



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0031233
(43) 공개일자 2025년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 40/11 (2025.01)
A61K 40/32 (2025.01) A61K 40/46 (2025.01)
A61P 31/20 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 40/11 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7000133
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월08일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2025년01월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/SG2022/050892
- (87) 국제공개번호 WO 2023/239290
국제공개일자 2023년12월14일
- (30) 우선권주장
202210626787.7 2022년06월05일 중국(CN)

- (71) 출원인
에스씨지 셀 테라피 피티이. 리미티드
싱가폴, 109683 싱가포르, 디포트 로드 #04-02 138
- (72) 발명자
프로처, 울리케
독일, 81735 뮌헨, 안츠르구트스트라세 45
위스키르헨, 카린
독일, 81669 뮌헨, 로젠하이머 스트라세 40
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인더웨이브

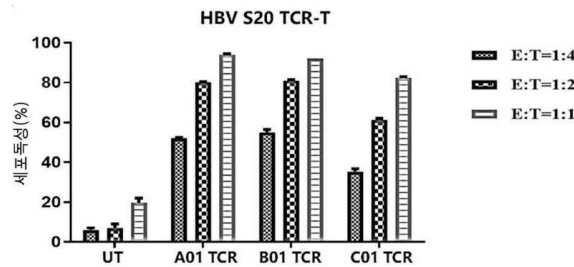
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 HBV 표면 항원 특이적 T 세포 수용체 및 이의 용도

(57) 요약

HBV 표면 항원을 특이적으로 표적하는 T 세포 수용체(TCRs) 및 상기 TCR을 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터, 상기 TCR, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 TCR-T 세포 및 HBV 감염증 및 기타 관련 질병들의 예방 또는 치료에서의 이들의 용도를 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 40/32 (2025.01)

A61K 40/46 (2025.01)

A61P 31/20 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2730/10122 (2013.01)

C12N 2730/10134 (2013.01)

C12N 2730/10145 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

(72) 발명자

황, 엔저우

중국, 상하이, 상하이, 상하이, 푸둥 디스트릭트,
시양커 로드 넘버 111, 빌딩 2, 4에프

진, 타오

중국, 상하이, 상하이, 상하이, 푸둥 디스트릭트,
시양커 로드 넘버 111, 빌딩 2, 4에프

장, 커

중국, 상하이, 상하이, 상하이, 푸둥 디스트릭트,
시양커 로드 넘버 111, 빌딩 2, 4에프

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편:

하기 아미노산 서열을 갖는 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:

α CDR3: ATDERDDMR (서열번호 3), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;
및

하기 아미노산 서열을 갖는 β CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:

β CDR3: ASSLNTEAF (서열번호 6), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;
또는

하기 아미노산 서열을 갖는 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:

α CDR3: GADTSTDKLI (서열번호 15), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;
및

하기 아미노산 서열을 갖는 β CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:

β CDR3: ASSHGGAYEQY (서열번호 18), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;
또는

하기 아미노산 서열을 갖는 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:

α CDR3: ATDAYGQNFV (서열번호 24), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;
및

하기 아미노산 서열을 갖는 β CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:

β CDR3: ASGSNTEAF (서열번호 25), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 하기를 포함하는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편:

각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역; 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3를 포함하는 TCR β 사슬 가변 영역; 또는 하나 이상의 CDR에서 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;

또는

각각 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역; 및 각각 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3를 포함하는 TCR β 사슬 가변 영역; 또는 하나 이상의 CDR에서 1 또는 2개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체;

또는

각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 24로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역; 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 25로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3를 포함하는 TCR β

사슬 가변 영역; 또는 하나 이상의 CDR에서 1 또는 2개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역은 서열번호 7, 서열번호 19 및 서열번호 26 중 어느 하나와 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 TCR β 사슬의 가변 영역은 서열번호 8, 서열번호 20 및 서열번호 27 중 어느 하나와 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 TCR α 사슬은 서열번호 10, 서열번호 21 또는 서열번호 28로 표시된 아미노산 서열을 포함하는 것인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 TCR β 사슬은 서열번호 11, 서열번호 22 또는 서열번호 29로 표시된 아미노산 서열을 포함하는 것인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편은 HLA-A2에 의해 제시된 HBV 표면 항원의 폴리펩티드에 결합 가능한 것인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 폴리펩티드는 FLLTRILTI (서열번호 31) 또는 FLLTKILTI (서열번호 32)의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 TCR의 α 사슬 및/또는 β 사슬의 C- 또는 N- 말단이 접합체(conjugates)와 결합되어 있고, 상기 접합체는 검출 가능한 마커, 치료제, PK 조절 모이어티(moiety) 또는 이들의 조합인, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편.

청구항 10

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 TCR 분자 또는 단편을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 TCR α 사슬의 가변 영역의 암호화 서열은 서열번호 33, 서열번호 38 또는 서열번호

43으로 표시된 것이고/이거나; 상기 TCR 베타 사슬의 가변 영역의 암호화 서열은 서열번호 34, 서열번호 39 또는 서열번호 44로 표시된 것인 핵산 분자.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 TCR α 사슬의 암호화 서열은 서열번호 35, 서열번호 40 또는 서열번호 45로 표시된 것이고/이거나; 상기 TCR β 사슬의 암호화 서열은 서열번호 36, 서열번호 41 또는 서열번호 46으로 표시된 것인 핵산 분자.

청구항 13

청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 14

청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자 또는 청구항 13의 발현 벡터에 의해 암호화되는 분리된 폴리펩티드.

청구항 15

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 이의 단편, 청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 청구항 13에 따른 벡터 또는 청구항 14에 따른 폴리펩티드를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 16

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 따른 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 단편, 청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 청구항 13에 따른 벡터, 청구항 14에 따른 폴리펩티드 또는 청구항 15에 따른 숙주 세포; 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 따른 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 또는 단편, 청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 청구항 13에 따른 벡터, 청구항 14에 따른 폴리펩티드, 청구항 15에 따른 숙주 세포 또는 청구항 16에 따른 약학적 조성물의 HBV 감염에 의해 유발되는 질병을 치료하기 위한 용도.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 HBV 감염에 의해 유발되는 질병은 간염(hepatitis), 간 섬유증(liver fibrosis), 간 경변증(liver cirrhosis) 및 간암(liver cancer)을 포함하는 것인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 면역요법 기술 분야에 관한 것으로, 특히 HBV 표면 항원을 표적으로 하는 T 세포 수용체, 이의 단편,

[0001]

TCR 폴리펩티드, 약학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1.1 전 세계 HBV 유병률

[0003] HBV는 주로 혈액, 모자간 전염 또는 성적 전염을 통해 전파되는 비세포성 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 오늘날에는 효과적인 백신과 항바이러스 약물이 있지만, HBV는 여전히 전 세계적으로 상당한 질병 부담을 야기한다. 2015년 전 세계 HBV 감염자 수는 2억 5,700만 명에 달하며, 만성 HBV 감염 합병증으로 인한 사망자 수는 88만 4,000명을 넘어섰다. 역학 연구에 따르면 아시아 및 아프리카 국가가 미주나 유럽보다 HBV 감염 비율이 더 높은 것으로 추정된다. 더불어 HBV 역전사효소의 교정 기능이 부족하기 때문에 HBV는 돌연변이를 일으켜 다른 유전자형을 생성하기 용이하다. 현재 지역별로 10가지의 서로 다른 HBV 유전자형이 분포한다.

[0004] 1.2 아시아인에게 가장 흔한 HBV 유전자형

[0005] 아시아 국가에서 HBV의 유전자형은 주로 B형과 C형이다. 연구진은 HBV 유전자형이 임상 결과에 영향을 미친다는 사실을 확인하여 지역마다 다른 유전자형의 유병률에 초점을 맞췄다. 예를 들어, 간경변이 간세포암으로 진행되는 것은 유전자형 C와 D에서 다른 유전자형보다 더 높은 확률로 발생한다.

[0006] 1.3 HCC와 그 발병 경로

[0007] HCC(간세포암, Hepatocellular Carcinoma)는 아시아인들에게서 가장 흔하고 치명적인 간암으로, 원발성 간세포암에 해당한다. 2017년 기준으로 HCC는 만성 간염 감염의 장기적인 합병증을 유발하여 약 47만 명의 사망을 초래했다. HCC의 분자병리학적 과정은 다양한 분자 이상과 유전자 돌연변이가 관여하는 복잡한 과정으로, 결국 악성 질환의 발생 및 HCC의 진행을 유발한다.

[0008] HBV-DNA(간염 바이러스 B형 DNA)의 게놈 통합은 HBV 관련 HCC의 80~90%에서 관찰된다. 분자 수준에서 HBV는 감염된 간세포의 유전자 발현 네트워크에 개입하여 이를 암 진행 경로로 유도한다. HBV-DNA의 통합은 삽입 부위에서 유전자 발현을 조절함으로써 유전체 불안정을 증가시키며, 이에 따라 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(phosphatidylinositide 3-kinase)/Akt, myc, Wnt/ β -카테닌, c-Met, Hedgehog 등의 발암 경로를 활성화한다.

[0009] 이전 연구에서는 Akt 신호전달이 TGF- β 에 의해 유도되는 세포 자멸사를 억제하고 종양 형성을 촉진할 수 있으며, 동시에 β -카테닌 신호전달과도 연관되어 간세포암을 유발할 수 있음을 시사한 바 있다. 또한, HBV-DNA 통합에 의해 유발된 분자적 변화는 DNA 손상 체크포인트에도 영향을 미쳐, 간경변이 진행된 간에서 종양 형성을 초래한다. 이러한 분자적 변화에는 p53 종양 억제 유전자의 기능 소실, p27 세포 주기 조절자의 불활성화, 인슐린 유사 성장 억제 수용체 2(IGF2R) 부위에서의 이형접합성 상실(LOH), p16 세포 주기 정지 단백질의 발현 소실 등이 포함된다.

[0010] 동시에, HBV는 선천 면역(innate immunity)을 억제하거나 차단하여 적응 면역 반응의 발달에도 영향을 미칠 수 있다. 이러한 만성적이고 지속적인 면역 반응은 병리학적으로 간염과 장기적인 섬유화(fibrosis)로 나타나며, 결국 간경변 및 간암을 유발한다.

[0011] 1.4 HCC 치료의 현재 상황

[0012] 현재 외과적 절제술(surgical resection)과 간 이식(liver transplantation)이 HCC 치료에서 가장 효과적인 방법으로 사용되지만, HCC 환자의 30% 미만의 HCC를 보유한 환자들만이 상기 수술을 받을 수 있고, 수술을 받을 수 있는 환자라도 수술 후 5년 내 재발률이 80%에 달한다. 또한, 기증자 간 이식 대기 시간이 매우 길고, 대기자 명단이 지속적으로 증가함에 따라 약 25%의 환자는 종양 진행으로 인해 이식을 받지 못하는 상황이다.

[0013] 가장 일반적으로 사용되는 보존적 치료는 경동맥 화학색전술(TACE, Transcatheter Arterial Chemoembolization)이지만, 이는 색전술로 인한 허혈성 손상(ischemic injury)이 복수(ascites) 증가 및 사망 위험을 높일 수 있기 때문에 간경변(advanced cirrhosis) 및 간부전(hepatic decompensation)이 이미 진행된 환자에서는 금기시된다.

[0014] 현재 FDA에서 승인한 HCC 치료용 표적 치료제는 소라페닙(Sorafenib)과 레고라페닙(Regorafenib)이며, 두 약물 모두 티로신 키나아제 억제제(Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs)에 속한다. 그러나 진행성 HCC(advanced HCC) 환자들을 대상으로 한 임상시험 데이터에 따르면, 이들 약물은 출혈 및 동정맥 혈전증 위험을 증가시킬 수 있다. 더불어 상기 약물 치료로 인한 생존 기간 연장 효과는 평균 2~3개월에 불과하며, 시간이 지남에 따른 질

병 진행이 매우 흔하게 나타난다.

- [0015] 또한, 현재까지도 여러 화학요법 병용 요법이 연구되고 있으나, 일반적으로 HCC 환자에게 유의미한 생존율 증가를 제공하지 못한다. 대표적인 화학요법으로는 PIAF (시스플라틴, 인터페론, 독소루비신, 5-플루오로우라실), GEMOX (젬시타빈, 옥살리플라틴), FOLFOX4 (5-플루오로우라실, 칼슘 폴리네이트, 옥살리플라틴) 등의 조합이 개발 중이지만, 임상시험이 성공적이지 못했으며 연구 결과도 아직 미완성 상태이다.
- [0016] 한편, 최근 HCC 면역치료에서 획기적인 발견을 하였는데, 3상 임상시험(Phase III first-line immunotherapy study)에 따르면, 아테졸리주맙(Atezolizumab)과 베바시주맙(Bevacizumab)을 병용 사용하는 것(T+A)이 기존 표준 치료제인 소라페닙 단독 요법보다 사망 및 질병 진행 위험을 유의미하게 감소시키는 것을 발견하였다. 그러나, 객관적 반응률(ORR, RECIST v1.1)은 27.3%, 무진행 생존 기간(mPFS)은 6.8개월에 불과했으며, 예후가 더 나쁜 진행성 HCC 환자를 대상으로 한 중국 연구에서는 mPFS가 5.7개월로 더 낮았다. 이러한 데이터는 HCC 면역치료가 과거에 비해 상당한 발전을 이루었지만, 치료 효과는 여전히 부족하고 추가 연구가 필요함을 의미한다.
- [0017] HBV 관련 HCC 환자는 항바이러스 치료(antiviral therapy)를 통해 바이러스 복제를 억제하고, 혈중 바이러스량을 감소시키며, 간 내 염증 반응(intrahepatic inflammatory response)을 완화하고 간경변 관련 예후를 개선해야 한다. 항바이러스 치료는 HBV 복제를 효과적으로 억제하고 간염 증상을 완화할 수 있지만, 완전한 바이러스 제거는 불가능하며 치료 중단 후에도 바이러스 조절이 어려운 문제가 있다.
- [0018] 핵산 유도체(nucleosides) 및 핵산 유사체(nucleoside analogs), 인터페론(interferons) 등이 또한 HBV 관련 HCC 예방 및 치료에 임상적으로 사용되고 있지만, 실제 치료 효과는 불확실하며, 전체 생존율(overall survival)과 질병 재발(disease recurrence) 측면에서 임상적 논란이 지속되고 있다. 또한, 장기적인 항바이러스제 사용은 약물 내성을 유발할 수 있으며, 지속적으로 사용하는 경우 약물의 효과가 감소할 수 있다. 특히, 화학요법을 받는 환자는 HBV 재활성화 위험이 있기 때문에 엔테카비르(entecavir)나 테노포비르(tenofovir) 등의 예방적 항바이러스 치료도 권장되는 실정이다.
- [0019] 결론적으로, 현재 이용 가능한 치료 방법과 약물의 한계 및 높은 위험성으로 인해 만성 B형 간염 및 HBV 관련 HCC 환자들에게 더 많은 선택지를 제공할 수 있는 새로운 치료 전략이 필요하다.
- [0020] **1.5 HBV 관련 HCC의 면역치료에서 T 세포의 역할과 TCR T 세포의 활용 근거**
- [0021] T 세포는 골수에서 유래하고 림프에서 성숙하며 흉선에서 완성되는 면역 세포이다. 이들은 표면에 T 세포 항원 수용체(TCR)를 발현하며, 세포 매개 면역에서 감염 및 암세포를 제거하는 데 중요한 역할을 한다. TCR은 주요 조직 적합성 복합체(MHC)에 의해 제시된 표적 에피토프를 특이적으로 인식하고 결합한다. T 세포가 표적을 인식하면 대량 증식, 사이토카인 방출 및 세포 독성을 통해 표적 세포를 사멸시킬 수 있다.
- [0022] 채택 면역요법(Adoptive T cell immunotherapy)은 백혈병 및 거대세포바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV)와 같은 바이러스 질환 치료를 위해 수행된 바 있다. 그러나 환자의 혈액에서 바이러스 또는 종양 특이적 T 세포를 분리하고 증식하는 것은 어렵고 시간이 오래 소요된다. 따라서 특정 바이러스 또는 종양 항원에 반응할 수 있도록 유전자 편집을 통해 T 림프구를 조작하는 새로운 치료 전략이 수행되었다. 이는 특정 항원을 표적으로 하는 T 세포 수용체(TCR) 또는 TCR α/β 이형이합체(heterodimers)를 도입하여 높은 항원 특이성을 가진 T 세포를 생성하는 방법이다.
- [0023] B형 간염 바이러스는 감염된 간세포에서 HBsAg 단백질을 합성하고, 소포체에서 바이러스를 조립하여 바이러스(또는 아형 바이러스) 입자로 분비하거나 세포막 교환을 통해 세포 표면에 도달하도록 한다. HBsAg 발현은 HBV-DNA가 통합된 HCC 세포에서도 흔히 발견된다.
- [0024] 임상적 증거에 따르면, HBV 특이적 T 세포를 이용한 채택 면역요법은 HBV 복제 또는 종양 성장을 조절할 수 있다. 백혈병 환자는 HBV에 대해 특이적인 면역을 가진 공여자로부터 골수를 이식받으면 HBV 면역을 획득할 수도 있다(이는 HBV 백신 접종이나 HBV 감염 후 자가 면역을 통해 회복된 공여자로부터 가능하다). 마찬가지로, HBV에 대한 특정 면역을 가진 대상자에게 HBV 양성 간을 이식할 경우, 이식된 간에서도 HBV 감염이 제거될 수 있다.
- [0025] 그러나, 만성 B형 간염 및 HBV 관련 HCC 환자의 경우 HBV 특이적 T 세포 면역이 심각하게 억제된다. 이들 환자에서는 HBV 특이적 T 세포가 기능적으로 결핍되어 있으며, T 세포의 수가 적고, 쉽게 소진되는 경향이 있다. 이러한 기능적 결핍으로 인해, 시험관 내 환자 혈액 분석에서는 HBV 특이적 T 세포가 거의 검출되지 않는다.
- [0026] 따라서, 고친화도 TCR-T 세포를 제작하여 환자에게 재주입하는 치료법이 새로운 대안이 되고 있다. 이는 유전자

공학 및 기타 생물학적 방법을 사용하여 HBV 표면 항원을 표적으로 하는 특정 TCR을 개발하고, 환자의 T 세포를 분리한 후 시험관 내에서 유전자 도입을 통해 변형하여 다시 체내에 주입하는 방식이다. 그러나 현재까지 HBV 감염으로 인한 질환, 특히 HBV 유발 간암을 치료하기 위한 안전하고 효과적인 TCR-T 치료법은 발견되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0027] 광범위하고 심층적인 연구를 통해, 본 발명은 HBV 표면 항원을 특이적으로 표적하여 HBV 감염으로 인해 발생한 간암 세포를 제거할 수 있는 T 세포 수용체 및 변형된 TCR-T 세포를 제공한다.
- [0028] 본원은 B형 간염 바이러스(HBV) 표면 항원 FLLTRILTI-HLA-A2 복합체에 특이적으로 결합하는 신규한 TCR 분자 또는 이의 단편(fragment)을 제공한다.
- [0029] 상기 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 단편은 하기를 포함한다:
- [0030] 하기 아미노산 서열을 갖는 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역: α CDR3: ATDERDDMR (서열번호 3), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및 하기 아미노산 서열을 갖는 β CDR3를 포함하는 TCR $\hat{\alpha}$ 사슬 가변 영역: β CDR3: ASSLNTEAF (서열번호 6), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0031] 다른 실시예에서, 상기 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 단편은 하기를 포함한다:
- [0032] 하기 아미노산 서열을 갖는 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역: α CDR3: GADTSTDKLI (서열번호 15), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및 하기 아미노산 서열을 갖는 β CDR3를 포함하는 TCR $\hat{\alpha}$ 사슬 가변 영역: β CDR3: ASSHGAYEQY (서열번호 18), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0033] 다른 실시예에서, 상기 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 단편은 하기를 포함한다:
- [0034] 하기 아미노산 서열을 갖는 α CDR3를 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역:
- [0035] α CDR3: ATDAYGQNFV (서열번호 24), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및 하기 아미노산 서열을 갖는 β CDR3를 포함하는 TCR $\hat{\alpha}$ 사슬 가변 영역: β CDR3: ASGSNTEAF (서열번호 25), 또는 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0036] 일부 실시예에서, 상기 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 단편은 하기를 포함한다:
- [0037] 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3을 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역; 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3을 포함하는 TCR β 사슬 가변 영역; 또는 하나 이상의 CDR에서 1 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0038] 일부 실시예에서, 상기 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 단편은 하기를 포함한다:
- [0039] 각각 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3을 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역; 및 각각 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3을 포함하는 TCR β 사슬 가변 영역; 또는 하나 이상의 CDR에서 1 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0040] 일부 실시예에서, 상기 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 단편은 하기를 포함한다:
- [0041] 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 24로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3을 포함하는 TCR α 사슬 가변 영역; 및 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 25로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3을 포함하는 TCR β 사슬 가변 영역; 또는 하나 이상의 CDR에서 1 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.
- [0042] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 7, 서열번호 19 및 서열번호 26 중 어느 하나와 적어도 90 % 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 8, 서열번호 20 및 서열번호 27 중

어느 하나와 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

- [0044] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 7과 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 8 과 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0046] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 19과 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0047] 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 20과 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0048] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 26과 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0049] 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 27과 적어도 90 %가 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0050] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 7에 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 8에 표시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0051] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 19에 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 20에 표시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0052] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 26에 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 서열번호 27에 표시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0053] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 TCR α 사슬의 불변 영역(constant region)인 TRAC*01과 TCRβ 사슬의 불변 영역인 TRBC1*01 또는 TRBC2*01을 포함하는 α β 이형접합체(heterodimer)이다. 상기 불변 영역(constant region)은 인간 TCR의 불변 영역 서열(human TCR constant region sequences) 또는 마우스 TCR의 불변 영역 서열(murine constant region sequences) 중에서 선택될 수 있다.
- [0054] 일부 실시예에서, 상기 불변 영역에 적어도 하나 이상의 인공적인 이황화 결합(artificial disulfide bond)을 도입함으로써, 상기 이형접합체의 안정성이 증가하고 내인성 가닥(endogenous strand)과의 불일치율(mismatch rate)이 감소된다.
- [0055] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR^α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 11로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 21로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR^α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 22로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 28로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR^α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 29로 표시된다.
- [0056] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 단일 사슬 융합 단백질(single-chain fusion protein)이다. 일부 실시예에서, 단일 사슬 TCR은 TCRβ 사슬과 TCR α 사슬이 P2A를 통해 연결되어 형성된다.
- [0057] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 N-말단(N-terminal)에서 C-말단(C-terminal)방향으로 하기를 포함한다: T 세포 수용체 베타 사슬 가변 영역 (T cell receptor beta chain variable region, TRBV), T 세포 수용체 베타 사슬 불변 영역 (T cell receptor beta chain constant region, TRBC), P2A 펩타이드 (P2A peptide), T 세포 수용체 알파 사슬 가변 영역 (T cell receptor alpha chain variable region, TRAV) 및 T 세포 수용체 알파 사슬 불변 영역 (T cell receptor alpha chain constant region, TRAC).
- [0058] 일부 실시예에서, 상기 P2A 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 9로 표시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR의 아미노산 서열은 서열번호 12에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR의 아미노산 서열은 서열번호 23에 표시된다. 다른 실시예에 있어서, 상기 단일 사슬 TCR의 아미노산 서열은 서열번호 30에 표시된다.

- [0059] 일부 실시예에서, 시스템인 잔기는 상기 TCR의 알파 사슬의 불변 영역과 상기 TCR의 베타 사슬의 불변 영역 사이에 최소 하나 이상의 인공 이황화 결합(artificial disulfide bond)을 형성한다.
- [0060] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 가용성이다.
- [0061] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 (a) 막 관통 영역을 제외한 TCR α 사슬의 전부 또는 일부; 및 (b) 막 관통 영역을 제외한 TCR β 사슬의 전부 또는 일부를 포함하고; 상기 (a) 및 (b)는 모두 기능적인 가변 영역을 포함하거나, 기능적인 가변 영역 및 TCR 사슬의 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다.
- [0062] 일부 실시예에서, 상기 TCR 또는 이의 단편은 HLA-A2에 의해 제시된 HBV 표면 항원의 폴리펩티드와 결합 가능하다. 일부 실시예에서, 상기 폴리펩티드는 아미노산 서열 FLLTRILT I (서열번호 31) 또는 FLLTKILT I (서열번호32)를 포함하거나, 이로 이루어져 있다.
- [0063] 일부 실시예에서, 적어도 하나 이상의 접합체가 상기 TCR의 알파 사슬 및/또는 상기 TCR의 베타 사슬의 C-또는 N- 말단에 결합되어 있고, 상기 T 세포 수용체에 결합한 접합체는 검출 가능한 라벨, 치료제, PK 조절 모이어티(moiety) 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0064] 본 발명은 또한 상기 TCR 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0065] 일부 실시예에서, 상기 TCR 유전자의 발현은 코돈 최적화를 통해 향상될 수 있다.
- [0066] 일부 실시예에서, 상기 TRAV의 암호화 서열은 서열번호 33에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TRBV의 암호화 서열은 서열번호 34에 표시된다. 일부 실시예에서, TRAV의 암호화 서열은 서열번호 38에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TRBV의 암호화 서열은 서열번호 39에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TRAV의 암호화 서열은 서열번호 43에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TRBV의 암호화 서열은 서열번호 44에 표시된다.
- [0067] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬의 암호화 서열은 서열번호 35에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬의 암호화 서열은 서열번호 36에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬의 암호화 서열은 서열번호 40에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬의 암호화 서열은 서열번호 41에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬의 암호화 서열은 서열번호 45에 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬의 암호화 서열은 서열번호 46에 표시된다.
- [0068] 일부 실시예에서, 상기 TCR의 암호화 서열(coding sequence)은 단일 사슬(single chain)이며, TCR β 사슬과 TCR α 사슬의 암호화 서열은 P2A 암호화 서열을 통해 연결된다. 일부 실시예에서, 상기 단일 가닥 TCR의 암호화 서열은 서열번호 37, 서열번호 42 또는 서열번호 47로 표시된다.
- [0069] 본원은 상기 기재된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 더 제공한다.
- [0070] 일부 실시예에서, 상기 벡터는 플라스미드(plasmids), 이원성 벡터(binary vectors), DNA 벡터(DNA vectors), mRNA 벡터(mRNA vectors), 레트로바이러스 벡터(retroviral vectors), 렌티바이러스 벡터(lentiviral vectors), 트랜스포존 기반 벡터(transposon-based vectors) 및 인공 염색체(artificial chromosomes)으로 이루어진 그룹에서 선택된다. 일부 실시예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이고, 일부 실시예에서, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0071] 본원은 상기 기재된 핵산 분자 또는 벡터에 의해 암호화된 폴리펩티드를 더 제공한다.
- [0072] 본원은 상기 기재된 TCR 또는 이의 단편, 상기 핵산 분자, 상기 벡터 또는 상기 폴리펩티드를 포함하는 숙주 세포를 더 제공한다.
- [0073] 일부 실시예에서, 상기 세포는 줄기세포이고; 일부 실시예에서, 상기 세포는 NK 세포이고; 일부 실시예에서, 상기 세포는 T 세포이고; 일부 실시예에서, 상기 세포는 CD4⁺ T 세포이고; 일부 실시예에서, 상기 세포는 CD8⁺ T 세포이다.
- [0074] 본원은 TCR 또는 이의 단편, 상기 핵산 분자, 상기 벡터, 상기 폴리펩티드, 또는 상기 숙주 세포를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 부형제(excipient), 희석제(diluent), 또는 담체(carrier)를 포함하는 약학적 조성물(pharmaceutical composition)을 더 제공한다.
- [0075] 본원은 HBV 감염증 및 다른 관련 질병들을 예방 또는 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 상기 TCR 또는 단편, 상기 핵산 분자, 상기 벡터, 상기 폴리펩티드, 상기 숙주 세포, 또는 상기 약학적 조성물의 용도를 더 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 HBV 감염증은 간염(hepatitis), 간섬유화(liver fibrosis), 간경변(liver

cirrhosis) 또는 간암(liver cancer)이다.

[0076] 본원은 HBV 감염증 또는 HBV 감염에 의해 유발되는 질병들을 치료하기 위한 상기 TCR 또는 단편, 상기 핵산 분자, 상기 벡터, 상기 폴리펩티드, 상기 세포, 또는 상기 약학적 조성물의 용도를 더 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 HBV 감염에 의해 유발되는 질병들은 간염(hepatitis), 간섬유화(liver fibrosis), 간경변(liver cirrhosis), 및 간암(liver cancer)중 하나 또는 그 이상을 포함한다.

[0077] 본 출원의 범위 내에서, 상기 기술된 기술적 특징과 아래에 명시된 기술적 특징, 예를 들어, 실시예는 서로 결합될 수 있으며, 새로운 기술적 솔루션 또는 선호되는 기술적 솔루션을 구성할 수 있다. 본 명세서의 공간상의 제약으로 인해, 모든 내용을 나열할 수는 없다.

과제의 해결 수단

[0078] 정의

[0079] 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위해, 특정 기술적 및 과학적 용어를 하기와 같이 명확히 정의한다. 본 명세서에서 별도로 정의되지 않은 경우, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 사람이 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다.

[0080] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "B형 간염 표면 항원 T 세포 수용체(TCR, hepatitis B surface antigen T cell receptor)"는 주요 조직 적합성 복합체(MHC, major histocompatibility complex)와 HBV 표면 항원의 복합체에 결합하여 도움 T 세포 반응(helper response) 또는 세포 독성 반응(cytotoxic response)을 유도하는 TCR을 의미한다.

[0081] 구체적으로, 상기 HBV 표면 항원은 HBs20-28일 수 있으며, 본원에서는 HBs20, HBs20-28, S20-28 및 S20이 동일한 의미로 혼용될 수 있다. 별도로 명시되지 않는 한, 이는 유전자형 A 및 D의 S20-28 항원으로, 아미노산 서열 FLLTRILTI를 포함한다.

[0082] 일부 실시예에서, 상기 HBV 표면 항원은 HBV 유전자형 A 및 D; 일부 실시예에서, 상기 HBV 표면 항원은 HBV 유전자형 B 및 C이다.

[0083] 일부 실시예에서, 상기 HBV 표면 항원은 FLLTRILTI (서열번호 31)의 아미노산 서열을 포함하고; 일부 실시예에서, 상기 HBV 표면 항원은 FLLTKILTI (서열번호 32)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0084] 일부 실시예에서, 상기 HBV 표면 항원은 FLLTRILTI (서열번호 31)의 아미노산 서열을 갖고; 일부 실시예에서, 상기 HBV 표면 항원은 FLLTKILTI (서열번호 32)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0085] 상기 용어 "MHC 분자(MHC molecule)"는 면역글로불린 초과(immunoglobulin superfamily)에 속하는 단백질을 의미하며, MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자일 수 있다. 상기 MHC 분자는 항원 제시에 특화되어 있으며, 개인마다 서로 다른 MHC를 가져 단백질 항원 내 다양한 펩타이드를 항원제시세포(APC)의 표면에 제시할 수 있다. 인간의 MHC는 일반적으로 "HLA 유전자 또는 HLA 복합체(HLA complex)"로 불린다.

[0086] "T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)"은 T 세포 막 표면에 존재하는 당단백질로, α-사슬/β-사슬(α-chain/β-chain) 또는 γ-사슬/δ-사슬(γ-chain/δ-chain) 이형접합체(heterodimers) 형태로 존재한다. TCR 이형접합체의 경우, 95 %의 T 세포에서 α 및 β 사슬로 구성되며, 5 %의 T 세포에서 γ 및 δ 사슬로 구성된다. 본래의 이형접합체 TCR(native heterodimeric TCR)은 α 사슬과 β 사슬로 구성되며, α 사슬과 β 사슬은 이형접합체 TCR의 서브유닛이다. 넓은 의미에서, 상기 α 및 β 사슬은 각각 가변 영역(variable region), 연결부(linker), 그리고 불변 영역(constant region)을 포함한다. 상기 β 사슬에는 가변 영역과 연결부 사이에 짧은 가변 영역(short variable region)이 존재할 수 있으나, 이는 일반적으로 연결부의 일부로 간주된다.

[0087] 상기 가변 영역(variable region)은 3개의 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)인 CDR1, CDR2, CDR3를 포함한다. 상기 CDR은 프레임워크 영역/framework regions) 내에서 키메라화(chimerized)된다. 본원의 상기 α 사슬과 β 사슬의 CDR 영역은 국제 면역유전자 정보 시스템(International ImMunoGeneTics, IMGT) 번호 체계를 사용하여 정의된다. 상기 CDR 영역은 TCR이 pMHC 복합체(pMHC complex)에 결합하는 것을 결정하며, TCR의 불변 영역(constant region) 서열은 IMGT 공공 데이터베이스에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 α 사슬의 불변 영역 서열은 "TRAC*01"이며, 상기 β 사슬의 불변 영역 서열은 "TRBC1*01" 또는 "TRBC2*01"이다.

[0088] 본원에서는 "T 세포 수용체(T cell receptor)", "TCR" 및 "TCR 분자(TCR molecule)"라는 용어가 동일한 의미로

혼용될 수 있다.

[0089] TCR 분자

[0090] 본원의 TCR 또는 이의 단편(fragments)은 HLA-A2에 의해 제시된 HBV 표면 항원을 인식한다. 일반 인구의 약 50%가 MHC 클래스 I 분자인 HLA-A2를 발현하며, 상기 HLA-A2는 HLA-A 혈청형(serotype)에 속한다. 따라서, 상기 HLA-A2 제한성을 갖는 TCR은 특정 질병을 치료하는 데 있어 광범위하게 활용될 수 있다. 특히, 이러한 아형(subtype)은 HLA-A*0201, *0202, *0203, *0206 및 *0207 유전자 산물을 포함하는 많은 HLA-A2 대립유전자의 유전자 산물을 식별할 수 있다.

[0091] 백인(Caucasian)과 아시아인(Asian) 인구 집단 사이에 HLA-A2 아형의 뚜렷한 차이가 존재할 수 있다. 예를 들어, HLA-A2에 양성인 백인 집단의 95% 이상이 HLA-A0201인 반면, HLA-A2에 양성인 중국인 집단은 다음과 같이 분류될 수 있다: 23%의 HLA-A0201; 45%의 HLA-A0207; 8%의 HLA-A0206; 23%의 HLA-A0203.

[0092] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 TCR α 사슬 가변 영역(alpha chain variable region) 및 TCR β 사슬 가변 영역(beta chain variable region)을 포함하며, 각각 3개의 상보성 결정 영역(CDR, complementarity determining region)을 갖는다.

[0093] 일부 실시예에서, TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 ATDERDDMR (서열번호 3) 아미노산 서열을 갖는 α CDR3 또는 이로부터 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체를 포함하고/하거나; 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 ASSLNTEAF (서열번호 6) 아미노산 서열을 갖는 β CDR3 또는 이로부터 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체를 포함한다.

[0094] 다른 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 GADTSTDKLI (서열번호 15) 아미노산 서열을 갖는 α CDR3 또는 이로부터 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체를 포함하고/하거나; 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 ASSHGAYEQY (서열번호 18) 아미노산 서열을 갖는 β CDR3 또는 이로부터 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체를 포함한다.

[0095] 다른 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 ATDAYQNFV (서열번호 24) 아미노산 서열을 갖는 α CDR3 또는 이로부터 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체를 포함하고/하거나; 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 ASGSNTEAF (서열번호 25) 아미노산 서열을 갖는 β CDR3 또는 이로부터 이로부터 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체를 포함한다.

[0096] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3을 포함하고/하거나; TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3을 포함한다.

[0097] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 각각 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3을 포함하고/하거나; 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 각각 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3; 또는 하나 이상의 CDRs에서 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 변이체를 포함한다.

[0098] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)은 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 24로 나타난 α CDR1, α CDR2 및 α CDR3을 포함하고/하거나; 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 25로 나타난 β CDR1, β CDR2 및 β CDR3; 또는 한 개 이상의 CDRs에서 1개 또는 2개의 아미노산이 또다른 아미노산으로 치환된 변이체를 포함한다.

[0099] 키메라 TCR(chimeric TCR)은 본원에서 설명하는 CDR 영역의 아미노산 서열을 CDR 영역과 호환 가능한 적절한 프레임워크 구조/framework structure)에 삽입하여 제작할 수 있다. 본 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 공개된 CDR 영역을 기반으로 하여, 해당 기능을 갖춘 TCR 분자를 설계하거나 합성할 수 있다. 따라서, 본원에서 TCR은 상기 α 및/또는 β 사슬의 CDR 영역의 아미노산 서열과 임의의 적절한 프레임워크 구조를 포함하는 TCR을 의미한다. 본원에서 설명하는 상기 TCR α 사슬 가변 영역(variable region)의 아미노산 서열은 서열번호 7, 서열번호 19 또는 서열번호 26과 적어도 90%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 98%의 서열 동일성을 갖고/갖거나; 상기 TCR β 사슬 가변 영역(variable region)의 아미노산 서열은 서열번호 8, 서열번호 20 또는 서열번호 27과 적어도 90%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 98%의 서열 동일성을 갖는다.

[0100] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역은 서열번호 7로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역은 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에

서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역은 서열번호 19로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역은 서열번호 20으로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역은 서열번호 26으로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 TCR β 사슬 가변 영역은 서열번호 27로 표시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0101] 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7로 표시된 아미노산 서열일 수 있고, 상기 TCR β 사슬 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 8로 표시된 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 19로 표시된 아미노산 서열일 수 있고, 상기 TCR β 사슬 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20으로 표시된 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 26으로 표시된 아미노산 서열일 수 있고, 상기 TCR β 사슬 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 27로 표시된 아미노산 서열일 수 있다.

[0102] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 TCR α 사슬의 불변 영역(TCR α chain constant region)과 TCR β 사슬의 불변 영역(TCR β chain constant region)을 포함하는 $\alpha\beta$ 이형접합체($\alpha\beta$ heterodimer)이다. 일부 실시예에서, 본원의 TCR 분자의 불변 영역은 인간 유래의 불변 영역(human constant regions)이다. 본 기술분야의 통상의 기술자는 관련 서적을 참고하거나 IMGT(국제 면역유전자 정보 시스템) 공공 데이터베이스를 조회하여 인간의 불변 영역의 아미노산 서열을 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 알파 사슬의 불변 영역 서열은 "TRAC*01"일 수 있으며, 상기 베타 사슬의 불변 영역 서열은 "TRBC1*01" 또는 "TRBC2*01"일 수 있다. 일부 실시예에서, TCR 불변 영역의 안정성을 향상시키고 외인성(exogenous) TCR 분자와 내인성(endogenous) TCR 분자 간의 불일치를 줄이기 위해, 불변 영역에 추가적인 이황화 결합(disulfide bonds)을 도입된다. 또한, 상기 불변 영역은 마우스 유래 불변 영역일 수도 있다. TRAC 및 TRBC를 마우스 유래 불변 영역으로 대체하면, 외인성 TCR 분자와 내인성 TCR 분자 간의 불일치를 방지할 수 있다. 이러한 효과는 외부에서 인위적인 이황화 결합을 도입하는 것과 유사한 목적이다.

[0103] 일부 실시예에서, 상기 TCR의 알파 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시되고/되거나; 상기 TCR의 베타 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 11로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR의 알파 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 21로 표시되고/되거나; 상기 TCR의 β 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 22로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 TCR의 α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 28로 표시되고/되거나; 상기 TCR의 β 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 29로 표시된다.

[0104] 일부 실시예에서, 본원의 상기 TCR 분자는 알파 사슬의 전부 또는 일부 및/또는 베타 사슬의 전부 또는 일부 형태일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR(single-chain TCR)은 TCR β 사슬의 아미노산 서열과 TCR α 사슬의 아미노산 서열이 P2A를 통해 연결되어 형성될 수 있다. 본원의 바람직한 실시예에서 T 세포 항원 수용체 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 TRBV, TRBC, P2A, TRAV 및 TRAC를 포함한다. 본원의 또 다른 바람직한 실시예에서 상기 T 세포 항원 수용체 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 방향으로 RAV, TRAC, P2A, TRBV 및 TRBC를 포함한다.

[0105] 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR 분자의 α 사슬 가변 영역은 CDR1 (서열번호 1), CDR2 (서열번호 2) 및 CDR3 (서열번호 3)을 포함하며; 바람직하게는 상기 단일 사슬 TCR 분자의 α 사슬 가변 영역은 서열번호 7에 나타난 α 사슬 가변 영역을 포함한다. 상기 단일 사슬 TCR 분자의 β 사슬 가변 영역은 CDR1 (서열번호 4), CDR2 (서열번호 5) 및 CDR3 (서열번호 6)을 포함하며; 바람직하게는 상기 단일 사슬 TCR 분자의 β 사슬 가변 영역은 서열번호 8에 나타난 베타 사슬 가변 영역을 포함한다.

[0106] 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR 분자의 알파 사슬 가변 영역은 CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 14) 및 CDR3 (서열번호 15)을 포함하며; 바람직하게는 상기 단일 사슬 TCR 분자의 알파 사슬 가변 영역은 서열번호 19에 나타난 알파 사슬 가변 영역을 포함한다. 상기 단일 사슬 TCR 분자의 베타 사슬 가변 영역은 CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 18)을 포함하며; 바람직하게는 상기 단일 사슬 TCR 분자의 β 사슬 가변 영역은 서열번호 20에 나타난 베타 사슬 가변 영역을 포함한다.

[0107] 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR 분자의 알파 사슬 가변 영역은 CDR1 (서열번호 1), CDR2 (서열번호 2) 및 CDR3 (서열번호 24)을 포함하며; 바람직하게는 상기 단일 사슬 TCR 분자의 알파 사슬 가변 영역은 서열번호 26에 나타난 α 사슬 가변 영역을 포함한다. 상기 단일 사슬 TCR 분자의 베타 사슬 가변 영역은 CDR1 (서열번호 4), CDR2 (서열번호 5) 및 CDR3 (서열번호 25)을 포함하며; 바람직하게는 상기 단일 사슬 TCR 분자의 베타 사슬 가변 영역은 서열번호 27에 나타난 베타 사슬 가변 영역을 포함한다.

[0108] 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR의 아미노산 서열은 서열번호 12로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 단일

사슬 TCR의 아미노산 서열은 서열번호 23로 표시된다. 일부 실시예에서, 상기 단일 사슬 TCR의 아미노산 서열은 서열번호 30으로 표시된다.

- [0109] 상기 자연적으로 존재하는 TCR은 막 단백질(membrane protein)이며, 이는 막 관통(transmembrane) 영역에 의해 안정화된다. 항원 인식 분자로서 면역글로불린과 유사하게, TCR 또한 진단 및 치료적 응용을 위해 개발될 수 있으며, 이 경우 가용성(soluble) TCR 분자가 필요하다.
- [0110] 상기 가용성 TCR 분자(soluble TCR molecules)는 막 관통 영역을 포함하지 않으며, 다양한 용도로 활용될 수 있다. 이들은 TCR과 pMHC의 상호작용에 관한 연구에서 만이 아니라, 감염을 탐지하는 진단용 툴 또는 자가면역질환의 마커로 사용할 수 있다. 또한, 가용성 TCR은 특정 항원을 제시하는 세포로 치료제를 전달하는 데 사용될 수 있으며 (예: 세포독성(cytotoxic) 또는 면역자극성(immunostimulatory) 화합물), 항-CD3 항체와 같은 다른 분자와 결합하여 특정 항원을 제시하는 표적 세포로 T 세포를 유도하는 역할을 할 수도 있다.
- [0111] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 가용성이다.
- [0112] 일부 실시예에서, 상기 TCR은 (a) 막 관통 영역을 제외한 TCR α 사슬의 전부 또는 일부; 및 (b) 막 관통 영역을 제외한 TCR β 사슬의 전부 또는 일부를 포함하고; 상기 (a) 및 (b)는 모두 기능적인 가변 영역을 포함하거나, 기능적인 가변 영역과 적어도 TCR 사슬의 불변 영역 일부를 포함한다.
- [0113] 일부 실시예에서, 상기 가용성 TCR의 알파 및 베타 사슬의 불변 영역 간에 인공적인 이황화 결합들(artificial disulfide bonds)이 존재한다.
- [0114] 상기 가용성 TCR은 본 기술 분야에서 통상적으로 알려진 모든 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 가용성 TCR을 제조할 수 있는 방법의 예로는, 적어도 하나의 인산콜린-특이 항체(phosphorylcholine-specific antibody)에서 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 TCR α 및 β 가변 영역으로 대체하는 다중 수용체 사슬을 구성하는 방법, TCR의 막 관통 영역 상류에 번역 종결 코돈을 도입하는 방법 또는 TCR α 및 β 사슬의 cDNA의 막 관통 영역을 GPI 연결된 단백질 Thy-1의 카르복시 말단에서 유래하는 GPI 연결을 위한 신호로 대체하는 방법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0115] 상기 가용성 TCR은 단독으로 사용되거나, 공유결합(covalent) 또는 비공유결합 방식으로 다른 접합체(conjugate)와 결합될 수 있으며, 바람직하게는 공유결합 방식으로 결합된다. 상기 접합체는 검출 가능한 라벨(detectable label), 치료제(therapeutic agent), PK 조절 모이어티(PK-modifying moiety) 또는 이들 중 하나 이상의 조합 또는 접합체를 포함할 수 있다.
- [0116] 상기 검출 가능한 라벨(detectable labels)은 형광 또는 화학발광 라벨(fluorescent or chemiluminescent labels), 방사성 라벨(radioactive labels), MRI(자기공명영상, magnetic resonance imaging), CT(전자 컴퓨터 X-선 단층 촬영법, electronic computer X-ray tomography technique)의 조영제(contrast medium) 또는 검출 가능한 생성물을 생성할 수 있는 효소(enzymes)를 포함하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0117] TCR과 결합할 수 있는 상기 치료제(therapeutic agent)는 항암 화학요법제(chemotherapeutic agents, 예: 시스플라틴 cisplatin), 전구약물 활성화 효소(prodrug-activating enzymes), 사이토카인(cytokines), 독소(toxins, 예: PE38, 칼시마이신 calcimycin, 디프테리아 독소 diphtheria toxin), 면역조절 항체 단편(immunomodulatory antibody fragments, 예: 항-CD3(anti-CD3), 항-CD16(anti-CD16), Fc 단편(Fc fragments), scFv), 방사성 핵종(radionuclides), 바이러스 입자(viral particles), 리포솜(liposomes), 금 나노입자(gold nanoparticles), 나노자기 입자(nanomagnetic particles) 또는 기타 형태의 나노입자(nanoparticles of any form)를 포함하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0118] 상기 가용성 TCR은 적어도 한 가지 이상의 항바이러스제(anti-viral drug)와 결합될 수 있다. 상기 항바이러스제는 HBV를 표적으로 할 수 있다. 예를 들어, 상기 항바이러스제는 아데포비어 디피복실(adefovir dipivoxil), 인터페론 알파-2b(interferon alfa-2b), 페길화 인터페론 알파-2a(pegylated interferon alfa-2a), 라미부딘(lamivudine), 엔테카비르(entecavir), 텔비부딘(telbivudine) 또는 기타 항바이러스제를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0119] 상기 TCR은 다가 TCR 복합체(multivalent TCR complex) 형태로도 제공될 수 있다. 상기 다가 TCR 복합체는 예를 들어, p53의 테트라머화 도메인을 사용하여 테트라머를 생성하거나, 본원의 하나 이상의 TCR이 다른 분자에 결합하여 형성된 복합체와 같이, 본원의 TCR을 결합하여 형성된 두 개, 세 개, 네 개 이상의 멀티머로 구성된다. 본원의 다가 TCR 복합체는 비다가성(non-multimeric) 야생형 TCR 또는 본원의 T 세포 수용체 이형접

합체(T cell receptor heterodimer)에 비해 FLLTRILTI-HLA-A*02 복합체와의 결합 능력을 증가시킬 수 있다. 따라서, 본원의 다가 TCR 복합체 또한 본원의 범위에 속한다. 본원의 TCR 복합체는 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo)에서 특정 항원을 제시하는 세포를 추적하거나 표적으로 삼는 데 사용될 수 있으며, 이를 활용하여 다른 다가 TCR 복합체를 생성하기 위한 중간체(intermediates)로도 사용될 수 있다.

[0120] 핵산

[0121] 본원은 상기 기술된 TCR 분자 또는 이의 단편(fragments)을 암호화하는 핵산 분자(nucleic acid molecules)를 제공하며, 이는 하나 이상의 CDRs, α 및/또는 β 사슬의 가변 영역(variable region), α 및/또는 β 사슬 전체를 포함할 수 있다.

[0122] 일부 실시예에서, 상기 핵산은 발현된 TCR α 및 β 사슬 간의 결합을 증가시키거나 안정화하는 하나 이상의 구조적 특징(structural features)을 암호화할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 핵산은 특정한 아미노산 또는 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 핵산은 TCR α 및 β 사슬 간의 이황화 결합(disulfide bonds) 형성을 위해 하나 이상의 비자연적 시스테인(unnatural cysteine) 잔기를 암호화할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 핵산은 TCR α 및 β 사슬의 불변 영역(constant domains)에 존재하는 하나 이상의 비자연적 시스테인(non-native cysteine) 잔기를 암호화할 수 있다.

[0123] 본원의 핵산 분자는 단일 가닥(single-stranded) 또는 이중 가닥(double-stranded)일 수 있으며, RNA 또는 DNA 일 수 있고, 인트론을 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다. 그러나, 바람직하게는 상기 핵산 분자는 인트론을 포함하지 않으며, 본원의 TCR 또는 이의 단편을 암호화할 수 있다.

[0124] 상기 TCR 유전자의 발현은 코돈 최적화(codon optimization) 과정을 통해 성공적으로 증가될 수 있다. 다른 생물 종에서는 특정 편향된 코돈(biased codons)이 선호되므로, 세포 유형에 따라 발현량을 증가시키기 위해 서열 내의 코돈을 변경할 수 있다. 포유류 세포를 포함한 다양한 생물체에서의 코돈 사용 표(codon usage table)는 해당 분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다.

[0125] 본원의 상기 TRAV를 암호화하는 염기 서열은 서열번호 33, 서열번호 38 또는 서열번호 43으로 표시될 수 있고/있거나, 상기 TRBV를 암호화하는 염기 서열은 서열번호 34, 서열번호 39 또는 44의 염기서열일 수 있다.

[0126] 본원의 상기 TCR α 사슬을 암호화하는 염기 서열은 서열번호 35, 서열번호 40 또는 서열번호 45로 표시될 수 있고/있거나, 상기 TCR β 사슬을 암호화하는 염기 서열은 서열번호 36, 서열번호 41 또는 서열번호 46으로 표시될 수 있다.

[0127] 일부 실시예에서, TCR의 코딩 서열(coding sequence)은 단일 가닥(single-stranded)일 수 있고, TCR β 사슬의 코딩 서열과 TCR α 사슬의 코딩 서열은 P2A 코딩 서열에 의해 연결될 수 있고, 상기 단일 가닥 코딩 핵산(single-stranded coding nucleic acid)은 동일한 판독 틀(reading frame) 내에 존재할 수 있다. 일부 실시예에서, 단일 가닥 TCR을 암호화하는 염기서열은 서열번호 37, 서열번호 42 또는 서열번호 47로 표시된다.

[0128] 발현 벡터

[0129] 본원은 적어도 하나의 "벡터(vector)"를 제공하며, 이는 외인성 핵산(exogenous nucleic acid)을 세포 내로 전달하는 매개체(DNA 또는 RNA) 역할을 한다. 상기 벡터는 세포 내에서 핵산을 발현할 수 있는 발현 벡터(expression vector)일 수 있다. 이러한 벡터는 발현될 서열을 암호화하는 핵산에 작동적으로 연결된(promoter sequence operably linked) 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 벡터는 종결 코돈(stop codons) 및 발현 증강 인자(expression enhancers)를 포함할 수 있다.

[0130] 일부 실시예에서, 본원은 적어도 하나의 "구성체(construct)"를 제공하며, 이는 본원의 폴리뉴클레오티드가 적어도 하나 이상의 프로모터(promoter)와 작동적으로 연결된 형태를 포함한다. 상기 TCR의 α 및 β 사슬을 암호화하는 서열은 분리된 세포에서 기능하는 적어도 하나의 프로모터와 작동적으로 연결될 수 있다. 적절한 프로모터는 구성적(constitutive) 또는 유도형(inducible) 프로모터일 수 있으며, 해당 분야의 통상의 기술자는 적절한 프로모터를 선택할 수 있다. 예를 들어, 적절한 프로모터는 레트로바이러스 LTR(retroviral LTR), SV40 프로모터(SV40 promoter), CMV 프로모터(CMV promoter) 및 세포성 프로모터(cellular promoters, 예: β -액틴(β -actin) 프로모터)를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0131] 일부 실시예에서, 본원은 상기 구성체(construct) 또는 폴리뉴클레오티드(polynucleotide)를 포함하는 적어도 하나의 벡터(vector)를 제공한다. 특히, 상기 벡터는 플라스미드(plasmids), 이진 벡터(binary vectors), mRNA 벡터(mRNA vectors), 렌티바이러스 벡터(lentiviral vectors), 레트로바이러스 벡터(retroviral vectors), 아

데노바이러스 벡터(adenoviral vectors), 아데노-연관 바이러스 벡터(aden-associated virus vectors) 및 헤르페스 단순 바이러스(HSV, Herpes Simplex Virus) 벡터를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 렌티바이러스 벡터(lentiviral vectors)가 in vitro, ex vivo 또는 in vivo에서 본원의 구성체를 전달하는 데 사용될 수 있으며, 이는 실시예에서 확인할 수 있다.

[0132] 세포

[0133] 본원은 또한 TCR 및/또는 이의 단편(fragments)을 발현하는 분리된 세포(isolated cells)를 포함하며, 이러한 세포는 줄기세포(stem cells) 또는 면역세포(immune cells)일 수 있다. 상기 면역세포는 T 세포(T cells), 자연살해세포(NK cells, natural killer cells), 수지상세포(dendritic cells) 또는 대식세포(macrophages)일 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 면역세포는 T 세포이다. 상기 T 세포는 환자로부터 분리된 T 세포일 수 있고, 말초혈 림프구(PBL, peripheral blood lymphocyte) 집단과 같이 환자로부터 분리된 혼합 세포 집단의 일부 유래 T 세포일 수 있다. 예를 들어, 상기 세포는 말초혈 단핵세포(PBMCs, peripheral blood mononuclear cells)에서 분리된 세포일 수 있고, CD4 도움 T 세포(helper T cells) 또는 CD8 세포독성 T 세포(cytotoxic T cells)일 수 있다. 상기 세포는 CD4/CD8 T 세포의 혼합 집단 유래일 수도 있다. 일반적으로, 상기 세포는 항체(예를 들어, 항-CD3 항체(anti-CD3 antibodies))로 활성화되어 형질도입(transfection)에 대한 효율을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 TCR 분자를 암호화하는 염기 서열을 포함하는 벡터(vector)를 이용해 형질도입할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원의 세포는 줄기세포일 수 있고, 예를 들어, 조혈모세포(hematopoietic stem cells, HSCs)일 수 있다. TCR 유전자를 HSC에 도입하더라도, 줄기세포 표면에는 CD3 분자가 발현되지 않으므로 TCR이 세포 표면에 발현되지 않는다. 그러나, HSC가 림프 전구세포(lymphoid precursors)로 분화하여 흉선(thymus)으로 이동하면, CD3 분자의 발현이 시작되며 TCR 분자의 발현도 유도된다. 본원의 TCR 또는 이의 단편(fragment)을 발현하는 세포는 채택 면역 요법(adoptive transfer protocols)에 적합할 수 있으며, 이를 통해 효과적인 치료법을 제공할 수 있다. 본원의 세포는 HBV 특이적 CD8 및 CD4 T 세포가 결핍되거나 기능이 저하된 환자의 문제를 극복할 수 있다.

[0134] 본원의 TCR 또는 이의 단편(fragments)을 암호화하는 DNA 또는 RNA를 T 세포에 형질도입(transfection)하기 위한 다양한 방법이 존재한다 (예: Robbins et al. (2008) J. Immunol. 180:6116-6131). 폴리뉴클레오티드(polynucleotide) 또는 벡터(vector)를 세포에 도입하는 방법은 해당 분야에서 널리 알려져 있다. 벡터는 포유류(mammalian), 박테리아(bacterial), 효모(yeast), 곤충(insect) 세포 등 다양한 숙주 세포(host cells)에 도입될 수 있으며, 해당 기술 또한 일반적으로 잘 알려져 있다. 예를 들어, 발현 벡터(expression vector)는 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법을 통해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0135] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 물리적 방법은 칼슘 인산염 침전법(calcium phosphate precipitation), 리포펙션(lipofection), 입자 폭격법(particle bombardment), 미세주입법(microinjection) 및 전기 천공법(electroporation) 등을 포함한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터를 사용하는 것을 포함한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 화학적 방법은 고분자 복합체(macromolecular complexes), 나노캡슐(nanocapsules), 마이크로스피어(microspheres) 등의 콜로이드 분산 시스템(colloidal dispersion systems)과, 유수(油水) 에멀전(oil-in-water emulsions), 미셀(micelles), 혼합 미셀(mixed micelles), 리포솜(liposomes) 등의 지질 기반 시스템(lipid-based systems)을 포함한다.

[0136] 본원은 또한 TCR, 단편(fragment) 또는 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공하며, 이는 본 발명의 벡터를 세포에 도입하고, 벡터가 세포에 의해 발현될 수 있는 적절한 조건에서 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0137] 폴리펩티드를 발현하기에 적합한 모든 세포는 본 발명에 따른 TCR, 단편 및 폴리펩티드를 생산하는 데 사용될 수 있다. 상기 세포는 원핵생물(prokaryote) 또는 진핵생물(eukaryote)일 수 있다. 바람직한 원핵생물 세포에는 대장균(E. coli)이 포함된다. 바람직한 진핵생물 세포의 예로는 효모 세포(yeast cell), 식물 세포(plant cell), 곤충 세포(insect cell) 또는 포유류 세포(mammalian cell) 등이 포함된다. 일부 경우, 원핵생물 세포는 진핵생물에서 수행되는 동일한 번역 후 변형(post-translational modifications)과정이 존재하지 않으므로 사용되지 않을 수 있다. 또한, 진핵생물에서는 매우 높은 수준의 발현이 가능하며, 적절한 태그(tags)를 사용하여 단백질을 쉽게 정제할 수 있다. 특정 플라스미드는 TCR, 단편 또는 폴리펩티드의 분비를 증가시키는 데 사용할 수도 있다.

[0138] 조성물

[0139] 본원은 또한 본 발명에 따른 TCR, 단편(fragment), 핵산, 벡터, 폴리펩티드(polypeptide) 또는 세포를 포함하는

조성물(compositions)을 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 조성물은 약학적 조성물이다. 일부 실시예에서, 상기 조성물은 연구, 치료, 예방 및/또는 진단에 적합한 조성물이다.

[0140] 일부 실시예에서, 본 발명에 따른 TCR, 단편, 핵산, 벡터, 폴리펩티드 또는 세포는 약제(medicament) 또는 의약품(pharmaceutical)으로 제형화될 수 있으며, 이는 해당 분야에서 널리 알려진 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 성분(pharmaceutically acceptable ingredients)과 함께 포함될 수 있다. 상기 성분은 약제학적으로 허용 가능한 담체(carriers), 보조제(adjuvants), 부형제(excipients), 희석제(diluents), 충전제(fillers), 완충제(buffers), 보존제(preservatives), 항산화제(anti-oxidants), 윤활제(lubricants), 안정제(stabilizers), 용해제(solubilizers), 계면활성제(surfactants, 예: 가습제(wetting agents)), 은폐제(masking agents), 착색제(colouring agents), 향미제(flavouring agents) 및 감미제(sweetening agents)를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용 가능(pharmaceutically acceptable)"이란, 해당 물질(화합물, 성분, 원료, 조성물, 제형 등)이 의료적 판단에 따라, 인체 등의 대상 조직과 접촉할 경우 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증 없이 합리적인 범위 내에서 사용이 적절함을 의미한다. 또한, 각 담체(carrier), 보조제(adjutant), 부형제(excipient) 등은 반드시 다른 성분들과의 호환성이 유지될 수 있도록 "허용 가능(acceptable)"해야 한다. 적절한 담체(carriers), 보조제(adjuvants), 부형제(excipients) 등은 "Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990" 및 "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994" 등과 같은 표준적인 약제학 서적에서 찾을 수 있다.

[0141] **의약 용도**

[0142] 또 다른 양상에서, 상기 TCR 또는 이의 단편(fragments), 핵산(nucleic acid), 벡터(vector), 폴리펩티드(polypeptide), 세포(cell) 또는 본원 약제학적 조성물(pharmaceutical composition)을 질병 또는 장애의 치료 및 예방을 위한 약제(medicament) 제조에 사용하는 용도가 제공된다.

[0143] 일부 실시예에서, 본원의 TCR 또는 단편, 핵산, 벡터, 폴리펩티드, 세포 또는 약학적 조성물은 HBV 감염에 의해 유발되는 질병들을 예방하거나 치료하는 데 사용될 수 있다. 상기 HBV 감염에 의해 유발되는 질병들은 급성 간염(acute hepatitis, 전격성 간부전(fulminant liver failure) 포함), 만성 간염(chronic hepatitis), 간 섬유화(liver fibrosis), 간경변(liver cirrhosis), 간세포암(HCC, hepatocellular carcinoma)과 같은 간암(liver cancer) 또는 췌장암(pancreatic cancer)을 포함한다.

[0144] **치료 및 예방 방법**

[0145] HBV 감염으로 인한 질병을 앓고 있는 환자 또는 건강한 기증자로부터 T 세포를 분리한 후, 본원의 TCR을 해당 T 세포에 도입한 뒤, 이를 환자에게 재주입(infusion)하여 치료 또는 예방이 수행될 수 있다. 따라서, 본원은 HBV 감염으로 인한 질병을 치료하는 방법으로서 본원의 TCR을 발현하는 분리된 T 세포를 환자에게 주입하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 T 세포는 환자 자신으로부터 유래된 세포이다. 일반적으로, 상기 방법은 (1) 환자로부터 T 세포를 분리하는 단계, (2) 시험관 내에서 상기 TCR 분자를 암호화하는 핵산 또는 벡터를 사용하여 T 세포에 형질전달(transduction)하는 단계, 및 (3) 유전자 변형된 T 세포를 환자의 생체 내로 주입하는 단계. 분리된 세포의 수, 형질도입된 세포의 수 및 재주입된 세포의 수는 의사가 결정할 수 있다.

발명의 효과

[0146] 본원은 HBV 표면 항원을 표적하는 새로운 특이적 TCR 또는 이의 단편(fragment)을 제공한다. 본원의 TCR은 HBV 표면 항원 S20-28의 네 가지 유전자형(A, B, C, D)을 표적하고 인식할 수 있다. 본원의 TCR은 HBV가 우세한 곳에서 가장 일반적인 HLA 대립유전자의 아형(subtype)을 인식할 수 있다. 따라서, 상기 TCR은 더 광범위한 적용 대상을 가질 수 있다. 본원의 TCR-T 세포는 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 매우 강력한 항바이러스 능력을 가지며, HBV 감염 세포를 특이적으로 표적하여 제거할 수 있다. 따라서, 상기 TCR은 간염, 간섬유화, 간경변, 간암을 포함하는 HBV 감염 및 관련 질환 치료에 사용될 수 있으며, 오프 타겟 부작용(off-target side-effects) 없이 적용 가능하다.

[0147] 한편, 본원은 시스테인을 이용하여 사슬 간에 이황화 결합을 도입함으로써, 유전자가 도입된 TCR/이형접합체의 안정성을 향상시키고, 내인성 TCR 사슬과의 오결합(mispairing)을 줄이는 방법을 적용하였다. 더불어, 본원은 TCR 발현 코돈을 최적화하여, TCR의 발현 효율을 향상시켰다.

도면의 간단한 설명

- [0148] 도 1은 단일 사슬 HBV S20 TCR의 개략적인 구조를 나타낸 도이다.
 도 2는 HBV S20 TCR-T의 발현 구조 및 작용 기전을 나타낸 도이다.
 도 3은 A01/B01/C01 TCR 렌티바이러스의 역가(titer)를 나타낸 도이다.
 도 4는 A01/B01/C01 TCR 렌티바이러스로 감염된 활성화된 T 세포의 MOI 검출 결과를 나타낸 도이다.
 도 5는 A01/B01/C01 TCR-T의 TCR 발현 정도를 나타낸 도이다.
 도 6는 HepG2-LMS-LG 세포에서의 S20-HLA02의 발현 수준을 나타낸 도이다.
 도 7은 HepG2-LMS-LG 세포에서의 서로 다른 효과 세포 대 표적 세포(E:T) 비율에 따른 A01 TCR-T의 세포독성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 8은 HepG2-LMS-LG 세포에서의 서로 다른 효과 세포 대 표적 세포(E:T) 비율에 따른 B01 TCR-T의 세포독성을 확인한 결과 및 사이토카인 프로파일 나타낸 도이다.
 도 9는 HepG2-LMS-LG 세포에서의 서로 다른 효과 세포 대 표적 세포(E:T) 비율에 따른 C01 TCR-T의 세포독성을 확인한 결과 및 사이토카인 프로파일 나타낸 도이다.
 도 10은 HepG2-LMS-LG 세포에서 A01/B01/C01 TCR-T의 세포독성을 비교한 결과를 나타낸 도이다.
 도 11은 표적 세포에서 서로 다른 HBV S20 TCR-T 하위 집단의 기능적 분석 결과를 나타낸 도이다.
 도 12는 A01/B01/C01 TCR-T에 의해 인식되는 S20 폴리펩티드의 주요 아미노산을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
 도 13은 A01/B01/C01 TCR-T의 인간 펩타이드 데이터베이스에 대한 교차 반응성 분석 결과를 나타낸 도이다.
 도 14는 A01/B01/C01 TCR-T의 다양한 유전자형 S20과의 결합 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.
 도 15는 A01/B01/C01 TCR-T가 다양한 HLA-A02의 아형을 인식하는 능력을 평가한 결과를 나타낸 도이다.
 도 16은 HepG2-LMS-LG CDX 이중 이식 모델에서 A01 TCR-T의 항종양 활성을 나타낸 도이다.
 도 17은 HepG2-LMS-LG CDX 이중 이식 모델에서 B01 TCR-T의 항종양 활성을 나타낸 도이다.
 도 18은 HepG2-LMS-LG CDX 이중 이식 모델에서 C01 TCR-T의 항종양 활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0149] 본 명세서의 기술적 해결 방안은 특정 실시예(specific embodiments)를 참조하여 명확하고 완전하게 설명된다. 명백히, 설명된 실시예들은 본 명세서의 일부 실시예에 해당하며, 모든 실시예를 포함하는 것은 아니다. 본 명세서의 실시예를 기반으로, 해당 분야의 숙련된 기술자가 창의적인 작업 없이 구현할 수 있는 모든 다른 실시예들은 본 명세서의 권리 범위에 포함된다. 이하 실시예의 기술 순서는, 특정 실시예의 우선순위를 제한하려는 의도가 아니다.

[0150] **실시예**

[0151] **실시예 1. HBV S20 TCR의 표적 유전자 획득 및 벡터 제작**

[0152] HBV 감염자(HLA-A2⁺)의 혈액으로부터 말초혈액단핵세포(PBMCs)를 분리하여 1 nM의 S20 폴리펩티드(FLLTRILT1)와 T2 세포(American typical Species collection)를 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 이후, 1 x 10⁶ 개의 말초혈액단핵세포를 1 x 10⁵ 개의 T2 세포와 함께 10 ng/mL IL-7 (Peprotech, Hamburg, Germany)과 IL-15 (Peprotech, Hamburg, Germany) 및 aldesleukin (Novartis Pharmaceuticals)이 최종 농도 50 U/mL로 추가된 배지에서 14일동안 배양하였다.

[0153] T 세포는 HLA-A02-S20 다중체(multimers)로 염색하였고, HLA-A02-S20 다중체에 결합된 CD8⁺ T 세포를 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하여 분리 및 정제하였다. 이후, T 세포는 S20 에피토프 특이 클론으로 추가 선별하였다. S20 에피토프 특이 클론에서 RNA를 추출하여 TCR의 α 및 β 사슬의 서열을 획득하고, HBV S20 특이적 TCR 라이브러리를 제작하였다. 세 개의 클론(A01/B01/C01)은 높은 친화성을 가져 가변 영역에서 추가적인 친화적 성숙(affinity maturation)과정이 필요하지 않았다. CDR1, CDR2, CDR3, TCR α 가변 영역 및 TCRβ 가변 영역의 아

미노산 서열은 하기 표 1에서 확인할 수 있다.

표 1

[0154]

TCR 단편	A01	B01	C01
α CDR1	서열번호1	서열번호13	서열번호1
α CDR2	서열번호2	서열번호14	서열번호2
α CDR3	서열번호3	서열번호15	서열번호24
β CDR1	서열번호4	서열번호16	서열번호4
β CDR2	서열번호5	서열번호17	서열번호5
β CDR3	서열번호6	서열번호18	서열번호25
TCR α 가변 region	서열번호7	서열번호19	서열번호26
TCR β 가변 region	서열번호8	서열번호20	서열번호27

[0155]

또한, TCR 불변 영역(TCR constant region)에 최소 하나 이상의 추가적인 이황화 결합(disulfide bond)을 도입하여 안정성을 향상시키고, 내인성(internal) 및 외인성(external) TCR 사슬 간의 불일치를 줄였다. 한편, TCR 유전자의 발현은 코돈 최적화(codon optimization)를 통해 성공적으로 향상될 수 있다. 수정된 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 아미노산 서열, 그리고 A01, B01, C01의 수정된 TCR α 가변 영역(variable region), TCR β 가변 영역, TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 암호화하는 서열은 표 2에 나타난 것과 같다. TCR α 및 β 사슬은 P2A 자가 절단 펩타이드(self-cleaving peptide)를 통해 연결되어, 각 형질도입(transduction)된 세포가 동일한 수준의 α 및 β 사슬을 발현하도록 하였다. A01, B01 및 C01의 단일 사슬 TCR 분자의 아미노산 서열은 각각 서열번호 12, 서열번호 23 및 서열번호 30 나타난 것과 같고, 이를 암호화하는 서열은 각각 서열번호 37, 서열번호 42 및 서열번호 47에 나타난 것과 같다.

표 2

[0156]

TCR	A01	B01	C01
TCR α	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:28
TCR β	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:29
TCR 단일 사슬	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:30
TCR V α 암호화 서열	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:43
TCR V β 암호화 서열	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:44
TCR α 사슬 암호화 서열	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:45
TCR β 사슬 암호화 서열	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:46
단일 사슬 TCR 암호화 서열	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:47

[0157]

pCDH 플라스미드에 표적 유전자 클로닝 TCR 유전자의 발현 효율을 향상시키기 위해 적절한 벡터 플라스미드를 선택하는 것은 매우 중요하다. 본 발명자들은 공개된 pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP 플라스미드의 원래 서열을 기반으로 하여, 암피실린 내성 유전자(ampicillin resistance gene)를 카나마이신 내성 유전자(kanamycin resistance gene)로 대체하여 전체 플라스미드 유전자를 합성하였다. 사용한 플라스미드의 제한 효소 위치는 표 3에 나타난 것과 같다.

표 3

[0158]

제한 효소 위치	제한 효소	인식 위치
3,090	NheI	GCTAGC
3,096	EcoRI	GAATTC
4,920	SalI	GTCGAC
5,521	KpnI	GGTACC

[0159]

이후, 표적 유전자의 양 끝에 EcoRI 및 SalI 제한 효소 자리(restriction sites)를 도입하기 위해 표적 유전자의 양 끝을 대상으로 프라이머를 설계하였다. 표적 유전자(A01/B01/C01 단일 가닥 TCR 코딩 서열)의 PCR 증폭을

수행하여 약 1800bp 길이의 증폭산물을 획득하였다. 이후, 전기영동(electrophoresis)을 통해 표적 유전자의 밴드를 정제한 후, EcoRI 및 SalI로 이중 처리되어 선형화(linearized)된 pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP 플라스미드에 연결하였다. 상기 연결된 플라스미드를 Stb13 형질전환이 가능한 세포에 형질전환하고 단일 클론을 선별하여 배양하였다. 추출된 표적 플라스미드는 이중 효소 절단, 전기영동 및 염기서열 분석을 수행하여 확인하였다. 제작된 표적 구성체(target construct)는 표 4에 나타난 것과 같이 5'LTR, HIV-1 Ψ, RRE, cPPT/CTS, EF-1α core promoter, WPRE, 3'LTR-SIN 및 기타 주요 기능적 요소들을 포함한다.

표 4

NO.	기능적 요소	위치
1	5'LTR	837...1,017
2	HIV-1 Ψ	1,064...1,189
3	RRE	1,682...1,915
4	cPPT/CTS	2,411...2,527
5	EF-1α core promoter	2,570...2,781
6	WPRE	4,926...5,514
7	3'LTR	5,588...5,821

[0160]

실시예 2. 렌티바이러스 포장 A01/B01/C01 TCR-T 세포에서 사용된 렌티바이러스 벡터는 HIV-1에서 유래한 3세대 "자가 불활성화(SIN, Self-inactivating)" 렌티바이러스 벡터로, VSV-G 가상 외피(pseudo envelope)를 가진 형태였다. 이 벡터에는 HBsAg(간염 B 바이러스 표면 항원) 특이적 T 세포 수용체(HBsAg TCRs)를 암호화하는 핵산이 삽입되어 있었다. 상기 렌티바이러스 벡터는 감염 능력만 가지고 있으며, 복제 능력은 없었다. 바이러스 입자의 직경은 약 80~120 nm였으며, 형태는 대략 구형 또는 이십면체 대칭 구조(icosahedral symmetrical structure)였다. 바이러스의 외막(outer membrane)은 VSV-G 외피 단백질이 포함된 지질막(lipid-like envelope)으로 구성되어 있었다. 내부로는 p17 단백질로 형성된 구형 매트릭스(Matrix)와 p24 단백질로 구성된 반원뿔 모양의 캡시드가 존재하였다. 캡시드 내부에는 TCR을 암호화하는 RNA 핵산 정보가 포함되어 있었다.

[0161]

3세대 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터의 각 구성 요소 기능은 하기와 같다:

[0162]

- Δ5'LTR 및 Δ3'LTR (절단/재조합된 긴 말단 반복 서열, Long Terminal Repeats): TCR 유전자의 양쪽 끝에는 Δ5'LTR(절단된 5'LTR)과 Δ3'LTR(절단된 3'LTR)이 존재함. Δ5'LTR에서 U3 영역이 제거되고, RSV의 인핸서 및 프로모터로 대체됨. Δ3'LTR에서 U3 영역이 제거되면서 증폭 및 전사 촉진 기능이 사라져 자가 불활성화 벡터가 됨. 벡터의 복제가 "tat" 단백질에 의존하지 않도록 설계됨.

[0163]

- RRE (Rev 응답 요소, Rev-Responsive Element): Rev 단백질의 "cis-작용 요소(cis-acting element)"로, 미성숙한, 즉 스플라이싱 되지 않은 mRNA 분자를 핵에서 세포질로 이동시키는 역할을 함.

[0164]

- cPPT (중간 폴리푸린 트랙, Central Polypurine Tract): 벡터의 형질도입(transduction) 효율을 개선하는 기능을 함.

[0165]

- EF-1α 프로모터: 유전자 발현의 시작 시점과 발현 강도를 조절함.

[0166]

- WPRE (우드척 간염 바이러스 후성서열, Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element): 전사(polyadenylation)를 증가시켜 전사체의 핵 내 수송을 촉진하고, 표적 유전자의 발현 효율을 개선함.

[0167]

렌티바이러스 벡터는 3세대 4-플라스미드 시스템(four-plasmid system)을 이용하여 293T 세포에 일시적 형질도입(transient transfection)하여 제작되었다. 상기 시스템은 3개의 헬퍼 플라스미드(helper plasmids)와 1개의 셔틀 플라스미드(shuttle plasmid)로 구성된다.

[0168]

상기 헬퍼 플라스미드 pGagPol-KanR은 바이러스 구조 단백질 Gag과 역전사효소 Pol을 암호화하며, 전자는 바이러스의 핵심 구조를 형성하고, 후자는 RNA의 역전사 및 삽입에 필요하다.

[0169]

플라스미드 pRev-KanR은 Rev 단백질을 암호화하며, 이는 RNA에 결합하여 mRNA 수송과 단백질 발현을 촉진한다.

[0170]

플라스미드 pVSV-G-KanR은 vesicular stomatitis virus 외피 단백질 VSV-G를 암호화하며, 이는 HIV 바이러스 외피 단백질을 대체하여 렌티바이러스 벡터가 거의 모든 조직 내 세포를 감염시킬 수 있도록 하고 렌티바이러스

[0171]

입자의 안정성을 향상시킨다.

[0172] **D10 세포 완전 배지 준비:** DMEM, 10% FBS(v/v), 1% Sodium Pyruvate를 혼합하여 4℃ 냉장고에 보관함.

[0173] **Day 0:** 사용된 293T 세포는 20세대 미만이며, 배양 접시에 세포의 밀도를 과하게 채우지 않았다. 2×10^7 개의 세포를 150 mm 접시에 배치하고, 20 mL D10 배지를 추가하여 충분히 혼합한 후 37℃에서 하룻밤 동안 배양하였다.

[0174] **Day 1:** 293T 세포가 60 ~ 80 %의 밀도에 도달했을 때 형질도입(transfection)을 수행하였으며, 세포를 접종한 후 형질도입까지의 시간은 24시간을 초과하지 않았다.

[0175] 렌티바이러스 패키징을 위한 플라스미드 복합체는 표 5에 나타난 것과 같다.

표 5

shuttle plasmid	RRE	REV	VSVG	PEIpro	OptiMEM
18 μ g	10 μ g	7 μ g	7 μ g	μ l	1 mL+1 mL

[0177] 플라스미드를 볼텍싱(vortexing)하면서 PEIpro를 한 방울씩 첨가하였고, 이후 실온에서 15분 동안 안정화하여 플라스미드-PEI 복합체(plasmid-PEI complex)를 형성하였다. 상기 복합체를 293T 세포가 담긴 150 mm 배양 접시에 천천히 추가하여 충분히 혼합한 후, 37℃의 이산화탄소 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. **Day 1:** 6시간 후, 293T 세포의 형질도입 배지를 제거하고 완전 D10 배지로 교체하였다.

[0178] **Day 3:** 형질도입 48시간 후 바이러스 상층액을 수집하고, 4℃의 냉장고에 일시적으로 보관한 후, 20 mL의 D10 배지를 추가하였다.

[0179] **Day 4:** 형질도입 72시간 후 바이러스 상층액을 수집하고, 48시간 상층액과 혼합한 후 4℃에서 3000 g으로 10분간 원심분리하고, 0.45 μ m의 필터를 사용하여 잔여물을 제거한 후 상층액을 보관하였다. 바이러스 농축을 위해 100K의 초여과 컵(ultrafiltration cups)을 사용하였다.

[0180] 바이러스 농축 후, 4℃에서 3000 g으로 원심분리하여 원하는 농도의 바이러스 용액을 얻었다. 원심분리 장치로부터 필터 컵을 여과액 수집 컵에서 분리한 후, 필터 컵을 거꾸로 뒤집어 샘플 수집 컵에 배치하였다. 이후, 4℃에서 1000 g으로 2분간 원심분리하여 샘플 수집 컵에서 바이러스 농축액을 수집하고, 소분하여 -70°C 이하에서 보관하였다.

[0181] **바이러스 용액 역가 검출**

[0182] 1×10^5 cells/hole의 Jurkat 세포를 24웰 플레이트에 접종하였다. 일정량의 바이러스 농축액을 단계적으로 희석하여 Jurkat 세포에 첨가하였다. 72시간 동안 배양한 후, 바이러스 역가는 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 검출되었다.

[0183] **바이러스 역가 검출**

[0184] **유세포 분석 완충액 준비:** DPBS, 2 %의 FBS를 혼합하여 4℃에서 보관 후 사용하였다. 각 그룹의 1×10^6 Jurkat 세포를 400 g으로 5분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 유세포 분석 완충액으로 두 번 세척하였다.

[0185] **PE Dextramer HBV-S20 세포 염색:** Flow buffer에 1:100 비율로 희석한 후, 100 μ l의 항체 희석액을 각 샘플에 첨가하였다. 4℃에서 30분 동안 암조건에서 배양한 후, flow buffer를 이용하여 세포를 세척하였다. 이후, 400 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, 상기 과정을 두 번 반복하였다.

[0186] 100 μ l의 유세포 분석 완충액으로 세포를 현탁한 후, 유세포 분석기를 이용하여 검출하였으며, 벡터 감염 역가(TU/mL)는 하기 수학적 식 1로 계산하였다:

[0187] [수학적 식 1]

[0188] Vector infection titer (TU/mL) = 웰당 세포 수 X 양성률(%) X 희석 배수 / 적정된 부피(mL)

[0189] 확인 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, A01, B01, C01 TCR의 렌티바이러스 역가는 모두 1×10^8 TU/mL 이상이었으

며, 이는 세 가지 HBV S20 TCR이 모두 높은 역가의 바이러스를 성공적으로 패키징할 수 있음을 의미한다.

- [0190] **실시예 3. HBV S20 TCR-T의 제조**
- [0191] T 세포 배양 배지 준비: PRIME-XV-T cell CDM, 400 IU/mL IL-2.
- [0192] T 세포 동결 보존액 준비: 75 % CS10 + 25 % HSA.
- [0193] T 세포 배양 및 감염 과정
- [0194] Day 0: 아페레시스(apheresis)로부터 순수한 CD3 T 세포를 분리하고 T 세포 배지를 이용하여 세포 농도를 1×10^6 cells/mL로 조정하였다. Transact(CD3/CD28 마이크로스피어) 활성제를 세포 현탁액과 1:30 비율로 혼합하여 충분히 섞은 후, 최종 농도 400 IU/mL의 인터루킨-2(IL-2)를 첨가하여 바이러스 감염 24시간 전까지 세포를 자극하였다.
- [0195] Day 1: T 세포의 농도를 5×10^5 cells/mL로 조정하고 바이러스 용액을 첨가하였다.
- [0196] Day 2 - 11: 바이러스 감염 후, 매일 세포 상태를 관찰하였으며, T 세포 배양 배지(400 IU/mL IL-2 포함)를 적절한 시기에 추가하여 T 세포의 밀도를 5×10^5 cells/mL로 유지하며 세포를 확장시켰다.
- [0197] Day 12: 세포를 300 g에서 5분간 원심분리하여 수확한 후, 5 %의 인간 혈청 알부민(human serum albumin)을 포함한 생리식염수로 세척하여 T 세포 전용 동결 보존액을 사용하여 적절한 밀도로 동결시켰다. 프로그램 냉각기(programmed cooler)를 이용하여 동결시켰으며, 액체 질소(liquid nitrogen)에 보관하였다.
- [0198] **실시예 4. S20 TCR-T의 MOI 검출 및 TCR 특이적 발현 확인**
- [0199] **실시예 4.1. HBV S20 TCR MOI 검출**
- [0200] Flow buffer (FACS buffer): DPBS, 2% FBS (v/v)를 혼합한 뒤, 4°C에서 보관 후 사용하였다.
- [0201] A01, B01, C01 렌티바이러스(lenti-virus)로 감염된 TCR-T 세포 및 NT 세포(대조군)를 수확하여 FACS buffer로 세척한 후, PE Dextramer HBV-S20으로 염색하고 4°C의 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, FACS 버퍼로 세척 후 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다.
- [0202] 확인 결과, 도 4에 나타난 것과 같이, A01, B01, C01 TCR-T의 발현 수준이 서로 일관되게 나타났다. 각 그룹에서 MOI_{HBV S20 TCR} = 1.2일 때, TCR-T 양성 비율이 60 % 이상이었으며, 이는 세 가지 S20 TCR 클론이 MOI 농도 구배 감염에 의해 TCR-T 세포에서 안정적으로 발현됨을 의미한다.
- [0203] **실시예 4.2. HBV S20 TCR-T의 특이적 발현 검출**
- [0204] 각 그룹(A01 TCR-T, B01 TCR-T, C01 TCR-T)에서 준비된 TCR-T 세포 및 NT 세포(대조군)를 수확하여 FACS buffer로 세척한 후, PE Dextramer HBV-S20 및 APC TCR v β 5.1으로 염색하고 4°C의 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, FACS buffer로 세척 후 유세포 분석(flow cytometry) 수행하였다.
- [0205] 확인 결과, 도 5에 나타난 것과 같이, A01, B01, C01 TCR-T 모두 오결합(mispairing) 비율이 낮았으며, 특이적 발현률이 50 % 이상에 도달한 것을 확인할 수 있었다. 이는 세 가지 HBV S20 TCR-T 클론이 낮은 오결합 비율로 특이적으로 발현될 수 있음을 의미한다.
- [0206] **실시예 5. S20 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 세포에 대한 세포 용해(cytolysis) 및 사이토카인 분석(cytokine analysis)**
- [0207] M10 완전 배지(M10 complete medium)는 DMEM, 10 % FBS (v/v), 1 % Sodium Pyruvate, 1 % HEPES, 1 % NEAA를 혼합하여 준비하였으며, 4°C에서 보관 후 사용하였다.
- [0208] **실시예 5.1. HepG2-LMS-LG 표적 세포(target cells) 준비**
- [0209] HLA-A02 아형(subtype)의 HepG2 세포 3개 웰을 콜라겐이 프리코팅 된(collagen precoated) 24-웰 플레이트에 1×10^5 cells/well로 시딩하였다. 이후, HBsAg(full-length HBsAg protein, FLLTRILTI 서열 포함)을 암호화하는 LMS-LG 렌티바이러스 벡터(luciferase 및 GFP 단백질을 포함)를 사용하여, 25 μ l, 5 μ l, 1 μ l의 LMS-LG 렌티바이러스 벡터를 각각 첨가하여 표적 HepG2-LMS-LG 세포를 제작하였다. 세포 밀집도가 90 %에 도달하면, 세포를 모두 6-웰 플레이트로 옮겨 증식시켰으며, 이후 세포 밀집도가 다시 90 %에 도달하면, 유세포 분석을 수행하였

다. 유세포 분석 결과 GFP 양성률이 95 % 이상인 세포를 선별하여 증식 배양하였으며, 표적 세포 은행을 확립하였다.

[0210] 확인 결과, 도 6에 나타난 것과 같이, 표적 세포에서 HepG2-LMS-LG의 양성률(positive rate)이 99 % 이상이었으며, 발현이 균일하게 나타났다. 이는 표적 세포가 성공적으로 제작되었음을 의미한다.

[0211] **실시예 5.2. A01 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 표적 세포 제거능 확인**

[0212] **Day 0:** HepG2-LMS-LG 세포를 콜라겐이 프리코팅 된(collagen pre-coated) 96-웰 플레이트에 1×10^4 cells/well, 100 μ l/well의 농도로 접종하였다. 각 웰에 A01 TCR-T 세포 100 μ l를 추가하여, 각각 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8의 비율(E:T, effector to target)이 되도록 조정하였다. 이후, A01 TCR-T 세포가 포함된 웰에 배양 배지 100 μ l 추가하였으며, 37°C에서 24시간 배양(culturing)하였다.

[0213] **Day 1:** 각 웰에 ONE-Glo™ Luciferase Assay System 50 μ l를 추가하고 충분히 혼합하였으며, 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 측정하였다. 제거 효율(Killing efficiency)은 하기 수학적 식 2와 같이 계산하였다:

[0214] [수학적 식 2]

[0215]
$$\text{Killing efficiency (\%)} = (1 - (\text{효과 세포 및 표적 세포의 평균값} / \text{표적 세포의 평균값})) \times 100\%$$

[0216] 확인 결과, 도 7에 나타난 것과 같이, E:T 비율이 8:1 및 4:1일 때, A01 TCR-T의 표적 세포 제거 효율이 80 % 이상에 도달하였으며, E:T 비율이 감소함에 따라 제거 효율도 감소하였다. 그러나, E:T 비율이 1:4까지 감소하더라도 여전히 제거 효과는 확인할 수 있었다. 한편, 음성 대조군(negative control)으로서 HepG2 vs A01 TCR-T 및 UT vs HepG2-LMS-LG 실험에서는 제거 기능이 관찰되지 않았다. 이 결과는 A01 TCR-T가 HBsAg 양성 표적 세포를 특이적으로 제거할 수 있음을 의미한다.

[0217] **실시예 5.3. B01/C01 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 표적 세포 제거능 확인**

[0218] **Day 0:** HepG2-LMS-LG 세포를 소화(digestion)한 후, 세포 밀도를 4×10^5 /mL로 조정하였다. 콜라겐 프리코팅 된(collagen pre-coated) 96-웰 플레이트의 각 웰에 M10 배지 50 μ l를 추가하여, RTCA 장비의 기준선(baseline)을 설정하였다. 이후, 각 웰에 세포(4×10^5 /mL) 50 μ l를 추가하였다. 약 5분 동안 안정화(resting)한 후, 16시간 동안 연속적으로 성장 곡선(growth curve)을 측정하였다.

[0219] **Day 1:** B01/C01 TCR-T 세포의 TCR 양성률(TCR positive rate) 및 세포 생존율(cell viability rate)을 분석하였다. B01/C01 TCR-T 세포를 각각 8×10^5 /mL, 2.0×10^5 /mL, 0.5×10^5 /mL의 밀도로 준비한 후, 각 웰에 50 μ l의 효과 세포(effector cells)를 추가하여 효과 세포 대 표적 세포 비율(E:T ratio) 2:1, 1:2, 1:8로 설정하였다. 이후, 제거 곡선(killing curve)을 지속적으로 모니터링하였다.

[0220] **Day 3:** 72시간 후, RTCA 모니터링을 종료하고 데이터 복사 및 제거 곡선 피팅(killing curve fitting)을 수행하였으며, 공배양(co-culture) 후 상층액(supernatant)을 수집하여 사이토카인(cytokine) 분석을 진행하였다.

[0221] 사이토카인 분석 절차는 하기와 같다:

[0222] - CBA 키트 (Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array Kit II, BD, 551809)를 실온에 보관한다.

[0223] - 2 mL의 Assay Diluent를 사용하여 표준 물질(standard substances)을 5000 pg/mL 농도로 용해, 실온에서 30분간 보관한다.

[0224] - 위에서 준비한 표준 용액을 S1으로 지정하고, S2-S9는 2배 희석(dilution)하여 단계적으로 준비하며, S10은 블랭크(blank)로 설정하여 표준 시료를 준비한다.

[0225] - Human Th1/Th2 Cytokine Capture Beads 혼합물은 A1-A6 마이크로스피어 용액을 1:1:1:1:1:1 비율로 균일하게 혼합하여 제조한다.

[0226] - 96-웰 U형 바닥 플레이트(U-shaped bottom plate)에 Human Th1/Th2 Cytokine Capture Beads 혼합물 50 μ l를 추가하고 Human Th1/Th2 PE Detection Reagent 50 μ l를 추가한다.

[0227] - 각 검출 웰(detection well)에 400 g으로 5분 간 원심분리 한 후 상층액 50 μ l 또는 표준 시료(S10-S1) 50 μ l를 추가한다.

[0228] - 암실에서 실온에서 180분 동안 반응 후, 100 μ l의 세척 버퍼(wash buffer) 추가한 뒤, 300 g에서 5분간 원심

분리 후 상층액을 제거한다.

- [0229] - 100 μ l FACS buffer로 재현탁(resuspend) 후, 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 샘플을 검출 및 결과 분석한다.
- [0230] 확인 결과, 도 9a 및 도9b 에서 나타난 것과 같이, B01 TCR-T와 48시간 동안 공배양한 후, E:T 비율 2:1, 1:2, 1:8에서 모든 제거 비율이 60% 이상에 도달하였으며, UT는 표적 세포에 대해 명확한 기능을 나타내지 않았다. B01 TCR-T 처리군에서의 IFN- γ 분비는 뚜렷했으며, UT 그룹에서는 미미했다(도 9c).
- [0231] 또한, C01 TCR-T와 48시간 동안 공배양한 후, E:T 비율 2:1, 1:2, 1:8에서 모든 제거 비율이 60 % 이상에 도달하였으며, UT에서는 표적 세포에 대한 세포 용해 기능이 관찰되지 않았다. 또한, C01 TCR-T는 음성 세포에 대해 거의 기능을 나타내지 않았다. 도 10a에서 볼 수 있듯이, C01 TCR-T의 IFN- γ 분비는 표적 세포에서 뚜렷했으나, 음성 세포에서는 낮았다. 또한, UT 처리군에서는 명확한 사이토카인 분비가 관찰되지 않았다(도 10b).
- [0232] **실시예 5.4. A01/B01/C01 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 세포에 대한 제거능 분석**
- [0233] **Day 0:** HepG2-LMS-LG 세포를 콜라겐이 프리코팅 된(collagen pre-coated) 96-웰 플레이트에 1×10^4 cells/well, 100 μ l/well로 시딩하였다. 이후 각 웰에 A01, B01, C01 TCR-T 세포 100 μ l를 추가하여 효과 세포 대 표적 세포 비율(E:T ratio) 1:1, 1:2, 1:4로 설정하였다. 대조군에는 T 세포 배양 배지를 100 μ l를 추가하였으며, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 동안 공배양(co-culture)하였다.
- [0234] **Day 1:** 웰에 ONE-GloTM Luciferase Assay System 50 μ l를 추가하여 충분히 혼합한 뒤, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 측정하였다. 제거 효율(Killing efficiency)은 하기 수학적 식 2와 같이 계산하였다:
- [0235] [수학적 식 2]
- [0236] Killing efficiency (%) = (1 - (효과 세포 및 표적 세포의 평균값 / 표적 세포의 평균값)) \times 100%
- [0237] 확인 결과, 도 11에 나타난 것과 같이, A01, B01, C01 TCR-T 모두 HepG2-LMS-LG 세포에 대해 유의미한 특이적 제거 효과를 나타내고, 그 효과는 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, HBsAg 음성(HBsAg-negative) 표적 세포에서는 거의 제거 효과를 나타내지 않았다.
- [0238] **실시예 6. HBV S20 TCR-T의 다양한 T 세포 하위 집합(T cell subsets)의 표적 세포에 대한 기능성(Functionality) 확인**
- [0239] CD4 T 세포는 대식세포 매개 항감염 반응을 강화하고, B 세포 매개 체액성 면역 반응을 증진하는 것이 주요 기능이다. CD8 T 세포는 표적 세포를 직접적으로 특이적으로 제거하는 것이 주요 기능이다. 본 발명자들은 HBV S20 TCR-T의 항종양 활성을 평가하기 위해, HBV S20 TCR-T에서 CD4 및 CD8 세포 하위 집합을 분리하여 분석하였다.
- [0240] **실시예 6.1. 세포 분리**
- [0241] Dynabeads[®] CD4 및 Dynabeads[®] CD8 양성 자성 비드(positive magnetic beads) 각각 25 μ l를 1×10^6 개의 HBV S20 TCR-T 세포에 첨가하였다. 이후, 충분히 혼합하여 균일하게 섞은 후 분리 컬럼(separation column)으로 옮기고 2 ~ 8 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양하였다.
- [0242] 분리 컬럼을 자석 거치대(magnetic stand)에 2분간 고정시켰다. 자성 비드에 부착된 세포가 튜브 벽에 흡착되면, 튜브 내 상층액을 제거하였다. 분리 컬럼을 제거한 후, 세척 용액(버퍼 1) 1 mL를 추가하여 2 ~ 3회 세척하고 다시 자석 거치대에 2분간 배치하였다. 상기 과정을 총 5회 반복하여 세포를 분리하였다.
- [0243] 버퍼 2 100 μ l에 상기 분리된 세포를 재현탁시킨 뒤, DETACHaBEAD[®] 10 μ l를 첨가한 후, 실온에서 45분간 부드럽게 혼합하면서 배양하였다. 분리 컬럼을 자석 거치대에 1분간 고정 후, 상층액에 포함된 T 세포를 새로운 시험관(test tube)으로 옮기고, 버퍼 24 mL로 세포를 완전히 세척 후, 400 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다.
- [0244] 최종적으로 얻어진 고순도(high-purity) CD4 및 CD8 T 세포를 유세포 분석(flow cytometry) 및 후속 기능 실험에 사용하였다.

- [0245] **실시예 6.2. 세포 하위 집단 분석**
- [0246] FACS 버퍼는 DPBS와 2 %의 FBS를 혼합하여 준비하였으며, 4°C에서 냉장 보관 후 사용하였다.
- [0247] 상기 실시예 6.1에서 분리한 CD4 및 CD8 세포를 FACS 버퍼로 2회 세척 후, 400 g에서 5분간 원심분리하였다. 각 샘플에 PE-Cy7-CD4, PerCP-Cy5.5-CD8, PE Dextramer 항체를 1:100 비율로 희석 후 100 μ l를 첨가하였다. 이후, 4°C의 암실에서 30분 동안 배양하였으며, FACS 버퍼로 2회 세척 후 원심분리하였다. 100 μ l의 FACS 버퍼에 세포를 재현탁 후, 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다.
- [0248] 확인 결과, 도 11에 나타난 것과 같이, 분리된 CD4 및 CD8 세포의 순도가 95 % 이상이었으며, CD4 세포의 양성률(positive rate)이 CD8 세포보다 다소 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [0249] **실시예 6.3. S20 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 세포 제거능 분석**
- [0250] **표적 세포 배양 배지(M10 complete medium):** DMEM, 10 % FBS, 1 % Sodium Pyruvate, 1 % HEPES 및 1% NEAA를 혼합하여 준비하였으며, 4°C에서 냉장 보관.
- [0251] **T 세포 배양 배지(TCM, T cell complete medium):** IL-2를 적절한 양의 PRIME-XV 배지에 첨가하여, 최종 농도가 400 IU/mL이 되도록 50 mL 원심분리 튜브에 넣고 충분히 혼합한 후, 2 ~ 8°C에서 보관하여 사용함.
- [0252] **Day 0:** HepG2-LMS-LG 세포를 소화 후, 세포 밀도를 4×10^5 /mL로 설정하였다. 96-웰 폴라렌 코팅 플레이트에 M10 배지 50 μ l를 추가하여 RTCA 기준선을 설정하고, 각 웰에 50 μ l의 HepG2-LMS-LG 세포(4×10^5 /mL)를 추가하였다. 5분간 안정화(resting)한 후, 16시간 동안 성장 곡선(growth curve) 연속 측정하였다.
- [0253] **Day 1:** CD4 및 CD8 분리 TCR-T 세포의 TCR 양성률 및 세포 생존율(cell viability) 분석하였으며, 미분리 TCR-T 세포는 대조군(control)으로 설정하였다. 각 웰에 효과 세포 50 μ l를 추가하여 E:T 비율을 4:1, 1:1, 1:4로 설정 후, 제거 곡선(killing curve)을 지속적으로 모니터링하였다.
- [0254] **Day 3:** 72시간 후, RTCA 모니터링 종료 후 데이터 저장 및 제거 곡선을 분석하였으며, 공배양(co-culture) 후 상층액(supernatant) 수집 후, 사이토카인 분석을 수행하였다. 사이토카인 분석 방법은 상기 실시예 5에 기재된 것과 동일하게 진행하였다.
- [0255] 확인 결과, 도 11b에 나타난 것과 같이, CD8 세포는 세 가지 효과 세포 대 표적 세포 비율(E:T ratio)에서 뛰어난 종양 세포 제거 능력을 나타냈으며, CD8 세포의 반감기 내 제거 시간(half-killing time)은 대조군의 절반 수준이었다. 표적 세포 비율이 높은 조건에서는 CD4 세포 또한 표적 세포에 대해 우수한 제거능을 보였다. 효과 세포 대 표적 세포 비율이 1:1일 경우, CD8 세포의 사이토카인 분비 수준은 대조군과 동일하였으나, CD4 세포 그룹보다는 높았다(도 11c 및 도 11d).
- [0256] 결론적으로, 이러한 결과는 CD8 TCR-T 세포가 CD4 TCR-T 세포보다 종양 세포에 대한 더 강력한 제거 능력과 사이토카인 분비 능력을 가지고 있음을 의미한다.
- [0257] **실시예 7. A01/B01/C01 TCR-T의 인간 폴리펩티드 데이터베이스(human polypeptide database)에 대한 교차반응성(cross-reactivity) 확인**
- [0258] TCR의 서열 다양성(sequence diversity), 에피토프(epitopes), 그리고 MHC/HLA 분자의 차이로 인해, TCR은 교차반응성(cross-reactivity)을 가질 수 있으며, 이는 잠재적인 오프 타겟 독성(off-target toxicity)을 초래할 가능성이 있다. 이와 관련하여, Alanine Scanning Peptide Library를 이용하여 폴리펩티드 기능, 안정성, 구조(conformation)와 밀접하게 관련된 특정 아미노산 부위를 식별할 수 있다. 본 실시예에서는 HBV S20 에피토프 펩타이드의 각 아미노산 잔기를 개별적으로 알라닌(alanine)으로 변이시켜, HBV S20 TCR-T가 변이된 에피토프를 교차 인식(cross-recognition)할 수 있는지 여부를 확인하였다.
- [0259] **표적 세포 완전 배지(R10):** RPMI 1640과 FBS를 10:1 비율로 혼합하여 충분히 섞고, 2~8°C에서 보관하여 사용.
- [0260] **T 세포 완전 배지(TCM):** IL-2를 적절한 양의 PRIME-XV 배지에 첨가하여, 최종 농도가 400 IU/mL이 되도록 50 mL 원심분리 튜브에 넣고 충분히 혼합한 후, 2 ~ 8°C에서 보관하여 이후 사용함.
- [0261] **펩타이드:** S20-AD, S20-BC, C18-AD 펩타이드 각각 2 mg을 170 μ l DMSO에 용해하여 최종 농도 10 mM로 조제함. 10 mM 용액 3 μ l를 297 μ l TCM으로 희석하여 100 μ M로 만든 후, 10배 단계 희석하여 최종 10 μ M 농도로 조정.
- [0262] **표적 세포(T2):** T2 세포를 수확하여 R10 배지에 재현탁(resuspend)한 뒤, 세포 생존율(cell viability)과 밀도

를 측정된 후, 2.5×10^6 개의 T2 세포를 5 mL TCM으로 재현탁함. 96-well U-bottom 플레이트에 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ (5×10^4 cells/well)로 접종하고, 음성 대조군(negative control) 웰에는 $100 \mu\text{l}$ TCM만 추가함. 각 웰에 최종 농도가 10^{-5} M ~ 10^{-9} M이 되도록 해당 펩타이드 용액을 추가하고 플레이트를 37°C 배양기에 2시간 동안 배양 후, 효과 세포(effector cells)를 추가함.

[0263] **효과 세포(TCR-T):** HBV S20 TCR-T 세포 3.6×10^6 개를 2.5 mL TCM 배지에 재현탁 후, TCR-T 양성 세포의 밀도를 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 로 조정함. 각 웰에 $50 \mu\text{l}$ 씩 효과 세포를 접종한 후, 37°C 배양기에 배양함. 24시간 공동 배양 후, 상층액(supernatant)에서 사이토카인(cytokine) 수준을 유세포 분석(flow cytometry)으로 측정함.

[0264] 사이토카인 분석은 상기 실시예 5에서 수행한 것과 같은 방식으로 수행함.

[0265] 도 13에서 나타난 것과 같이, A01/B01/C01 TCR-T는 14개의 폴리펩티드에 대해 교차반응성(cross-reactivity)을 나타내지 않았다.

[0266] 결론적으로, HBV S20 TCR-T가 인식하는 주요 아미노산 모티프(motif)는 3-6번 위치(LTRI)에 있음을 확인하였다. 이 영역의 아미노산 잔기가 변형되면, 변이된 폴리펩티드에 대한 TCR의 인식 기능이 크게 감소하였다. 생물정보학 예측 알고리즘(bioinformatics prediction algorithm)을 통해 인간 펩타이드 라이브러리(human peptide library)를 비교한 결과, S20 에피토프 펩타이드와 6개의 아미노산이 동일한 인간 펩타이드 서열 14개를 확인하였다. 그러나, T2 세포 로딩 방법(T2 cell loading method)을 이용한 실험에서 HBV S20 TCR-T가 이들 인간 자가항원 펩타이드(human autoantigenic peptides)와 교차 반응을 보이지 않았다. 이 결과는, HBV S20 TCR-T가 인간 내인성 항원(human endogenous antigens)에 대해 잠재적인 오프 타겟 독성(off-target toxicity) 위험이 매우 낮음을 나타낸다.

[0267] **실시예 8. A01/B01/C01 TCR-T가 서로 다른 유전자형(genotypes)의 S20과 결합능 확인**

[0268] T 세포는 주로 TCR이 표적 세포 표면의 종양 항원 및 HLA-펩타이드 복합체를 인식함으로써 종양 항원을 인식한다. TCR-T와 종양 항원 간의 특이적 결합을 통해 활성화 신호가 전달되며, 이를 통해 표적 세포에 대한 제거 기능(killing function)이 유도된다. 본 실시예에서는, HBV S20 TCR-T가 서로 다른 유전자형을 가진 HBV에서 어떻게 작용하는지를 연구하기 위해, T2 세포를 다양한 농도의 S20-gt A/D(유전자형 A 또는 D, 아미노산 서열 FLLTRILTI) 또는 S20-gt B/C(유전자형 B 또는 C, 아미노산 서열 FLLTKILTI)로 로딩하여 실험을 진행하였다.

[0269] **표적 세포 완전 배지(R10):** RPMI 1640과 FBS를 10:1 비율로 혼합하여 충분히 섞고, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 보관하여 사용.

[0270] **T 세포 완전 배지(TCM):** IL-2를 적절한 양의 PRIME-XV 배지에 첨가하여, 최종 농도가 $400 \text{ IU}/\text{mL}$ 이 되도록 50 mL 원심분리 튜브에 넣고 충분히 혼합한 후, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 보관하여 이후 사용함.

[0271] **펩타이드:** S20-AD, S20-BC, C18-AD 펩타이드 각각 2 mg 을 $170 \mu\text{l}$ DMSO에 용해하여 최종 농도 10 mM 로 조제함. 10 mM 용액 $3 \mu\text{l}$ 를 $297 \mu\text{l}$ TCM으로 희석하여 $100 \mu\text{M}$ 로 만든 후, 10배 단계 희석하여 최종 $10 \mu\text{M}$ 농도로 조정.

[0272] **표적 세포(T2):** T2 세포를 수확하여 R10 배지에 재현탁(resuspend)한 뒤, 세포 생존율(cell viability)과 밀도를 측정된 후, 2.5×10^6 개의 T2 세포를 5 mL TCM으로 재현탁함. 96-well U-bottom 플레이트에 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ (5×10^4 cells/well)로 접종하고, 음성 대조군(negative control) 웰에는 $100 \mu\text{l}$ TCM만 추가함. 각 웰에 최종 농도가 10^{-5} M ~ 10^{-9} M이 되도록 해당 펩타이드 용액을 추가하고 플레이트를 37°C 배양기에 2시간 동안 배양 후, 효과 세포(effector cells)를 추가함.

[0273] **효과 세포(TCR-T):** HBV S20 TCR-T 세포 3.6×10^6 개를 2.5 mL TCM 배지에 재현탁 후, TCR-T 양성 세포의 밀도를 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 로 조정함. 각 웰에 $50 \mu\text{l}$ 씩 효과 세포를 접종한 후, 37°C 배양기에 배양함. 24시간 공동 배양 후, 상층액(supernatant)에서 사이토카인(cytokine) 수준을 유세포 분석(flow cytometry)으로 측정함.

[0274] 사이토카인 분석은 상기 실시예 5에서 수행한 것과 같은 방식으로 수행함.

[0275] 도 14에서 나타난 것과 같이, A01/B01/C01 TCR-T는 HBV S20 gt A/D 또는 S20 gt B/C 폴리펩티드로 로딩된 T2 세포에서 강한 사이토카인 분비(cytokine secretion)를 나타냈다. 폴리펩티드 농도가 10^{-5} M에 도달했을 때, IFN- γ 분비량이 $5 \text{ ng}/\text{mL}$ 이상으로 증가하였으나, C18-27 gt A/D에 대해서는 어떠한 기능도 나타내지 않았다. A01/B01/C01 TCR-T의 사이토카인 분비는 S20 농도에 따라 용량 의존적(dose-dependent)으로 증가하였다.

- [0276] 결론적으로, HBV S20 TCR-T는 서로 다른 유전자형(genotypes)을 가진 HBV에 대해 명확한 기능을 가지며, 대부분의 HBV 바이러스 아형(subtypes)을 포괄할 수 있고, 여러 일반적인 유전자형에서도 우수한 기능을 나타낸다.
- [0277] **실시예 9. A01/B01/C01 TCR-T의 HLA-A02 아형(subtypes) 인식능 확인**
- [0278] TCR이 MHC 분자가 제시하는 항원 펩타이드를 특이적으로 인식할 때는 HLA 아형에 의해 제한된다. HepG2는 HLA-A*02:01/24:02를 가지는 인간 간암 세포주이고, SW403은 HLA-A*02:05/03:01을 가지는 인간 간암 세포주이며, KATO III는 HLA-A*02:01/02:07을 가지는 인간 위암 세포주이고, SNU-1은 HLA-A*02:07/30을 가지는 인간 위암 세포주이다.
- [0279] 상기 세포들에 S20 에피토프 펩타이드를 로딩한 후, HBV S20 TCR-T가 표적 세포를 제거하고 사이토카인을 분비하는 능력을 확인하여, HLA-A02의 다양한 아형을 가진 표적 세포가 제시하는 S20 에피토프 펩타이드-MHC 복합체와 HBV S20 TCR-T 간의 결합력을 *in vitro* 상에서 평가하였다.
- [0280] **표적 세포 완전 배지(R10):** RPMI 1640과 FBS를 10:1 비율로 혼합하여 충분히 섞어 제조한 뒤, 2 ~ 8°C에서 보관하여 이후 실험에 사용하였다.
- [0281] **T 세포 완전 배지:** PRIME-XV 배양액에 IL-2를 최종 농도 400 IU/mL로 첨가한 후, 50 mL 원심분리 튜브에 충분히 혼합하여 2 ~ 8°C에서 보관하였다.
- [0282] **펩타이드:** S20 펩타이드 2 mg를 200 μ l DMSO에 녹여 최종 농도 10 mg/mL로 조제하였다. 10 μ l의 용액을 90 μ l TCM으로 희석하여 1 mg/mL로 만든 후, 10배 단계 희석하여 최종 1 μ g/mL 농도로 제조하였다.
- [0283] **표적 세포:** HepG2, SW403, KATO III 및 SNU-1 세포를 수확하여 R10 배지에 재현탁(resuspend)하였다. 세포 생존율 및 밀도를 측정 한 후, 세포 수에 맞게 8×10^5 개의 세포를 4 mL TCM 배지로 재현탁하였다. 96-well U-bottom 플레이트의 각 웰에 2×10^4 개의 표적 세포(100 μ l/well)를 접종하고, T 세포만 포함하는 그룹에는 펩타이드 없이 100 μ l TCM을 추가하였다. 각 웰에 최종 농도 1 μ g/mL이 되도록 해당 펩타이드 용액을 추가하였으며, 96-well U-bottom 플레이트를 37°C의 배양기에 2시간 동안 배양한 후, 효과 세포(effector cells)를 추가하였다.
- [0284] **효과 세포:** HBV S20 TCR-T 세포를 고르게 혼합한 후, 세포 생존율과 밀도를 측정하였다. 세포 계수(counting) 및 양성률(positive rate) 결과를 기반으로 TCM 배지로 세포 밀도를 조정하고, 96-well U-bottom 플레이트에 효과 세포(effector cells)를 50 μ l/well씩 E:T 비율이 2:1이 되도록 접종하였다. 상기 플레이트를 37°C의 배양기에 넣어 배양하였다. 24시간 공동 배양(co-incubation) 후, 유세포 분석(flow cytometry)을 이용하여 사이토카인(cytokine) 수준을 측정하였다.
- [0285] 도 15에서 나타난 것과 같이, HLA-A*02:01을 가진 HepG2를 기준(reference)으로 하여 분석하였다. A01 TCR-T, B01 TCR-T 및 C01 TCR-T가 HLA-A*02:07을 가진 KATO III 및 SNU-1 세포(S20 폴리펩티드 로딩됨)와 공동 배양되었을 때, 유의미한 사이토카인 분비(cytokine secretion)가 관찰되었다. 그러나, S20 폴리펩티드를 로딩하지 않은 표적 세포와 공동 배양된 경우, 관련 사이토카인 분비가 감지되지 않았다. HLA-A*02:07을 가진 SW403 세포는 S20 폴리펩티드 유무와 관계없이 어떤 사이토카인 분비도 나타내지 않았다.
- [0286] 즉, HepG2, KATO III, SNU-1 세포(HLA-A02:01 또는 HLA-A02:07)가 S20 에피토프 펩타이드를 로딩하면, HBV S20 TCR-T를 효과적으로 활성화하여 관련 사이토카인을 분비하게 한다는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 HBV S20 TCR-T가 특정 HLA 아형에서 높은 특이적 결합 활성(specific binding activity)을 가짐을 나타낸다. 그러나 HLA 아형 제한(HLA subtype restriction)으로 인해, HLA-A*02:05를 가진 SW403 세포는 S20 에피토프 펩타이드를 로딩해도 HBV S20 TCR-T를 활성화하지 못한다는 것을 의미하며, HBV S20 TCR-T가 HLA-A02:01 및 HLA-A02:07 두 아형에서 S20 에피토프 펩타이드를 교차 인식(cross-recognition)할 수 있다는 점은, HBV S20 TCR-T의 적용 범위가 넓은 환자 집단을 포괄할 수 있음을 의미한다.
- [0287] **실시예 10. A01 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 이종이식(xenograft) 모델에서의 생체 내 약력학(pharmacodynamics) 및 약동학(pharmacokinetics) 확인**
- [0288] 생체 내에서 A01 TCR-T의 종양 세포에 대한 항종양 활성(anti-tumor activity)을 확인하기 위해, HBsAg 간암 세포(HepG2-LMS-LG)를 이식한 면역결핍 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.)를 사용하여 마우스 CDX 모델을 구축하였다. 상기 모델은 A01 TCR-T 세포의 간암 종양 제거 효과를 평가하기 위해 개발되었다.

- [0289] **Day -6:** NPG 마우스의 우측 겨드랑이(subcutaneously in the right axilla)에 1×10^7 개의 종양 세포를 접종(inoculation)하였다.
- [0290] **Day 0:** 종양 크기가 약 100 mm^3 에 도달한 것을 확인하고, 마우스를 각 그룹당 10마리씩 설정하여 6개의 그룹으로 분류하였다. 그 중 4개의 그룹에는 서로 다른 용량의 B01 TCR-T 세포를 주입하였으며, 고용량 그룹에는 2×10^7 cells/mouse로, 중간용량 그룹에는 1×10^7 cells/mouse으로, 저용량 그룹에는 0.5×10^7 cells/mouse으로, 초저용량 그룹에는 0.2×10^7 cells/mouse로 주입하였다. 남은 두 그룹은 대조군으로 사용하였으며, 대조군 1에는 세포 동결 보존액만 투여하였고, 대조군 2 그룹에는 형질도입되지 않은 T 세포(Mock-T, 1.5×10^7 cells/mouse)를 투여하였다. 이후, 종양 및 약물동태학(pharmacokinetic) 데이터를 수집하였으며, 종양 크기를 주 2회 측정하였다.
- [0291] 대조군과 비교했을 때, 서로 다른 용량의 A01 TCR-T 세포를 주입한 그룹들은 종양 성장에 대해 유의미한 억제 효과를 나타냈으며, 4개 실험군에서 종양 부피가 유의미하게 감소하였다(도 16a). 또한, 각 용량 그룹에서 세포가 정맥 주입된 후 마우스의 체중은 감소하지 않은 것을 확인할 수 있었다(도 16b).
- [0292] A01 TCR-T의 복제 수(copy number)는 투여 후 1일째 모든 조직에서 검출되었으며, 이후 점차 감소하는 경향을 보였고, 투여 후 7일째에 최저 수준으로 감소하였다. 그러나 투여 후 14일째 및 21일째에, A01 TCR-T 세포는 간(liver), 비장(spleen), 폐(lung), 심장(heart)과 같이 혈류가 풍부한 조직에서 다시 확장되었으며, 투여 후 21일째에 TCR-T 세포 수가 최고치(peak)에 도달하였다(도 16c).
- [0293] 위의 결과를 바탕으로, A01 TCR-T는 HepG2-LMS-LG 이종이식 모델에서 항종양 활성을 나타내었으며, 그 효과는 용량과 양의 상관관계를 보였다. 특히, 혈류가 풍부한 간, 비장, 폐, 심장 등에서 TCR-T 세포가 유의미하게 확장되었으며, 시험 제품과 관련된 전신 독성(systemic toxicity)은 관찰되지 않았다. 동물 모델에서 이식편대숙주병(GvHD, graft-versus-host disease)에 의해 다중 장기/조직에서 단핵구(mononuclear cell) 침윤이 발생할 가능성이 있기 때문에, 실험 기간은 21일로 제한하였다. 그러나, HBV-S20 TCR-T 세포는 환자 유래 자가 T 세포(patient-derived autologous T cells)를 사용하여 임상 시험에서 제조되었기 때문에, GvHD는 회피할 수 있을 것이다.
- [0294] **실시예 11. B01 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 이종이식(xenograft) 모델에서의 생체 내 약력학(in vivo pharmacodynamics) 확인**
- [0295] HBsAg 간암 세포(HepG2-LMS-LG)를 이식한 면역결핍 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.)를 이용하여 마우스 CDX 모델을 구축하였으며, 이를 통해 B01 TCR-T 세포의 간암 제거 효과를 평가하였다.
- [0296] **Day -6:** NPG 마우스의 우측 겨드랑이(subcutaneously in the right axilla)에 1×10^7 개의 종양 세포를 접종(inoculation)하였다.
- [0297] **Day 0:** 마우스를 각 그룹당 10마리씩 설정하여 6개의 그룹으로 분류하였다. 그 중 4개의 그룹에는 서로 다른 용량의 B01 TCR-T 세포를 주입하였으며, 고용량 그룹에는 2×10^7 cells/mouse로, 중간용량 그룹에는 1×10^7 cells/mouse으로, 저용량 그룹에는 0.5×10^7 cells/mouse으로, 초저용량 그룹에는 0.2×10^7 cells/mouse로 주입하였다. 남은 두 그룹은 대조군으로 사용하였으며, 대조군 1에는 세포 동결 보존액만 투여하였고, 대조군 2 그룹에는 형질도입되지 않은 T 세포(Mock-T, 4.3×10^7 cells/mouse)를 투여하였다. 이후, 주 2회 종양 크기를 측정하면서 데이터를 수집하였다.
- [0298] 대조군과 비교하였을 때, 서로 다른 용량의 B01 TCR-T 세포들은 종양 성장에 대해 유의미한 억제 효과를 나타냈으며, 4개 실험군에서 종양 부피가 유의미하게 감소하였다(도 17a). 종양 억제율(tumor inhibition rate)은 모두 90 % 이상이었으며, 각 용량 그룹에서 세포가 정맥 주입된 후 마우스의 체중은 감소하지 않은 것을 확인할 수 있었다(도 17b). 결론적으로, B01 TCR-T는 생체 내에서 종양 세포를 제거하는 능력을 나타냈으며, 관찰된 부작용도 없었다.
- [0299] **실시예 12. C01 TCR-T의 HepG2-LMS-LG 이종이식 모델에서의 생체 내 약력학(in vivo pharmacodynamics) 확인**
- [0300] HBsAg 간암 세포(HepG2-LMS-LG)를 이식한 면역결핍 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.)를 이용하여 마우스 CDX 모델을 구축하였으며, 이를 통해 C01 TCR-T 세포의 간암 제거 효과를 평가하였다.

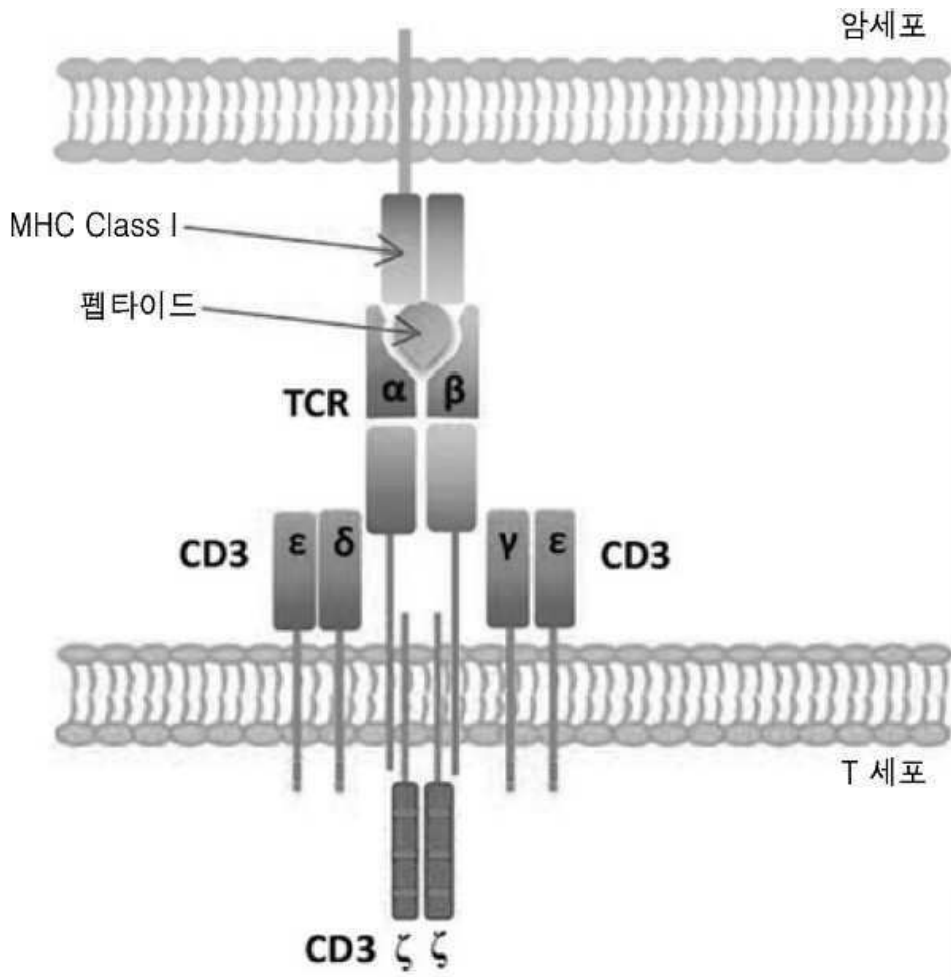
- [0301] **Day -6:** NPG 마우스의 우측 겨드랑이(subcutaneously in the right axilla)에 1×10^7 개의 종양 세포를 접종 (inoculation)하였다.
- [0302] **Day 0:** 마우스를 각 그룹당 5마리씩 설정하여 4개의 그룹으로 분류하였다. 이들 중, 2개의 그룹은 다른 용량의 C01 TCR-T 세포를 주입하였으며, 구체적으로 고용량 그룹에는 2×10^7 C01 TCR-T 세포/mouse 로 투여하고 저용량 그룹에는 5×10^6 C01 TCR-T 세포/mouse 로 투여하였다. 남은 두 그룹은 대조군으로 사용하였으며, 대조군 1에는 세포 동결 보존액만 투여하였고, 대조군 2 그룹에는 형질도입되지 않은 T 세포(Mock-T, 2.9×10^7 cells/mouse) 를 투여하였다. 이후, 종양 크기를 지속적으로 모니터링하며 데이터를 수집하였다.
- [0303] 대조군과 비교하였을 때, C01 TCR-T 세포를 고용량으로 투여한 군에서 저용량으로 투여한 군 대비 유의미한 종양 성장 억제 효과를 나타냈으며, 종양 부피가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 18a). 각 용량 그룹에서 세포가 정맥 주입된 후 마우스의 체중은 감소하지 않은 것을 확인할 수 있었다(도 18b). 또한, 대조군과 비교하였을 때, C01 TCR-T 세포를 고용량으로 투여한 군의 조직에서 qPCR을 이용해 더 높은 수의 C01 TCR-T 복제 수(copy number)가 검출된 것을 확인할 수 있었고, 이는 동물의 체내에서 TCR-T 세포의 생존 및 확장을 의미하고, 세포 확장 정도와 종양 크기 간에 유의미한 음의 상관관계가 있음을 나타낸다. 즉, 이는 마우스 내에서 C01 TCR-T 세포가 더 많이 확장될수록 종양에 대한 제거 및 억제 효과가 더욱 강하게 나타난 다는 것을 의미한다(도 18c).
- [0304] 결론적으로, 체내에서 C01 TCR-T의 복제(copy number) 수가 더 높았으며, C01 TCR-T는 생체 내(in vivo)에서 종양 세포에 대한 명확한 제거 효과를 나타냈고, 명확하게 관찰된 부작용(adverse reactions)도 없었다.
- [0305] 본 명세서는 위에서 상세히 설명되었다. 본 명세서의 원리와 구현 방식은 구체적인 실시예를 통해 설명되었다. 상기 실시예의 설명은 본 명세서의 방법 및 핵심 아이디어를 이해하는 데 도움을 주기 위한 것이며, 해당 기술 분야의 통상의 기술자는 본 명세서의 개념을 바탕으로 구체적인 실시예 및 적용 범위에서 변경할 수 있다. 따라서, 본 명세서의 내용은 본 발명의 적용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

도면

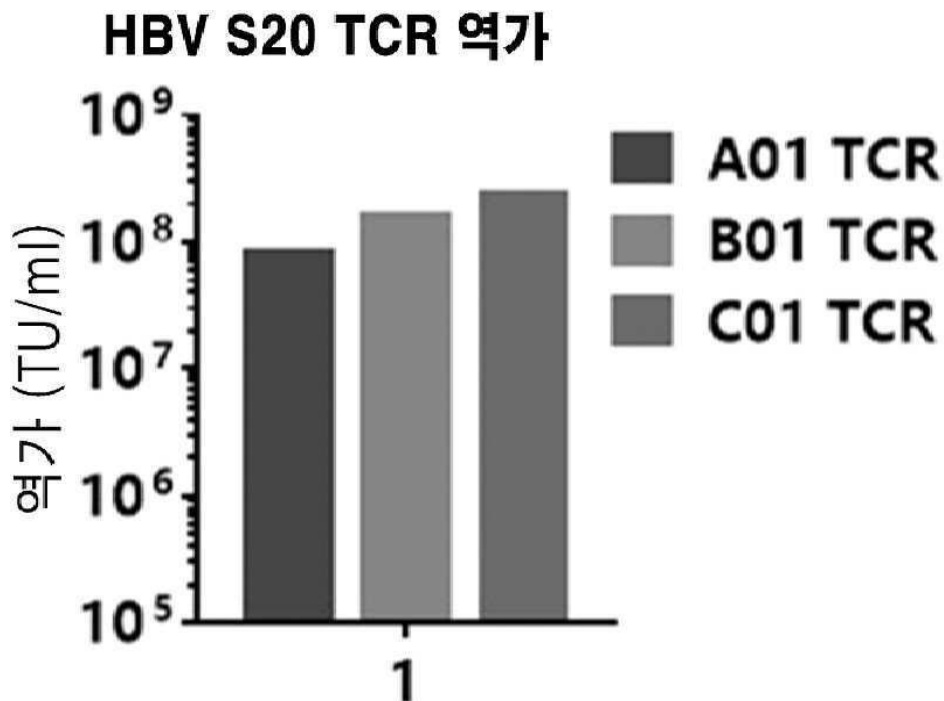
도면1



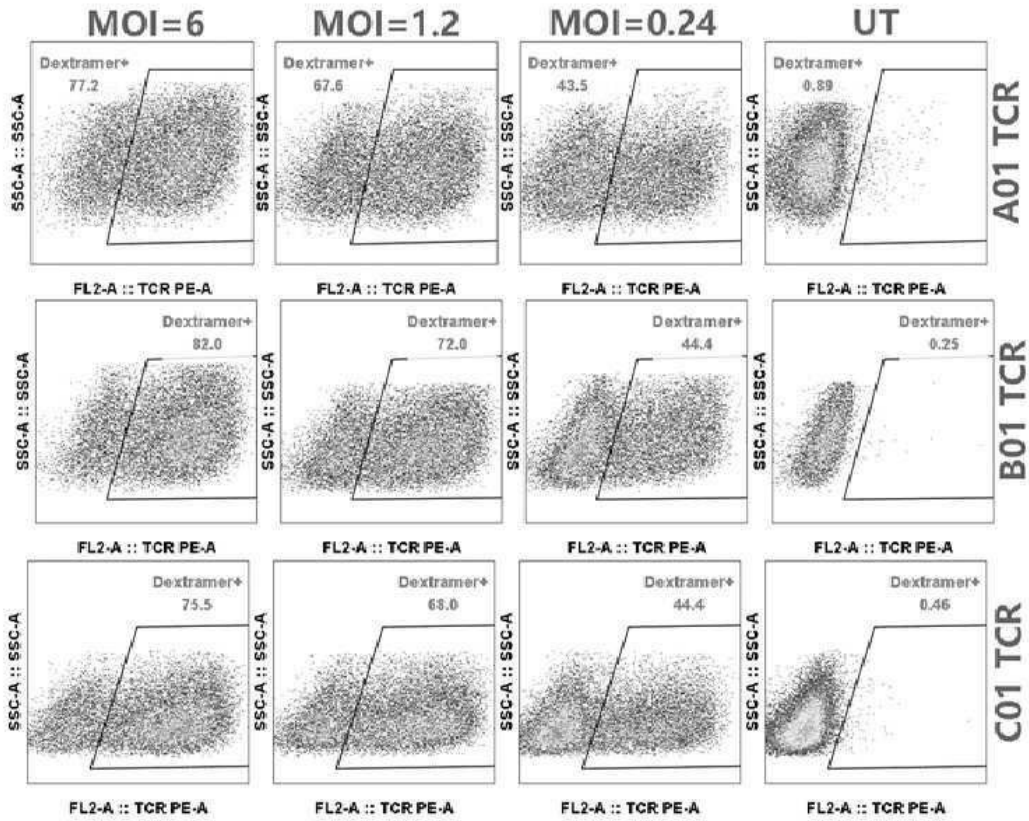
도면2



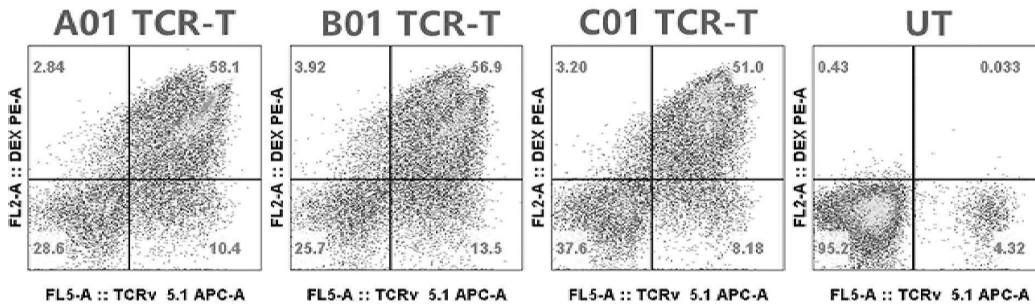
도면3



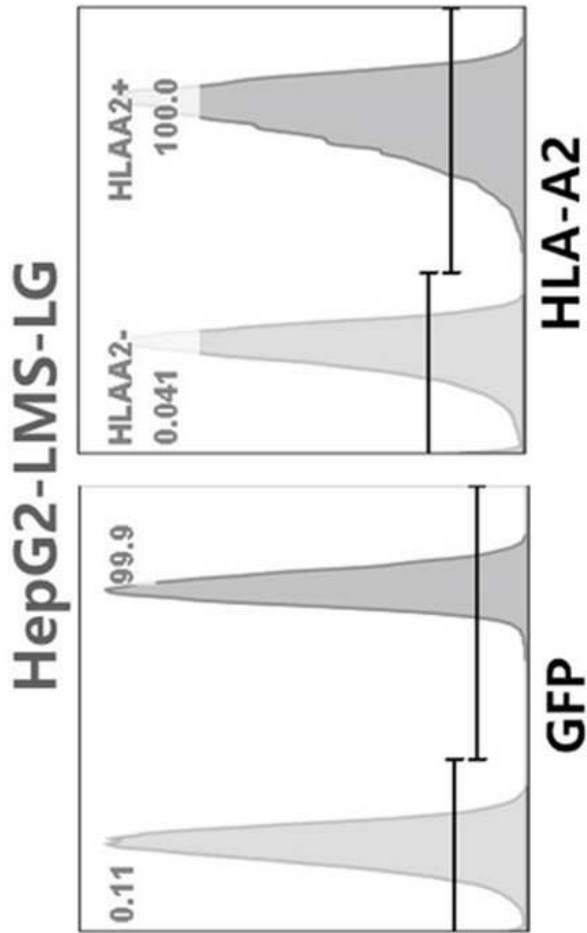
도면4



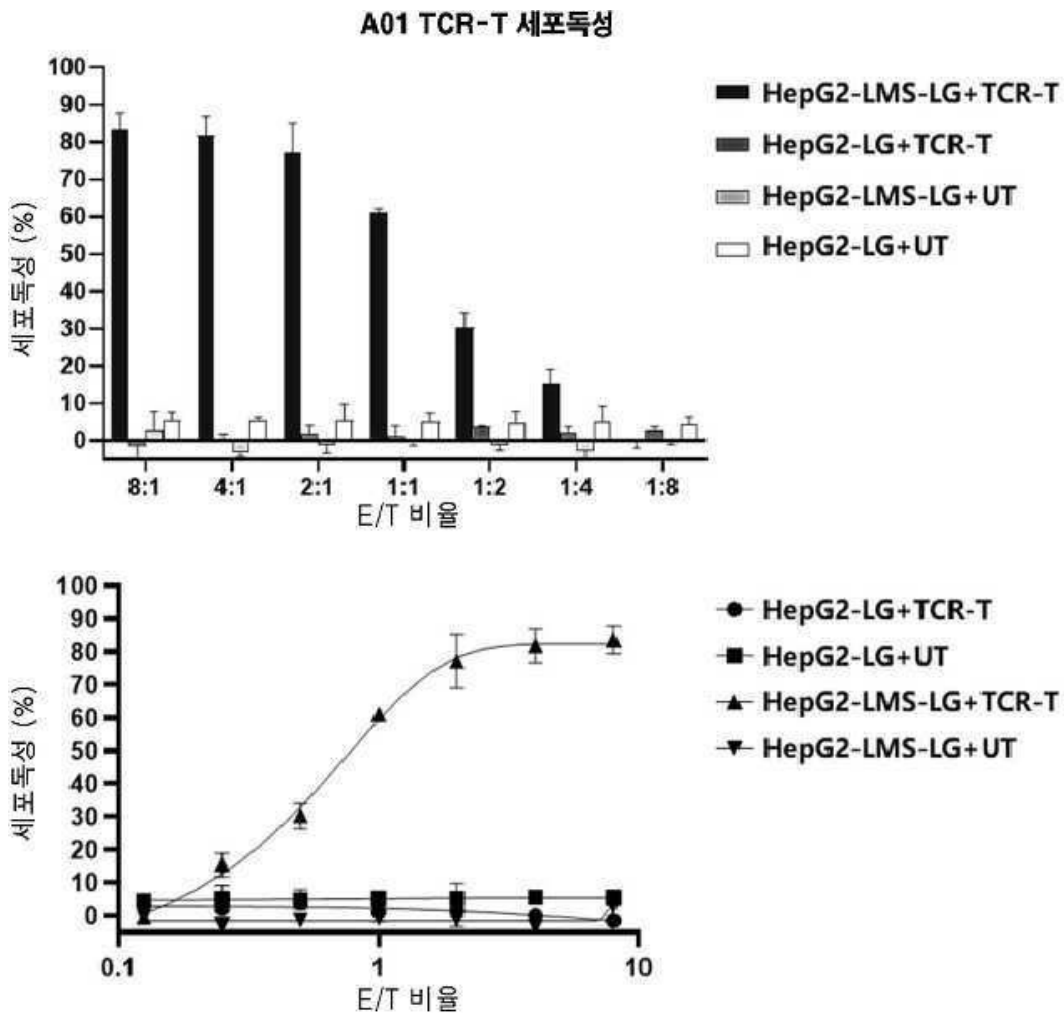
도면5



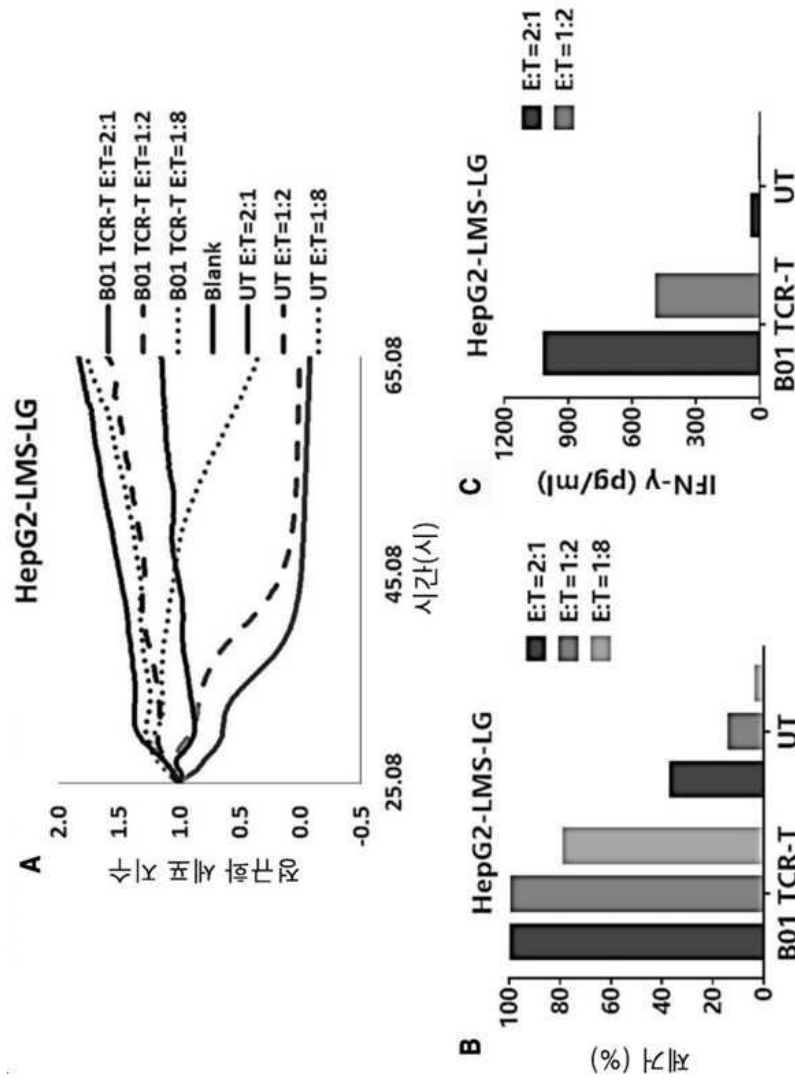
도면6



도면7

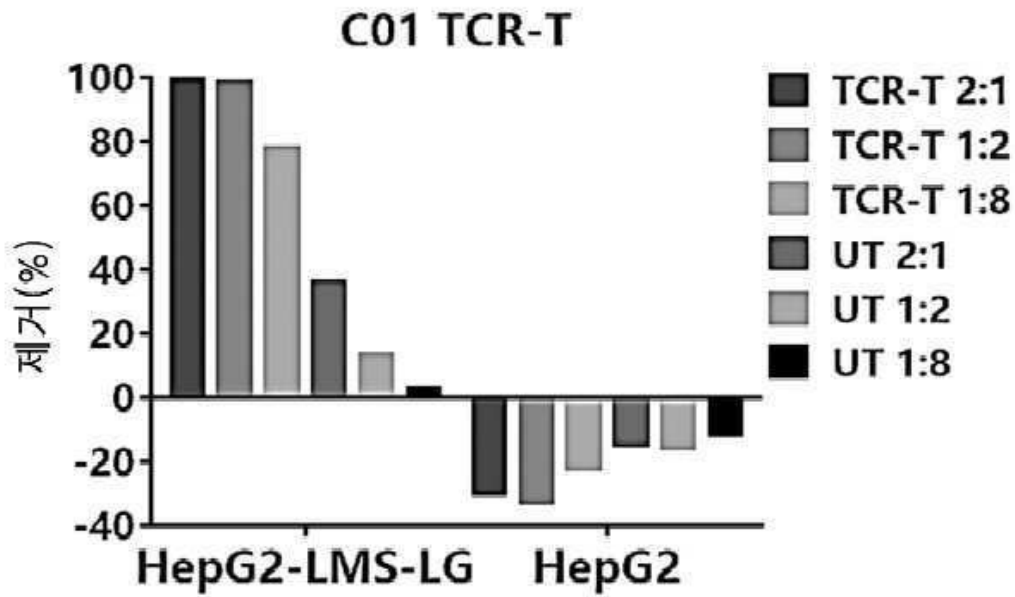


도면8

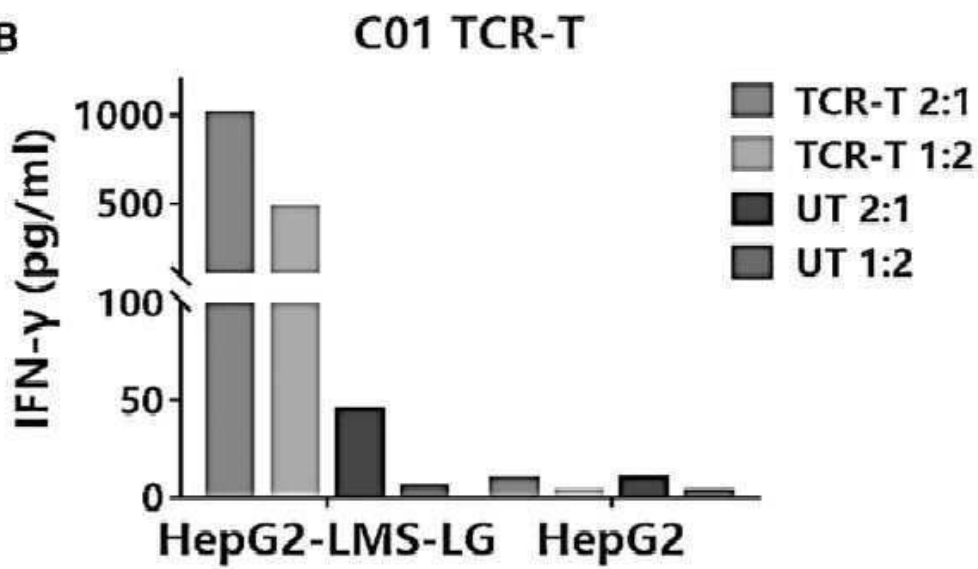


도면9

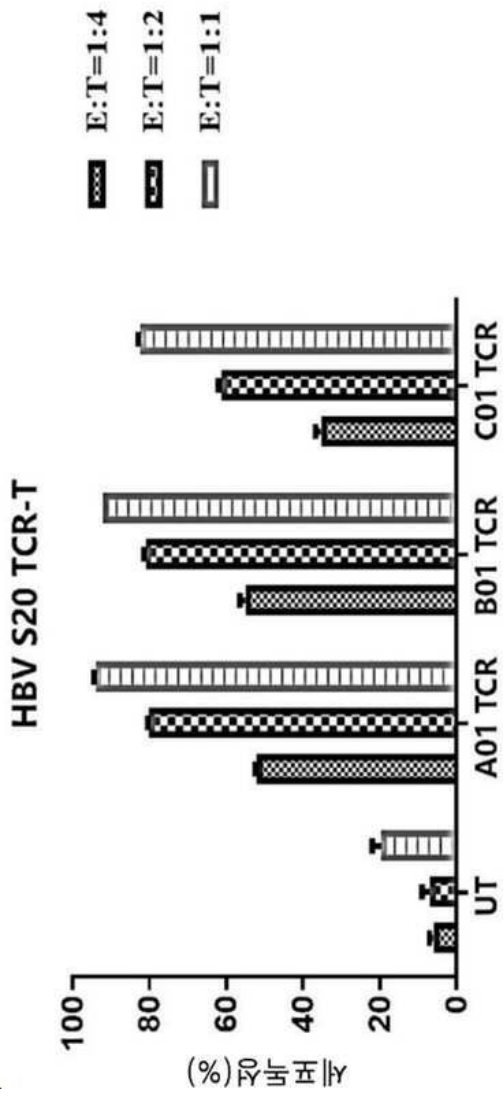
A



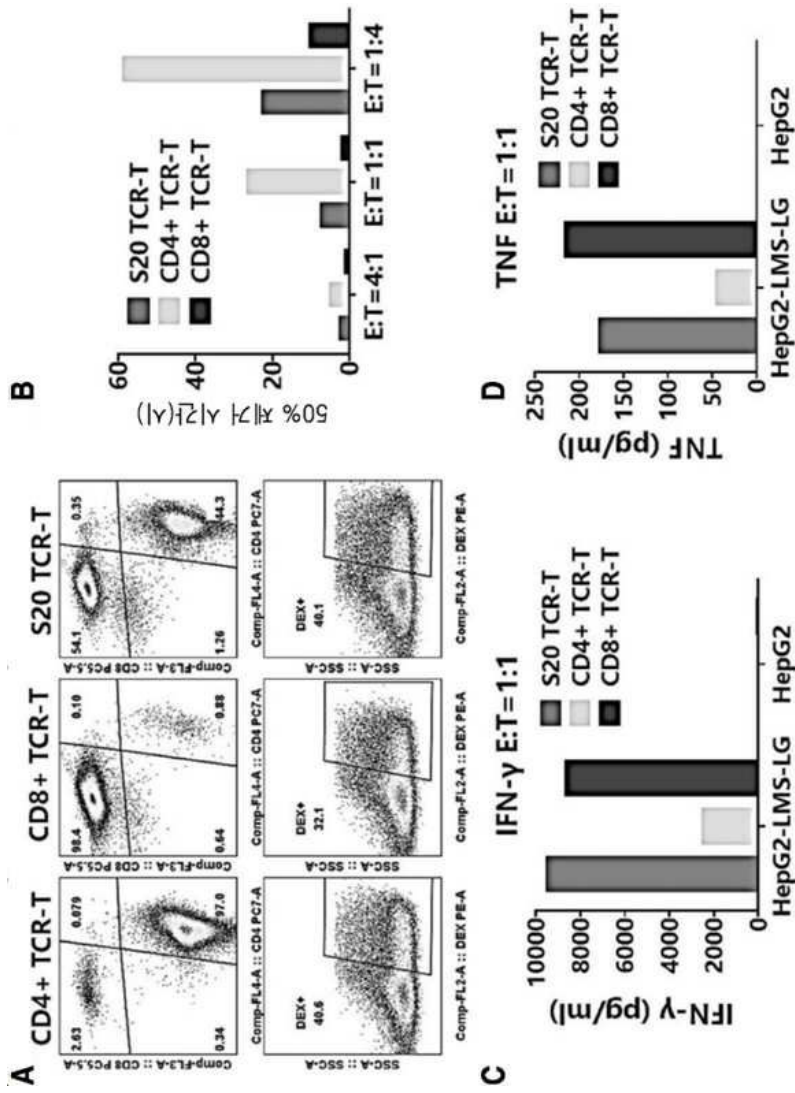
B



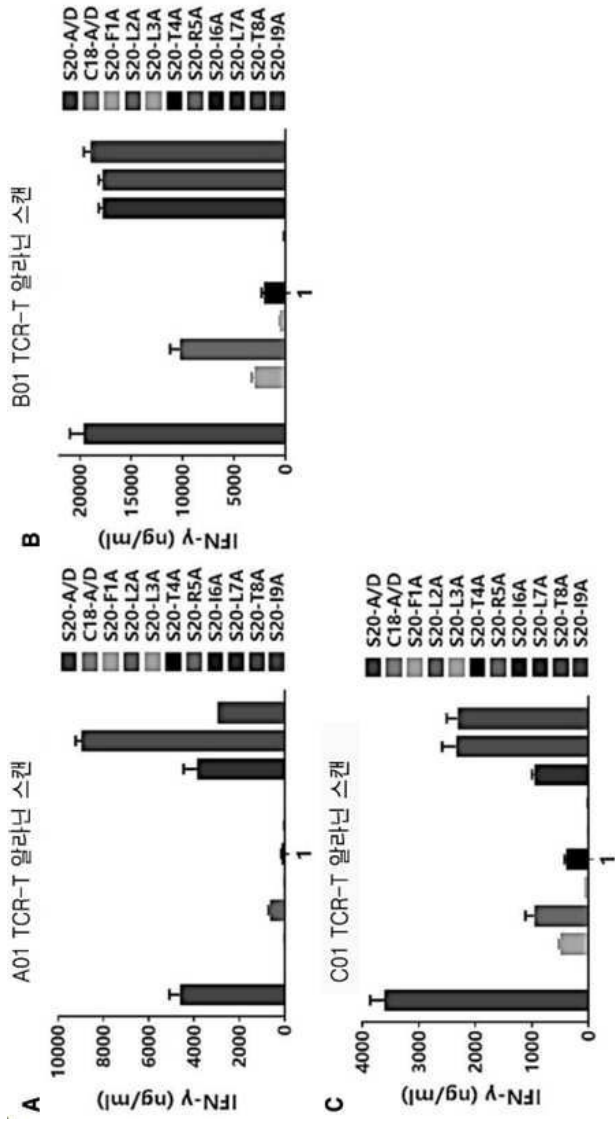
도면10



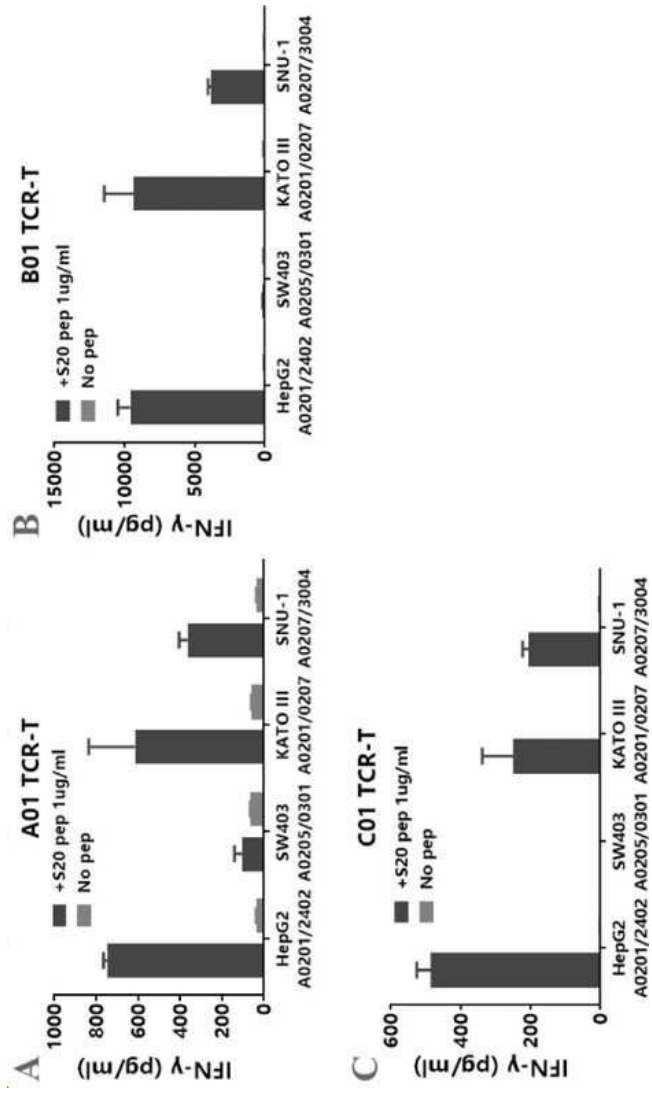
도면11



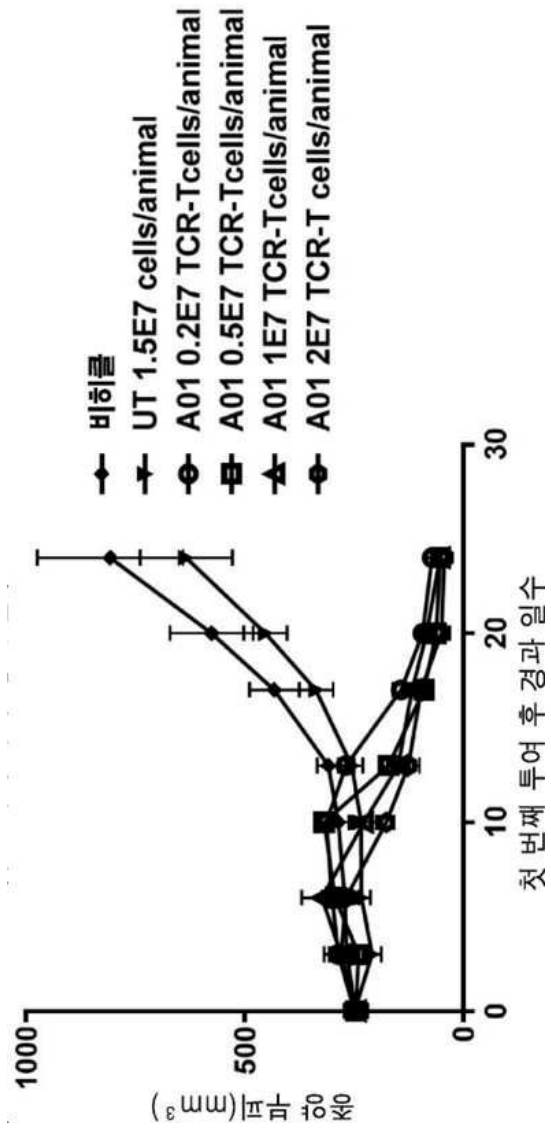
도면12



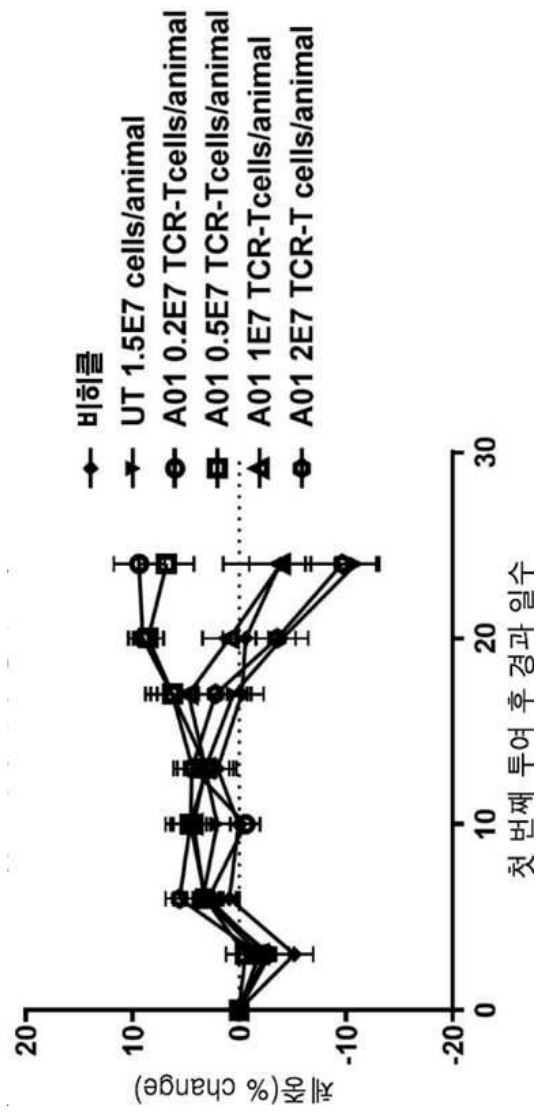
도면15



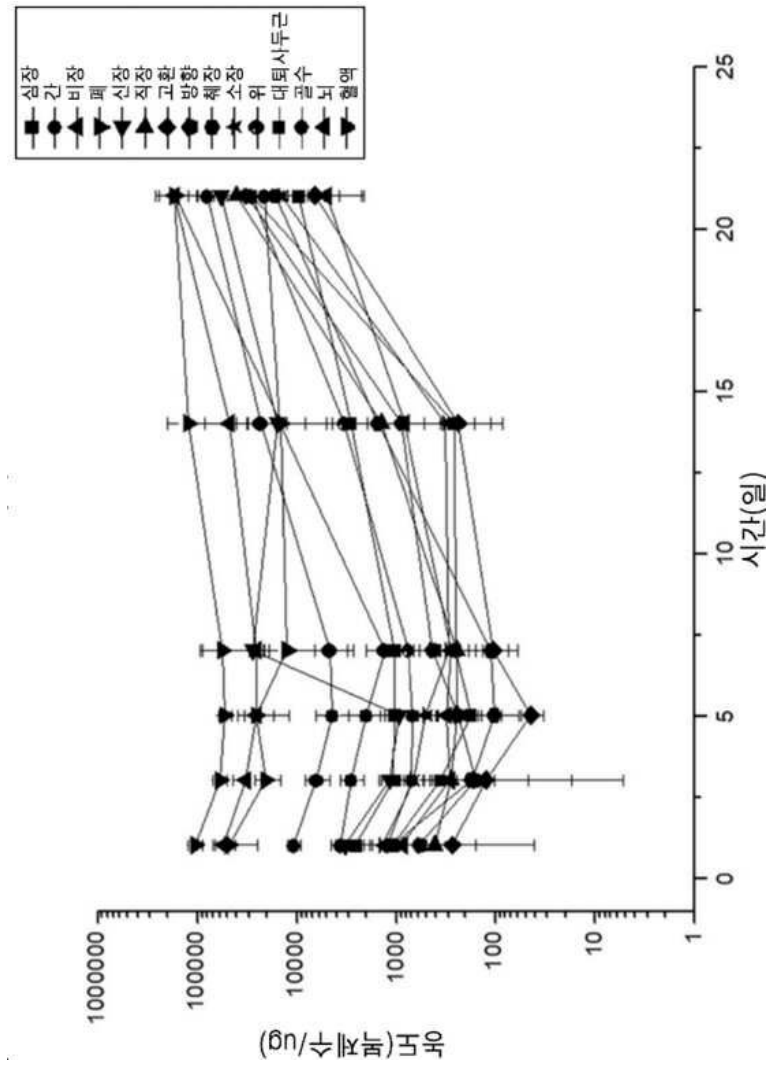
도면16a



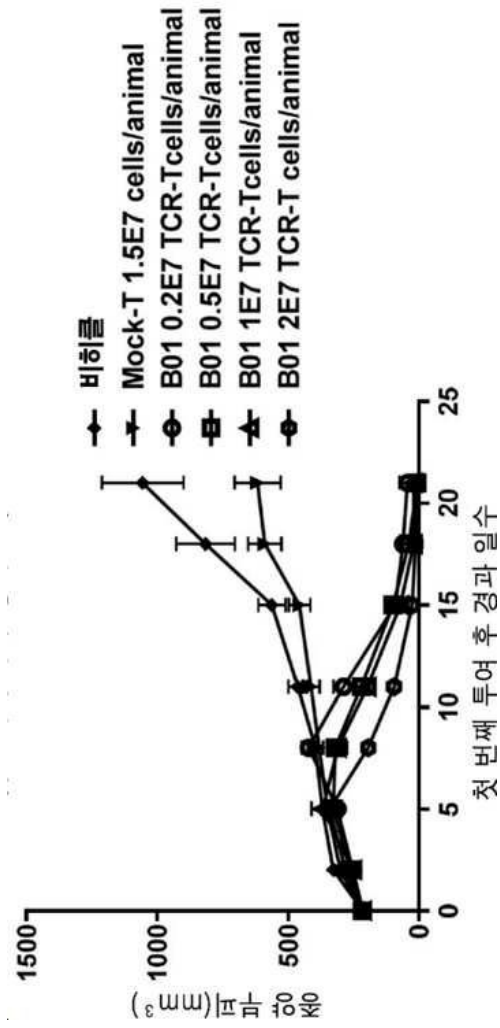
도면16b



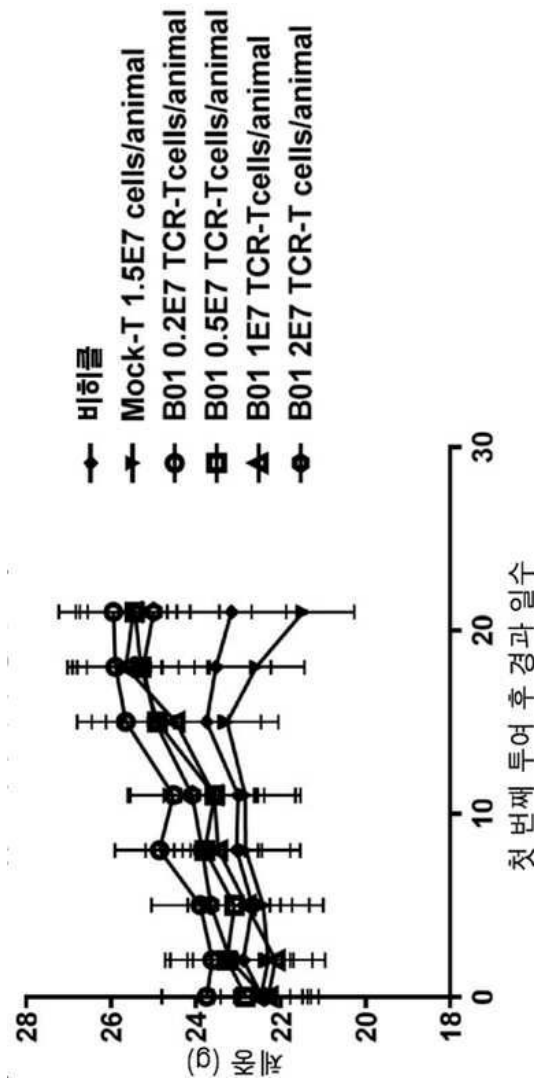
도면16c



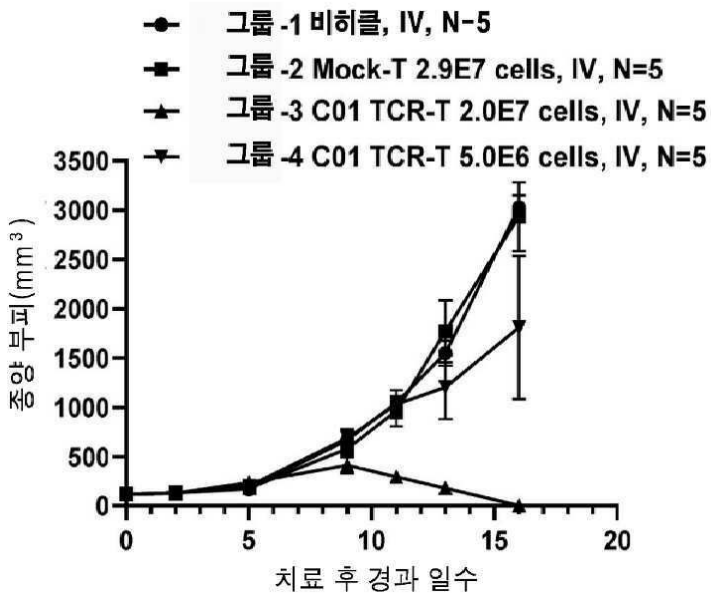
도면17a



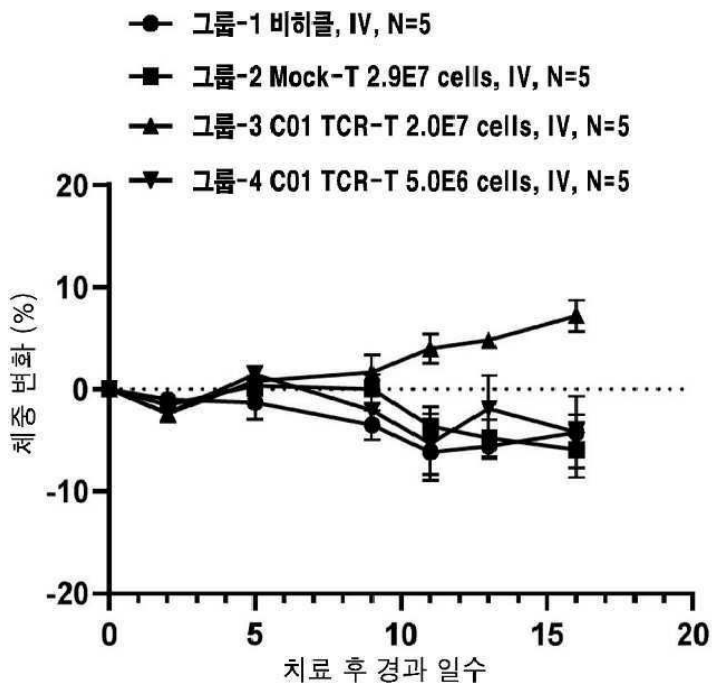
도면17b



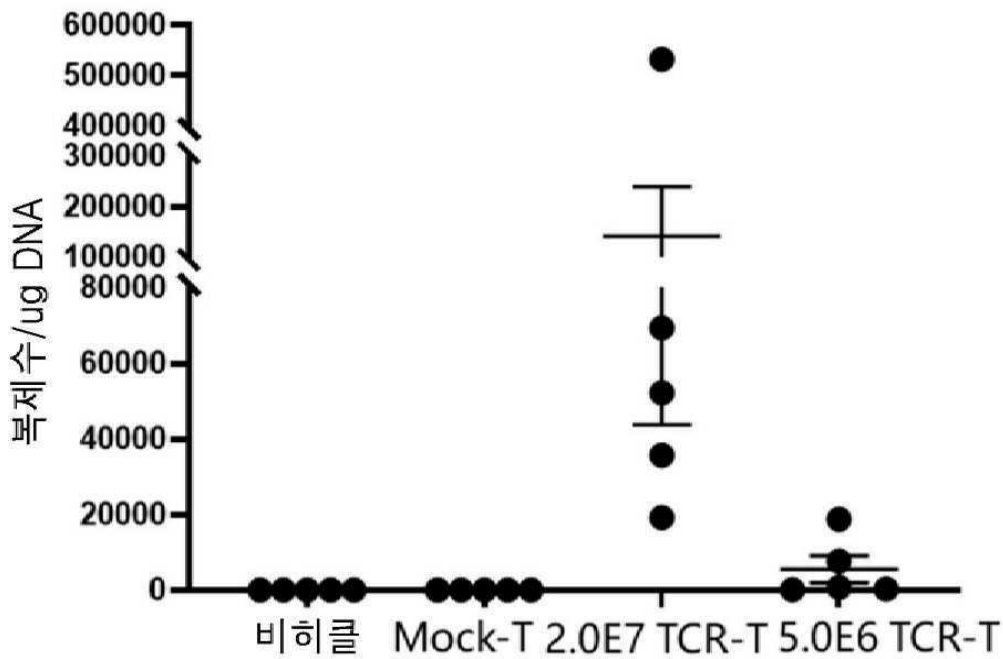
도면18a



도면18b



도면18c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.