원래 클론되었던 관계없는 TCR 대신, scTCR/마우스 카파 융합 벡터인 pSUN27을 절단하는 *AgeI/BstBI*로 클론하고, 264scTCR/IL-2 융합 단백질 발현 벡터인, pSUN28을 얻었다. 유동 세포 분석기 분석의 일부에 대해 음성 대조군으로서 이용된 264scTCR 카파 융합은, *AgeI/BstBI* 264scTCR 단편을, 원래의 TCR 대신 pSUN27을 절단하는 *AgeI/BstBI*로 클론하여 생성하였다.

[0185] 포유동물 세포에서 융합 단백질을 생산하기 위해서, CHO.K1 세포를 바이오 라드(Bio-Rad)사의 세포융합장치(Gene Pulser)를 이용하여 전기영동하고, 이어서 1mg/mL G418을 함유하는 배지에서 제한 희석 클로닝 및 선택하였다.

[0186] 4. 단백질 정제

[0187] 세포로스 4B 칼럼(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)에 연결된, TCR β 쇠의 불변 영역에서 에피토프를 인식하는, 단일클론 항-마우스 TCR 항체 H57-597을 사용하여 면역친화 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청 액체로부터 264scTCR/IL-2를 정제하였다. 이어서 정제된 샘플을 농축하고 30kDa 분자량 분리 막(Millipore, Bedford, MA)인 Ultrafree-15 원심분리 필터를 이용하여 PBS로 버퍼-교환하였다. 생화학적 및 기능 분석을 위해 TCR 융합 단백질 샘플을 2-8°C(단기) 또는 -80°C(장기)에서 저장하였다. 4-12% Nu-PAGE 폴리아크릴아미드 겔(Novex, San Diego, CA) 및 Novex EX-Cell II 시스템을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건 하에서 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE 겔은 쿠마시 블루로 염색하였다.

[0188] 5. ELISA

[0189] 모든 ELISA는 100-200ng/웰 항-인간 IL-2 mAb 또는 항-마우스 TCR V β 3 mAb 으로 코팅된 Maxisorb 96 웰 플레이트(Nunc, Rochester, NY)를 이용하여 수행하였다. 융합 단백질을 비오틴화된 항-마우스 TCR H57 mAb, 항-마우스 TCR V β 3 mAb, 또는 항 IL-2 다클론 Ab로 탐지하고, 이어서 스트렙타비딘-HRP(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), TMB 기질, 및 0.18M H₂SO₄로 반응을 종결하였다(BioFX, Owings Mills, MD). 96 웰 플레이트 판독기(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)를 사용하여 450nm에서 흡수를 측정하였다.

[0190] 6. TCR 융합 단백질로 세포 염색

[0191] p53(aa149-157) 또는 p53(aa 264-272) 펩티드로 펄스된 T2 세포를 상온에서 30분 동안 PBS 중의 1% FBS에서 264scTCR/IL-2 융합 단백질 0.5 μ g과 함께 배양하였다. 그 후 상기 세포를 상온에서 30분 동안 0.5 μ g의 항-IL-2 Ab 또는 0.5 μ g의 비오틴화된 항-TCR H57-597 mAb에 이어서 각각, 1 μ g의 항-마우스 카파-PE 또는 5ng 스트렙타비딘-PE(둘 다 Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ로부터 입수)로 배양하였다. FACS 분석 전에 샘플을 PBS 중의 1% FBS로 세척하였다(Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ). 두 p53 펩티드가 유사하게 HLA-A2에 결합하였는지를 측정하기 위해서, 펩티드 적재된 세포를 BB7.2로 상온에서 30분 동안 이어서 FITC 라벨된 염소 항-마우스 IgG로 염색하고 FACS 분석 장치상에서 분석하였다.

[0192] CTLL-2 세포를 상온에서 30분 동안 0.5 μ g의 융합 단백질로 배양하였다. 결합된 융합 단백질을 탐지하기 위해서, 0.5 μ g의 비오틴화된 항-TCR V β 3 mAb를 첨가하고 상온에서 30분 동안 배양하고 이어서 5ng 스트렙타비딘-PE로 배양하거나, 또는 30분 동안 0.5 μ g PE-라벨된 HLA-A2.1 p53(aa 264-272) 사량체를 이용하여 단백질을 탐지하였다. p53 펩티드로 적재된 접합된 HLA-A2 사량체는 전술한 것과 같이 [1] 제조하였다. FACS 분석 전에 샘플을 PBS 중의 1% FBS로 세척하였다. IL-2 수용체 차단 실험을 위해서, 264scTCR/IL-2 또는 264scTCR/카파 융합 단백질과 배양하기 전에 CTLL-2 세포를 30분 동안 α -인간 CD25 차단 항체 또는 동형 대조군 항체로 배양하였다. BALB/c 마우스 비장 세포의 염색을 위해서, CTLL-2 세포에 대해서 기재한 것과 같이 HLA-A2.1 p53(aa 264-272)

사량체를 이용하여 염색을 수행하여 결합된 융합 단백질을 탐지하였다.

[0193] A375 세포는 효소-없는 세포 해리 버퍼(Sigma, St. Louis, MO)로 배양하였다. 5×10^5 세포의 샘플은 PBS 중의 1% FBS로 세척하고, 상온에서 30분 동안 융합 단백질 없이, 5 μ g의 3C8(관련없는 TCR/IL-2 융합 단백질), 또는 5 μ g의 264scTCR/IL-2로 배양하고, 이어서 1 μ g의 비오틴화된 H57-597 mAb로 배양하였다. 그 후, 세포를 상온에서 15분 동안 PE-라벨된 스트렙타비딘으로 배양하고, 세척하고, FACScan으로 분석하였다.

[0194] 7. 세포 접합(conjugation)

[0195] p53(aa 264-272) 펩티드 또는 p53(aa149-157) 펩티드로 펄스된 T2 세포를 7.88ng/ml 디히드로에티디움 (HE)(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)으로 라벨하고, CTLL-2 세포를 50ng/ml 칼세인 AM(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)으로 라벨하였다. 세척 후, 상기 두 라벨된 세포 집단을 상온에서 20분 동안 2 μ g의 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 존재 또는 부재 중에서 1:1 비율로 함께 혼합하였다. 이어서 세포를 FACScan에 의해 분석하였다.

[0196] 8. 생물학적 분석

[0197] CTLL-2 세포를 다양한 농도의 재조합 IL-2 또는 264scTCR/IL-2를 함유하는 100 μ l의 배양 배지에 4×10^3 세포/웰로 살포하고 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 21시간 동안 배양하였다. 특이성에 대한 대조군으로서 CTLL-2 세포를 5 또는 50 μ g의 항-인간 CD25 차단 항체 또는 동형 대조군 항체의 존재 또는 부재 중에서 264scTCR/IL-2로 배양하고, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 21시간 동안 배양하였다. 세포 증식 시약인 WST-1(Roche Inc., Indianapolis, IN)을 20 μ l/웰로 가하고 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하였다. 96-웰 플레이트 판독기 상 450nm에서 흡수를 판독하였다.

[0198] 9. 마우스에서 약물 동력학

[0199] 동물과 연관된 모든 실험에 대해서, 실험실 동물 관리(NIH 공보 제85-23, 1985 개정)의 원칙뿐만 아니라, 적용할 수 있는 특정 국법을 따랐다. 암컷 BALB/c 마우스에 100 μ l의 전체 부피에 PBS로 희석된 32 μ g의 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 측면의 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 주사하였다. 배경 수준을 수립하기 위해 264scTCR/IL-2를 주사하지 않은 한 군의 마우스로부터 혈청을 수집하였다. 15 및 30분, 1, 2, 4, 8, 24 시간에서 주사한 군으로부터 꼬리 출혈에 의해 혈청을 수집하였다. 혈액 샘플을 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 14,000 X g에서 원심분리하고, 혈청을 수집하고, 사용할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 264scTCR/IL-2 농도는 포획에 대해서 항-TCR V β 3 또는 항-IL-2 단일클론 항체 및 탐지에 대해서 비오틴화된 항-TCR H57 단일클론 또는 항-IL-2 다클론 항체에 이어 스트렙타비딘 HRP를 이용하여 ELISA에 의해 측정하였다.

[0200] 10. 생체 내 연구

[0201] 암컷 무흉선 누드 마우스(nu/nu)에 측면의 꼬리 정맥을 통해 5.0×10^5 의 A375-C15N 세포를 주사하였다. 실험동물에 종양 세포 주사 후 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 및 35일에 264scTCR/IL-2(100 μ l 전체 부피에서 32, 10, 3, 1, 또는 0.1 μ g) 또는 재조합 인간 IL-2(100 μ l 전체 부피에서 8, 2.5, 0.75, 0.25, 또는 0.025 μ g)의 다양한 투여량으로 주사하였다. 종양 세포 주사 후 42일에, 모든 실험동물을 안락사시키고, 폐를 제거하고 보인 용액(Bouin's solution)에서 고정하였고, 표면 폐 종양 결절을 세웠다. 각 폐에 있는 종양 결절은 두 관측자가 세었고, 평균 수를 기록했다.

[0202] 11. TCR 구조물 및 IgG 및 Bir A 태그 서열을 포함하는 융합 단백질

[0203] TCR 유전자를 전술과 같이 T 세포 클론 A2.1 264#5로부터 클론하였다. 상기 T 세포 클론으로부터 유도된 단일쇄 TCR을 264scTCR로 지정하였다. 주형으로 264scTCR/IL-2 융합 단백질을 이용하여 3 도메인의 단일쇄

264scTCR을 증폭하였다. 264scTCR/IgG1 발현 구조물을 생성하기 위하여, 단일쇄 TCR 단편을 항체 가변 영역 대신, 항체 중쇄 발현 벡터로 결합하여 인간 IgG1 중쇄 영역에 융합된 단일쇄 TCR을 얻었다. 264scTCR/trunIgG1을 생성하기 위해서, 이황화 결합을 허용하는 힌지(hinge) 영역 전에서 절단되는 IgG1 중(heavy) 도메인을 함유하는 발현 벡터로 TCR 단편을 결합하였다.

[0204] 264scTCR/BirA 발현 구조물을 생성하기 위해서, 단일쇄 TCR 단편을 BirA 태그 서열(Backett, D. et al. Protein Sci.1999 Apr;8(4):921-9)을 포함하는 발현 벡터로 결합하였고, 그렇게 해서 태그 서열은 264scTCR 분자의 C-말단 프레임에서 발현되었다.

[0205] 거대세포 바이러스 단일-쇄 TCR(CMVscTCR)을 HLA-A2 제한된 CMV-pp65 펩티드로 자극된 CTL로부터 클론하였다. IgG1 단편을 264scTCR/IgG1 DNA로부터 증폭하여 CMVscTCR/IgG1 구조물을 생성하였다.

[0206] 포유동물 세포에서 융합 단백질을 생산하기 위해서, CHO.K1 세포를 바이오 라드(Bio-Rad)사의 세포융합장치(Gene Pulser)를 이용하여 전기영동하고, 이어서 1mg/mL G418을 함유하는 배지에서 제한 희석 클로닝 및 선택하였다.

[0207] 단백질 정제는 다음과 같이 행하였다. 264scTCR/IgG1, 264scTCR/BirA, 및 264scTCR/trunIgG1은 세파로스 4B 칼럼(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)에 연결된 H57-597 단일클론 항체를 사용하여 면역친화 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청 액체로부터 정제하였다. CMVscTCR/IgG1은 세파로스 4B 칼럼(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)에 연결된 BF1 단일클론 항체를 사용하여 면역친화 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청 액체로부터 정제하였다. 264scTCR/BirA를 제조자가 원하는 조건 하에서 비오틴-단백질 리가아제(Avidity)로 비오틴화하였다.

[0208] 12. 유동 세포 분석기에 의해서 264scTCR 시약에 의한 세포 염색의 탐지

[0209] 고정 및 비고정된 세포를 염색하는 264scTCR 시약의 능력은 몇가지 연구로 특성을 기술할 수 있다. 세포 염색 전략은 다양한 탐지가 가능한 도메인을 수반하고, 이러한 융합체와 다양한 형광 라벨된 탐침간의 세포 상호작용을 탐지하는 264scTCR 융합체의 사용을 포함한다. 특이적 염색을 평가하기 위해 몇 가지 대조군을 사용하였다. 대조군은 p53(aa 264-273) 항원이 결여된 세포를 264scTCR 시약으로 염색, p53-양성 세포를 CMVscTCR로 염색, p53-양성 세포를 2차 염색 시약 단독으로 염색, 및 p53-양성 세포를 가용성 HLA-A2/p53 다량체와 같은 경쟁적 차단 시약으로 또는 없이 264scTCR 시약으로 염색한 것을 포함한다.

[0210] 264scTCR의 단량체 또는 다량체 형태를 특이적으로 세포를 염색하는 능력에 대해 실험하였다. T2 세포에 37°C에서 2.5 시간 동안 100µg/ml로 p53(aa264-273) 또는 p53(aa149-157)로 적재하였다. 과량의 펩티드를 제거하는 세척 단계 후, 세포를 30-45분 동안 125pM에서 264scTCR/IL-2, 264scTCR/IgG1, 264scTCR/trIgG1 또는 264scTCR/BirA(비오틴화 없이)와 함께 배양하였다. 환원 및 비-환원 샘플의 SDS-PAGE 분석은 264scTCR/trunIgG1 및 264scTCR/BirA 단백질은 단량체이고 264scTCR/IgG1 단백질은 이량체를 나타낸다. 또다른 세척 단계 후, 세포를 2.5 µg의 PE-접합된 H57 mAb(H57-PE)와 함께 30분 동안 배양하였다. 세포를 세척하고 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어(BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 FACScan 흐름 세포분석 기기(BD Sciences, San Jose, CA)상에서 분석하였다. 비염색 및 H57-PE 염색된 T2 세포는 또한 배경 염색을 수립하기 위하여 분석하였다.

[0211] 다음의 문헌들이 본 발명의 명세서 전체에 언급(아래에 보인 것과 같은 번호에 의해)되었다. 각 문헌은 참조로서 도입된다.

1. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JL, McMichael AJ, Davis MM (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94
2. Anderson KS, Alexander J, Wei M, Cresswell P (1993) Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines. *J Immunol* 151: 3407
3. Bauer RJ, Dedrick RL, White ML, Murray MJ, Garovoy MR (1999) Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-CD11a antibody hu1124 in human subjects with psoriasis. *J Pharmacokinet Biopharm* 27: 397
4. Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA (1996) Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 98: 2801
5. Chung S, Wucherpfennig KW, Friedman SM, Hafler DA, Strominger JL (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12654
6. Donohue JH, Rosenberg SA (1983) The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J Immunol* 130: 2203
7. Dummer R, Gore ME, Hancock BW, Guillou PJ, Grob HC, Becker JC, Oskam R, Dieleman JP, Burg G (1995) A multicenter phase II clinical trial using dacarbazine and

[0212]

- continuous infusion interleukin-2 for metastatic melanoma. Clinical data and immunomonitoring. *Cancer* 75: 1038
8. Engel I, Ottenhoff TH, Klausner RD (1992) High-efficiency expression and solubilization of functional T cell antigen receptor heterodimers. *Science* 256: 1318
 9. Gregoire C, Rebai N, Schweisguth F, Necker A, Mazza G, Auphan N, Millward A, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B (1991) Engineered secreted T-cell receptor alpha beta heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8077
 10. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155: 1823
 11. Grussenmeyer T, Scheidtmann KH, Hutchinson MA, Eckhart W, Walter G (1985) Complexes of polyoma virus medium T antigen and cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7952
 12. Hank JA, Albertini MR, Schiller J, Sondel PM (1993) Activation of multiple effector mechanisms to enhance tumor immunotherapy. *J Immunother* 14: 329
 13. Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung NK, Sondel PM (1990a) Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 50: 5234
 14. Hank JA, Sosman JA, Kohler PC, Bechhofer R, Storer B, Sondel PM (1990b) Depressed in vitro T cell responses concomitant with augmented interleukin-2 responses by lymphocytes from cancer patients following in vivo treatment with interleukin-2. *J Biol Response Mod* 9: 5
 15. Hank JA, Surfus J, Gan J, Chew TL, Hong R, Tans K, Reisfeld R, Seeger RC, Reynolds CP, Bauer M, et al. (1994) Treatment of neuroblastoma patients with antiganglioside GD2 antibody plus interleukin-2 induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against neuroblastoma detected in vitro. *J Immunother* 15: 29
 16. Harvill ET, Fleming JM, Morrison SL (1996) In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. A general strategy for immune potentiation. *J Immunol* 157: 3165
 17. Harvill ET, Morrison SL (1995) An IgG3-IL2 fusion protein activates complement, binds Fc gamma RI, generates LAK activity and shows enhanced binding to the high affinity IL-2R. *Immunotechnology* 1: 95
 18. Hilyard KL, Reyburn H, Chung S, Bell JI, Strominger JL (1994) Binding of soluble natural ligands to a soluble human T-cell receptor fragment produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9057
 19. Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER., Vogelstein B, Levine AJ (1990) Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in

transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1: 571

20. Hurford RK Jr, Dranoff G, Mulligan RC, Tepper RI (1995) Gene therapy of metastatic cancer by in vivo retroviral gene targeting. *Nat Genet* 10: 430
21. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5879
22. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675
23. Kendra K, Gan J, Ricci M, Surfus J, Shaker A, Super M, Frost JD, Rakhmilevich A, Hank JA, Gillies SD, Sondel PM (1999) Pharmacokinetics and stability of the ch14.18-interleukin-2 fusion protein in mice. *Cancer Immunol Immunother* 48: 219
24. Klausner RD, Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS (1990) The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol* 6: 403
25. Lewis LD, Cole BF, Wallace PK, Fisher JL, Waugh M, Guyre PM, Fanger MW, Curnow RT, Kaufman PA, Ernstoff MS (2001) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the bispecific antibody MDX-H210 when administered in combination with interferon gamma: a multiple-dose phase-I study in patients with advanced cancer which overexpresses HER-2/neu. *J Immunol Methods* 248: 149
26. Lin AY, Devaux B, Green A, Sagerstrom C, Elliott JF, Davis MM (1990) Expression of T cell antigen receptor heterodimers in a lipid-linked form. *Science* 249: 677
27. Lode HN, Xiang R, Dreier T, Varki NM, Gillies SD, Reisfeld RA (1998) Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Blood* 91: 1706
28. Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA (1997) Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 89: 1586
29. Lustgarten J, Marks J, Sherman LA (1999) Redirecting effector T cells through their IL-2 receptors. *J Immunol* 162: 359
30. McLaughlin R, O'Hanlon D, McHale T, Connolly CE, Given HF (2001) Prognostic implications of p53 and bcl-2 expression in 108 women with stage two breast cancer. *Ir J Med Sci* 170: 11
31. Motzer RJ, Rakhit A, Ginsberg M, Rittweger K, Vuky J, Yu R, Fettner S, Hooftman L (2001) Phase I trial of 40-kd branched pegylated interferon alfa-2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 19: 1312

[0214]

32. Motzer RJ, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, Sandstrom K, Nadeau R, Parmar H, Bukowski R (1998) Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4: 1183
33. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ, et al. (1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 153: 1697
34. Pardoll DM (1995) Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 13: 399
35. Peng LS, Penichet ML, Morrison SL (1999) A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity. *J Immunol* 163: 250
36. Penichet ML, Harvill ET, Morrison SL (1997) Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. *Hum Antibodies* 8: 106
37. Posey JA, Raspet R, Verma U, Deo YM, Keller T, Marshall JL, Hodgson J, Mazumder A, Hawkins MJ (1999) A pilot trial of GM-CSF and MDX-H210 in patients with erbB-2-positive advanced malignancies. *J Immunother* 22: 371
38. Pullarkat V, Deo Y, Link J, Spears L, Marty V, Curnow R, Groshen S, Gee C, Weber JS (1999) A phase I study of a HER2/neu bispecific antibody with granulocyte-colony-stimulating factor in patients with metastatic breast cancer that overexpresses HER2/neu. *Cancer Immunol Immunother* 48: 9
39. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, et al. (2001) Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 33: 433
40. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, et al (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316: 889
41. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE (1989) Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 210: 474
42. Rosenberg SA, Spiess PJ, Schwarz S (1983) In vivo administration of Interleukin-2 enhances specific alloimmune responses. *Transplantation* 35: 631
43. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* 228: 307

[0215]

44. Royal RE, Steinberg SM, Krouse RS, Heywood G, White DE, Hwu P, Marincola FM, Parkinson DR, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. (1996) Correlates of Response to IL-2 Therapy in Patients Treated for Metastatic Renal Cancer and Melanoma. *Cancer J Sci Am* 2: 91

45. Sherman LA, Hesse SV, Irwin MJ, La Face D, Peterson P (1992) Selecting T cell receptors with high affinity for self-MHC by decreasing the contribution of CD8. *Science* 258: 815

46. Sondel PM, Kohler PC, Hank JA, Moore KH, Rosenthal NS, Sosman JA, Bechhofer R, Storer B (1988) Clinical and immunological effects of recombinant interleukin 2 given by repetitive weekly cycles to patients with cancer. *Cancer Res* 48: 2561

47. Sosman JA, Hank JA, Moore KH, Borchert A, Schell K, Kohler PC, Goldstein D, Bechhofer R, Storer B, Albertini MR, et al. (1991) Prolonged interleukin-2 (IL-2) treatment can augment immune activation without enhancing antitumor activity in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 9: 35

48. Temnim L, Baker H, Sinowatz F (2001) Immunohistochemical detection of p53 protein expression in breast cancer in young Kuwaiti women. *Anticancer Res* 21: 743

49. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA (1995) Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11993

50. Theobald M, Biggs J, Hernandez J, Lustgarten J, Labadie C, Sherman LA (1997) Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185: 833

51. Thor Straten P, Guldberg P, Schrama D, Andersen MA, Moerch U, Seremet T, Siedel C, Reisfeld RA, Becker JC (2001) In situ cytokine therapy: redistribution of clonally expanded T cells. *Eur J Immunol* 31: 250

52. Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA (1997) IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158: 3359

53. van Golen KL, Risin S, Staroselsky A, Berger D, Tainsky MA, Pathak S, Price JE (1996) Predominance of the metastatic phenotype in hybrids formed by fusion of mouse and human melanoma clones. *Clin Exp Metastasis* 14: 95

54. Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K (1992) Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356: 793

55. Weil-Hillman G, Voss SD, Fisch P, Schell K, Hank JA, Sosman JA, Sugamura K, Sondel PM (1990) Natural killer cells activated by interleukin 2 treatment in vivo respond to interleukin 2 primarily through the p75 receptor and maintain the p55 (TAC) negative phenotype. *Cancer Res* 50: 2683

56. Wiebke EA, Rosenberg SA, Lotze MT (1988) Acute immunologic effects of interleukin-2 therapy in cancer patients: decreased delayed type hypersensitivity response and decreased proliferative response to soluble antigens. *J Clin Oncol* 6: 1440.

[0216]

[0217]

[0218]

여기서 언급한 모든 참고문헌들의 기재사항은 참조로서 여기에 도입되었다. 본 발명은 그 바람직한 실시 형태에 관하여 기재하였다. 그러나, 기술분야의 당업자는, 이 기재내용을 고려하여, 본 발명의 사상 및 범위 내에서 변형 및 개량을 행할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0027]

도 1A-B는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 개략적 구조(1A) 및 아미노산 서열(1B)을 나타내는 도면이다.

[0028]

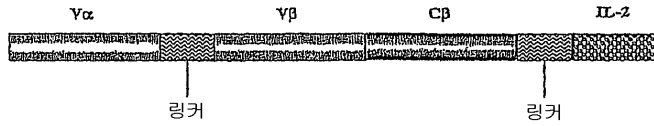
도 2는 감염된 CHO 세포 내에서 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 생성을 나타내는 측정 겔을 나타낸 것이다.

- [0029] 도 3A-C는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 TCR 부위의 MHC/펩티드 결합력을 도시하는 그래프이다.
- [0030] 도 4A-B는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 IL-2 부위의 IL-2 수용체 결합력을 나타내는 그래프이다.
- [0031] 도 5A-B는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 생물학적 활성을 나타내는 그래프이다.
- [0032] 도 6A-D는 264scTCR/IL-2 융합 단백질에 의해 매개된 펩티드-적재된 T2 세포와 CTLL-2 세포의 접합 (conjugation)을 나타내는 그래프이다.
- [0033] 도 7A-C는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 혈청 반감기를 나타내는 그래프이다.
- [0034] 도 8은 264scTCR/IL-2 융합 단백질로 종양 세포 염색(staining)한 것을 나타내는 그래프이다.
- [0035]
- [0036] 도 9는 264scTCR/IL-2 융합 단백질의 항암 효과를 나타내는 그래프이다.
- [0037] 도 10A-B는 264scTCR 시약(reagent)으로 비-특이적 p53 펩티드(10A) 또는 특이적 p53 펩티드(10B)가 적재된 T2 세포의 염색한 것을 나타내는 그래프이다.
- [0038] 도 11A-D는 다양한 264scTCR 시약 및 2차 시약으로 종양 세포의 염색한 것을 나타내는 그래프이다.
- [0039] 도 12A-B는 경쟁적인 가용성 펩티드-MHC 분자(라벨된 264-Tet) 첨가와 함께 또는 첨가 없이, 264scTCR/IgG1 및 CMVscTCR/IgG1 (대조) 시약으로 고정된 A375(12A) 또는 T2 세포(12B)의 염색을 나타내는 그래프이다.
- [0040] 도 13은 A2 및 p53 항원에 대해서 및 264scTCR/IgG1 및 CMVscTCR/IgG1 융합 단백질로의, 고정된 종양 세포 유형(A375, HT29 및 Saos2)의 염색패턴을 나타내는 일련의 현미경 촬영 사진이다.
- [0041] 도 14는 264scTCR/BirA 다량체와 반응한 T2 세포의 정량 염색을 나타내는 그래프이다.
- [0042] 도 15는 264scTCR/IgG1 융합 단백질과 반응한 T2 세포의 정량 염색을 나타내는 그래프이다.
- [0043] 도 16은 264scTCR/BirA 사량체(tetramer) 또는 264scTCR/IgG1 융합체와 반응한 세포에 대해, 적재된 p53 펩티드의 양의 증가에 따른 세포당 복합체의 수를 나타내는 그래프이다.
- [0044] 도 17A-B는 264scTCR/BirA 사량체(17A) 또는 264scTCR/IgG1 융합 단백질(17B)과 반응한 A375 종양 세포의 정량 염색을 나타내는 그래프이다.
- [0045] 도 18은 264scTCR/BirA 사량체와 반응한 3개의 종양 세포주의 정량 염색(세포당 복합체의 수)을 나타내는 그래프이다.
- [0046] 도 19는 도 18에서와 같이 264scTCR/IgG1 융합 단백질과 반응한 3개의 종양 세포주의 정량 염색을 나타내는 그래프이다.
- [0047] 도 20은 2차 항체, CVMscTCR/IgG1(대조군) 또는 264TCR/IgG1 융합 단백질로 염색된 A375 종양의 고정 영역을 나타내는, $\times 200$ 의 3개의 현미경 촬영 사진이다.
- [0048] 도 21은 도 20에서와 같은 종양 영역을 나타내는, 더욱 고배율의($\times 400$) 3개의 현미경 촬영 사진이다.

도면

도면1

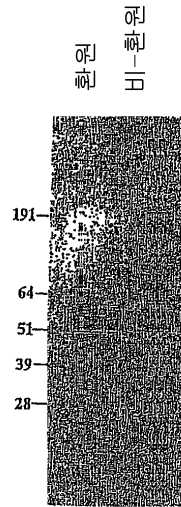
A



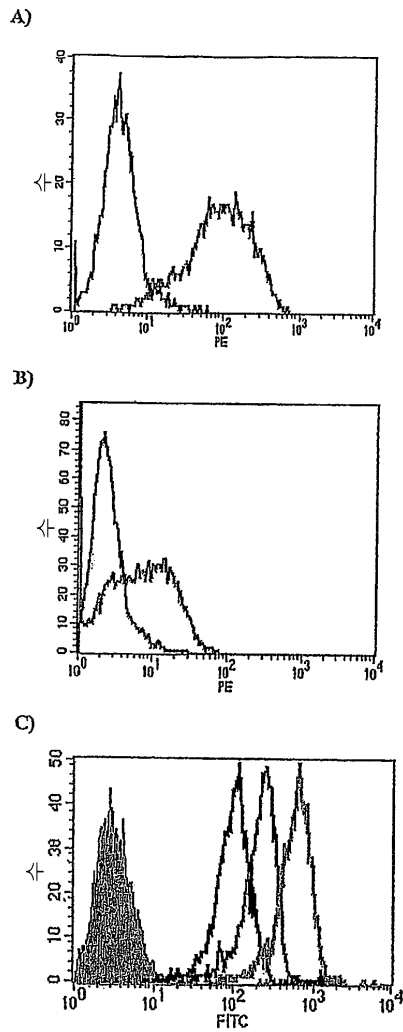
B

리더 1-20
 metdtllllwvllllwvpgssty QSYTQPDARV
 Vα21-133
FVSEGA SLQLRCKYFYSSTPXL FHYVQYPR
QGLQLLLKXYSGDPVVQGVHCFEAEFSKSH
SSFHLLRKA SVHWS DSAVYFCVLSHDSHYQL
IWGSSTKLI IKPD TSGGGSGGGSGGGGS
 (G₄)₄ 링커 134-157
GGGSSSSNSKV I Q T P R Y L Y K G Q G Q K A K M R C
 Vβ158-271
IPEKQHPVVFWYQQHKNHEFKFLINPQHQE
VLQQIDMT EKRFSAECPSNSP C S L E I Q S S E
AGDSALYL CAS SLSGGTEVFTGRTRLTV
 Cβ272-397
VEDLRHVTPPKVSLFEP SRANIANKQKATL
VCLARGFFPDHVELSNVNVNGKEVHSGVSTY
PQAYKESNFSYCLSSRLRVSATFHHNPRNH
FRCQVQFHGLSEEDKNFEGSPKPVTONISA
 링커 398-414
EANGRADVNAKTTAPSVYPLAPVSGAPTSS
 IL-2415-548
STKKTQLQLLEHLLDLQMLNHGINHYKNPK
LTRMLTFKFXMPKKATELKHLLQCLEEELKE
LEEVLHLAQS KNFHLRPRDLISNINVIYLE
LKGSBYTEMCFYADETA.TIVBFLNRWITFC
 EE태 □ 549-550
QSIISTLT S R E E E E Y N P M E * *

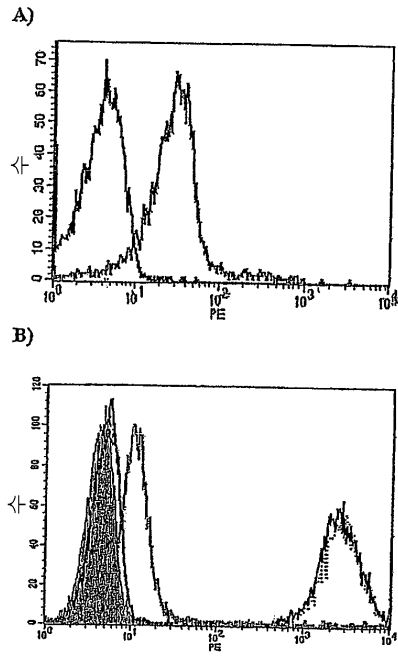
도면2



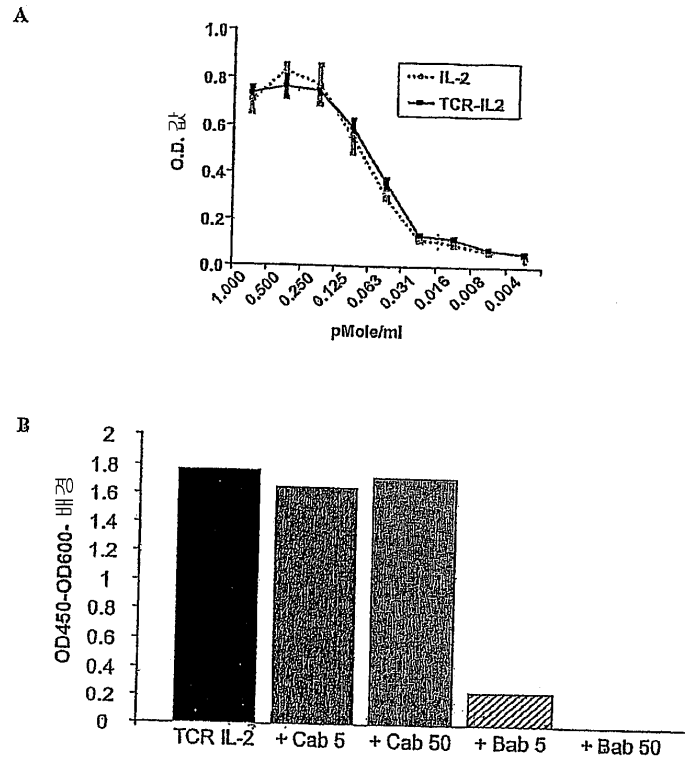
도면3



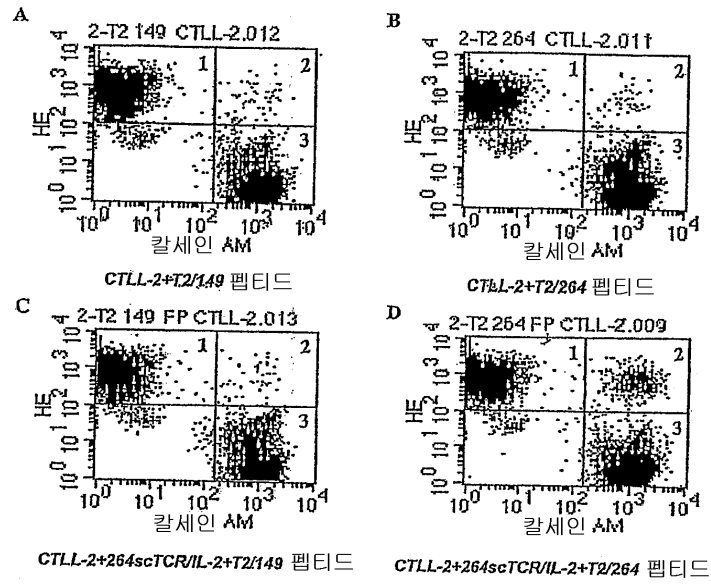
도면4



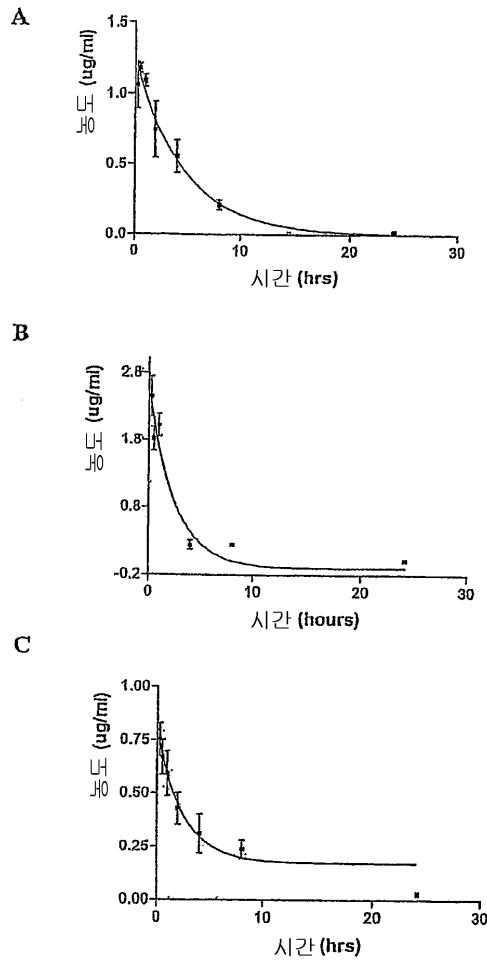
도면5



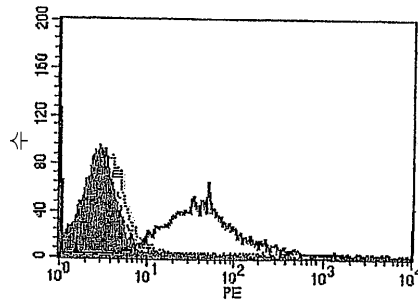
도면6



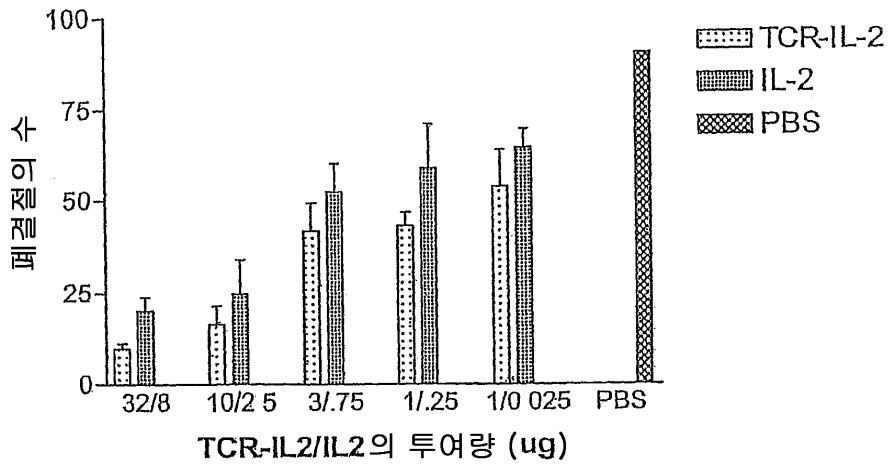
도면7



도면8

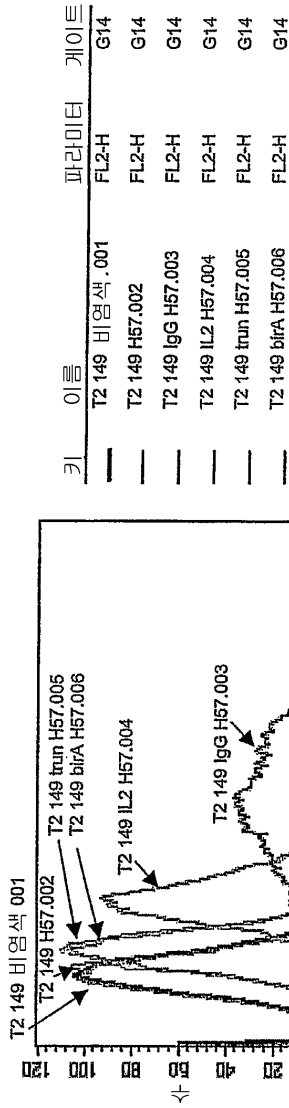


도면9

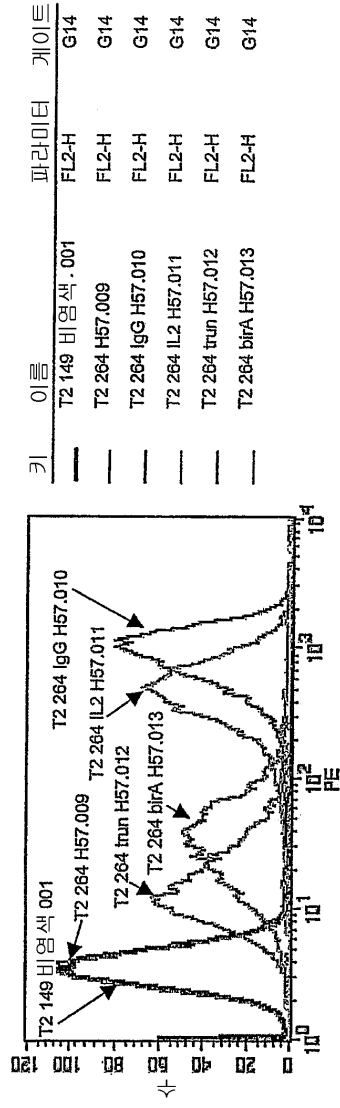


도면10

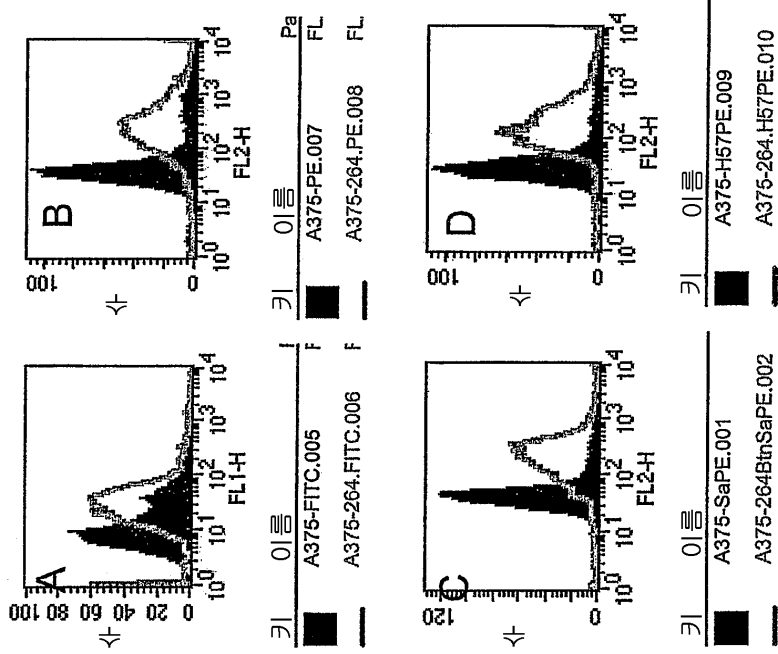
A. 비특이적 펄티드로 적재한 T2 세포



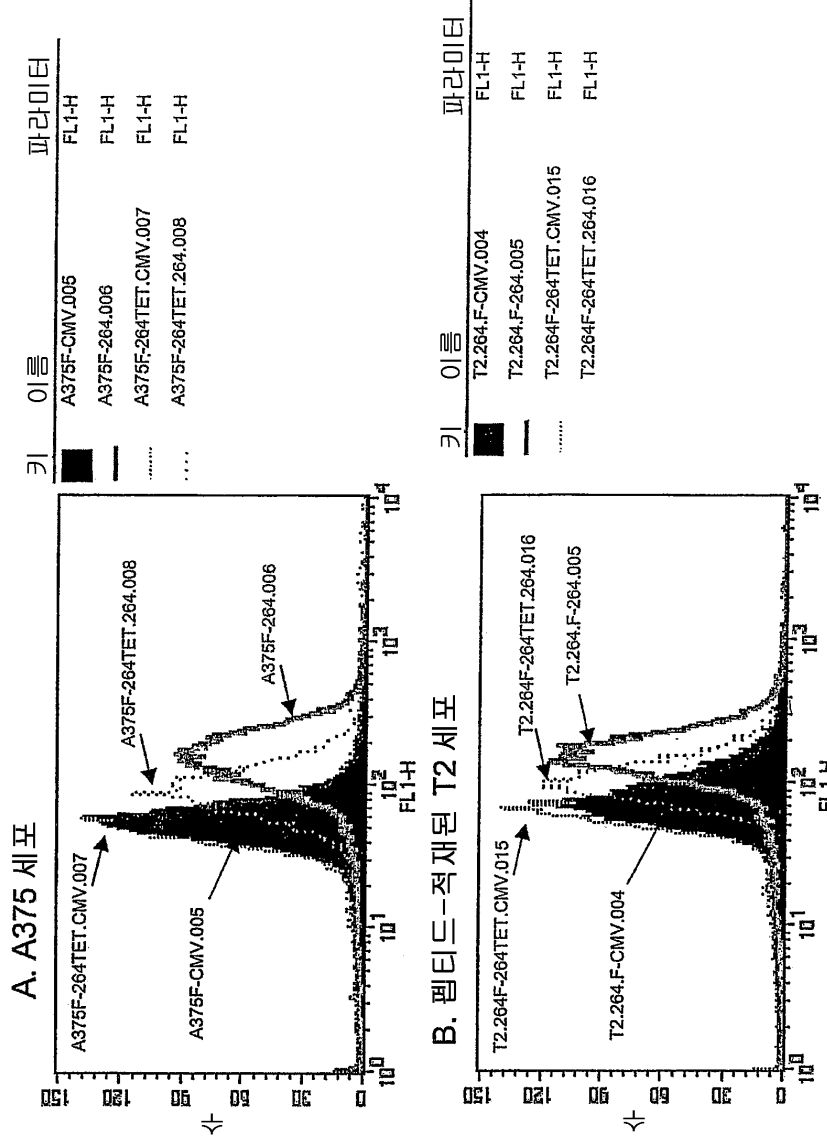
B. 특이적 펄티드로 적재한 T2 세포



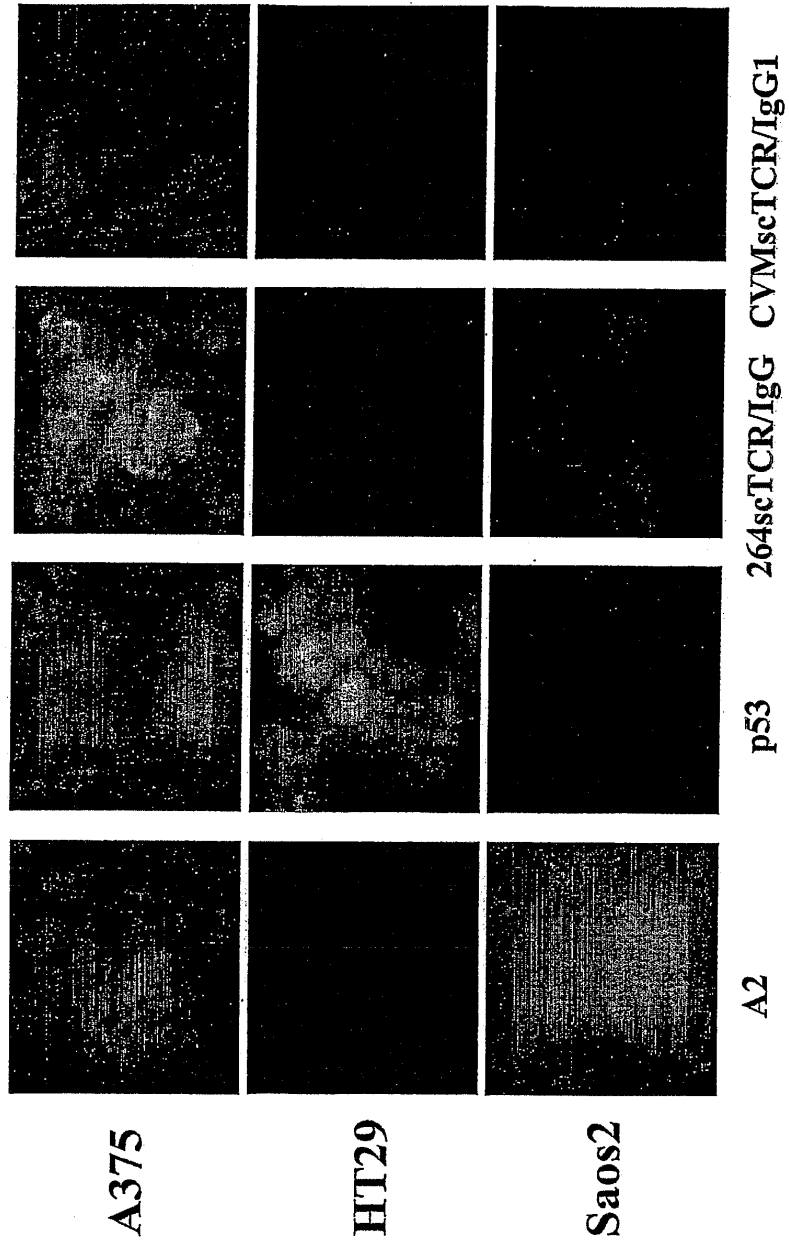
도면11



도면12

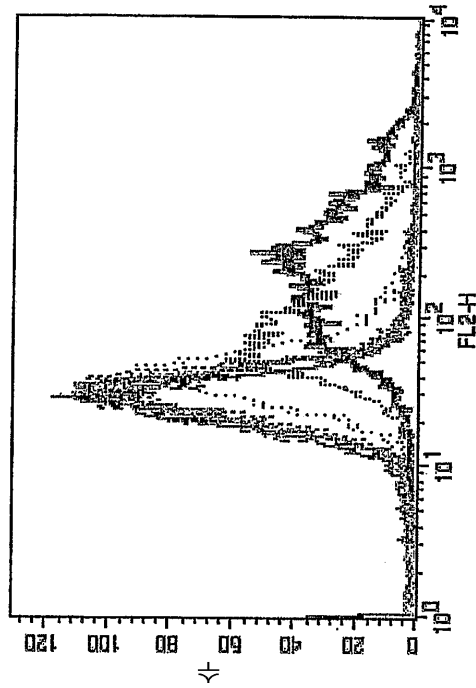
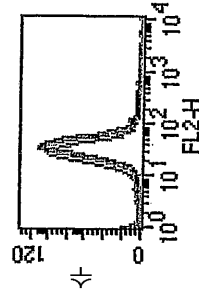


도면13



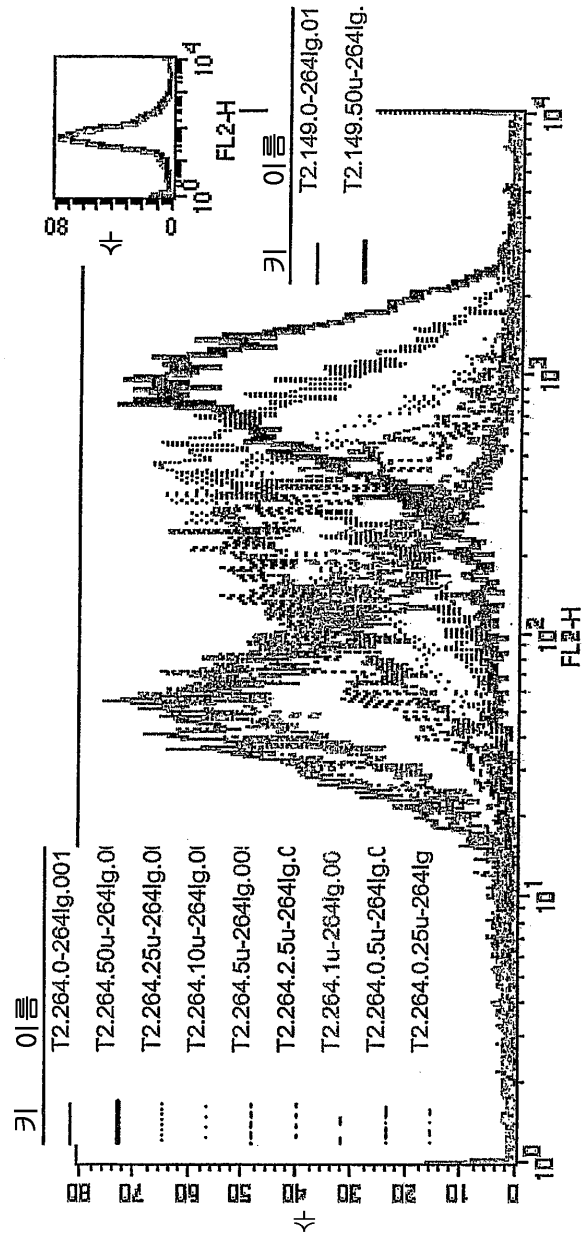
도면14

키	이름
—	T2.264.0-264BtmSaPE.005
—	T2.264.50u-264BtmSaPE.006
.....	T2.264.25u-264BtmSaPE.007
....	T2.264.10u-264BtmSaPE.008
----	T2.264.5u-264BtmSaPE.009
.....	T2.264.2.5u-264BtmSaPE.010
--	T2.264.1u-264BtmSaPE.011
----	T2.264.0.5u-264BtmSaPE.012
----	T2.264.0.25u-264BtmSaPE.013

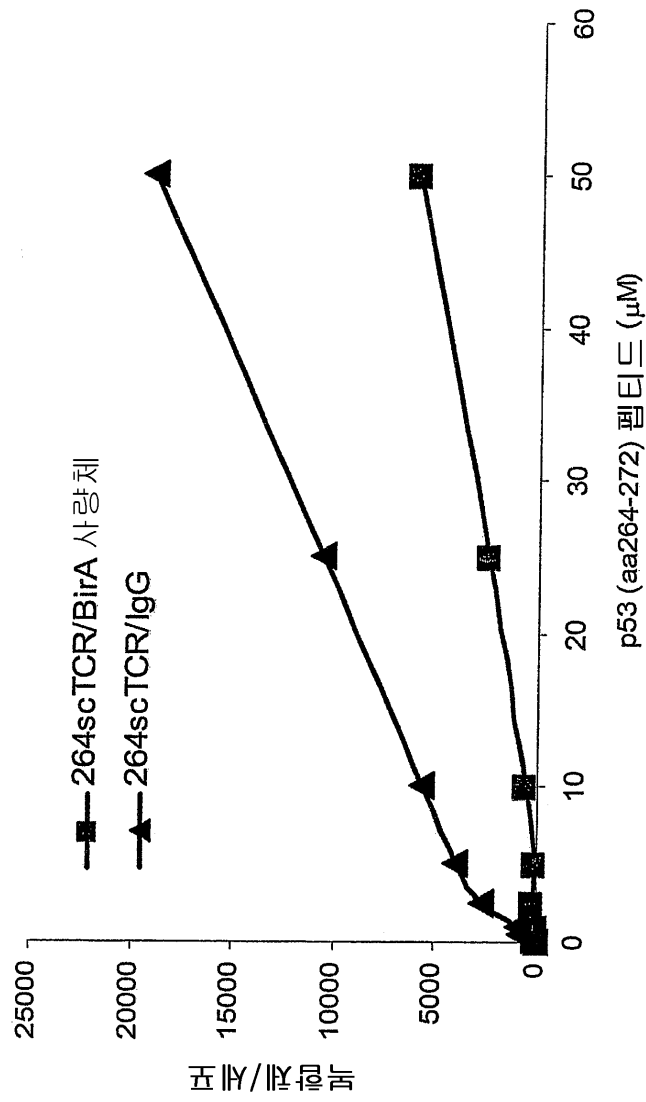


키	이름
—	T2.149.0-264BtmSaPE.015
—	T2.149.50u-264BtmSaPE.014

도면15

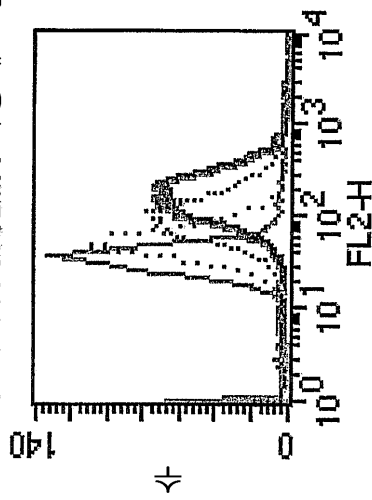


도면16



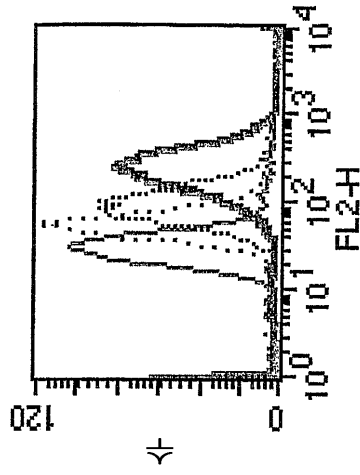
도면17

A. 264scTCR/BirA 사랑체로 염색



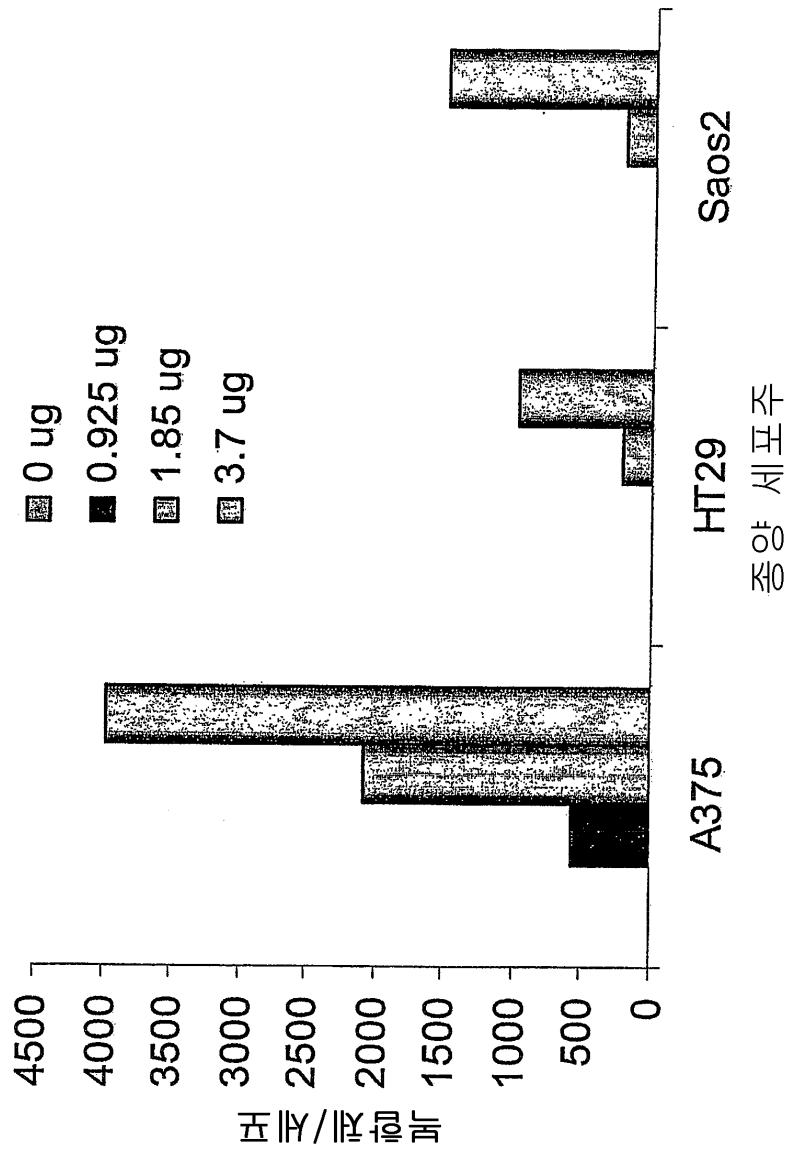
키	이름
—	A375-SaPE.5.001
—	A375-264BtnSaPE.5.002
.....	A375-264BtnSaPE.2.5.003
.	A375-264BtnSaPE.1.25.004

B. 264scTCR/IgG1 시약으로 염색

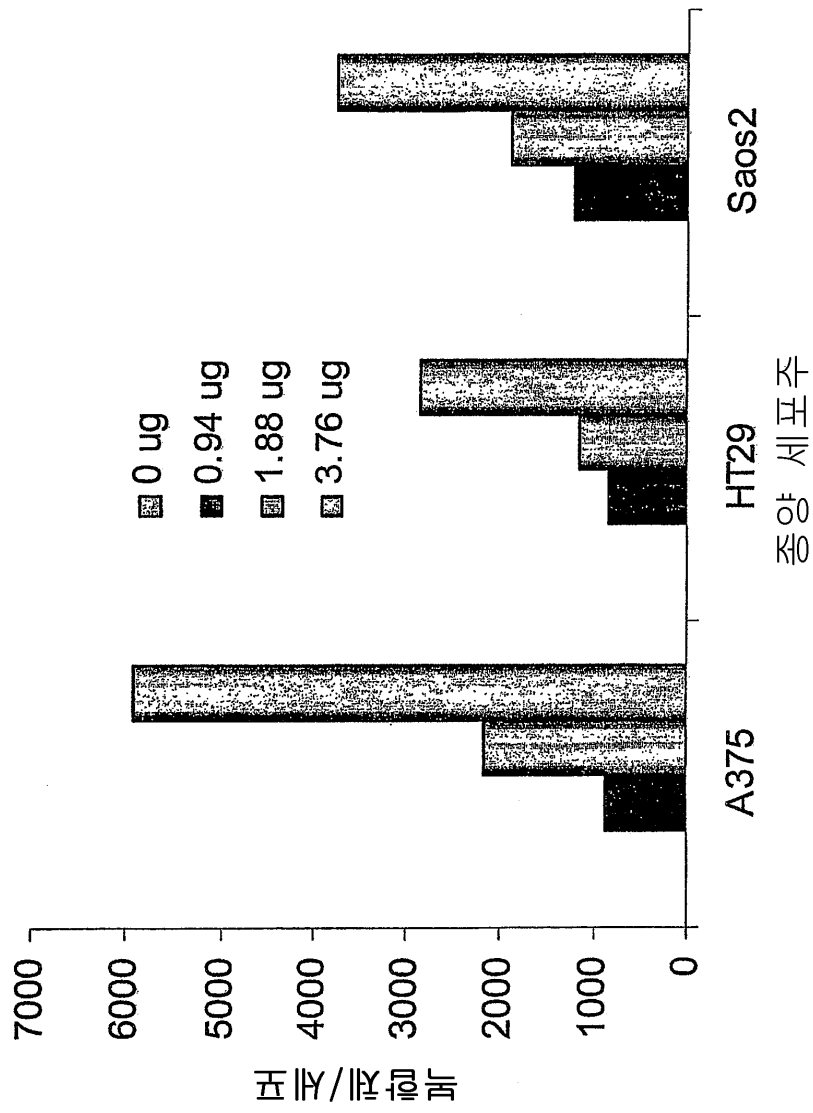


키	이름
—	A375-H57PE.001
.	A375-264Ig0.47H57PE.002
.....	A375-264Ig0.94H57PE.003
—	A375-264Ig1.88H57PE.004

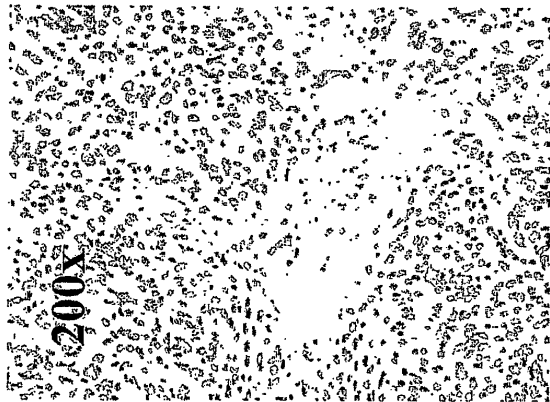
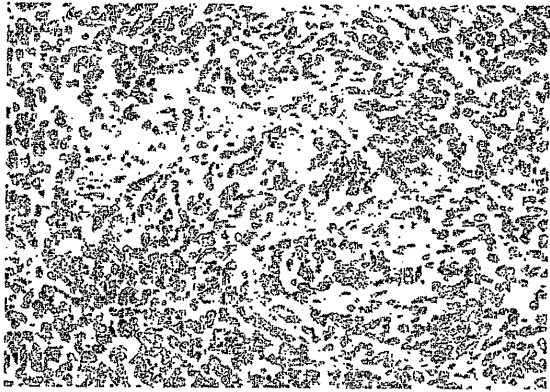
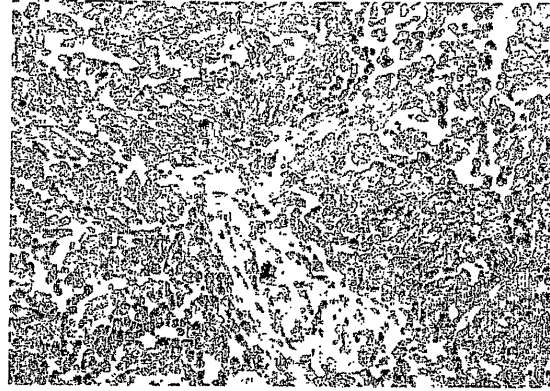
도면18



도면19

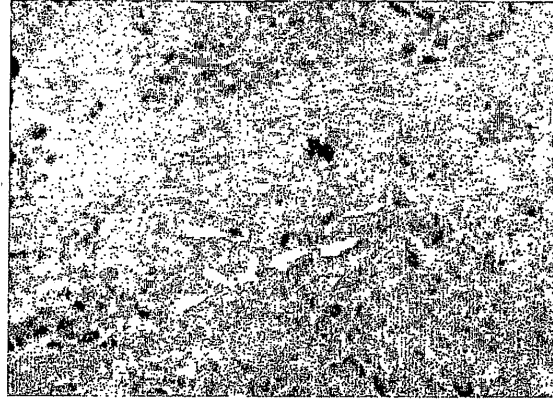


도면20



2 차 항체 CMYscTCR/IgG1 264scTCR/IgG1

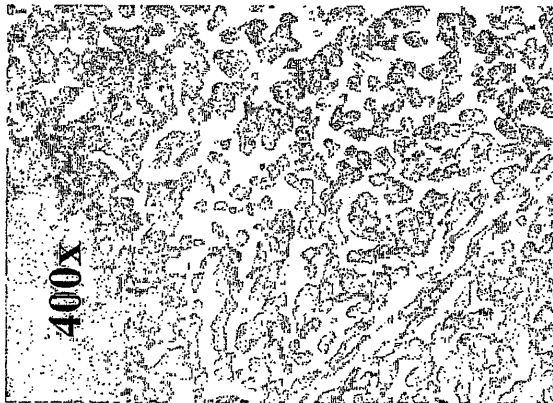
도면21



264scTCR/IgG1



CMVscTCR/IgG1



2차 항체