(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12Q 1/68
C12P 21/00

(45) 공고일자 2000년04월01일
(11) 등록번호 10-0246529
(24) 등록일자 1999년12월06일

(21) 출원번호 10-1992-0701966
(22) 출원일자 1992년08월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US 91/09431
(86) 국제출원일자 1991년12월12일
(65) 공개번호 특1992-0703847
(43) 공개일자 1992년12월18일
(87) 국제공개번호 WO 91/10591
(87) 국제공개일자 1992년06월25일

(30) 우선권주장 627,643 1990년12월14일 미국(US)
7/627,643 1990년12월14일 미국(US)
(73) 특허권자 셀 제네시스, 인크. 스티븐 에이. 서윈. 엠.디.
미합중국 94404 캘리포니아, 포스터 시티, 레이크사이드 드라이브 322더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 린다 에스 스티븐슨
미합중국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 5층
(72) 발명자 다니엘제이.카폰
미합중국 94402 캘리포니아 산마테오오레곤 애브뉴 817
아아더바이스
미합중국 94941 캘리포니아 밀밸리바스코 드라이브 10
브라이언에이.어어빙
미합중국 94107 캘리포니아 샌프란시스코 아르칸자스 스트리트 587
(74) 대리인 남상선

심사관 : 안미정

(54) 수용체 관련된 신호 변환 경로를 위한 키메라 사슬

요약

본 발명에서는 키메라 단백질과 키메라단백질을 코드화하는 DNA서열이 제공되는데, 키메라 단백질은 리간드에 결합할 수 있는 세포외재 도메인, 경막 도메인 및 신호화 경로를 활성화시킬 수 있는 세포질 도메인을 특징으로 한다. 세포외재 도메인과 세포질 도메인은 천연적으로는 함께 발견되지 않는다. 리간드가 세포외재 도메인에 결합하면 세포내에서 신호의 변환과 신호화 경로의 활성화가 유발되며, 그로써 세포는 신호화 경로에 관련하여 다양한 기능을 수행하도록 유도될 수 있다. 광범위한 세포외재 도메인이 수용체로서 사용될 수 있으며, 그러한 도메인은 천연적이거나 또는 합성된다.

명세서

[발명의 명칭]

수용체 관련된 신호 변환 경로를 위한 키메라 사슬

[기술분야]

본 발명은 신호 변환을 위해 키메라 표면 막 단백질을 사용하는 것에 관한 것이다.

[배경기술]

세포 활성의 조절은 자주 표면 막 수용체에 대한 리간드의 결합에 의해 이루어진다. 수용체의 세포외 부분과의 복합체가 형성되면, 배좌의 변화가 일어나, 수용체의 세포질 부분이 세포내로 변환될 신호를 생성시키도록 변화된다. 일부의 경우, 세포질 부분의 변화는 다른 단백질에 대한 결합을 초래하며, 이경우, 다른 단백질은 활성화되어, 다양한 기능을 수행할 수 있다. 일부의 경우, 세포질 부분이 자동인산화되거나 인산화되어, 이것의 활성의 변화가 야기된다. 이들 사건은 자주 칼슘, 고리형 아데노신 일인산염, 이노시톨 포스페이트, 디아실글리세롤 등과 같은 2차 메신저와 결합된다. 리간드가 결합되면 특정 신호가 유도된다.

상이한 리간드를 사용함으로써 신호를 유도시키고자 하는 다수의 경우가 있다. 예를 들어, 특정 T 세포를 활성화시키고자 할 수 있는데, 그 후, T 세포는 세포독성제로서, 또는 인터루킨, 콜로니 자극 인자 또는 그 밖의 사이토킨을 분비시켜서, 또 다른 세포를 자극시킴으로써 활성화제로서 유효하게 될 것이다. 항원을 인지하는 T 세포 수용체의 능력은 숙주 MHC 분자의 성질에 의해 제한된다. 따라서, MHC 제한되지 않은 리간드 결합 도메인이 T세포 수용체의 신호변환 도메인에 직접 결합되어 있는 키메라 T 세포 수용체를 사용하면, MHC의 유전적 배경에 관계없이, 생성되는 공학적 이펙터 T 세포를 임의의 개체에서 사용할 있게 된다. 이러한 방식으로, 리간드를 변화시켜, 바람직한 반응을 개시시킬 수 있으며, 이 경

우, 어떤 이유로 인해 천연 제제는 유용하지 않을 수 있다.

따라서, 바람직한 신호를 변환시키기 위하여 정상 리간드 이외의 리간드를 사용하는 것을 제공함에 있어서, 세포 반응을 조절하는 방법을 찾는 데 본 발명의 관심이 있다.

[관련문헌]

T-세포 항원 수용체는 CD3의 이종이량체와 불변쇄사이에 비공유결합을 갖는다 [Weiss and Imboden (1987) Adv. Immunol., 41 : 1-38 ; Cleavers et al. (1988) Ann. Rev. Immunol., 6 : 629-662 ; Frank et al., (1990) Sem. Immunol., 2 : 89-97]. 제타(zeta)사슬의 설명은 애쉬웰과 클라우스너의 참고문헌에서 찾아볼 수 있다 [Ashwell and klausner (1990) Ann.Rev.Immunol., 8 : 139-167].

T-세포 수용체 ('TCR')에 의한 포스파티딜이노시톨-특이적 포스포 리파아제 C 개시된 활성화는 다음 참고문헌에 실려 있다. [Weiss et al.(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 416-4173 ; Imboden and Stobo(1985) J. Exp. Meol., 161 : 446-456]. TCR은 또한 티로신 키나아제를 활성화시키고 [Samelson et al. (1986) Cell, 46 : 1083-1090 ; Patel et al.(1987) J. Biol Chem., 262 : 5831-5838 et al. (1989) J. Biol. Chem., 264 : 10836-10842], 제타 사슬은 키나아제 경로의 기질중 하나이다 Baniyash et al. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 18225-18230 ; Samelson et al.(1986), 상기 동일문헌]. 티로신 키나이제의 src족의 하나인 Fyn은 CD3 복합체와 공침전되어 CD3 복합체를 TCR-활성화된 키나아제에 대한 우수한 후보로 만든다고 보고되어 있다 [Samelson et al.(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 4358-4362].

TCR 복합체에서 제타 사슬의 성질은 문헌[Baniyash et al. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 9874-9878 : Orloff et al. (1989) 상기동일문헌, 264 : 14812-14817]에 기재되어 있다. 이종이량체 제타 및 에타 단백질은 문헌[Jin et al.(1990) Proc. Natl. Acaol. Sci. USA 87 : 3319-3323]에 설명되어 있다. 또한 호모-및 이종량이체의 설명은 문헌[Mercep et al. (1988) Sceince, 242 : 571-574 ; Mercep et al. (1989) Science, 246 : 1162-1165]에서도 찾아볼 수 있다. 또한 [Sussman et al. (1988) Cell, 52 : 85-95]도 참조할 수 있다. 제타 단백질의 역할에 대해서는 문헌을 참고할 수 있다. [Weissman et al. (1989) EMBO, J., 8 : 3651-3656 ; Frank et al. (1990) Science, 249 : 174-177 ; Lanier et al. (1989) Nature, 342 : 803-805].

비만세포 및 호염기성 세포상에 발현되는 Fcε R1 수용체의 감마 서브유닛 및 그것의 제타 사슬에 대한 동종성에 대한 설명은 다음문헌을 참고한다 [Bevan and Cnnha-Melo (1988) Prog. Allergy, A2 : 123-184 ; Kinet (1989) Cell, 57 : 31-354 ; Benhamou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 5327-5330 ; Orloff et al. (1990) Nature, 347 : 189-191].

[발명의 요약]

세포내 2차 메신저 활성화는, 자주 키나아제를 포함하는, 신호의 변환 및 2차 메신저 시스템의 활성화와 관련된 세포질 영역 및 특정 리간드에 결합하여 결합 복합체의 형성시에 신호를 세포질 영역에 전달시킬 수 있는 세포외 영역을 갖는 키메라 단백질을 사용함으로써 달성된다. 특히, TCR의 제타 및 에타사슬과 FCε R1의 감마 사슬의 세포질 서열이 사용되어, 경막 도메인(trans-membrane domain)에 의해 천연 세포외 영역 이외의 영역에 결합된다. 이러한 방식으로, 키메라 단백질을 발현시킬 수 있는 세포는, 세포질 부분에 대한 정상적인 활성화 방식과는 대조적으로, 리간드와 접촉됨으로써 활성화될 수 있다.

[특정 구체예의 설명]

본 발명은 신규한 DNA 서열, 예를 들어 발현 카세트 및 벡터의 일부로서의 DNA 서열 뿐만 아니라, 세포내에 이들을 존재시키는 것에 관한 것이며, 여기에서, 신규한 서열은 천연적으로 함께 존재하지 않은 3개의 도메인 : (1) 신호를 정상적으로 변환시켜 메신저 시스템의 활성화를 유발시키는 세포질 도메인, (2) 외부 세포막을 가로지르는 경막도메인 및 (3) 리간드에 결합하여 신호를 세포질 도메인에 전달시킴으로써 메신저 시스템을 활성화시키는 세포외 수용체 도메인을 포함한다.

세포질 도메인은 일반적으로 G 단백질을 배재한, 여러 가지 메신저 시스템을 활성화시키는 것으로 공지된 단백질로부터 유도될 수 있다. 세포질 도메인이 유도되는 단백질은 그 자체가 리간드 결합 능력을 가질 필요는 없으며, 이러한 단백질은 리간드 결합 능력을 제공하는 또 다른 단백질과 결합할 수 있으면 충분하다. 관심의 세포질 영역으로는 T 세포 수용체의 제타 사슬, 제타 mRNA의 또 다른 스플라이싱의 결과로써 제타 사슬과 대부분의 C-말단 엑손만이 상이한 에타 사슬 및 FcεR1 수용체의 감마 서브유닛, 및 리간드에 결합할 수 있는 기타 단백질과의 상호작용의 결과로써 신호를 전달할 수 있는 그 밖의 세포질 영역이 있다.

일반적으로 약 50 내지 500 아미노산인 다수의 세포질 영역 또는 이것의 기능적 단편 또는 돌연변이체가 사용될 수 있으며, 여기에서, 전체 천연 세포질 영역 또는 이것의 활성 부분만이 사용될 수 있다. 특히 관심있는 세포질 영역은 하나 이상의 2차 메신저 경로, 특히, 단백질 키나이제, 보다 특히, 단백질 키나아제 C(PKC)와 관련된 경로와 관련될 수 있는 세포질 영역이다.

관심의 경로로는 2차 메신저인 이노시톨-1,4,5-트리포스페이트와 디아실글리세롤을 생성시키는 포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트의 가수분해와 정상적으로 관련된, 포스파티딜이노시톨 특이적 포스포리파아제 관련된 경로가 있다. 또 다른 경로는 칼슘 매개성 경로이며, 이것은 키메라 단백질의 세포질 부분에 의한 직접 또는 간접 활성화의 결과일 수 있다. 또한, 그 자체로서 또는 또 다른 경로와 결합되어 키메라 단백질의 세포질 부분의 인산화를 포함할 수 있는 키나아제 경로가 관련될 수 있다. 하나 이상의 아미노산 측쇄, 특히 티로신이 인산화될 수 있다. 티로신 키나아제와 scr 패밀리의 일원인 fyn이 제타 사슬과 관련이 있을 수 있다는 몇몇 증거가 있다.

통상 전체 세포질 영역이 사용될 것이지만, 많은 경우, 전체 사슬을 사용할 필요는 없을 것이다. 절단된 단백질이 사용될 수 있을 정도까지는, 이러한 절단된 단백질은 온전한 사슬 대신 사용될 수 있다.

경막 도메인은 세포질 부분을 제공하는 단백질의 도메인, 세포외 부분을 제공하는 단백질의 도메인 또는 완전히 상이한 단백질과 결합된 도메인일 수 있다. 대부분의 경우, 기타 도메인 중의 하나 또는 다른 도메인, 특히 세포외 도메인과 천연적으로 결합된 경막 도메인을 갖는 것이 편리할 것이다. 몇몇 경우에는, 이황화물 결합을 형성할 수 있는 시스테인 잔기를 함유하는 제타, 에타 또는 FcεR1 감마 사슬의 경막 도메인을 사용하여, 생성되는 키메라 단백질이 자체적으로 또는 변형되지 않는 형태의 제타, 에타, 감마 또는 관련 단백질과 이황화물 결합된 이량체를 형성할 수 있는 것이 바람직할 것이다. 몇몇의 경우에는, 경막 도메인은 동일하거나 상이한 표면막 단백질의 경막 도메인에 대한 이러한 도메인의 결합이 방지되도록 선택될 것이다.

세포외 도메인은 리간드 결합 및/또는 신호 변환과 관련된 광범위한 세포외 도메인 또는 분비된 단백질 중의 어느 하나로부터 수득될 수 있다. 세포외 도메인은 단량체, 동종이량체, 이종이량체 단백질 또는 비공유 복합체의 형태로 다수의 단백질과 결합된 단백질의 일부일 수 있다. 특히, 세포외 도메인은 CH1과 힌지(hinge) 영역의 존재에 의하여 Ig 경쇄와 공유결합될 수 있는 Ig 중쇄로 구성될 수도 있RJSK 힌지, CH2 및 CH3 도메인의 존재에 의하여 그 밖의 Ig 중쇄/경쇄 복합체와 공유결합될 수 있는 Ig 중쇄로 구성될 수도 있다. 후자의 경우, 키메라 구조물에 결합되는 중쇄/경쇄 복합체는 키메라 구조물의 항체 특이성과는 상이한 특이성을 갖는 항체를 구성할 수 있다. 항체의 기능, 소망하는 구조 및 신호 변환에 따라, 전체 사슬 또는 절단된 사슬이 사용될 수 있으며, 여기에서, CH1, CH2, 또는 CH3 도메인의 일부 또는 전부가 제거될 수 있거나 힌지 영역의 일부 또는 전부가 제거될 수 있다. 또한, 다양한 천연 수용체가 사용될 수 있으며, 이 경우, 수용체는 CD4, CD8-알파 또는 사이토킨과 같은 표면 막 단백질, 또는 호르몬 수용체와 결합된다. 수용체는 천연 리간드, 항체 또는 이것의 단편, 합성 분자, 예를 들어 약제, 또는 신호를 유도할 수 있는 임의의 그 밖의 제제에 대해 반응성일 수 있다.

수용체가 단백질의 분자 복합체이고, 이들 중 하나의 사슬만이 리간드에 결합하는 주요한 역할을 갖는 경우, 리간드 결합 단백질의 세포외 부분만을 사용하는 것이 일반적으로 바람직할 것이다. 세포외 부분이 그 밖의 단백질의 그 밖의 세포외 부분과 복합체를 형성하거나 이황화물 결합을 통하여 공유 결합을 형성할 수 있는 경우, 이러한 이량체 세포외 영역의 형성이 또한 제공될 수 있다. 또한, 전체 세포외 영역이 필요하지 않은 경우, 전체 세포외 영역의 절단된 부분이 사용될 수 있으며, 이 경우, 절단된 부분은 기능적이다. 특히, CD4의 세포외 영역이 사용되는 경우, gp120, 즉, HIV 엔벨로프 당단백질의 결합에 필요한 서열만이 사용될 수 있다. Ig가 세포외 영역으로서 사용되는 경우, 항체 분자의 항원 결합 영역만이 사용될 수 있고, 분자의 불면 영역(예를 들어, CH2와 CH3 도메인으로 구성된 Fc영역)은 사용되지 않을 수 있다. 경쇄 및 중쇄 영역은 함께 융합되어 가변영역을 형성할 수 있다.

몇몇 경우에, 천연 단백질의 결합 영역에 있는 수 개의 아미노산, 통상 10개 이하, 보다 통상적으로는 5개 이하의 아미노산이 결실될 수 있다. 또한, 경계 부분에 소수의 아미노산, 통상 10개 이하, 보다 통상적으로는 5개 이하의 아미노산을 도입시키고자 할 수 있다. 아미노산의 결실 또는 삽입은 편리한 제한 부위, 용이한 조작, 발현 수준의 향상 등을 제공하는 구성의 필요에 대한 결과인 것이 보통일 것이다. 또한 유사한 이유로, 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산으로 치환시키고자 할 수 있으며, 이 경우, 임의의 한 도메인에서 약 5개 미만의 아미노산이 치환되는 것이 보통이다. 전술한 바와 같이, 세포질 도메인을 사용되는 특정 도메인에 따라, 약 50 내지 500개의 아미노산인 것이 일반적일 것이다. 경막 도메인은 일반적으로 약 25개 내지 50개 아미노산을 가지는 반면, 세포외 도메인은 일반적으로 약 50개 내지 500개 아미노산을 가질 것이다.

일반적으로, 키메라 단백질을 표면 막으로 유도시키는 오픈 리딩 프레임(ORF)의 5'말단에 있는 신호 서열은 세포외 도메인의 신호서열일 것이다. 그러나, 몇몇 경우에, 이 서열을 상이한 신호 서열로 교환시키고자 할 수 있다. 그러나, 신호 서열은 단백질이 표면 막으로 유도되는 동안에 프레세싱되어 단백질로부터 제거되기 때문에, 특정 신호 서열은 일반적으로 본 발명에 대해 중요하지 않을 것이다. 유사하게는, 신호 서열과 결합되는 부위는 천연 절단 부위일 것이며, 이것은 또한 일반적으로 신호 서열 또는 세포외 도메인과 결합된 천연 절단 부위일 것이다.

본 발명에 따른 키메라 단백질을 코드화하는 키메라 구조물은 종래 방법으로 제조될 것이다. 대부분의 경우, 천연 서열이 사용될 수 있기 때문에, 필요에 따라 천연 유전자가 단리되고 조작되어, 다양한 도메인이 적절히 결합될 수 있다. 따라서, 유전자의 바람직하지 않은 부분들의 결실을 유도하는 적절한 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용함으로써 서열의 절단된 부분을 제조할 수 있다. 대안적으로, 프라이머 수복이 사용될 수 있는데, 이 경우, 관심의 서열이 적절한 숙주에 클로닝될 수 있다. 각각의 경우, 말단을 생성시키는 프라이머가 사용될 수 있는데, 이것은 서열을 어닐링시킴으로써 키메라 단백질을 코드화하는 소망하는 오픈 리딩 프레임을 생성시킨다. 서열은 평활 말단이거나 상보적인 중첩 부분을 갖는 제한 부위를 제공하도록 선택될 수 있다. 연결 동안에, 혼성화 및 연결에 의해 원래 제한 부위 중의 어느 하나가 재생성되지 않는 것이 바람직하다.

바람직한 경우, 세포외 도메인은 표적 숙주에서 발현이 이루어지게 하는 전사 개시 영역을 또한 포함할 수 있다. 대안적으로, 표적 숙주, 이러한 숙주내로 키메라 단백질을 도입시키는 목적, 소망하는 발현 수준, 표적 숙주의 성질 등에 따라, 구조적 또는 유도적 발현이 이루어지게 할 수 있는 상이한 전사 개시 영역을 제공하고자 할 수 있다. 따라서 표적 숙주의 분화 또는 성숙, 표적숙주의 활성화 등이 일어날 때 발현될 수 있다.

구조성이거나 유도성인 광범위한 프로모터가 문헌에 기재되어 있으며, 여기에서, 유도는 특정한 세포 타입 또는 특정한 성숙 수준과 관련될 수 있다. 대안적으로, 또한 사용될 수 있는 다수의 바이러스 프로모터가 공지되어 있다. 관심의 프로모터로는 β-액틴 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 사람 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 프렌드(Friend) 비장 포커스(fous) 형성 바이러스 프로모터가 있다. 프로모터는 인핸서와 결합될 수 있거나 결합되지 않을 수 있으며, 여기에서, 인핸서는 천연적으로 특정한 프로모터와 결합될 수 있거나 상이한 프로모터와 결합될 수 있다.

오픈 리딩 프레임의 서열은 게놈 DNA, 즉, cDNA로부터 수득되거나, 합성되거나 또는 이들의 조합물일 수

있다. 게놈 DNA의 크기 및 인트론의 수에 따라, cDNA 또는 이것의 조합물이 사용될 수 있다. 많은 경우, 인트론은 mRNA를 인정화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, mRNA를 안정화시키는 비코딩 영역이 제공될 수 있다.

종결 영역은 세포질 도메인에 대해 3'쪽에 제공되며, 여기에서, 종결영역은 세포질 도메인과 천연적으로 결합될 수 있거나 상이한 공급원으로부터 유도될 수 있다. 대부분의 경우, 종결 영역은 중요하지 않으며, 광범위한 종결 영역이 발현에 불리한 영향을 미침이 없이 사용될 수 있다.

다양한 조작이 시험관내에서 수행될 수 있거나, 적당한 숙주, 예를 들어 대장균에서의 클로닝을 위해 벡터내로 도입될 수 있다. 따라서, 각각의 조작후, DNA 서열의 결합으로부터 생성된 구조물이 클로닝될 수 있고, 벡터가 단리될 수 있으며, 원하는 키메라 단백질을 코드화하는 서열을 확인하기 위해 서열이 스크리닝될 수 있다. 서열은 제한 분석, 서열화 등에 의해 스크리닝될 수 있다. 클로닝 전에, 서열은 PCR과 적절한 프라이머를 사용하여 증폭됨으로써 바람직한 오픈 리딩 프레임의 충분한 양이 제공될 수 있지만, 전체 오픈 리딩 프레임의 일부에 대해 실질적인 상동성을 갖는 오염성 DNA 단편의 양은 감소된다.

표적 세포는 임의의 편리한 방식으로 키메라 구조물에 의해 형질전환될 수 있다. 기법으로는 인산 칼슘 침전성 DNA 형질전환, 일렉트로포레이션, 원형질체 융합, DNA 피복된 입자를 사용하는 바이오리스틱스(biolistics), 트랜스펙션 및 감염이 있으며, 여기에서, 키메라 구조물은 적절한 바이러스, 특히 비복제성 형태의 바이러스 등에 도입된다.

표적 숙주가 형질전환되면, 통합(integration)이 일어나는 것이 일반적일 것이다. 그러나, 벡터의 적절한 선택에 의해, 에피솜 유지가 제공될 수 있다. 다수의 벡터는 바이러스 기원인 것으로 알려져 있으며, 여기에서, 세포내에 유지되는 바이러스의 복사체 갯수는 세포의 생존성을 유지시킬 정도로 충분히 낮다. 예시적인 벡터로는 SV40, EBV 및 BPV가 있다.

구조물은 이것이 표적 숙주 고유의 다른 표면 막 단백질과 상호작용하는 것을 방지하도록 고안될 것이다. 따라서, 대부분의 경우, 표면 막에 존재하는 다른 단백질에 대한 키메라 단백질의 결합이 방지될 것이다. 이것을 달성하기 위해, 다른 경막 도메인에 결합하지 않는 것으로 알려져 있는 경막 도메인이 선택될 수 있고, 예를 들어, 시스테인을 치환시키는 것과 같이 특정 아미노산이 변형될 수 있으며, 기타 여러 가지 방법이 있다.

형질전환된 숙주가 키메라 단백질을 소망하는 조절에 따라 원하는 수준으로 표면 막 단백질로서 발현시킬 수 있다는 것이 입증되면, 경막 단백질이 원하는 신호 유도를 제공하기 위해 숙주에서 기능적인 지를 측정할 수 있다. 특정 세포질 도메인의 신호 유도의 효과가 알려질 것이기 때문에, 키메라 단백질의 작용력을 입증하기 위해 정립된 유도 측정용 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, TCR 결합에 ㄴ의해 CD69 발현이 유도된다. 따라서, 숙주 세포가 활성화시 CD69를 발현시키는 것으로 알려져 있는 경우, 형질전환된 세포를 규정된 리간드와 접촉시킨 후, CD69의 발현에 대해 검정할 수 있다는 것은 제타 세포질 도메인을 갖는 키메라 단백질로 예측될 것이다. 물론, 특정 세포질 도메인과 결합된 다른 단백질로부터의 보조 신호가 필요하지 않기 때문에, 신호의 변환을 제공하지 못하는 것이 특정 표적 숙주에서의 키메라 단백질의 비작동성에만 기인할 수 있다는 것을 아는 것이 중요하다.

광범위한 표적 숙주가 사용될 수 있으며, 척추 동물, 보다 특히, 포유 동물, 바람직하게는 가축 또는 영장류, 특히 사람으로부터의 세포인 것이 일반적이다. 본 발명의 키메라 구조물은 신호 변환에 의해 조절되는 특정 경로의 연구을 위해, 상이한 리간드를 사용하여 세포 반응을 개시시키기 위해, 예를 들어 림프구의 특정 서브샛의 활성화를 유도시키기 위해 사용될 수 있으며, 이 경우, 림프구는 정상 세포 상의 특이적인 표면 막 단백질과 구별될 수 있는 특이한 표면 막 단백질을 제공하는 세포, 예를 들어 신생 세포, 바이러스 감염된 세포, 또는 다른 질병 세포의 특정 표면 마아커에 의해 활성화될 수 있다. 세포는 추가로 변형되어 발현 카세트가 도입될 수 있으며, 여기에서, 형질전환된 세포의 활성화에 의해 특정 생성물이 분비될 것이다. 이러한 방식으로, 인터페론, TNF, 퍼포란(perforan), 천연 세포독성제 등과 같은 특이한 제제의 유도된 전달이 제공될 수 있으며, 이 경우, 분비의 수준은 천연적 분비보다 훨씬 증가될 수 있다. 또한, 세포는 반응의 국소화를 제공하도록, 주사, 카테테르 등을 사용하여 부위에 특이적으로 유도될 수 있다.

본 발명은 세포독성 림프구(CTL), 천연 킬러 세포(NK), 종양 침투성 림프구(TIL), 호중구, 호염구, T 헬퍼 세포, 또는 활성화되면 표적 세포를 치사시키거나 사이토킨을 분비시킬 수 있는 기타 세포에 사용될 수 있다. 따라서, 질병에 걸린 세포, 예를 들어 HIV, HTLV-Ⅰ 또는 Ⅱ, 사이토메갈로바이러스, B형 또는 C형 간염 바이러스, 미오박테리움 아비움 등으로 감염된 세포 또는 신생 세포(여기에서, 질병에 걸린 세포는 질병에 걸린 상태와 관련된 표면 마아커를 가짐)는 세포독성 세포 또는 사이토킨 분비 세포의 특이적인 표적이 될 수 있다. 또는, 펩티드 리간드와 복합체화된 특정 MHC 단백질은 본 발명의 키메라 T 세포 수용체에 의해 인지되는 표적일 수 있다. 병원체 또는 종양 질환의 표면 마아커, 예를 들어 HIV의 경우, gp 120에 결합하는 수용체 세포외 도메인, 예를 들어 CD4를 제공함으로써, 세포는 치료제로서 작용할 수 있다. 추가로 기능성 클래스 Ⅰ 및/또는 Ⅱ MHC 항원의 발현 또는 전좌를 방지시키도록 세포를 변형시킴으로써, 세포가 숙주 면역계에 의해 외래 물질로서 인지되는 것이 방지될 수 있기 때문에, 세포는 유전적 배경에 관계없이 임의의 개체에서 치료적으로 사용될 수 있다. 또한 숙주 세포를 단리시키고, 본 발명의 구조물로 트렌스펙팅시킨 후, 트랜스펙팅된 숙주 세포를 숙주에 귀환시킬 수 있다.

다른 용도로는 키메라 구조물의 합성을 유도하는 레트로바이러스 벡터 구조물로, 주어진 개체로부터의 숙주 세포를 형질전환시키는 것이 있다. 이러한 세포의 형질전환 및 환자 체내로의 재도입에 의해, 자가이식 유전자 치료법이 달성될 수 있다.

항체 수용체에 대하여, 관심의 리간드로는 바이러스 단백질, 예를 들어 사람 사이토메갈로바이러스의 gB 엔벨로프 당단백질, 및 특이적 또는 중폭된 방식으로 암세포 상에서 발견되는 표면단백질, 예를 들어 사람 유방 및 난소 암종에서 종종 증폭되는 HER-2 단백질이 있을 수 있다. 기타 수용체에 대해, 특히 관심있는 수용체 및 리간드는 CD4(여기에서, 리간드는 HIV gP120 엔벨로프 당단백질임), 및 다른 바이러스

수용체, 예를 들어 사람 리노바이러스에 대한 수용체인 ICAM 및 폴리오바이러스에 대한 관련 수용체분자이다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 예시되며, 이들에 제한되지 않는다.

[실험]

[재료 및 방법]

[CD 8/ζ 키메라 구성]

중합효소 연쇄 반응, PCR (참조: Mullis et al. (1986) Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, LI, 263-273)을 사용하여 pSV7d-CD8α로부터의 CD8α의 세포외 및 경막 부분(잔기 1-187)과 pGEM3zζ로부터의 사람 ζ 사슬의 세포질부분(잔기31-142)을 증폭시켰다. DNA 서열은 문헌 [Littman et al. (1985) Cell 40:237-246; CD8] 및 [Weissman et al. (1988) Proc Natl.Acad. Sci. USA, 85 : 9709-9713;ζ]에 공지되어 있다. 플라스미드 pSV7d-CD8α와 pGEM3zζ는 각각 단 리트만(Dan, Littman) 박사 및 줄리 터너(Julie Turner) 박사(University of CA,S.F.)와 알.디.클라우스너(R.D. Klausner) 박사 및 에이.엠. 바이스만(A.M. Weisman) 박사(N.I.H)의 호의로 제공받았다. CD8 단편의 3'서열과 제타 단편의 5'서열을 코드화하는 프라이머를, 2개의 생성물의 어닐링에 의해 혼성체 주형이 생성될 정도로 중합되도록 고안하였다. 이 주형으로부터, XbaI과 BamHI 클로닝 부위를 함유하는 외부 프라이머를 사용하여 키메라를 증폭시켰다. CD8/ζ 키메라를 PTfneo[참조: Ohashi et al. (1985) Nature, 316 : 606-609]내로 서브클로닝시키고, 생거(Sanger)의 디데옥시 뉴클레오티드 기법[참조: Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 74 : 5463-5467]에 의해 서열화하였다.

[항체]

C305와 Leu4 mAb는 각각 주르카트(Jurkat) Ti β 사슬과 CD3ε의 세포외 결정기를 인지한다. ATCC로부터 입수되는 OKT8은 CD8의 세포외 에피토프를 인지한다. 쥐과 동물ζ서열[참조: Orloff et al. (1989) J.Biol. Chem, 264 : 14812-14817]의 아미노산 132 내지 144를 포함하는 펩티드에 대해 유도된 항 ζ토끼 항혈청 #387은 알.디.클라우스너 박사, 에이.엠.바이스만 박사 및 엘.이.사멜슨(L.E. Samelson) 박사의 호의로 제공받았다. 항-포스포티로신 mAb인 4G10은 디. 모리슨(D.Morrison) 박사, 비.드루커(B. Druker) 박사 및 티.로버츠(T. Roberts) 박사의 호의로 제공받았다. W6/32는 사람 HLA 클레스 1 항원 상에 발현된 불변체 결정기를 인지한다. CD69와 반응하는 Leu 23은 백톤-디킨슨 모노클로날 센터(Becton-Dickinson Monoclonal Center, Milpitas, Ca.)로부터 입수하였다. MOPC 195인 IgG2a(참조: Litton Bionetics, Ken sington, MD)를 FACS 분석에서 대조 mAb로서 사용하였다. 다른 언급이 없는 한, 모든 실험에서, mAb의 복수액을 1:1000의 최종 희석률(포화농도)로 사용하였다.

[셀 라인 및 트랜스펙션]

사람 백혈병 T 셀 라인 쥬르카트와 이것의 유도체인 J.RT3-T3.5를 10% 우태아혈청(FBS), 글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신(Irvin Scientific)이 첨가된 RPMI 1640에서 유지시켰다. 키메라 트랜스펙팅된 클론을, 제네티신(Geneticin; GIBCO, Grand Island, NY) 2mg/㎖을 첨가시킨 상기 배지에서 계대배양시켰다. 쥬르카트 및 J.RT3-T3.5내로의 pTfneo-CD8/ζ의 일렉트로포레이션은, 10^7개 세포당 플라스미드 2㎍으로, 전압 250V 및 정전용량 960㎌을 사용하여 바이오-래드 진 펄서(Bio-Rad Gene Pulser)에서 수행하였다. 트랜스펙션 후, 세포를 2일간 RPMI에서 증식시킨 후, 제네티신 함유 배지에 플레이팅시켰다. 제한 희석에 의해 클론을 수득하고, TCR 및 유동 세포계측법(이하 참조)에 의해 CD8/ζ 발현에 대해 스크리닝하였다. 야생형 CD8 단백질로 트랜스펙팅된 쥬르카트 CD8 클론은 줄리 터너 박사와 단 리트만 박사의 호의로 제공받았다.

[유동 세포계측법]

약 1×10^6개 세포/조건을 포화 농도의 항체로 염색한 후, 플루오레이신 컨쥬게이팅된 염소 항-마우스 Ab와 함께 인큐베이팅한 다음, 이미 공지된 바와 같이[참조: Weiss 및 Stobo 1984, 1984] FACScan(Beckton Dickinson)에서 분석하였다. CD69 발현에 대해 분석된 세포를 플루오레신 컨쥬게이팅된 Leu 23(항-CD69 mAb) 또는 MOPC 195(대조 mAb)로 직접 염색하였다.

[형광계측법에 의한 $[Ca^{+2}]i$측정]

칼슘 민감성 형광을 공지된 바와 같이[참조: Goldsmith 및 Weiss, 1987, Proc. Natl. Acad. Sck USA, 84 : 6879-6883] 모니터하였다. 세포를, 포화 농도(복수액의 1:1000 희석)의 가용성 mAb C305와 OKT8로 자극하였다. 최대 형광은 트리톤(Triton)×-100으로 세포를 용해시킨 후 측정되었고, 최소 형광은 EGTA에 의해 Ca^{+2} 가 킬레이팅된 후 수득되었다. $[Ca^{+2}]i$는 공지된 방정식 $[Ca^{+2}]i=Kd\ S\ (F\ 관찰값-F\ 최소값)/(F\ 최대값-F\ 관찰값)$(Kd = 250nM)[참조: Grynkiewica et al. (1985) J. Biol. Chem., 260 : 3440-3448]을 사용하여 측정하였다.

[인산 이노시톨 측정]

세포를, 인산염 완충 식염수 중의 1㎖ 당 40μCi의 $[^3H]$ 미오-이노시톨(Amersham)로 3시간 동안 로딩시킨 후, 10% 우태아 혈청이 첨가된 RPMI 1640에서 밤새 배양하였다. 세포를 10mM LiCl의 존재하여 복수액의 1:1000 희석률의 지정된 항체로 15분간 자극하여, IP_1의 탈인산화를 억제하였다. 가용성 인산 이노시톨의 추출 및 정량은 문헌에 기재된 바와 같이 수행하였다[참조: Imboden 및 Stobo (1985) J. Exp. Med., 161 : 446-456].

[표면 요오드화]

세포를 문헌에 기재된 바와 같이[참조: Weiss 및 Stobo (1984) J. Exp. Med., 160 : 1284-1299] 락토퍼옥시다아제/글루코오스 옥시다아제(Sigma) 과정을 사용하여 1251로 표지하였다.

[면역침전]

세포를, 프로테아제 억제제, 1mM PMSF, 아프로티닌 및 루펩틴(leupeptin)의 존재하에, 1% NP40(Nonidet P40), 150mM NaCl, 및 10mM Tris pH7.8 중에서, 2×10^7 개 세포/200㎖로 용해시켰다. 포스포티로신 함량에 대해 분석하고자 하는 용해물에 대한 용해 완충액에는 문헌에 기재된 바와 같이[참조: Desai et al. 1990. Nature, VOL. 348 : 66-69] 포스파타아제 억제제를 첨가하였다. 요오드화된 용해물에, 10mM 요오도아세트아미드를 첨가하여 용해후 이황화물 결합 형성을 방지하였다. 디기토닌 용해를 1% 디기토닌, 150mM NaCl, 10mM Tris pH 7.8, 0.12% Triton X-100 중에서 수행하였다. 4℃ 에서 30분 후, 용해물을 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 고정된 황색 포도상구균(Staph A; Calbiochem-Behring)으로 사전세척(preclean)하였다. 또는, 용해 전에 항체로 자극된 세포의 용해물을 세파로오스 비이드로 사전세척하였다. 사전세척된 용해물을 면역침전 항체를 사전부착(prearmed)시킨 단백질 A 세파로오스 CL-4B 비이드와 인큐베이팅하였다. 세척된 면역침전물을 SDS 샘플 완충액 +/-5% β-메르캅토에탄올 중에 재현탁시키고, 비등시킨 후, 11% 폴리아크릴아미드 겔상에서 전기영동하였다.

[포스포티로신 함량의 평가를 위한 세포의 자극]

세포를 복수액의 1:250 희석률의 항체에 의해 2×10^7개 세포/200㎖로 혈청 유리 배지에서 자극시켰다. 37℃ 에서 2분후, 배지를 흡인시키고, 세포를 NP40 용해 완충액 100㎖ 중에서 용해시켰다. 용해물을 사전세척한후, 초원심분리하고, 샘플을 SDS PAGE에 의해 분석하였다.

[면역블롯]

겔을 전달 완충액(20mM Tris-염기, 150mM 글리신, 20% 메탄올)에서 30분 동안 평형시키고, 25볼트로 밤새 작동하는 바이오-레드 웨스턴 블롯팅 장치내의 니트로셀룰로오스 막에 옮겼다. 막을 1.5% 오발부민이 첨가된 TBST(10mM Tris HCl [pH 8], 150mM NaCl, 0.05% 트윈 50)에서 차단시킨후, mAb 4G10 또는 토끼 항-ζ 항혈청(#387) 중의 어느 하나와 인큐베이팅시켰다. 면역블롯을 세척하고 알칼리성 포스파타아제 컨쥬게이팅된 염소 항-마우스 또는 염소 항-토끼 항체의 1:7000 희석액과 인큐베이팅시켰다. 1 내지 2시간 후, 블롯을 세척하고, 제조업자(Promega)의 지시에 따라, 니트로블루테트라졸리움 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트 기질을 사용하여 전개시켰다.

[IL-2 생물학적검정]

자극을 위해, 세포를 4℃에서 30분간 포화 농도(복수액의 1:1000 희석률)의 지정된 항체로 피복시켰다. 결합되지 않은 항체의 제거 후, 세포를 토끼 항-마우스 Ig(Zymed Labs)로 사전피복되어 있는 24-웰 조직배양 플레이트 상으로 스피닝시키고, 10% FBS가 첨가된 배지로 차단시켰다. 포르볼미리스테이트 아세테이트(Phorbol myristate acetate)인 PMA(Sigma)와 이오노마이신(Calbiochem)을 각각 최종 농도 10mg/㎖과 1mM에 첨가하였다. 세포가 없는 상층액을 20시간 후 수거하여, 문헌에 기재되어 있는 바와 같이[참조: Mosmann 1983, J.Immunol. Meth., 65 : 55-63] MTT 비색측정법에서, IL-2 의존성 CTLL-2.20 셀 라인을 사용하여 IL-2 함량에 대해 평가하였다.

[결과]

T 세포 수용체 포지티브 및 T 세포 수용체 네가티브 쥬르카트 세포에서 CD8/ζ 키메라의 특징화

전술된 CD8/ζ 키메라 구조물을, 일렉트로포레이션에 의해, 쥬르카트 사람 백혈병 T 셀 라인에 트랜스펙팅시켜, 클론 JCD8/ζ2를 생성시키고, 쥬르카트 유도된 돌연변이체인 온길이 Ti β사슬 전사체 및 단백질이 결여된 JRT3.T3.5에 트랜스펙팅시켜, Jβ-CD8/ζ14를 생성시켰다. JRT3.T3.5가 정상 수준의 Tiα와 CD3 서브유닛을 발현시킨다고 하더라도, Tiβ 발현의 결여에 의해 세포 표면 상에서 TCR이 발현되지 않는다[참조: Ohashi et al.(1985) Nature, 316 : 606-609]. 이런 세포안으로 키메라의 형질전환은 추가의 TCR 사슬의 복잡한 결합없이 ζ의 신호화 표현형의 평가를 가능하게 하였다. 안정하게 형질전환된 클론에서 키메라의 및 TCR의 표면발현의 수준은, CD8(OKT8) 또는 TCR의 CD3ε서브유닛(Leu 4)중 어느 하나를 인지하는 mAb를 사용하여 유동 세포계측법에 의해 정량하였다. 둘 다 고수준의 CD8/ζ을 발현하는 상기 클론의 형광 히스토그램을 관찰하였다. : 이 세포를 모든 실험의 대조표준으로서 사용하였다. 세개의 클론은 비교할만한 수준의 CD8 에피토프 및 T 세포 수용체를 발현한다. 단, 예외적으로, Jβ-CD8/z 14는 표면 TCR을 발현하지 못한다. 그로써, CD8/ζ 키메라는 TCR 사슬의 부재시에 세포 표면 상에 발현될 수 있다.

CD8/ζ 키메라 단백질의 구조를 특성확인하기 위하여, 세포의 표면을 방사선요오드 처리하고, 1% NP40에 용해시킨 후 OKT8 또는 쥐과의 ζ의 세포질 펩티드 서열에 대하여 발생한 정상 토끼 항혈청으로 면역침전시켰다. 환원 조건하에서, CD8 또는 ζ에 대한 항체는 키메라-형질전환된 세포로부터의 34 내지 35KD의 단일한 단백질을 침전시키는 한편, OKT8은 쥬르카트 CD8로 부터의 야생형 CD8을 나타내는 29KD 단백질을 침전시킨다. CD8은 자신의 정상적인 환경에 있을때 외견상 분자량이 32-34KD 이지만[Snow and Terhorst(1983), J. Biol. Chem., 258 : 14675-14681], 쥬르카트 및 CD8-포지티브라인인 HPB.ALL에서의 CD8과 비교하는 예비실험은, 여기에서 관찰된 CD8의 크기의 감소가 쥬르카트 숙주에서의 다른 글리코실화 패턴으로부터 유발되는 것임을 시사한다. 비환원 조건하에서, 단백질의 보다 복잡한 패턴은 CD8과 CD8/ζ 키메라 두가지의 면역침전에서 모두 볼 수 있다. 이런 복합성은 동종다량체와 이종다량체가 이전에 관찰되었기 때문에 [Snow and Terhorst (1983), 상기동일] CD8 침전의 특성이다. 대략 70 및 100KD에서 이동하는 JCD8/ζ2로 부터의 면역침전된 2개의 눈에 띄는 종은 키메라의 동종이량체와 동종삼량체를 나타내는것 같다. 키메라의 ζ부분과 이황화물 결합을 형성하기 위해 존재하는 시스테인 잔기가 없기 때문에, 키메라에 형성된 모든 이황화물 결합은 CD8을 통해서 형성되어야 한다. 그러므로, CD8/ζ과 이종이량체를 형성하는 모든 단백질은 야생형 CD8과도 이종이량체를 형성하는 것 같고, 그로써 CD8/ζ키메라에

특이적으로 원인을 돌릴 수 있는 모든 신호화 사건을 설명하는 것 같지는 않다.

키메라와 내인성 CD3 γ,δ 및 ε과의 비공유 결합은 키메라에 의해 변환된 신호의 해석을 복잡하게 할 수 있다. ζ의 세포외 및 경막 도메인의 제거가 CD3 사슬에 무관한 ζ의 발현을 유도하기에 충분한가를 결정하기 위해서, 세포표면을 요오드로 처리한 후, TCR 복합체의 통합을 보존하는 것으로 알려져 있는 세제인 디기토닌 중에서 용해시켰다. 쥬르카트 CD8과 TCR-발현 키메라-형질전환체인 JCD8/ζ2둘 다에서 TCR의 면역침전은, CD3(Leu4) 면역침전물의 동일한 특성패턴을 나타낸다. TCR-결합된 ζ가 잘 요오드화되지는 않지만, 그것의 세포외 도메인이 표지화를 위한 티로신 잔기를 함유하고 있지 않으므로, CD3 면역침전의 면역블롯은 상기 용해 조건하에서의 존재를 확증해준다. 소량의 표지된 CD3 ε을 하기와 동일한 mAb가 TCR 결핍세포를 염색하지 못한다는 사실에도 불구하고 TCR결핍 세포의 Leu4 면역침전에서 볼 수 있다. 나타난 소량의 면역침전된 단백질은, 표지화 과정중에 소수의 침투될 수 있는 또는 비생육성 세포의 내부 CD3ε의 방사성 표지화에 기인하는 것 같다. 보다 중요하게는, TCR-포지티브 또는-네가티브 세포에서 CD8/ζ키메라의 침전물에서는 CD3 사슬을 검출할 수 없고, JCD8/ζ2의 Leu4 침전물에서도 나타나는 카메라는 없다. 자동 X선 사진의 의도적인 과다노출 또한 키메라와 공침전하는 TCR 사슬을 나타내지 못한다. 키메라와 TCR 사슬의 공-결합의 의문점을 추가로 해소하기 위하여, 키메라 발현에 미치는 TCR의 항체-유도 저하조절의 효과를 평가하였다. JCD8/ζ2를 포화량의 C305와 밤새 인큐베이션함으로 인하여, 쥬르카트 Tiβ 사슬의 에피토프에 대한 mAb는 TCR의 94%의 내부화를 야기하였고, CD8/ζ 키메라의 표면발현은 영향을 받지 않았다. 상기 2가지 독립적인 기준에 의하여 CD8/ζ과 CD3 γ,δ, 및 ε 사슬사이에는 식별할 수 있는 결합은 존재하지 않는다.

공유연결이 내인성 ζ과 CD8/ζ 키메라 사이에 존재하는지를 측정하기 위하여, 쥬르카트 CD8과 JCD8/ζ2에서의 ζ과 OKT8 면역침전을 비교하면서 ζ면역블롯 분석을 수행하였다. 항-ζ 항혈청은 JCD8/2로 부터의 키메라와 ζ둘 모두와 키메라와 면역침전할 뿐만 아니라, 쥬르카트 CD8 대조표준으로 부터의 내인성 ζ와도 면역침전한다. 항-ζ 항혈청과는 대조적으로, OKT8은 키메라와는 면역침전하지만 JCD8/ζ2에서 ζ와는 면역 침전하지 않으며, 한편 쥬르카트 CD8에서는 어떤종도 검출되지 않는다. 일괄하여, 상술된 실험의 결과는 키메라와 내인성 T세포수용체 서브유닛사이의 상호작용에 대해 반대되는 결론을 나타낸다.

[포스파티딜이노시톨 및 티로신 키나아제 경로의 활성화를 유도하는 CD8/ζ의 자극]

CD8/ζ의 세포외 도메인의 결합이 세포내 신호화 사건을 유발하는지의 여부를 측정하기 위하여, 키메라 형질전환된 세포에서 세포질 유리 칼슘([Ca+2]i)의 증가를 유도하는 OKT8의 능력을 조사하였다. 항-Tiβ 단클론성 항체 C305로 JCD8/ζ2의 TCE를 자극할때 얻어지는 형광분석 투사도를 얻었다. 가용성 OKT8을 첨가하면, 칼슘([Ca+2]i)의 실질적인 증가를 볼 수 있는데, 이것은 ζ의 세포질 도메인이 포스포리파아제 C의 활성화를 야기하는 신호화 기계에 커플링할 수 있음을 시사한다. 다음에 TCE 사슬의 표면발현이 결핍된 세포에서 신호를 변환시킬 수 있는 키메라의 능력을 조사하였다. C305로 TCR-네가티브 Jβ-CD8/ζ14를 자극하면 [Ca+2]i의 검출가능한 증가를 유도하지 않지만, OKT8은 여전히 강한 칼슘반응으로 유도할수 있다. 쥬르카트 CD8에서 OKT8을 이용한 자극시에 [Ca+2]i의 상당한 증가의 결핍은 키메라의 ζ부분이 유도된 [Ca+2]i 반응에 필요하다는 것을 증명한다. TCR 자극시 발생하는 [Ca+2]i의 증가는 인산이노시톨의 증가에 기인하므로, PIP2 가수 분해를 유도하는 CD8/ζ의 능력을 OKT8로의 자극후에 인산 이노시톨의 변화를 평가함으로써 시험하였다. OKT8로 CD8/ζ을 자극한 결과 두 개의 키메라-발현세포에서 인산이노시톨의 생성이 야기되었다. 대조적으로, 쥬르카트 CD8에서 야생형 CD8 단백질의 자극으로는 인산 이노시톨은 주지되지 않았다. 쥬르카트 CD8과 CD8/ζ2에서 TCR의 자극은 인산 이노시톨의 증가를 유도한 한편, TCR-결핍 형질변환체인 Jβ-CD8/ζ14에서는 TCR 자극시에도 그러한 증가는 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 칼슘 형광분석 데이터와 일치하며, 내인성 세포 표면 TCR 사슬의 부재시에도 포스포리파아제 C를 활성화시키는 키메라의 능력을 확증시킨다.

T 세포수용체의 자극이 이노시톨 인지질 경로에 더불어 티로신키나아제 경로를 활성화시키기 때문에, 키메라 자극이 티로신키나아제 활성화를 유발할 것인지의 여부를 측정하는 것이 중요하였다. 웨스턴블롯은 자극전에 모든 3개의 클론에서 소수의 티로신-인산화된 단백질이 존재하고 있음을 나타낸다. 쥬르카트 CD8과 JCD8/ζ2를 C305(항-Tiβ)로 자극하면, 티로신 키나아제 경로는, 많은 단백질의 티로신 인산화의 유도에 의해 입증되는 바 활성화된다. 예측했던 바와같이, C305는 TCR-네가티브 형질변환체인 Jβ-CD8/ζ14에서 아무런 영향을 미치지 않는다. JCD8/ζ2와 Jβ-CD8/ζ14상의 키메라의 OKT8로의 자극은 TCR 자극으로 볼 수 있었던 것과 구별이 되지 않는 티로신-인산화된 밴드의 패턴의 출현을 야기시켰다. 대조적으로, 쥬르카트에서 야생형 CD8을 통한 자극은 티로신 인단백질의 유도를 야기하지 않는다. 그로써, Ti와 CD3 ㄴγ,δ, 및 ε의 부재시에 CD8/ζ 키메라는 무상 TCR과 유사한 방식으로 티로신 키나아제 경로를 활성화시킬 수 있다.

JCD8/ζ2가 그것의 표면상에 2개의 식별가능한 ζ형태, 즉, 각각 독립적으로 자극될 수 있는 내인성 ζ와 CD8/ζ 키메라를 발현하기 때문에, 수용체-유도된 ζ인산화의 특이성이 착수되었다. 자극되지 않았거나 C305 또는 OKT8로 자극된, 3클론으로 부터 유도된 ζ의 면역침전을, 항-포스포티로신 항체와의 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 적은 분획의 ζ면역침전을 ζ항혈청으로 블롯팅하며 샘플들간의 단백질 함량의 차이에 의해 대해 조절하였다. TCR-자극된 쥬르카트 CD8 세포로 부터 유도된 용해물의 분석은, ζ의 7개의 세포질 티로신 잔기의 다양한 인산화 정도를 가장 유사하게 나타내는 16-21KD의 밴드의 복합성을 가지는 ζ 인산화의 전형적인 패턴을 나타낸다. 이 실험에서, 적은 정도의 구조성 ζ의 인산화는 쥬르카트 CD8에서 검출되지만, 이것은 야생형 CD8 단백질의 자극에 의해서는 증가되지 않는다. ζ의 인산화가 C305-자극된 쥬르카트 CD8에서 볼 수 있는 것보다 약하긴해도 JCD8/ζ2에서 TCR의 자극으로 볼 수 있는 한편, 키메라의 인산화는 유도되지 않는다. 역으로, JCD8/ζ2와 Jβ-CD7/ζ14 상의 CD8/ζ 키메라 수용체의 자극은 34K-39KD의 유도된 넓은 밴드로서 볼 수 있는, 독자적인 키메라의 고도의 인산화를 야기한다. 이 결과는 ζ의 인산화에 기여하는 수용체-활성화된 키나아제가 자극된 수용체 복합체에만 있는 기질을 인지한다는 것을 의미한다.

[후기 T 세포활성화를 유발하는 CD8/ζ의 자극]

T-세포활성화는 수용체-조절된 신호가 특이한 유전자의 발현을 유도하는 작용을 하는 핵에 수용체-조절된 신호를 전달함으로 부터 유도된다. 하나의 그러한 유전자는 활성화 항원 CD69를 코드화하는데, 이것의 표면 발현은 T 세포수용체 자극 후 수시간내에 유도되며, 단백질 키나아제 C의 활성화에 의존성인 것으로 여겨진다[Testi et al., J.Immunol., 142 : 1854-1860]. T 세포활성화에서 CD69의 기능이 잘 해명되지는 않았지만, CD6는 말단의 신호 변환 사건의 마아커를 제공한다. 유동 세포계측법은 자극되지 않은 세포상에 매우 적은 정도로 기본적은 CD69 발현이 있음을 나타낸다. 최대수준은 모든 세포상에서 단백질 키나아제의 활성화제인 포볼미리스테이트 아세테이트(phobol myristate, acetate, PMA)로 유도된다. TCR의 자극은 쥬르카트 CD8과 JCD8/ζ2상에 CD69의 유도를 유발하지만, TCR-네가티브 클론인 Jβ-CD8/ζ14상에는 그러한 유도를 유발하지 못한다. 더욱이, OKT8로의 세포의 자극은 CD8/ζ키메라를 발현하는 두 세포상에서 모두 CD69를 유도한다. 야생형 CD8단백질의 자극으로 최소정도의 CD69 유도가 나타나지만, 이 수준은 클래스 I MHC항체 W6/32로 쥬르카트 CD8을 자극했을때 관찰된 것보다 높지 않다.

후기 활성화 사건을 평가하기 위해 가장 통상적으로 상용되는 기준은 아마도 림포카인, 인터류킨-2(IL-2)의 생성이다[Smith (1986) Science, 240 : 1169-1176]. IL-2 유전자는 엄격하게 조절되며, 이것의 전사를 위해서 많은 신호의 통합을 필요로 하고, 그것을 CD8/ζ 키메라를 통한 신호화 평가에 대하여 가치있는 말단부 마이커로 만든다. PMA의 존재하에 TCR 항체로 쥬르카트 CD8과 JCD8/ζ2를 자극하면 IL-2의 생성을 유도한다.

JCD8/ζ2와 쥬르카트 CD8 세포를, PMA의 존재하에(10ng/㎖) 지정된 mAb 또는 이노마이신(1μm)으로 자극시켰다. IL-2 분비는, 자극된 세포의 배양 상층액의 IL-2 의존성 CTLL-2.20 세포의 성장을 지지하는 능력에 의해 측정하였다. PMA 단독으로는 쥬프카트에서 IL-2 생성을 유도하지 못하고, 아직은 CTLL 2.20 세포의 생존성에 대하여 적은 직접적인 효과만을 가지기 때문에, PMA 단독으로 얻어진 값을 각 반응값으로 부터 제하여서 2개의 독립적인 실험으로 부터의 데이터위에 제시된 값을 산출하여 나타낸다.

[표 1]

IL-2 생성의 유도

처리	IL-2 (유닛/㎖)			
	쥬르카트 CD 8		JCD8/ζ2	
	실험번호 #		실험번호 #	
	#1	#2	#1	#2
미자극	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C305+PMA	13.5	9.1	3.7	2.1
OKT8+PMA	<0.1	<0.1	6.8	7.0
C305+OKT8+PMA	--	--	--	--
W6/32+PMA	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
이오노마이신+PMA	30.4	4.2	24.2	24.6

중요하게도, 쥬르카트 CD8에 대한 OKT8의 처리는 IL-2를 유도하지 못하지만, JCD8/ζ의 유사한 처리는 TCR 자극을 받은 동일 세포에서 생성된 것보다 일관성 있게 더 높은 수준의 IL-2 분비를 유도한다. Jβ-CD8/ζ14는 이 평가에서 모든 실험적 자극에 대해 보다 약하게 반응하였지만, 데이타는 이 세포도 C305가 아니라 OKT8에 반응하여 IL-2를 재생가능하게 분비한다는 점에서 정성적으로 유사하다. 이들 데이타는 초기 신호변환사건에 더불어, 후기 활성화 사건이 CD8/ζ 키메라의 자극시에 일어나고, 그로써 생리적 방식으로 관련된 신호변환경로에 커플될 수 있는 능력을 입증한다는 것을 확인시켜준다.

[CD4-ζ키메라]

[CD4-제타 키메라의 제조]

사람 제타 cDNA를 포함하고 있는 플라스미드 pGEM3zeta는 알.디.클라우스너박사와 에스.제이. 프랭크박사에게서 제공받았다. 사람 CD4 cDNA를 포함하고 있는 플라스미드 pBS.L3T4는 디.리트만박사와 엔.란다우박사에게서 제공받았다. 세포외(EXT) 도메인의 잔기 7로 부터 완전한 사람 제타 사슬 코팅서열을 둘러싸고 있는 BamHI-ApaI 제한단편(대략 0.64kb)을 pGEM3zeta로 부터 절출하여 pBluescript II SK(+)(pSK는 미합중국 캘리포니아 소재의 Stratagene 사의 파지미드(phagemid)-기저클로닝 벡터이다)의 폴리킹커의 BamHI과 ApaI 제한부위에 서브클론하여 pSK.zeta를 생성시켰다. 계속해서, 완전한 CD4 코딩서열을 둘러싸고 있는 BamHI 제한단편(대략1.8kb)을 pBS.CD4-zeta의 BamHI 부위에 서브클론하여 pSK.CD4.zeta를 생성시켰다.

단일 스트란드의 DAN를 pSK.CD4.zeta로 부터 제조하여 (Stratagene pBluescript II 프로토콜), 올리고뉴크레오티드-중재 직접 돌연변이 생성[Zoller, M. and Smith, M., Nucleic Acid Res. (1982) 10 : 6487-6500]에 대한 주형으로서 사용하여, 하기 설명되는 소망하는 결합부를 갖는 CD4-제타 키메라를 생성시켰다. CD4-제타 융합물 1,2 및 3을 계속해서 생거의 디데옥시뉴클레오티드 기법[Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., PNAS (1977) 74 : 5463-5467]에 의해 서열화하고, 발현 벡터 pIK.1.1 또는 pIK.1.1.Neo의 폴리링커안으로 동일한 부위에서 클론시켰다.

완전한 CD4 코딩영역을 둘러싸고 있는 EcoRI-BamHI 제한단편(대략1.8kb)을 pSK.CD4.zeta로 부터 절출하여 pIK1.1 또는 pIK1.1 또는 pIK1.1Neo 폴리링커의 EcoRI 부위와 BglII 부위사이에 서브클론 하였다.

플라스미드 pUCRNeoG[Hudziak, et al., Cell (1982) 31 : 137-146]는 라우스 육종 바이러스(RSV) 3'LTR의 전사조절하에 네오마이신 유전자를 운반 한다. RSV-neo 카세트를 pURCNeoG로 부터, HincII 제한단편(대략2.3kb)으로서 절출하여 pIK.1.1 의 2개의 SspI 부위 사이에 서브클론하여 pIK1.1Neo를 생성시켰다.

pIK.1.1은 pMF2에 4회의 연속적인 카세트 삽입에 의하여 제조된 포유동물 발현 벡터로, 합성 폴리링커 5'-HindII-SphI-EcoRI-AatII-BglI-XhoI-3'을 pSKII(Stratagene)의 KpnI과 ScaI 부위 사이에 삽입시킴으로써 제조되며, 이때에 KpnI과 ScaI 부위는 소멸된다. 먼저, SV40 T 항원 폴리아데닐화 부위[SV40의 뉴클레오티드 2770-2553, Reddy, et al., Science (1978) 200 : 494-502]을 포함하고 있는 BamHi-XbaI 단편과, SV40 복제기원(SV40의 뉴클레오티드 5725-5528)을 포함하고 있는 NheI-SalI 단편을 BglII와 XhoI 부위 사이의 3-부분 결찰에 의해 삽입시켰다. 동시에 BglII, BamHI, XbaI, NheI, SalI 및 XhoI 부위는 소멸되었다. 이들 BamHI-XbaI, NheI과 NheI-SalI 단편들은, 주형으로서 각각 대응단부에 BamHI, XbaI, SalI 및 부위를 통합시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍 ; 5'-GGTCGACCTGGATCCGCCATACCAC-ATTTGTAG-3', 5'-GCCGCGGCTCTAGAGCCAGACATGATAAGATAC-3', 5'-AAGCTTGT-GCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCG-3', 및 5'-CGAATTCGGTCGACCGCAAAAGCCTAGG-CCTCC-3' 을 사용하여, pSV2Neo[Southern and Berg, J. MOl.Appl. Gen.(1982) 1 : 327-341]로 PCR에 의해 합성하였다. 둘째로, 사람 α1 글로빈 유전자 제 2 엑손(뉴클레오티드 +143~+251)의 스플라이스 수용체를 함유하고 있는 SphI-EcoRI 단편을 SphI과 EcoRI 부위 사이에 삽입시킨다. 이 SphI-EcoRI 단현은 주형으로서 각각 대응단부에 SphI 과 EcoRI 부위를 통합시키는 올리고 뉴클레오티드 프라이머쌍 : 5'-GTCTATAGCATGCTCCCCTGCTCCGACCCG-3', 5'-GGTACCGAATTCTCCTGCGGGGAGAAGCAG-3을 사용하여 pπSVα HP[Treisman et al., PNAS (1983) 80 : 7428-7432]로 PCR에 의해 합성되었다. 세번째로, 합성폴리링커 5'-EcoRI-BagII-ApaI-AatII-3'을 EcoRI과 AatII 부위 사이에 삽입시킨다. 네번째로, CMV IE 인핸서/프로모터[뉴클레오티드-674~-19, Boshart et al., Cell (1985) 41 : 521-530]를 함유하고 있는 HindIII-SacI 단편과, CMV IE 제 1 엑손/스플라이스 도너(뉴클레오티드-19~+170)를 함유하고 있는 SacI-SahI 단편을 HindIII와 SphI 부위사이의 3부분 결찰에 의해 삽입시킨다. HindIII-SacI 단편은 주형으로서 대응단부에 HindIII와 SacI 부위를 통합시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머 5'-CGCCAAGCTTGGCCATTGCATACGGT-3'과 5'-GAGGTCTAGACGGTTCACTAAACGAGCTCT-3'을 사용하여 pUCH.CMV(M. Calos, Stanford Univ)로 PCR에 의하여 제조한다. SacI-SahI 단편은 화학적으로 합성한다.

[결과]

[CD4-제타 키메라의 디자인]

사람 CD4 분자만이 현재 HIV에 대해 높은 친화성을 가지고 있는 수용체라는 것이 특성확인되어 있으며, HIV 엔벨로프 당단백질인 gp160의 gp120 부분에 결합한다. 성숙한 CD4 분자는 4개의 직렬형 Ig-유사 V영역(V1-V4)에 대한 세포외(EXT) 도메인(성숙한 CD4 단백질이 잔기 1-371), 24aa 경막(TM) 도메인(성숙한 CD4 단백질의 잔기 372-395), 및 38aa 세포질(CYT) 도메인(성숙한 CD4 단백질의 잔기 396-433)을 포함한다. 돌연변이 분석은 gp120의 높은 친화성 결합에 대한 결정기가 CD4의 처음 106aa, 즉 V1내에 있음을 보여주었다.

성숙한 제타분자는 10aa EXT 도메인, 20aa TM 도메인, 및 112aa CYT 도메인 을 포함한다.

3개의 CD4-제타 키메라 수용체(F1,F2 및 F3)를 CD4의 세포외(EC) 및 세포질(CYT) 도메인 및 제타로 부터 각각 제조하였다. 이들 CD4-제타 수용체의 경막(TM) 도메인은 제타(F1,F2) 또는 CD4(F3)로 부터 유도한다. F2 와 F3은 4개의 V도메인을 모두 가지고 있다.

특이적으로, F2는 네개의 모든 V영역으로 이루어지는 CD4 EXT 도메인(성숙한 CD4 단백질의 잔기 1-370), 제타도메인의 TM 도메인(성숙한 제타사슬의 잔기 8-30)및 제타의 CYT 도메인(성숙한 제타 사슬의 잔기 31-142)을 보유하고 있다.

또한 특이적으로 F3은, 네개의 모든 V도메인을 포함하고 있는 CD4 EXT 도메인(성숙한 CD4 단백질의 잔기 1-371), CD4의 TM 도메인(성숙한 CD4 사슬의 잔기 372-395) 및 제타의 CYT 도메인(성숙한 제타 사슬의 잔기 31-142)을 보유하고 있다.

또한 특이적으로 F1은, CD4 EXT 도메인의 V1과 V2(성숙한 CD4 단백질의 잔기 1-180), 제타의 TM 도메인(성숙한 제타 사슬의 잔기 8-30) 및 제타의 세포질(CYT)도메인(성숙한 제타 사슬의 잔기 31-142)을 보유하고 있다.

[CD4-제타 수용체의 일시적 발현]

키메라 수용체 F1,F2 및 F3과, 천연 CD4 유전자를, CMV 프로모터/인핸서(이하에 추가로 설명함)를 경유하여 전사를 지시하는 발현 벡터 pIK.1.1 안으로 도입하였다. 이들 키메라 수용체의 발현의 세포표면수준과 구조적 통합성을 평가하기 위하여, 고도로 효과적인 일시적 발현 시스템을 사용하였다. 구조물을 일렉트로포레이션에 의하여 사람 초기(embryonic) 신장 셀 라인 293에 도입시키고, 24시간후에 세포를 수확하여 계속해서 CD4의 V1 도메인, OKT4A에 특이적인 FITC-커플된 MAb 를 사용하여 FACS에 의해 분석하였다. 세포분류로 부터, 표면 F2와 F3의 유사하게 높은 수준이 OKT4A에 의해 검출되더라도, 동일한 일

시적 측정에서 이 항체에 의해 검출된 F1의 수준은 매우 낮다.

F1이 막에 존재하는지를 설명하기 위해, 그리고 키메라 단백질의 구조를 평가하기 위해 방사선 표지된 단백질의 면역침전을 수행하였다. 293세포를 F1,F2 또는 F3으로 일렉트로포레이션하고 20시간 후에, 세포를 여러시간동안 35S-메티오닌으로 펄스-표지하고, 1% NP40에서 용해시킨후 OKT4A에 의해 (Ortho) 또는 쥐과의 제타의 세포질 펩티드에 대하여 발생된 토끼 항혈청(알. 클라우스너박사(NIH)에게서 얻음)에 의해 면역침전시켰다. F2 또는 F3에 관련하여 방사선 표지된 F1의 수준은, OKT4A 대신에 항제타 항혈청이 면역침전제로서 사용된 경우에 상당히 더 높다. 이들 결과는 F1 수용체가 V1-특이적 MAb의 효과적인 결합에 대하여 필요한 위상을 제공하지 못함을 시사한다.

[F1 및 F2 형태 이황화-결합된 동종이량체; F3은 단량체임]

천연제타는 제타 사슬이 동일한 유전자의 대체 스플라이싱된 생성물인 Eta와 결합되어 있는, 이황화-결합 동종이량체 또는 이종이량체로서 존재 한다. F1과 F2는 둘다 제타의 TM 도메인을 소유하며, 그러므로, 막기부의 시스테인 잔기(성숙한 제타 사슬의 위치 11)를 경유하여 동종이량체(및 가능하게는 천연 제타를 가지고 있는 천연 제타를 가지고 있는 이종이량체)를 형성하는 가능성을 가질 것이다. 대조적으로, F3의 TM 도메인은 CD4로 부터 유도되며, 따라서 F3 수용체에 대하여 천연 CD4 분자의 천연 단량체 상태를 제공하는 것으로 예측될 것이다.

이들 수용체가 공유결합을 형성하는지의 여부를 측정하기 위하여, 평가하고자 하는 각 구조물로 일렉트로포레이션 되어 있는 방사선 표지된 293 세포의 면역침전을 환원 및 비환원조건하에서 분석하였다. 환원 및 비환원 조건하에서, 대략 70kd의 단백질이 F3으로 일렉트로포레이트된 293 세포로 부터의 OKT4A에 의해 면역침전된다. 예측했던 바와같이, 환원 및 비환원 조건하에서 CD4가 또한 대략 60kd 의 단일 단백질에 대해 발생한다. 대조적으로, F1과 F2는 비환원 조건하에서, 환원조건하에 볼 수있는 것(대략 각각 35kd와 70kd) 보다 대략 2배인 각각 약 70kd와150kd의 단백질에 대해 일어난다. 이들 결과는 F1과 F2가 천연 제타와 같이 이황화-결합된 동종이량체로서 존재하는 한편, F3은 천연 CD4 처럼 단량체로서 존재하는 것을 입증해준다. 이들 데이타는 그러나 비공유결합된 이량체를 형성하는 F3의 능력을 인정하지 않는 것은 아니다.

[사람 T 셀 라인내로의 CD4-제타 수용체의 도입]

키메라 수용체 유전자 F1,F2 및 F3와, 천연 CD4 유전자를, 선택적인 마아커를 포함하는 pIK.1.1의 유도체 pIK.1.1.Neo 안에 도입시켰다. 각 구조물은 일렉트로포레션을 통하여 사람 T 세포 백혈병 라인인 쥬르카트와, 제한희석 및 G418에 대한 선택에 의하여 얻어진 독립적인 쥬르카트 클론안에 안정하게 도입시켰다. 키메라 수용체의 세포표면 발현은 FITC-커플된 OKT4A를 사용하여 쥬르카트 클론의 FACS분석에 의해 평가하였다. 비록 천연 쥬르카트 세포가 세포표면상에 저수준의 CD4를 발현하지만, 고수준의 F2 또는 F3을 발현하는 형질전환체를 비형질전환세포와 관련하여 관찰하는 상당히 더 높은 수준의 형광에 의하여 쉽게 확인하였다. 마찬가지로, 고수준의 CD4를 발현하는 안정한 클론도 또한 확인하였다. 대조적으로, F1 수용체 구조물로 일렉트로포레이트된 세포로부터 분리된 클론들중 어느것도, 천연 쥬르카트 세포로 볼 수 있는 것(상기 참조)보다 더 높은 수준의 OKT4A-특이적 형광을 나타내지 못하였다.

100이상의 쥬르카트 클론의 FACS 분석은 F3 수용체가 F2 수용체보다 상당히 더 높은 수준(50배 까지)으로 쥬르카트 세포에서 안정하게 발현될 가능성을 가지고 있음을 나타내었다. 제타 TM 도메인은 TCR 복합체의 어젬블리 및 세포표면 발면에 포함되는 것으로 여겨진다. 그러므로, 제타 TM 도메인을 포함하는 수용체의 세포표면 발현은 '상재성(resident)' TCR 사슬(Ti, CD3)의 활용성에 의해 제한된다. 어어빙과 바이스는 문헌[Irving and Weiss, Cell (1991) 64 : 891-901]에서, 제타의 TM 도메인 CD8의 TM 도메인으로 대체되어 있는 CD8-제타 수용체가 쥬르카트 세포에서 TCR 복합체와 무관하게 발현됨을 증명하였다. 추측컨대 F3 수용체는 CD4 TM 도메인에 의하여 상재성 TCR 사슬로 부터 유사하게 분리되고, 그러므로 F2 수용체에 의해 경험했던 표면 발현 수준을 잠정적으로라도 억제하지 못한다.

[천연 및 키메라 수용체의 자극시 CD69 발현의 유도]

CD69(Leu-23)는 T, B, 및 NK 림프구상에 존재하는 초기 사람 활성화 항원이다. CD69는 CD3/TCR의 자극후 2시간내에 T 림프구의 세포 표면상에서 검출되고, 18 내지 24시간 내에 최대 수준에 도달한다. 그러므로 Co69는 CD3/TCR-중재신호에 대한 반응에서 유도된 첫번째 검출가능한 세포표면 단백질로, T 세포활성화의 믿을만한 마아커를 나타낸다. 쥬르카트 T 셀라인 에서 및 F2, F3 또는 CD4중 어느 하나를 발현하는 선택된 대표적인 쥬르카트 클론에서 특이적으로 CD69 유도를 조절하는 CD4-제타 키메라 수용체의 능력을 기능분석을 위해 조사하였다.

Ti α/β 또는 CD3 사슬에 특이적인 단클론성 항체들은 항원의 효과를 모방할 수있고 신호변환 및 T 세포 활성화 사건을 자극하는 아고니스트로서 작용한다. 세포들을 (a) Tiβ사슬 쥬르카트(C305), (b) CD3ε사슬(OKT3), 및 (c) CD4의 V1 도메인(OKT4A)에 특이적인 고정된 mAb 들로 자극시켰다. W6/32는 사람 HLA 클래스 I 항원의 불변 결정기를 인지하며, 일부의 실험에서 네가티브 대조표준으로서 사용하였다. Co 69 발현은 FITC-커플된 항-Leu23 MAb를 사용하여, 자극후 대략 18시간 후에 FACS 분석에 의해 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다. 자극되지 않은 세포들은 매우 낮은 수준의 기본적인 CD69 발현을 나타내지만, 단백질 키나아제 C의 약리학적 활성화제, 즉 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)로 자극될 때에는 최대 발현이 유도된다. 천연 Ti를 C305 MAb로 자극하거나 또는 천연 CD3를 OKT3 MAb로 자극하면 또한 CD69 마아커에 대한 유도를 초래한다. 그러나, OKT4A에 의한 자극은 키메라 CD4-제타수용체를 발현하는 형질전환에 대해서만 고수준의 CD69 발현을 불러일으킨다. 많은 형질전환체에 대해서, 특히 F3-유도된 형질전환체에 대해서, 자극시에 관찰된 CD69 유도수준은 PMA로 볼 수 있는 것과 동일하다.

야생형 CD4를 OKT4A로 자극하ㄴ면, 많은 쥬르카트 CD4-형질전환체에서 측정한바, CD69의 유도를 거의 또는 전혀 볼 수 없다. 마찬가지로, 형질 전환체를 클래스 1항체, W6/32로 처리하면 이 측정에서는 아무런 유의할만한 효과가 나타나지 않았다.

이들 결과는 CD8-제타 키메라 수용체를 포함하는, 어어빙과 바이스의 작업(1991. 상기 문헌참조)을 확증하며 그것을 확대시키는데, 제타의 세포질 단부를 가지고 있는 CD4 키메라 수용체가 T 세포 활성화 사건의 개시에 효과적으로 기능하는 것을 보여준다. 구체적으로, CD4 TM 도메인(F3)을 포함하고 있는 키메라 CD4-제타 수용체는, 제타 TM 도메인(F2)을 포함하고 있는 것이 천연제타의 동종이량체 형태를 보유하고 있다는 사실에도 불구하고, 제타 TM 도메인(F2) 함유 수용체보다 더 효과적으로(최소한 CD69 유도에 대해서) T 세포 활성화를 조절한다. 효율의 이런 차이는 F2에 비교하여 F3을 발현하는 쥬르카트 클론의 세로 표면상에 존재하는 키메라 수용체의 상당히 더 높은 수준에 기인하는 것과, 또는 TCR 복합체로 부터의 수용체의 '분리'가 최소한 이 특별한 경로를 경유한 신호화를 증대시키는 가능성이 가능하다.

F3은 공유 동종이량체 형태로 존재하지 않는다는 점에서 F2 및 천연 제타와 상이하다. 어어빙과 바이스에 의해 설명된[Irving and Weiss (1991), 상기 동일문헌] CD8-제타 키메라 수용체는 천연 CD8과 같이 이황화-결합된 이량체로서 존재하고, 그로써 제타 TM 도메인의 부재에도 불구하고 천연 제타의 이량체 형태를 보존한다. CD8-제타와는 대조적으로, 본원에서 설명된 F3 수용체는 상기 나타난 바와같이 이황화-결합된 동종이량체를 형성할 수 없다. 그러므로 이들 데이타는 키메라 수용체의 공유 이량체화가, CD69 유도에 의해 측정되는바 T 세포 활성화의 개시에 필수적이지 않음을 증명한다.

실질적으로 상술된 바와같은, CD8-ζ 키메라에 대한 IL-2 발현 검출과정에 이어서, CD4-ζ 키메라를 발현하는 쥬르카트 세포에 의한 항-CD4 항체에 대한 반응에서 IL-2 분비를 또한 관찰하였다.

상기 결과로부터, 세포외 도메인이 관심의 리간드와 ㄴ결합되어 있는 경우 표면막 단백질로서 작용하는 키메라 단백질의 발현을 제공함으로써 숙주 세포에서 다양한 신호화 경로의 활성화를 제공할 수 있는 한편, 자연적으로는 세포외 도메인과 결합되어 있지 않는 세포질 도메인이 소망하는 경로의 활성화를 제공할 수 있음이 명백하다. 상기와 같은 방식으로, 인공적인 리간드에 의해 특정 경로로 활성화될 세포가 형질전환되어 특이한 목적에 사용될 수 있다. 이것은 세포외 도메인으로서 CD4를 사용하여 예시될 수 있는데, 이때에 HIV 단백질의 결합은 감염된 세포를 파괴하기 위하여 세포독성 활성을 자극시킬 수 있는 T-세포의 활성화를 유발할 수 있다. 마찬가지로, 다른 세포도 질병치료에 보다 효과적이 되거나 또는 면역효과등을 위하여 변형될 수 있다.

본 명세서에 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 본원에 각각의 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참고로 삽입되는 것으로 표시되는 것과 동일한 정도로 참고로 삽입된다.

본 발명을 지금까지 전체적으로 설명하였으며, 당업자에게는 첨부된 특허청구의 사상 또는 범주로부터 벗어남이 없이 많은 수정 및 변형이 이루어질 수 있음이 명백할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

리딩 프레임 내에, 신호서열을 코드화하는 핵산; 하나 이상의 리간드에 특이적으로 결합하는 세포외 표면 막 도메인을 코드화하는 핵산; 경막 도메인을 코드화하는 핵산; 및 세포외 도메인이 리간드에 결합하는 경우에 신호를 개시시키는 세포질 도메인을 코드화하는 핵산을 포함하는 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포질 도메인이 제타 사슬임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 세포외 도메인이 Ig의 중쇄 자체 또는 경쇄와 결합된 Ig의 중쇄이거나 이것의 절단된 부분임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 4

제2항에 있어서, 세포외 도메인이 CD8임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 5

제2항에 있어서, 세포외 도메인이 CD4임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 6

제1항에 있어서, 경막 도메인이 세포외 도메인에 천연적으로 결합되어 있음을 특징으로 하는 핵산.

청구항 7

제1항에 있어서, 경막 도메인이 세포질 도메인에 천연적으로 결합되어 있음을 특징으로 하는 핵산.

청구항 8

전사 개시 영역, 전사 개시 영역의 전사 조절을 받는 제1항에 따른 핵산, 및 전사 종결 영역을 포함하는 발현 카세트.

청구항 9

제8항에 있어서, 전사 개시 영역이 포유동물 숙주에서 기능적임을 특징으로 하는 발현 카세트.

청구항 10

제1항에 따른 핵산을 포함하는 포유동물 면역 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 세포질 도메인이 CD3 제타 사슬임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 세포외 도메인이 Ig의 중쇄 자체 또는 경쇄와 결합된 Ig의 중쇄이거나 이것의 절단된 부분임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 13

제11항에 있어서, 세포외 도메인이 CD8임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 14

제11항에 있어서, 세포외 도메인이 CD4임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 15

제10항에 있어서, 전사 개시 영역이 포유동물 면역 세포에서 기능적이고, 세포가 포유동물 면역 세포임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 포유동물 면역 세포가 사람 면역 세포임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 17

N-말단에서 C-말단방향으로, 그 자체로 또는 제 2 세포외 도메인과 결합하여, 하나 이상의 리간드에 특이적으로 결합하는 세포외 표면 막 도메인; 경막 도메인; 및 CD3 제타 사슬, CD3 에타 사슬 또는 FCεR1 수용체의 감마 사슬의 세포질 도메인을 포함하며, 세포외 도메인과 세포질 도메인이 천연적으로 함께 결합되어 있지 않음을 특징으로 하는 단백질.

청구항 18

제17항에 있어서, 세포질 도메인이 CD3 제타 사슬임을 특징으로 하는 단백질.

청구항 19

제17항에 있어서, 세포외 도메인이 Ig의 중쇄 자체 또는 경쇄와 결합된 Ig의 중쇄이거나 이것의 절단된 부분임을 특징으로 하는 단백질.

청구항 20

제17항에 있어서, 세포외 도메인 CD8임을 특징으로 하는 단백질.

청구항 21

제17항에 있어서, 세포외 도메인이 CD4임을 특징으로 하는 단백질.

청구항 22

표면 막 단백질로서 제17항에 따른 단백질을 포함하는 포유동물 면역 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, 세포외 도메인이 제 2 단백질과 결합되어 결합 부위를 규정함을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 24

제19항에 따른 단백질을 표면 막 단백질로서 포함하며, 세포독성 T 림프구임을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 25

제21항에 따른 단백질을 표면 막 단백질로서 포함하며, 세포독성 T 림프구임를 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 26

제19항에 따른 단백질을 표면 막 단백질로서 포함하며, 클래스 I 또는 클래스 II MHC 중의 1종 이상의 표면 발현이 실질적으로 없음을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 27

제21항에 따른 단백질을 표면 막 단백질로서 포함하며, 클래스 I 또는 클래스 II MHC 중의 1종 이상의 표면 발현이 실질적으로 없음을 특징으로 하는 포유동물 면역 세포.

청구항 28

2차 메신저 경로에 의하여 세포를 활성화시키는 방법으로서, 세포를 세포외 도메인에 결합하여 신호를 세포질 도메인에 변환시키는 리간드가 접촉시키는 것을 포함하여, 2차 메신저 경로를 활성화시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제9항에 따른 발현 카세트를 포함하는 레트로바이어스 RNA 또는 DNA 구조물.