



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0157435
(43) 공개일자 2022년11월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12Q 1/6881 (2018.01)
G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7036214
(22) 출원일자(국제) 2021년03월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/023240
(87) 국제공개번호 WO 2021/188954
국제공개일자 2021년09월23일
(30) 우선권주장
62/992,701 2020년03월20일 미국(US)

- (71) 출원인
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브
헬쓰 앤드 휴먼 서비씨즈
미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788,
스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스
티튜츠 오브 헬쓰, 오피스 오브 테크놀로지 트랜
스퍼
(72) 발명자
크리슈나 스리
미국 메릴랜드주 20852 노스 베데스다 스트래스모
어 홀 스트리트 10300 아파트먼트 104
로워리 프랭크 제이 3세
미국 메릴랜드주 20871 클라크스버그 마즈 스트리
트 13052
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

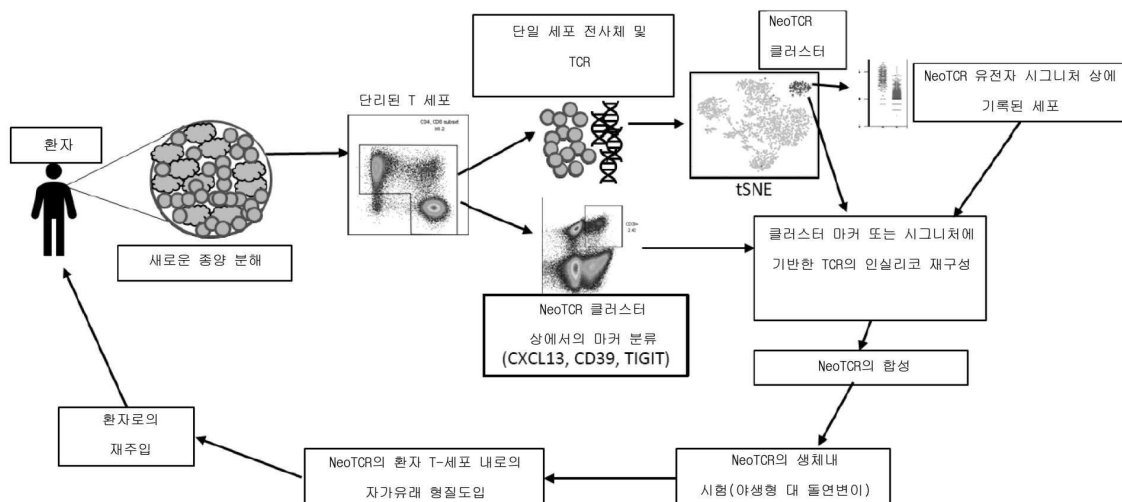
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 면역요법을 위해 단일 세포 분석에 의해 종양으로부터 T 세포 및 T 세포 수용체를 분리하는 방법

(57) 요약

표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 분리하는 단계; 유전자 발현 프로파일을 갖는 분리된 T 세포를 선택하는 단계; 및 선택된 T 세포를 선택되지 않은 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다. 분리된 선택된 T 세포는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제공한다. T 세포 수용체(TCR)를 분리하는 방법, TCR을 발현하는 세포의 집단을 제조하는 방법, 분리된 TCR, 분리된 세포의 집단, 약학 조성물, 및 포유동물에서 병태를 치료 또는 예방하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/1072 (2013.01)
C12Q 1/6881 (2018.05)
G01N 33/56972 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

하나다 켄이치

미국 메릴랜드주 20817 베데스다 그린트리 로드
5806

양 제임스 씨

미국 메릴랜드주 20814 베데스다 루즈벨트 스트리트
5305

로젠버그 스티븐 에이

미국 메릴랜드주 20854 포토맥 아이언 게이트 로드
10104

로빈스 폴 에프

미국 메릴랜드주 20815 체비 체이스 글렌데일 로드
7907

요셉 라미

미국 메릴랜드주 20878 게이더스버그 랜즈엔드 드
라이브 14

명세서

청구범위

청구항 1

환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 분리하는 단계;

유전자 발현 프로파일을 갖는 분리된 T 세포를 선택하는 단계; 및

선택된 T 세포를 선택되지 않은 세포로부터 분리하는 단계

를 포함하고, 이때, 분리된 선택된 T 세포가 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단(enriched population)을 제공하고, 표적 항원이 암 특이적 돌연변이, 암 항원 또는 암 관련 바이러스 항원에 의해 인코딩된 신생항원이고, 유전자 발현 프로파일이

(a) (i) $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) $AFAP1IL2^+$, $ASB2^+$, $CXCL13^+$, $HMOX1^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $PDLIM4^+$, $TIGIT^+$, LTB^- , $LYAR^-$, $RGCC^-$ 및 $S100A10^-$ 중 하나 이상;

(b) $CD4^+$, 및 $BATF^+$, $CD247^+$, $CXCL13^+$, $DNPH1^+$, $DUSP4^+$, $GYPE^+$, $IFITM1^+$, $IGFLR1^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $LIMS1^+$, NMB^+ , $NR3C1^+$, $SH2D1A^+$, $SPOCK2^+$, $SUPT3H^+$, $TIGIT^+$, $TNFRSF18^+$, $CCL5^-$, $CD52^-$, $GSTP1^-$, JUN^- , $LGALS1^-$, LTB^- , $LYAR^-$, $PLP2^-$, $RGCC^-$, $S100A10^-$, VIM^- 및 $ZFP36^-$ 중 하나 이상;

(c) $CD8^+$, 및 $AFAP1IL2^+$, $ALOX5AP^+$, $ARHGAP9^+$, $ASB2^+$, $CARD16^+$, $CD3G^+$, $CD8A^+$, $CD8B^+$, $CLIC3^+$, $CTSW^+$, $CXCL13^+$, $CXCR6^+$, $GALNT2^+$, $GZMB^+$, $HLA-DPA1^+$, $HLA-DPB1^+$, $HLA-DRB1^+$, $HLA-DRB5^+$, $HMG13^+$, $HMOX1^+$, $ITGAE^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $MPST^+$, $NAP1L4^+$, $NELL2^+$, $NSMCE1^+$, $PDLIM4^+$, $PTMS^+$, $RAB27A^+$, $RARRES3^+$, $RBPJ^+$, $TIGIT^+$, $ANXA1^-$, $EEF1B2^-$, $EMP3^-$, $IL7R^-$, $LGALS3^-$, LTB^- , $LYAR^-$, $RGCC^-$, $RPL36A^-$ 및 $S100A10^-$ 중 하나 이상;

(d) $CD8^+$, 및 $CD39^+$, $CD74^+$, $CD103^+$, $CD106^+$, $CD137^+$, $HLA-DR^+$, $TIGIT^+$, $CCR7^-$, $CD8A^-$, $CD16^-$, $CD45RA^-$, $CD62L^-$ 및 $IL7R^-$ 중 하나 이상;

(e) $ABI3^+$, $AC243960.1^+$, $ACP5^+$, $ADGRG1^+$, $AHI1^+$, $ASB2^+$, $BST2^+$, $CARS^+$, $CCL4^+$, $CD27^+$, $CD2BP2^+$, $CD82^+$, $CTSW^+$, $CXCL13^+$, $CXCR6^+$, $DUSP4^+$, $ENTPD1^+$, $GALNT2^+$, $GATA3^+$, $GPR25^+$, $GZMB^+$, $HDLBP^+$, $HLA-DPA1^+$, $HLA-DRB1^+$, $HMOX1^+$, $ID2^+$, $IGFLR1^+$, $ITGAL^+$, $LINC01871^+$, $LINC01943^+$, $MIS18BP1^+$, $MPST^+$, $NCF4^+$, $NSMCE1^+$, $PCED1B^+$, $PDCD1^+$, $PHPT1^+$, $PLEKHF1^+$, $PRF1^+$, $PTMS^+$, $SLC1A4^+$, $SLF1^+$, $SMC4^+$, $SUPT3H^+$, $TIGIT^+$, $TNFRSF18^+$, TOX^+ , $TRAF3IP3^+$ 및 $YPEL2^+$ 중 하나 이상;

(f) $CD4^+$, 및 $ADI1^+$, $AHI1^+$, $ARID5B^+$, $BATF^+$, $CMTM7^+$, CPM^+ , $CXCL13^+$, $CYTH1^+$, $ELMO1^+$, $ETV7^+$, $FABP5^+$, $FBLN7^+$, $FKBP5^+$, $GRAMD1A^+$, $HIF1A^+$, $IL6ST^+$, $ITGA4^+$, ITK^+ , $JAK3^+$, $KLRB1^+$, $LEF1^+$, $LIMS1^+$, MAF^+ , MAL^+ , $MIR4435-2HG^+$, $MYL6B^+$, $NAP1L4^+$, NMB^+ , $NR3C1^+$, $PASK^+$, $PGM2L1^+$, $PIM2^+$, $PPP1CC^+$, $SESN3^+$, $SH2D1A^+$, $SOC1^+$, $STAT1^+$, $SYNE2^+$, $TBC1D4^+$, $TIGIT^+$, $TLK1^+$, $TMEM123^+$, $TMEM70^+$, $TNIF^+$, TOX^+ , $TSHZ2^+$, $UCP2^+$, $VOPP1^+$ 및 $YPEL2^+$ 중 하나 이상;

(g) $CD8^+$, 및 $AC243829.4^+$, $ACP5^+$, $APOBEC3C^+$, $APOBEC3G^+$, $CCL3^+$, $CCL4^+$, $CCL4L2^+$, $CCL5^+$, $CD27^+$, $CD8A^+$, $CD8B^+$, $CST7^+$, $CTSW^+$, $CXCL13^+$, $DUSP4^+$, $ENTPD1^+$, $FABP5^+$, $GALNT2^+$, $GNLY^+$, $GZMA^+$, $GZMB^+$, $GZMH^+$, $GZMK^+$, $HAVCR2^+$, $HCST^+$, $HLA-DMA^+$, $HLA-DPA1^+$, $HLA-DPB1^+$, $HLA-DRA^+$, $HLA-DRB1^+$, $HLA-DRB5^+$, $HMOX1^+$, $IFNG^+$, $IGFLR1^+$, $ITGAL^+$, $JAML^+$, $LINC01871^+$, $LYST^+$, $MIR155HG^+$, $NKG7^+$, $PLEKHF1^+$, $PRF1^+$, $PTMS^+$, $RGS1^+$, $SLF1^+$, $SMC4^+$, $SUPT3H^+$, $TIGIT^+$ 및 TOX^+ 중 하나 이상;

(h) AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상; 또는

(i) TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 하나 이상

을 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 따른 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계;

농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계;

하나 이상의 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 T 세포 수용체(TCR: T cell receptor) 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 시퀀싱하는 단계;

CDR3을 포함하는 알파 쇠 가변 영역을 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩된 CDR3을 포함하는 베타 쇠 가변 영역과 짝짓는 단계;

짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하고, 짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 숙주 세포에 의해 발현시키는 단계;

짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 발현하는 숙주 세포를 표적 항원에 대한 항원 특이성에 관하여 스크리닝(screening)하는 단계; 및

표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 선택하는 단계

를 포함하고, 이때, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분이 단리되는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 방법.

청구항 3

환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 단리하는 단계;

농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계;

별도의 단일 T 세포 샘플에서의 T 세포 수용체 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 시퀀싱하는 단계;

유전자 발현 프로파일을 갖는 별도의 단일 T 세포 샘플을 선택하는 단계;

CDR3을 포함하는 알파 쇠 가변 영역을 유전자 발현 프로파일을 갖는 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩되는 CDR3을 포함하는 베타 쇠 가변 영역과 짝짓는 단계;

짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하고, 짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 숙주 세포에 의해 발현시키는 단계;

짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 발현하는 숙주 세포를 표적 항원에 대한 항원 특이성에 관하여 스크리닝하는 단계; 및

표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 쇠 가변 영역 및 베타 쇠 가변 영역을 선택하는 단계

를 포함하고, 이때, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분이 단리되고, 표적 항원이 암 특이적 돌연변이, 암 항원 또는 암 관련 바이러스 항원에 의해 인코딩되는 신생항원이고, 유전자 발현 프로파일이

(a) (i) CD4⁺ 및 CD8⁺ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) AFAP1IL2⁺, ASB2⁺, CXCL13⁺, HMOX1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, PDLIM4⁺, TIGIT⁺, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻ 및 S100A10⁻ 중 하나 이상;

(b) CD4⁺, 및 BATF⁺, CD247⁺, CXCL13⁺, DNP1⁺, DUSP4⁺, GYPC⁺, IFITM1⁺, IGFLR1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, LIMS1⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, SH2D1A⁺, SPOCK2⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, CCL5⁻, CD52⁻, GSTP1⁻, JUN⁻, LGALS1⁻, LTB⁻, LYAR⁻, PLP2⁻, RGCC⁻, S100A10⁻, VIM⁻ 및 ZFP36⁻ 중 하나 이상;

(c) CD8⁺, 및 AFAP1IL2⁺, ALOX5AP⁺, ARHGAP9⁺, ASB2⁺, CARD16⁺, CD3G⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CLIC3⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, GALNT2⁺, GZMB⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMG3⁺, HMOX1⁺, ITGAE⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, MPST⁺, NAP1L4⁺, NELL2⁺, NSMCE1⁺, PDLIM4⁺, PTMS⁺, RAB27A⁺, RARRES3⁺, RBPJ⁺, TIGIT⁺, ANXA1⁻, EEF1B2⁻, EMP3⁻, IL7R⁻, LGALS3⁻, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻, RPL36A⁻ 및 S100A10⁻ 중 하나 이상;

(d) CD8⁺, 및 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7⁻, CD8A⁻, CD16⁻, CD45RA⁻, CD62L⁻ 및 IL7R⁻ 중 하나 이상;

(e) ABI3⁺, AC243960.1⁺, ACP5⁺, ADGRG1⁺, AHI1⁺, ASB2⁺, BST2⁺, CARS⁺, CCL4⁺, CD27⁺, CD2BP2⁺, CD82⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, GALNT2⁺, GATA3⁺, GPR25⁺, GZMB⁺, HDLBP⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DRB1⁺, HMOX1⁺, ID2⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, LINC01871⁺, LINC01943⁺, MIS18BP1⁺, MPST⁺, NCF4⁺, NSMCE1⁺, PCED1B⁺, PDCD1⁺, PHPT1⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, SLC1A4⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, TOX⁺, TRAF3IP3⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상;

(f) CD4⁺, 및 ADI1⁺, AHI1⁺, ARID5B⁺, BATF⁺, CMTM7⁺, CPM⁺, CXCL13⁺, CYTH1⁺, ELMO1⁺, ETV7⁺, FABP5⁺, FBLN7⁺, FKBP5⁺, GRAMD1A⁺, HIF1A⁺, IL6ST⁺, ITGA4⁺, ITK⁺, JAK3⁺, KLRB1⁺, LEF1⁺, LIMS1⁺, MAF⁺, MAL⁺, MIR4435-2HG⁺, MYL6B⁺, NAP1L4⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, PASK⁺, PGM2L1⁺, PIM2⁺, PPP1CC⁺, SESN3⁺, SH2D1A⁺, SOCS1⁺, STAT1⁺, SYNE2⁺, TBC1D4⁺, TIGIT⁺, TLK1⁺, TMEM123⁺, TMEM70⁺, TNIK⁺, TOX⁺, TSHZ2⁺, UCP2⁺, VOPP1⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상;

(g) CD8⁺, 및 AC243829.4⁺, ACP5⁺, APOBEC3C⁺, APOBEC3G⁺, CCL3⁺, CCL4⁺, CCL4L2⁺, CCL5⁺, CD27⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CST7⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, FABP5⁺, GALNT2⁺, GNLY⁺, GZMA⁺, GZMB⁺, GZMH⁺, GZMK⁺, HAVCR2⁺, HCST⁺, HLA-DMA⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRA⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMOX1⁺, IFNG⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, JAML⁺, LINC01871⁺, LYST⁺, MIR155HG⁺, NKG7⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, RGS1⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상;

(h) AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상; 또는

(i) TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 하나 이상

을 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 TIGIT⁺을 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 CXCL13⁺을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 CD8⁺ 및 CXCL13⁺을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD4^+$ 및 $CXCL13^+$ 을 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD8^+$, $TIGIT^+$, 및 $CD39^+$ 및 $PD-1^+$ 중 하나 또는 둘 다를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD8^+$, $TIGIT^+$, $CD39^+$ 및 $PD-1^+$ 을 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD8^+$, $CXCL13^+$, 및 $CD39^+$, $TIGIT^+$ 및 $PD-1^+$ 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD8^+$, $CXCL13^+$, $CD39^+$, $TIGIT^+$ 및 $PD-1^+$ 을 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD4^+$, $CXCL13^+$, 및 $CD39^+$, $TIGIT^+$ 및 $PD-1^-$ 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일이 $CD4^+$, $CXCL13^+$, $CD39^+$, $TIGIT^+$ 및 $PD-1^-$ 을 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계가

- (i) 유전자 발현 프로파일의 양성으로 발현된 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 존재를 검출하는 단계;
- (ii) 유전자 발현 프로파일에서 발현에 대해 음성인 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 부재를 검출하는 단계;
- (iii) 유전자 발현 프로파일에서 발현에 대해 음성인 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 /또는
- (iv) 유전자 발현 프로파일에서 발현에 대해 양성인 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계가

- (i) 유전자 발현 프로파일의 양성으로 발현된 유전자에 의해 인코딩된 RNA의 존재를 검출하는 단계;
- (ii) 유전자 발현 프로파일에서 발현에 대해 음성인 유전자에 의해 인코딩된 RNA의 부재를 검출하는 단계;
- (iii) 유전자 발현 프로파일에서 발현에 대해 음성인 유전자에 의해 인코딩된 RNA의 양을 측정하는 단계; 및/또는
- (iv) 유전자 발현 프로파일에서 발현에 대해 양성인 유전자에 의해 인코딩된 RNA의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계가 하나 이상의 단일 세포 차원 축소 방법을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계가 시퀀싱에 의한 전사체 및 에피토프의 세포 인덱싱(CITE-Seq: Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing) 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계가 단일 세포 전사체 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계가 유전자 발현 프로파일에서 하나 이상의 유전자의 세포 표면 발현을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

(d)의 유전자 발현 프로파일이 PD-1⁺ 및 TIM-3⁺ 중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

(e) 또는 (g)의 유전자 발현 프로파일이 LAG3⁺을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

암 관련 바이러스 항원이 인유두종바이러스(HPV: human papillomavirus) 항원인, 방법.

청구항 23

제2항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 단계; 및

단리된 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 말초 혈액 단핵 세포(PBMC:

peripheral blood mononuclear cell) 내로 도입하여 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포를 수득하는 단계

를 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 집단을 제조하는 방법.

청구항 24

(a) 제1항 및 제4항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계;

(b) 농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계;

(c) 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 T 세포 수용체 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 시퀀싱하는 단계;

(d) CDR3을 포함하는 알파 쇄 가변 영역을 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩된 CDR3을 포함하는 베타 쇄 가변 영역과 짝짓는 단계;

(e) 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 내로 도입하고, 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 PBMC에 의해 발현시키는 단계; 및

(f) (a)에 따라 제조된 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단의 복수의 별도의 단일 T 세포 샘플에 대하여 (c), (d) 및 (e) 단계를 수행함으로써, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 풀링된(pooled) 집단을 제공하는 단계

를 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 풀링된 집단을 제조하는 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서,

T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 PBMC의 수를 확장시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제2항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 단리된 T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 27

제1항, 제4항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 제조된 단리된 세포의 집단.

청구항 28

제27항에 따른 단리된 세포의 집단 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 29

포유동물에서 암 또는 바이러스 병태인 병태를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 제25항에 따른 T 세포 수용체, 제26항에 따른 단리된 세포의 집단, 또는 제27항에 따른 약학 조성물.

청구항 30

(i) 제1항 및 제4항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계; 또는

(ii) 제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라, T 세포 수용체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 단리된 세포의 집단을 제조하는 단계

를 포함하는, 암 또는 바이러스 병태인 병태의 치료 또는 예방을 위한 약제를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 특허 출원은 2020년 3월 20일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 제62/992,701호를 우선권 주장하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 연방 지원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health), 국립 암연구소(National Cancer Institute)의 프로젝트 번호 ZIA BC 010984 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0005] 전자 제출된 자료의 참조에 의한 포함

[0006] 본원과 동시에 제출되고 다음과 같이 식별된 컴퓨터 판독 가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열 목록은 전체가 본원에 참조로 포함된다: 2021년 3월 18일자 "753067_ST25.TXT"라는 명칭의 553 바이트 ASCII(텍스트) 파일 1개.

배경 기술

[0007] 암 특이적 돌연변이에 의해 인코딩된 신생항원을 표적으로 하는 T 세포를 사용하는 입양 세포 치료법(Adoptive cell therapy)은 일부 환자에서 양성 임상 반응을 일으킬 수 있다. 그럼에도 불구하고, 암 및 기타 병태의 치료를 위한 ACT의 성공적인 사용에 대한 몇 가지 장애가 남아 있다. 예를 들어, 암 반응성 T 세포를 생산하기 위해 사용되는 현행 방법은 상당한 시간이 필요하며 암 표적에 결합하는 원하는 T 세포 수용체를 쉽게 식별하지 못할 수 있다. 따라서, ACT를 위해 단리된 세포의 집단을 수득하는 개선된 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 한 양태는 환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 단리하는 단계; 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계; 및 선택된 T 세포를 선택되지 않은 세포로부터 분리하는 단계를 포함하고, 이때, 분리된 선택된 T 세포가 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단(enriched population)을 제공하고, 이때, 표적 항원이 암 특이적 돌연변이, 암 항원 또는 암 관련 바이러스 항원에 의해 인코딩된 신생항원이고, 유전자 발현 프로파일이 (a) (i) CD4⁺ 및 CD8⁺ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) AFAP1IL2⁺, ASB2⁺, CXCL13⁺, HMOX1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, PDLIM4⁺, TIGIT⁺, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻ 및 S100A10⁻ 중 하나 이상; (b) CD4⁺, 및 BATF⁺, CD247⁺, CXCL13⁺, DNPH1⁺, DUSP4⁺, GYPC⁺, IFITM1⁺, IGFLR1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, LIMS1⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, SH2D1A⁺, SPOCK2⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, CCL5⁻, CD52⁻, GSTP1⁻, JUN⁻, LGALS1⁻, LTB⁻, LYAR⁻, PLP2⁻, RGCC⁻, S100A10⁻, VIM⁻ 및 ZFP36⁻ 중 하나 이상; (c) CD8⁺, 및 AFAP1IL2⁺, ALOX5AP⁺, ARHGAP9⁺, ASB2⁺, CARD16⁺, CD3G⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CLIC3⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, GALNT2⁺, GZMB⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMGN3⁺, HMOX1⁺, ITGAE⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, MPST⁺, NAP1L4⁺, NELL2⁺, NSMCE1⁺, PDLIM4⁺, PTMS⁺, RAB27A⁺, RARRES3⁺, RBPJ⁺, TIGIT⁺, ANXA1⁻, EEF1B2⁻, EMP3⁻, IL7R⁻, LGALS3⁻, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻, RPL36A⁻ 및 S100A10⁻ 중 하나 이상; (d) CD8⁺, 및 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7⁻, CD8A⁻, CD16⁻, CD45RA⁻, CD62L⁻ 및 IL7R⁻ 중 하나 이상; (e) ABI3⁺, AC243960.1⁺, ACP5⁺, ADGRG1⁺, AHI1⁺, ASB2⁺, BST2⁺, CARS⁺, CCL4⁺, CD27⁺, CD2BP2⁺, CD82⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, GALNT2⁺, GATA3⁺, GPR25⁺, GZMB⁺, HDLBP⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DRB1⁺, HMOX1⁺, ID2⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, LINC01871⁺, LINC01943⁺, MIS18BP1⁺, MPST⁺, NCF4⁺, NSMCE1⁺, PCED1B⁺, PDCD1⁺, PHPT1⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, SLC1A4⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, TOX⁺, TRAF3IP3⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상; (f) CD4⁺, 및 ADI1⁺, AHI1⁺, ARID5B⁺, BATF⁺, CMTM7⁺, CPM⁺, CXCL13⁺, CYTH1⁺, ELM01⁺, ETV7⁺, FABP5⁺, FBLN7⁺, FKBP5⁺, GRAMD1A⁺, HIF1A⁺, IL6ST⁺, ITGA4⁺, ITK⁺, JAK3⁺, KLRB1⁺, LEF1⁺, LIMS1⁺, MAF⁺, MAL⁺, MIR4435-2HG⁺, MYL6B⁺, NAP1L4⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, PASK⁺, PGM2L1⁺,

PIM2⁺, PPP1CC⁺, SESN3⁺, SH2D1A⁺, SOCS1⁺, STAT1⁺, SYNE2⁺, TBC1D4⁺, TIGIT⁺, TLK1⁺, TMEM123⁺, TMEM70⁺, TNK1⁺, TOX⁺, TSHZ2⁺, UCP2⁺, VOPP1⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상; (g) CD8⁺, 및 AC243829.4⁺, ACP5⁺, APOBEC3C⁺, APOBEC3G⁺, CCL3⁺, CCL4⁺, CCL4L2⁺, CCL5⁺, CD27⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CST7⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, FABP5⁺, GALNT2⁺, GNLY⁺, GZMA⁺, GZMB⁺, GZMH⁺, GZMK⁺, HAVCR2⁺, HCST⁺, HLA-DMA⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRA⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMOX1⁺, IFNG⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, JAML⁺, LINC01871⁺, LYST⁺, MIR155HG⁺, NKXG7⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, RGS1⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상; (h) AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상; 또는 (i) TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 하나 이상을 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계; 농축된 집단 중의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계; 하나 이상의 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 TCR 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 시퀀싱하는 단계; CDR3을 포함하는 알파 채 가변 영역을 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩된 CDR3을 포함하는 베타 채 가변 영역과 짝짓는 단계; 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하고, 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 숙주 세포에 의해 발현시키는 단계; 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 발현하는 숙주 세포를 표적 항원에 대한 항원 특이성에 관하여 스크리닝(screening)하는 단계; 및 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 선택하는 단계를 포함하고, 이때, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 단리되는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체 (TCR) 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 양태는 (a) 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따른 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 준비하는 단계; (b) 농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계; (c) 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 TCR CDR3을 시퀀싱하는 단계; (d) CDR3을 포함하는 알파 채 가변 영역을 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩된 CDR3을 포함하는 베타 채 가변 영역과 짝짓는 단계; (e) 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 PBMC 내로 도입하고, 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 PBMC에 의해 발현시키는 단계; 및 (f) (a)에 따라 제조된 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단의 복수의 별도의 단일 T 세포 샘플에 대해 (c), (d), 및 (e)를 수행함으로써, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 풀링된 집단을 제공하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 풀링된 집단을 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 양태는 환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 단리하는 단계; 농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계; 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 TCR CDR3을 시퀀싱하는 단계; 유전자 발현 프로파일을 갖는 별도의 단일 T 세포 샘플을 선택하는 단계; CDR3을 포함하는 알파 채 가변 영역을 유전자 발현 프로파일을 갖는 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩되는 CDR3을 포함하는 베타 채 가변 영역과 짝짓는 단계; 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하고, 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 숙주 세포에 의해 발현시키는 단계; 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 발현하는 숙주 세포를 표적 항원에 대한 항원 특이성에 관하여 스크리닝하는 단계; 및 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 선택하는 단계를 포함하고, 이때, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 단리되고, 이때, 유전자 발현 프로파일은: (a) (i) CD4⁺ 및 CD8⁺ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) AFAP11L2⁺, ASB2⁺, CXCL13⁺, HMOX1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, PDLIM4⁺, TIGIT⁺, LTB⁺, LYAR⁺, RGCC⁺ 및 S100A10⁺ 중 하나 이상; (b) CD4⁺, 및 BATF⁺, CD247⁺, CXCL13⁺, DNPH1⁺, DUSP4⁺, GYPC⁺, IFITM1⁺, IGFLR1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, LIMS1⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, SH2D1A⁺, SPOCK2⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, CCL5⁺, CD52⁺, GSTP1⁺, JUN⁺, LGALS1⁺, LTB⁺, LYAR⁺, PLP2⁺, RGCC⁺, S100A10⁺, VIM⁺ 및 ZFP36⁺ 중 하나 이상; (c) CD8⁺, 및 AFAP11L2⁺, ALOX5AP⁺, ARHGAP9⁺, ASB2⁺, CARD16⁺, CD3G⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CLIC3⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, GALNT2⁺, GZMB⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺,

HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMG3⁺, HMOX1⁺, ITGAE⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, MPST⁺, NAP1L4⁺, NELL2⁺, NSMCE1⁺, PDLIM4⁺, PTMS⁺, RAB27A⁺, RARRES3⁺, RBPJ⁺, TIGIT⁺, ANXA1⁻, EEF1B2⁻, EMP3⁻, IL7R⁻, LGALS3⁻, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻, RPL36A⁻ 및 S100A10⁻ 중 하나 이상; (d) CD8⁺, 및 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7⁻, CD8A⁻, CD16⁻, CD45RA⁻, CD62L⁻ 및 IL7R⁻ 중 하나 이상; (e) ABI3⁺, AC243960.1⁺, ACP5⁺, ADGRG1⁺, AHI1⁺, ASB2⁺, BST2⁺, CARS⁺, CCL4⁺, CD27⁺, CD2BP2⁺, CD82⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, GALNT2⁺, GATA3⁺, GPR25⁺, GZMB⁺, HDLBP⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DRB1⁺, HMOX1⁺, ID2⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, LINC01871⁺, LINC01943⁺, MIS18BP1⁺, MPST⁺, NCF4⁺, NSMCE1⁺, PCED1B⁺, PDCD1⁺, PHPT1⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, SLC1A4⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, TOX⁺, TRAF3IP3⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상; (f) CD4⁺, 및 ADI1⁺, AHI1⁺, ARID5B⁺, BATF⁺, CMTM7⁺, CPM⁺, CXCL13⁺, CYTH1⁺, ELMO1⁺, ETV7⁺, FABP5⁺, FBLN7⁺, FKBP5⁺, GRAMD1A⁺, HIF1A⁺, IL6ST⁺, ITGA4⁺, ITK⁺, JAK3⁺, KLRB1⁺, LEF1⁺, LIMS1⁺, MAF⁺, MAL⁺, MIR4435-2HG⁺, MYL6B⁺, NAP1L4⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, PASK⁺, PGM2L1⁺, PIM2⁺, PPP1CC⁺, SESN3⁺, SH2D1A⁺, SOCS1⁺, STAT1⁺, SYNE2⁺, TBC1D4⁺, TIGIT⁺, TLK1⁺, TMEM123⁺, TMEM70⁺, TNIK⁺, TOX⁺, TSHZ2⁺, UCP2⁺, VOPP1⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상; (g) CD8⁺, 및 AC243829.4⁺, ACP5⁺, APOBEC3C⁺, APOBEC3G⁺, CCL3⁺, CCL4⁺, CCL4L2⁺, CCL5⁺, CD27⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CST7⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, FABP5⁺, GALNT2⁺, GNLY⁺, GZMA⁺, GZMB⁺, GZMH⁺, GZMK⁺, HAVCR2⁺, HCST⁺, HLA-DMA⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRA⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMOX1⁺, IFNG⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, JAML⁺, LINC01871⁺, LYST⁺, MIR155HG⁺, NKG7⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, RGS1⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상; (h) AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상; 또는 (i) TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 하나 이상을 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 TCR 또는 항원 결합 부분을 단리하는 단계; 및 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cell) 내로 도입하여 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 집단을 제조하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 추가 양태는 관련된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분, 단리된 세포의 집단, 및 임의의 본 발명의 방법에 따라 제조된 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 추가 양태는 포유동물의 병태를 치료 또는 예방하는 관련 방법 및 포유동물의 병태를 치료 또는 예방하기 위한 약제를 제조하는 관련 방법을 제공하며, 이때, 병태는 암 또는 바이러스 병태이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1a는 결장직장암 환자 4323으로부터의 T 세포에 대한 t-SNE 분석 결과를 도시한 것이다(t-SNE 맵). 클러스터 번호는 0 내지 7이다.

도 1b는 도 1a의 t-SNE 맵 상으로 투영된 공지된 신생항원 반응성 TCR을 도시한 것이다. 공지된 신생항원 반응성 TCR은 클러스터 5(상자 영역)에 국한된다.

도 1c는 도 1a의 클러스터 5에서 4323 T 세포에 의한 선택된 유전자의 발현을 도시한 것이다.

도 2a는 클러스터 전사체(transcriptome) 프로파일에 기반하여 전향적으로 재구성된 모든 신생항원 반응성 TCR이 클러스터 5(상자 영역)에 위치했음을 보여주는 환자 4323의 TIL에 대한 t-SNE 맵이다.

도 2b는 시험된 모든 비반응성 TCR(어두운 원)이 특이성을 나타내는 8개의 클러스터 모두에 위치했음을 보여주는 환자 4323의 TIL에 대한 t-SNE 맵이다.

도 3a는 결장직장암 환자 4324로부터의 T 세포에 대한 t-SNE 분석 결과를 도시한 것이다(t-SNE 맵). 클러스터

번호는 0 내지 6이다.

도 3b는 도 3a의 t-SNE 맵 상으로 투영된 공지된 신생항원 반응성 TCR을 도시한 것이다. 공지된 신생항원 반응성 TCR은 클러스터 6(상자 영역)에 국한된다.

도 3c는 도 3a의 클러스터 6에서 4324 T 세포에 의한 선택된 유전자의 발현을 도시한 것이다.

도 4a는 유방암 환자 4322로부터의 T 세포에 대한 t-SNE 분석 결과를 도시한 것이다(t-SNE 맵). 클러스터 번호는 0 내지 8이다.

도 4b는 도 4a의 t-SNE 맵 상으로 투영된 공지된 신생항원 반응성 TCR을 도시한 것이다. 공지된 신생항원 반응성 TCR은 클러스터 3(상자 영역)에 국한된다.

도 4c는 도 4a의 클러스터 3에서 4322 T 세포에 의한 선택된 유전자의 발현을 도시한 것이다.

도 5a는 이전의 결장직장암 환자 4323 및 폐암 환자 4234 및 4237로부터의 $CD8^+$ T 세포에 대한 조합된 t-SNE 분석의 결과를 도시한 것이다(t-SNE 맵). 클러스터 번호는 0-6이다.

도 5b는 도 5a의 t-SNE 맵 상으로 투영된 공지된 신생항원 반응성 TCR, 및 4234 및 4237에 의한 4323 $CD8^+$ 클러스터의 재클러스터링을 도시한 것이다. 공지된 신생항원 반응성 TCR은 클러스터 4(상자 영역)에 국한된다.

도 5c는 도 5a의 클러스터 4에서 $CD8^+$ 4323, 4234 및 4237 T 세포에 의한 선택된 유전자의 발현을 도시한 것이다.

도 6은 환자 4323의 신생항원 반응성 T 세포(n=236 세포) 및 환자 4323의 신생항원 반응성 T 세포 이외의 세포(n=2597)에 대한 NeoTCR 시그니처 점수(signature score)를 보여주는 그래프이다.

도 7a는 결장직장암 환자 4283의 T 세포에 대한 t-SNE 분석 결과를 나타낸다(t-SNE 맵). 클러스터 번호는 0-4이다.

도 7b는 도 7a의 t-SNE 맵 상으로 투영된 공지된 신생항원 반응성 TCR을 도시한 것이다. 공지된 $CD4^+$ 신생항원 반응성 TCR은 클러스터 2(상자 영역)에 국한된다.

도 7c는 도 7a의 클러스터 2에서 4283 T 세포에 의한 선택된 유전자의 발현을 도시한 것이다.

도 8a는 다른 환자의 본래의 tSNE 도표 상으로 투영된 Pt. 4323의 NeoTCR 클러스터 전사체 프로파일로부터 유도된 NeoTCR 시그니처의 95번째 백분위수(더 어두운 점)를 발현하는 세포를 도시한 것이다.

도 8b는 다른 환자의 본래의 tSNE 도표 상으로 투영된 Pt. 4322로부터 유래된 NeoTCR 시그니처의 95번째 백분위수(더 어두운 점)를 발현하는 세포를 도시한 것이다.

도 8c는 다른 환자의 본래의 tSNE 도표 상으로 투영된 Pt. 4323, 4234 및 4237로부터 유래된 NeoTCR 시그니처의 95번째 백분위수(더 어두운 점)를 발현하는 세포를 나타낸다.

도 9는 항체-기반 tSNE 및 전사체-기반 tSNE에 의해 분석된 T 세포의 클러스터링을 비교하는 도표를 도시한 것이다. T 세포는 3명의 NSCLC 환자(4234, 4237 및 4369)로부터의 6가지 신생항원(DOPEY2, U2AF1, SLFN11, BPNT1 및 MLLT4)에 대하여 반응성이었다. 신생항원 반응성 $CD8^+$ T 세포는 더 어두운 점으로 표시된다.

도 10은 환자 4234에 대한 tSNE 도표를 도시한 것이다. 상자 안의 2개의 tSNE 도표는 각각 환자 4234의 TIL에서 $CD8^+$ 세포 및 신생항원 반응성 $CD8^+$ T 세포의 분포를 도시한 것이다. 상자 밖의 10개의 tSNE 도표는 신생항원 반응성 T 세포와 관련된 지시된 분자를 발현하는 세포의 분포를 도시한 것이다. 대표적인 10개 분자에 대한 결과가 제시되며 모든 도표에서 어두운 점은 각 도표 위에 지시된 특징과 관련된 세포를 표시한다.

도 11a 내지 11d는 FBC 항체에 의해 검출된 바와 같은 세포 표면 단백질의 발현을 도시한 것이다. 검은 점은 환자 4234의 TIL에서 신생항원 반응성 T 세포를 나타내고 회색 점은 다른 비항원 반응성 T 세포를 나타낸다. 도 11a: CD8A 발현은 신생항원 반응성 T 세포에서 낮다(흐릿함). 도 11b: CCR7 및 CD45RA 발현은 둘 다 낮으며, 이는 신생항원 반응성 세포가 효과기 기억 T 세포임을 시사한다. 도 11c: 신생항원 반응성 세포는 낮은(흐릿한 양성) CD103 발현을 가지며 CD39 양성이다. 도 11d: 대부분의 신생항원 반응성 CD8 T 세포는 PD-1과 Tim-3 둘 다 발현한다.

도 12는 본 발명의 양태에 따른 단일 세포 분석을 사용하여 종양으로부터 신속한 신생-항원 TCR 단리를 위한 작업 흐름을 예시하는 개략도이다. 본 발명의 양태는 예를 들어 면역요법을 위한 항종양 돌연변이 특이적 신생항원 반응성 TCR을 수득하는 2가지 방법을 제공할 수 있다: (1) 단일 세포 RNA 시퀀싱, 및 TCR을 인실리코(*in silico*) 재구성하기 위한 NeoTCR 유전자 시그니처의 후속 적용, 및 (2) TCR 재구성이 수반되는, 최소 마커를 사용한 분류에 기반한 유세포 분석에 의한 종양 신생항원 반응성 TCR의 직접적 단리.

도 13은 DMSO로 처리된 표적 세포(대조군)(좌측 패널) 또는 HPV16 E4를 제시하는 표적 세포(우측 패널)와의 공동 배양 후 4397 TCR1이 형질도입된 효과기 세포에 의한 4-1BB 발현을 보여주는 FACS 데이터를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 많은 종양이 종양 침윤 림프구(TIL: tumor-infiltrating lymphocyte)를 포함할 수 있지만 이들 중 일부만이 실제로 암 돌연변이-인코딩된 신생항원과 반응성일 수 있다. 소정의 종양 내에 체류하는 많은 TIL은 종양의 표적 면역 거부 반응에 직접적으로 참여하지 않는 방관자 T 세포일 수 있다. 혼합된 집단으로부터 종양 표적 T 세포를 농축하는 마커를 식별하기 위한 이전의 노력은 다양한 성공과 거의 합의의 달성을 이루지 못하였다. 시험관내 신생항원 반응성에 기반하여 선택된 TIL 단편 배양물로 환자를 치료하려는 이전의 노력은 TIL이 진행된 전이성 암 환자의 장기간의 퇴행을 매개하는 능력을 보여주었다. 그러나 TIL 단편 스크리닝은 느리고 노동 집약적인 과정으로 순수한 종양 반응성 TIL 집단을 가진 환자를 치료할 능력이 없을 수 있다. 오히려, TIL 단편 스크리닝은 확장을 위한 시험관내 반응성이 가장 높은 TIL 단편을 선택할 수만 있다. 그러한 기술은 종양 반응성 TIL이 종양과 무관한 경쟁자에 의해 초과 성장하여 반응성이 감소된 치료 제품을 초래할 수 있는 확률론적 과정일 수 있다. 자가유래 종양 반응성 T 세포의 마커에 대한 조사는 PD-1 및 CD39와 같은 일부 마커가 종양 반응성 T 세포를 농축할 수 있음을 보여주었지만, 그러한 농축이 T 세포 치료법을 조작하는 데 적용될 수 있는 TCR 서열의 식별을 허용하기에 충분한지는 불분명하다. 암 관련 바이러스 항원에 반응성인 T 세포의 식별과 관련하여 유사한 문제가 존재한다.
- [0017] 본 발명의 방법은 항원, 예를 들어, 치료법을 위해 T 세포를 조작하는데 사용될 수 있는 암 특이적 항원 및 암 관련 바이러스 항원에 대해 반응성인 T 세포의 TCR 서열을 신속하게 식별함으로써 이러한 단점 및 기타 단점을 개선할 수 있다. 본 발명의 방법은 유리하게는 그러한 세포를 더 낮은 빈도로 함유하는 천연 TIL 집단을 찾아서 성장시키고 투여하는 것과 관련된 불확실성을 방지할 수 있다.
- [0018] 종양 표본으로부터 단리된 T 세포의 단일 세포 분석에 의하여 표적 항원에 대해 반응성인 이전에 식별된 TCR의 대부분을 포함하는 다수의 통상적인 상피암에 존재하는 세포의 집단을 밝혀냈다는 것이 발견되었다. 이러한 집단은 본원에 기재된 유전자 발현 프로파일에 의해 정의될 수 있다. 예를 들어, 환자의 종양으로부터의 특유의 체세포의 개인화된 돌연변이를 표적으로 하는 클론에 의해 정의된 T 세포 수용체를 사용하여, 본원에 기재된 유전자 발현 프로파일을 갖는 세포에 의해 발현된 새로운 미지의 TCR이 재구성되었고, 이는 암 신생항원 반응성인 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 양태는 또한 암 신생항원 반응성 T 세포를 선택하고 식별하는 유전자 발현 프로파일의 CITE-seq 분석을 사용하는 독립적인 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 종양 침윤 T 세포의 성장 및 비싸고 시간 소모적인 스크리닝의 필요 없이 통상적인 암의 세포 기반 면역요법을 위해 T 세포 및 TCR을 신속하게 단리할 잠재력을 극적으로 증가시킨다. 본원에 기재된 유전자 발현 프로파일은 또한 유리하게는 암 관련 바이러스 항원에 반응성인 T 세포 및 TCR을 식별할 수 있다.
- [0019] 암 신생항원 반응성 TIL의 잘 정의된 집단이 다양한 조직의 종양에 존재하고 이러한 집단의 시그니처가 혼합된 집단으로부터 암 신생항원 반응성 TIL을 전향적으로 식별하기에 충분히 강력하다는 것이 또한 발견되었다. 본원에 기재된 본 발명의 방법에 의해 식별된 유전자 발현 프로파일을 이용하여, 종양으로부터 단일 T 세포를 정확하게 분석하고 TCR 정보를 사용하여 환자 치료를 위한 암 신생항원 반응성 TCR을 전향적으로 합성하는 것이 가능하다.
- [0020] 본 발명의 한 양태는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "항원 특이적" 및 "항원 특이성"이라는 문구는, T 세포의 항원 또는 이의 에피토프로의 결합이 면역 반응을 유도하도록, T 세포가 항원 또는 이의 에피토프에 특이적으로 결합하여 항원 또는 이의 에피토프를 면역학적으로 인식함을 의미한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법에 의해 수득된 T 세포의 집단은 본 발명의 방법에 의해 수득되지 않은 세포의 집단에 비해 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포를 더 높은 비율로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 한 양태에서, 표적 항원은 암 항원이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암 항원"은 항원이 종

양 또는 암과 관련되도록 종양 세포 또는 암 세포에 의해 단독으로 또는 우세하게 발현되거나 과발현되는 임의의 분자(예: 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 지질, 탄수화물 등)를 지칭한다. 암 항원은 정상, 비종양 또는 비암성 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 그러나 이러한 경우, 정상적인 비종양 또는 비암성 세포에 의한 암 항원의 발현은 종양 또는 암 세포에 의한 발현만큼 강력하지 않다. 이와 관련하여, 종양 또는 암 세포는 정상적인 비종양 또는 비암성 세포에 의한 항원의 발현과 비교하여 항원을 과발현하거나 유의적으로 더 높은 수준으로 항원을 발현할 수 있다. 또한, 암 항원은 발달 또는 성숙에 대하여 상이한 상태의 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 예를 들어, 암 항원은 일반적으로 성체 숙주에서 발견되지 않는 배아 또는 태아의 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 대안적으로, 암 항원은 일반적으로 성체 숙주에서 발견되지 않는 줄기 세포 또는 전구 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 암 항원은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 메조텔린(mesothelin), CD19, CD22, CD276(B7H3), gp100, MART-1, 상피 성장 인자 수용체 변이체 III(EGFRVIII), TRP-1, TRP-2, 티로시나제, NY-ESO-1(CAG-3으로도 공지됨), MAGE-1, MAGE-3 등이 포함된다

[0022] 본 발명의 한 양태에서, 표적 항원은 암 특이적 돌연변이에 의해 인코딩되는 신생항원이다. 신생항원은 발현된 단백질의 암 특이적 돌연변이에서 발생하는 암 항원의 한 부류이다. 용어 "신생항원"은 정상(비암성) 세포에 의해 발현되는 상응하는 야생형(비돌연변이) 펩티드 또는 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 암 세포에 의해 발현되는 펩티드 또는 단백질과 관련된다. 신생항원은 환자 특이적일 수 있다. "암 특이적 돌연변이"는 종양 또는 암 세포의 핵산에는 존재하지만 상응하는 정상적인, 즉 비종양성 또는 비암성 세포의 핵산에는 존재하지 않는 체세포 돌연변이이다.

[0023] 본 발명의 한 양태에서, 표적 항원은 바이러스 특이적 항원이다. 바이러스 특이적 항원은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 바이러스에 감염되지 않은 세포에 의해 발현되거나 제시되지 않는 바이러스 감염 세포(APC: virally-infected cell)에 의해 발현되거나 제시되는 임의의 바이러스 단백질 또는 펩티드, 예를 들어 env, gag, pol, gp120, 티미딘 키나제 등을 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 바이러스 특이적 항원은 암 관련 바이러스 항원, 예를 들어 인간 유두종바이러스(HPV: human papillomavirus) 16 E4, HPV 16 E6, HPV 16 E7, HPV 18 E6, HPV 18 E7 등이다. 바이러스 특이적 항원은, 예를 들어, 헤르페스(herpes) 바이러스 항원, 폭스(pox) 바이러스 항원, 헤파드나바이러스(hepadnavirus) 항원, 유두종 바이러스 항원, 아데노바이러스(adenovirus) 항원, 코로나바이러스(coronavirus) 항원, 오르토믹소바이러스(orthomyxovirus) 항원, 파라믹소바이러스(paramyxovirus) 항원, 플라비바이러스(flavivirus) 항원 및 칼리시바이러스(calicivirus) 항원일 수 있다. 예를 들어, 바이러스 특이적 항원은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV: respiratory syncytial virus) 항원, 인플루엔자 바이러스 항원, 단순 헤르페스 바이러스 항원, 엡슈타인-바르 바이러스(EBV: Epstein-Barr virus) 항원, HPV 항원, 수두(varicella) 바이러스 항원, 거대 세포 바이러스 항원, A형 간염 바이러스 항원, B형 간염 바이러스 항원, C형 간염 바이러스 항원, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항원, 인간 T-림프성 바이러스 항원, 칼리시 바이러스 항원, 아데노바이러스 항원 및 아레나 바이러스 항원으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 암 관련 바이러스 항원은 HPV 항원이다.

[0024] 상기 방법은 환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 종양 샘플은 예를 들어 원발성 종양으로부터의 조직 또는 전이성 종양 부위로부터의 조직일 수 있다. 이와 같이, 종양 샘플은 제한 없이 흡인, 생검 또는 절제를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 획득될 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 환자는 암 환자이다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 환자는 바이러스 병태를 앓고 있는 환자이다.

[0025] 상기 방법은 유전자 발현 프로파일을 갖는 분리된 T 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 유전자 발현 프로파일을 갖는 분리된 T 세포를 선택하는 단계는 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하고, 하나 이상의 단일 T 세포에 의한 하나 이상의 유전자의 발현 및/또는 비-발현을 별도로 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일을 갖는 분리된 T 세포를 선택하는 단계는 단일 세포 전사체 분석을 수행하는 단계를 포함한다.

[0026] 하나 이상의 단일 T 세포에 의한 하나 이상의 유전자의 발현 및/또는 비-발현의 검출은 예를 들어 CHROMIUM 단일 세포 유전자 발현 솔루션 시스템(Single Cell Gene Expression Solution system)[10x 게노믹스(Genomics), 캘리포니아주 플레젠티 소재]("CHROMIUM 시스템")을 사용하여 수행될 수 있다. CHROMIUM 시스템은 세포별로 높은 처리량의 디지털 유전자 발현에 의해 복합적 세포의 집단의 심층 프로파일링을 수행한다. CHROMIUM 시스템은 5' 전사 또는 TCR 분석을 위해 개별 세포의 cDNA를 바코드로 표시한다. 예를 들어, 샘플은 10,000개 세포의 입력으로 시작하여 약 500개 유전자/세포의 평균에 의해 약 3000개 세포/샘플에 대한 데이터를 산출할 수 있다.

[0027] 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일을 갖는 분리된 T 세포를 선택하는 단계는 시퀀싱에 의한 전사체

및 에피토프의 세포 인덱싱(CITE-Seq: Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing) 분석을 수행하는 단계를 포함한다. CITE-Seq는 예를 들어 스토에키우스(Stoeckius) 등의 문헌[*Nat. Methods*, 14(9): 865-868 (2017)]에 기재되어 있다. 간단히 말해서, CITE-seq는 많은 단일 세포에 대한 전사체 프로파일링과 함께 단백질 마커의 항체 기반 검출을 병렬로 조합한다. 올리고뉴클레오타이드-표지화된 항체는 세포 단백질 및 전사체 측정을 효율적인 단일 세포 판독에 통합하는 데 사용된다.

[0028] 단일 세포 전사체 분석(예를 들어, 약 3000개 세포/샘플 및 약 500개 유전자/세포)에 의해 산출된 데이터의 높은 차원수 때문에, 유전자 발현 데이터의 분석을 위해 차원 축소가 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 하나 이상의 단일 세포 차원 축소 방법을 수행하는 단계를 포함한다. 단일 세포 차원 축소 방법의 일례는 t-분포 확률론적 이웃 임베딩(t-SNE: t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) 분석이다. t-SNE는 각 데이터 포인트에 2차원 또는 3차원 맵의 위치를 제공하여 고차원 데이터를 시각화한다. t-SNE는 예를 들어 반 데르 마텐(Van der Maaten) 및 힌턴(Hinton, J.)의 문헌[*Machine Learning Res.*, 9: 2579-2605(2008)]에 기재되어 있다. 간단히 말해서, t-SNE는 두 단계로 수행된다. 1 단계에서는 다양한 인접 지점 간의 관계를 나타내는 고차원 공간에 확률 분포가 생성된다. 2단계에서, 가능한 한 최상의 확률 분포를 따르는 저차원 공간이 재생성된다. t-SNE의 "t"는 2단계에서 사용된 분포인 t-분포에서 기원된다. "S" 및 "N"("확률론적" 및 "이웃")은 이웃한 포인트를 가로 지르는 확률 분포의 사용에서 기원된다. 단일 세포 차원 축소 방법의 또 다른 예는 균일한 매니폴드 추정 및 투영(UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection)이다.

[0029] 유전자 발현 프로파일은 (i) 하나 이상의 유전자의 양성 발현, (ii) 하나 이상의 유전자의 음성 발현, 또는 (iii) 하나 이상의 유전자의 음성 발현과 조합된 하나 이상의 유전자의 양성 발현을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양성"(이는 "+"로 약칭될 수 있음)은 지시된 유전자의 발현과 관련하여 T 세포가 환자의 중앙 샘플에서의 다른 T 세포와 비교하여 지시된 유전자의 발현을 상향 조절함을 의미한다. 상향조절된 발현은 예를 들어, 약 0.2, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 또는 전술된 값 중 임의의 두 값 사이의 범위, 또는 그 이상의 평균 대수 배수 변화(염기 2에 대한)에 의한 지시된 유전자의 발현의 정량적 증가를 포함할 수 있다. 용어 "음성"(이는 "-"로 약칭될 수 있음)은, 지시된 유전자의 발현과 관련하여 본원에서 사용되는 바와 같이, T 세포가 환자의 중앙 샘플에서 다른 T 세포와 비교하여 지시된 유전자의 발현을 하향조절함을 의미한다. 하향조절된 발현은 예를 들어, 약 -0.2, 약 -0.5, 약 -1, 약 -2, 약 -3, 약 -4, 약 -5, 약 -6, 약 -7, 약 -8, 약 -9, 약 -10, 약 -11, 약 -12, 약 -13, 약 -14, 약 -15, 약 -16, 약 -17, 약 -18, 약 -19, 약 -20, 약 -21, 약 -22, 약 -23, 약 -24, 약 -25, 약 -26, 약 -27, 약 -28, 약 -29, 약 -30, 약 -31, 약 -32, 약 -33, 약 -34, 약 -35, 또는 전술된 값 중 임의의 두 값 사이의 범위, 또는 그 이상의 평균 대수 배수 변화(염기 2에 대한)에 의한 표시된 유전자의 발현의 양적 감소를 포함할 수 있다. 하향조절된 발현은 지시된 유전자의 발현의 부재를 포함할 수 있지만, 하향조절은 또한 환자의 중앙 샘플에서의 다른 T 세포와 비교하여 더 낮은 수준이지만 지시된 유전자의 발현의 존재를 포함한다.

[0030] 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 (i) $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) $AFAP11L2^+$, $ASB2^+$, $CXCL13^+$, $HMOX1^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $PDLIM4^+$, $TIGIT^+$, LTB^- , $LYAR^-$, $RGCC^-$ 및 $S100A10^-$ 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 (i) $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) $AFAP11L2^+$, $ASB2^+$, $CXCL13^+$, $HMOX1^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $PDLIM4^+$, $TIGIT^+$, LTB^- , $LYAR^-$, $RGCC^-$ 및 $S100A10^-$ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11개 또는 그 이상(또는 전술된 값 중 임의의 두 값 사이의 범위)을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 (i) $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 중 하나 또는 둘 다, 및 (ii) $AFAP11L2^+$, $ASB2^+$, $CXCL13^+$, $HMOX1^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $PDLIM4^+$, $TIGIT^+$, LTB^- , $LYAR^-$, $RGCC^-$ 및 $S100A10^-$ 모두를 포함한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 $CD4^+$, 및 $BATF^+$, $CD247^+$, $CXCL13^+$, $DNPH1^+$, $DUSP4^+$, $GYPC^+$, $IFITM1^+$, $IGFLR1^+$, $ITM2A^+$, $KLRB1^+$, $LIMS1^+$, NMB^+ , $NR3C1^+$, $SH2D1A^+$, $SPOCK2^+$, $SUPT3H^+$, $TIGIT^+$, $TNFRSF18^+$, $CCL5^-$, $CD52^-$, $GSTP1^-$, JUN^- , $LGALS1^-$, LTB^- , $LYAR^-$, $PLP2^-$, $RGCC^-$, $S100A10^-$, VIM^- 및 $ZFP36^-$ 중 하나 이상을 포함한다. 유전자 발현 프로파일은, 예를 들면, (i) $CD4^+$ 및 $CXCL13^+$; (ii) $CD4^+$, $CXCL13^+$, 및 $CD39^+$, $TIGIT^+$ 및

PD-1⁻ 중 하나 이상; 또는 (iii) CD4⁺, CXCL13⁺, CD39⁺, TIGIT⁺ 및 PD-1⁻ 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 유전자 발현 프로파일은 CD4⁺, 및 BATF⁺, CD247⁺, CXCL13⁺, DNP1⁺, DUSP4⁺, GYPC⁺, IFITM1⁺, IGFLR1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, LIMS1⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, SH2D1A⁺, SPOCK2⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, CCL5⁻, CD52⁻, GSTP1⁻, JUN⁻, LGALS1⁻, LTB⁻, LYAR⁻, PLP2⁻, RGCC⁻, S100A10⁻, VIM⁻ 및 ZFP36⁻ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29개 또는 그 이상(또는 전술된 값 중 임의의 두 값 사이의 범위)을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD4⁺, 및 BATF⁺, CD247⁺, CXCL13⁺, DNP1⁺, DUSP4⁺, GYPC⁺, IFITM1⁺, IGFLR1⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, LIMS1⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, SH2D1A⁺, SPOCK2⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, CCL5⁻, CD52⁻, GSTP1⁻, JUN⁻, LGALS1⁻, LTB⁻, LYAR⁻, PLP2⁻, RGCC⁻, S100A10⁻, VIM⁻ 및 ZFP36⁻ 모두를 포함한다.

[0032]

본 발명의 또 다른 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 AFAP1IL2⁺, ALOX5AP⁺, ARHGAP9⁺, ASB2⁺, CARD16⁺, CD3G⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CLIC3⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, GALNT2⁺, GZMB⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMGN3⁺, HMOX1⁺, ITGAE⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, MPST⁺, NAP1L4⁺, NELL2⁺, NSMCE1⁺, PDLIM4⁺, PTMS⁺, RAB27A⁺, RARRES3⁺, RBPJ⁺, TIGIT⁺, ANXA1⁻, EEF1B2⁻, EMP3⁻, IL7R⁻, LGALS3⁻, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻, RPL36A⁻ 및 S100A10⁻ 중 하나 이상을 포함한다. 유전자 발현 프로파일은, 예를 들면, (i) CD8⁺ 및 CXCL13⁺; (ii) CD8⁺, TIGIT⁺, 및 CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 하나 또는 둘 다; (iii) CD8⁺, TIGIT⁺, CD39⁺, 및 PD-1⁺; (iv) CD8⁺, CXCL13⁺, 및 CD39⁺, TIGIT⁺, 및 PD-1⁺ 중 하나 이상; 또는 (v) CD8⁺, CXCL13⁺, CD39⁺, TIGIT⁺, 및 PD-1⁺을 포함할 수 있다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 AFAP1IL2⁺, ALOX5AP⁺, ARHGAP9⁺, ASB2⁺, CARD16⁺, CD3G⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CLIC3⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, GALNT2⁺, GZMB⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMGN3⁺, HMOX1⁺, ITGAE⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, MPST⁺, NAP1L4⁺, NELL2⁺, NSMCE1⁺, PDLIM4⁺, PTMS⁺, RAB27A⁺, RARRES3⁺, RBPJ⁺, TIGIT⁺, ANXA1⁻, EEF1B2⁻, EMP3⁻, IL7R⁻, LGALS3⁻, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻, RPL36A⁻, 및 S100A10⁻ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42개 또는 그 이상(또는 전술된 값 중 임의의 두 값 사이의 범위)을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 AFAP1IL2⁺, ALOX5AP⁺, ARHGAP9⁺, ASB2⁺, CARD16⁺, CD3G⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CLIC3⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, GALNT2⁺, GZMB⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMGN3⁺, HMOX1⁺, ITGAE⁺, ITM2A⁺, KLRB1⁺, MPST⁺, NAP1L4⁺, NELL2⁺, NSMCE1⁺, PDLIM4⁺, PTMS⁺, RAB27A⁺, RARRES3⁺, RBPJ⁺, TIGIT⁺, ANXA1⁻, EEF1B2⁻, EMP3⁻, IL7R⁻, LGALS3⁻, LTB⁻, LYAR⁻, RGCC⁻, RPL36A⁻ 및 S100A10⁻의 모두를 포함한다.

[0033]

본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 ABI3⁺, AC243960.1⁺, ACP5⁺, ADGRG1⁺, AHI1⁺, ASB2⁺, BST2⁺, CARS⁺, CCL4⁺, CD27⁺, CD2BP2⁺, CD82⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, GALNT2⁺, GATA3⁺, GPR25⁺, GZMB⁺, HDLBP⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DRB1⁺, HMOX1⁺, ID2⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, LAG3⁺, LINC01871⁺, LINC01943⁺, MIS18BP1⁺, MPST⁺, NCF4⁺, NSMCE1⁺, PCED1B⁺, PDCD1⁺, PHPT1⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, SLC1A4⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, TOX⁺, TRAF3IP3⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 ABI3⁺, AC243960.1⁺, ACP5⁺, ADGRG1⁺, AHI1⁺, ASB2⁺, BST2⁺, CARS⁺, CCL4⁺, CD27⁺, CD2BP2⁺, CD82⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, GALNT2⁺, GATA3⁺, GPR25⁺, GZMB⁺, HDLBP⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DRB1⁺, HMOX1⁺, ID2⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, LAG3⁺, LINC01871⁺, LINC01943⁺, MIS18BP1⁺, MPST⁺, NCF4⁺, NSMCE1⁺, PCED1B⁺, PDCD1⁺, PHPT1⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, SLC1A4⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, TOX⁺, TRAF3IP3⁺ 및 YPEL2⁺ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

개 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 ABI3⁺, AC243960.1⁺, ACP5⁺, ADGRG1⁺, AHI1⁺, ASB2⁺, BST2⁺, CARS⁺, CCL4⁺, CD27⁺, CD2BP2⁺, CD82⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, CXCR6⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, GALNT2⁺, GATA3⁺, GPR25⁺, GZMB⁺, HDLBP⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DRB1⁺, HMOX1⁺, ID2⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, LAG3⁺, LINC01871⁺, LINC01943⁺, MIS18BP1⁺, MPST⁺, NCF4⁺, NSMCE1⁺, PCED1B⁺, PDCD1⁺, PHPT1⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, SLC1A4⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺, TNFRSF18⁺, TOX⁺, TRAF3IP3⁺ 및 YPEL2⁺ 모두를 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 추가로 LAG3⁺을 포함한다.

[0034]

본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD4⁺, 및 ADI1⁺, AHI1⁺, ARID5B⁺, BATF⁺, CMTM7⁺, CPM⁺, CXCL13⁺, CYTH1⁺, ELMO1⁺, ETV7⁺, FABP5⁺, FBLN7⁺, FKBP5⁺, GRAMD1A⁺, HIF1A⁺, IL6ST⁺, ITGA4⁺, ITK⁺, JAK3⁺, KLRB1⁺, LEF1⁺, LIMS1⁺, MAF⁺, MAL⁺, MIR4435-2HG⁺, MYL6B⁺, NAP1L4⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, PASK⁺, PGM2L1⁺, PIM2⁺, PPP1CC⁺, SESN3⁺, SH2D1A⁺, SOCS1⁺, STAT1⁺, SYNE2⁺, TBC1D4⁺, TIGIT⁺, TLK1⁺, TMEM123⁺, TMEM70⁺, TNIK⁺, TOX⁺, TSHZ2⁺, UCP2⁺, VOPP1⁺ 및 YPEL2⁺ 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 ADI1⁺, AHI1⁺, ARID5B⁺, BATF⁺, CMTM7⁺, CPM⁺, CXCL13⁺, CYTH1⁺, ELMO1⁺, ETV7⁺, FABP5⁺, FBLN7⁺, FKBP5⁺, GRAMD1A⁺, HIF1A⁺, IL6ST⁺, ITGA4⁺, ITK⁺, JAK3⁺, KLRB1⁺, LEF1⁺, LIMS1⁺, MAF⁺, MAL⁺, MIR4435-2HG⁺, MYL6B⁺, NAP1L4⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, PASK⁺, PGM2L1⁺, PIM2⁺, PPP1CC⁺, SESN3⁺, SH2D1A⁺, SOCS1⁺, STAT1⁺, SYNE2⁺, TBC1D4⁺, TIGIT⁺, TLK1⁺, TMEM123⁺, TMEM70⁺, TNIK⁺, TOX⁺, TSHZ2⁺, UCP2⁺, VOPP1⁺ 및 YPEL2⁺ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48개 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD4⁺, 및 ADI1⁺, AHI1⁺, ARID5B⁺, BATF⁺, CMTM7⁺, CPM⁺, CXCL13⁺, CYTH1⁺, ELMO1⁺, ETV7⁺, FABP5⁺, FBLN7⁺, FKBP5⁺, GRAMD1A⁺, HIF1A⁺, IL6ST⁺, ITGA4⁺, ITK⁺, JAK3⁺, KLRB1⁺, LEF1⁺, LIMS1⁺, MAF⁺, MAL⁺, MIR4435-2HG⁺, MYL6B⁺, NAP1L4⁺, NMB⁺, NR3C1⁺, PASK⁺, PGM2L1⁺, PIM2⁺, PPP1CC⁺, SESN3⁺, SH2D1A⁺, SOCS1⁺, STAT1⁺, SYNE2⁺, TBC1D4⁺, TIGIT⁺, TLK1⁺, TMEM123⁺, TMEM70⁺, TNIK⁺, TOX⁺, TSHZ2⁺, UCP2⁺, VOPP1⁺ 및 YPEL2⁺ 모두를 포함한다.

[0035]

본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 AC243829.4⁺, ACP5⁺, APOBEC3C⁺, APOBEC3G⁺, CCL3⁺, CCL4⁺, CCL4L2⁺, CCL5⁺, CD27⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CST7⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, FABP5⁺, GALNT2⁺, GNLY⁺, GZMA⁺, GZMB⁺, GZMH⁺, GZMK⁺, HAVCR2⁺, HCST⁺, HLA-DMA⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRA⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMOX1⁺, IFNG⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, JAML⁺, LINC01871⁺, LYST⁺, MIR155HG⁺, NKG7⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, RGS1⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 AC243829.4⁺, ACP5⁺, APOBEC3C⁺, APOBEC3G⁺, CCL3⁺, CCL4⁺, CCL4L2⁺, CCL5⁺, CD27⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CST7⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, FABP5⁺, GALNT2⁺, GNLY⁺, GZMA⁺, GZMB⁺, GZMH⁺, GZMK⁺, HAVCR2⁺, HCST⁺, HLA-DMA⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRA⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMOX1⁺, IFNG⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, JAML⁺, LINC01871⁺, LYST⁺, MIR155HG⁺, NKG7⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, RGS1⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48개 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 AC243829.4⁺, ACP5⁺, APOBEC3C⁺, APOBEC3G⁺, CCL3⁺, CCL4⁺, CCL4L2⁺, CCL5⁺, CD27⁺, CD8A⁺, CD8B⁺, CST7⁺, CTSW⁺, CXCL13⁺, DUSP4⁺, ENTPD1⁺, FABP5⁺, GALNT2⁺, GNLY⁺, GZMA⁺, GZMB⁺, GZMH⁺, GZMK⁺, HAVCR2⁺, HCST⁺, HLA-DMA⁺, HLA-DPA1⁺, HLA-DPB1⁺, HLA-DRA⁺, HLA-DRB1⁺, HLA-DRB5⁺, HMOX1⁺, IFNG⁺, IGFLR1⁺, ITGAL⁺, JAML⁺, LINC01871⁺, LYST⁺, MIR155HG⁺, NKG7⁺, PLEKHF1⁺, PRF1⁺, PTMS⁺, RGS1⁺, SLF1⁺, SMC4⁺, SUPT3H⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 모두를 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프

로파일은 추가로 LAG3⁺을 포함한다.

[0036] 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 AHI1⁺, CXCL13⁺, FABP5⁺, NAP1L4⁺, ORMDL3⁺, PPP1R16B⁺, SH2D1A⁺, TIGIT⁺ 및 TOX⁺ 모두를 포함한다.

[0037] 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 중 임의로 1, 2개 또는 그 이상을 포함할 수 있다.. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 TIGIT⁺, CD39⁺ 및 PD-1⁺ 모두를 포함한다.

[0038] 본 발명의 또 다른 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7⁻, CD8A⁻, CD16⁻, CD45RA⁻, CD62L⁻ 및 IL7R⁻ 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 추가로 PD-1⁺ 및 TIM-3⁺ 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7⁻, CD8A⁻, CD16⁻, CD45RA⁻, CD62L⁻ 및 IL7R⁻ 중 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 그 이상(또는 전술된 값 중 임의의 두 값 사이의 범위)을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7⁻, CD8A⁻, CD16⁻, CD45RA⁻, CD62L⁻ 및 IL7R⁻ 모두를 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 (중양 중 다른 CD8⁺ T 세포와 비교하여) 낮은 CD8A, CD45RA 음성, 매우 낮은 CD62L 음성, 매우 낮은 CCR7 음성, 매우 낮은 CD16 음성, 및 매우 낮은 IL7R 음성 중 하나를 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CD8⁺, 및 세포 표면 단백질 CD39⁺, CD74⁺, CD103⁺, CD106⁺, CD137⁺, HLA-DR⁺, TIGIT⁺, CCR7^{lo}, CD8A^{lo}, CD16^{lo}, CD45RA^{lo}, CD62L^{lo} 및 IL7R^{lo} 중 하나 이상을 포함한다. 지시된 유전자의 발현과 관련하여 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "낮음"(이는 "lo"로 약칭될 수 있음)은 면역조직화학적 방법(예: FACS, 유세포 분석, 면역형광 분석 및 현미경 검사)을 사용하여 지시된 유전자의 발현에 대해 양성인 다른 세포보다 지시된 발현된 유전자의 경우 덜 밝게 염색되는 세포의 하위 집합을 지칭한다. 예를 들어, 지시된 유전자의 "낮음" 발현 수준을 갖는 세포는 지시된 유전자의 발현에 대해 양성인 다른 세포의 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 95% 이상 덜 밝게 염색될 수 있다.

[0039] 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 TIGIT⁺를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 유전자 발현 프로파일은 CXCL13⁺을 포함한다.

[0040] 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 본원에 기재된 유전자 발현 프로파일에서 유전자(들)의 발현 생성물(들)의 존재 또는 부재를 검출하거나 그 양을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일의 양성으로 발현된 유전자(들)에 의해 인코딩되는 단백질(들)의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일에서의 발현에 대해 음성인 유전자(들)에 의해 인코딩되는 단백질(들)의 부재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일에서의 발현에 대해 음성인 유전자(들)에 의해 인코딩되는 단백질(들)의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일에서의 발현에 대해 양성인 유전자(들)에 의해 인코딩되는 단백질(들)의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일의 양성으로 발현된 유전자(들)에 의해 인코딩되는 RNA의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일에서의 발현에 대해 음성인 유전자(들)에 의해 인코딩된 RNA의 부재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는

추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일의 양성으로 발현된 유전자(들)에 의해 인코딩되는 RNA의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일의 음성으로 발현된 유전자(들)에 의해 인코딩되는 RNA의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일에서 하나 이상의 유전자의 세포 표면 발현의 존재 및/또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 유전자 발현 프로파일을 갖는 단리된 T 세포를 선택하는 단계는 유전자 발현 프로파일에서 하나 이상의 유전자의 세포 표면 발현의 양을 측정하는 단계를 포함한다. 세포 표면 발현은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 유세포 분석법[예를 들어, 형광 활성화 세포 분류(FACS: fluorescence-activated cell sorting)]에 의해 검출 또는 측정될 수 있다.

[0041] 본 발명의 한 양태에서, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법은 T 세포의 수를 확장하는 것을 포함하지 않는다. T 세포의 수의 확장은 예를 들어 미국 특허 제8,034,334호; 미국 특허 제8,383,099호; 미국 특허 출원 공개공보 제2012/0244133호; 두들리(Dudley) 등의 문헌[J. Immunother., 26:332-42(2003)]; 및 리델(Riddell) 등의 문헌[J. Immunol. Methods, 128: 189-201(1990)]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 것 처럼 임의의 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, T 세포의 수의 확장은 T 세포를 OKT3 항체, IL-2 및 피더 PBMC(예를 들어, 조사된 동종이계 PBMC)와 함께 배양함으로써 수행된다. 표적 항원에 대해 원하는 특이성을 갖는 희귀한 및/또는 취약한 T 세포는 T 세포의 수를 확장하는 동안 손실될 수 있다. 본 발명의 방법은 유리하게는 T 세포의 수를 확장하지 않고 본 발명의 방법을 수행함으로써 이러한 희귀한 및/또는 취약한 T 세포를 포함하는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조할 수 있다.

[0042] 상기 방법은 선택되지 않은 세포로부터 선택된 T 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 이때, 분리된 선택된 T 세포는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제공한다. 이와 관련하여, 선택된 세포는 선택되지 않은 세포, 즉 유전자 발현 프로파일을 갖지 않는 세포로부터 물리적으로 분리될 수 있다. 선택된 세포는 예를 들어 분류와 같은 임의의 적절한 방법에 의해 선택되지 않은 세포로부터 분리될 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 방법을 제공한다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, TCR의 "항원 결합 부분"은, 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같이, 항원 결합 부분이 표적 항원에 특이적으로 결합하는 한, 그것의 모체가 되는 TCR의 연속 아미노산을 포함하는 임의의 부분을 지칭한다. 용어 "항원 결합 부분"은 본 발명의 TCR의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이 부분 또는 단편은 그것의 모체가 되는 TCR(또는 TCR)의 생물학적 활성을 보유한다. 항원 결합 부분은 예를 들어, 모 TCR과 비교하여 유사한 정도로, 동일한 정도로, 또는 더 높은 정도로 표적 항원에 특이적으로 결합하거나, 또는 병태를 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 유지하는 TCR의 부분을 포함한다. 모 TCR과 관련하여, 기능적 부분은 예를 들어, 모 TCR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0045] 항원 결합 부분은 본 발명의 TCR의 α 및 β 쇄 중 하나 또는 둘 다의 항원 결합 부분, 예컨대 본 발명의 TCR의 α 쇄 및/또는 β 쇄의 가변 영역(들)의 상보성 결정 영역(CDR)1, CDR2, 및 CDR3중 하나 이상을 포함하는 부분을 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 항원 결합 부분은 α 쇄의 CDR1(CDR1 α), α 쇄의 CDR2(CDR2 α), α 쇄의 CDR3(CDR3 α), β 쇄의 CDR1(CDR1 β), β 쇄의 CDR2(CDR2 β), β 쇄의 CDR3(CDR3 β), 또는 이들의 임의의 조합의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항원 결합 부분은 본 발명의 TCR의 CDR1 α , CDR2 α 및 CDR3 α 의 아미노산 서열; CDR1 β , CDR2 β 및 CDR3 β 의 아미노산 서열; 또는 CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β 및 CDR3 β 모두의 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 본 발명의 한 양태에서, 항원 결합 부분은 예를 들어 상기 제시된 CDR 영역의 조합을 포함하는 본 발명의 TCR의 가변 영역을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 항원 결합 부분은 본 발명의 TCR의 α 쇄의 가변 영역의 아미노산 서열(V α), β 쇄의 가변 영역의 아미노산 서열(V β), 또는 V α 및 V β 둘 다의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 한 양태에서, 항원 결합 부분은 가변 영역 및 불변 영역의 조합을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 항원 결합 부분은 본 발명의 TCR의 α 또는 β 쇄, 또는 α 및 β 쇄 둘 다의 전체 길이를 포함할 수 있다.

[0048] 상기 방법은 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 본 발명의 방법에 따라 표적 항원에 대하여

항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0049] 상기 방법은 농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하고, 하나 이상의 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 TCR 알파쇄 CDR3 및 베타쇄 CDR3을 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, TCR 알파쇄 CDR3 및 베타쇄 CDR3의 시퀀싱은 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 유전자 발현 프로파일을 분석하기 위해 사용되는 단일 세포 전사체 분석을 사용하여 수행될 수 있다. TCR 알파쇄 CDR3 및 베타쇄 CDR3을 시퀀싱하기 위한 다른 기술은 예를 들어 US 제2020/0056237호 및 WO 제2017/048614호에 기재되어 있다.
- [0050] 상기 방법은 CDR3을 포함하는 알파쇄 가변 영역을 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩된 CDR3을 포함하는 베타쇄 가변 영역과 짝짓는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 상기 방법은 CDR3을 포함하는 알파쇄 가변 영역과 CDR3을 포함하는 베타쇄 가변 영역의 짝짓기가 기능적 TCR을 산출하도록 TCR을 재구성하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, TCR은 인실리코 재구성된다. TCR을 인실리코 재구성하고 CDR3을 포함하는 알파쇄 가변 영역을 CDR3을 포함하는 베타쇄 가변 영역과 짝짓는 방법은 예를 들어 US 제2020/0056237호 및 WO 제2017/048614호에 기재되어 있다.
- [0051] 상기 방법은 선택된 T 세포로부터 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 단리하는 단계를 포함할 수 있으며, 이때, TCR 또는 이의 항원 결합 부분은 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는다.
- [0052] 상기 방법은 짝지어진 알파쇄 가변 영역 및 베타쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하고, 짝지어진 알파쇄 가변 영역 및 베타쇄 가변 영역을 숙주 세포에 의해 발현시키는 단계를 포함할 수 있다. 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 재조합 발현 벡터)을 숙주 세포 내로 도입하는 단계는 예를 들어, 그린(Green) 등(Eds.)의 문헌[*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th Ed. (2012)]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 임의의 다양한 상이한 방식으로 수행될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하는데 유용한 기술의 비제한적 예는 형질전환, 형질도입, 형질감염 및 전기천공을 포함한다.
- [0053] 본 발명의 한 양태에서, 상기 방법은 예를 들어 그린(Green) 등의 상기 문헌에 기재된 바와 같은 확립된 분자 클로닝 기술을 사용하여 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 재조합 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계를 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 플라스미드 및 바이러스와 같이 증식 및 확장 또는 발현 또는 둘 다를 위해 설계된 벡터를 포함한다. 벡터는 트랜스포존(transposon)/트랜스포사제(transposase), pUC 시리즈[퍼멘타스 라이프 사이언시즈(Fermentas Life Sciences)], pBluescript 시리즈[스타르타젠(Stratagene), 캘리포니아주 라호야 소재], pET 시리즈[노바젠(Novagen), 위스콘신주 매디슨 소재], pGEX 시리즈[파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech), 스웨덴 옘살라 소재] 및 pEX 시리즈[클론텍(Clontech), 캘리포니아주 팔로 알토 소재]로 구성된 군에서 선택될 수 있다. λGT10, λGT11, λZapII(스타르타젠), λEMBL4 및 λNM1149와 같은 박테리오파지 벡터도 사용할 수 있다. 식물 발현 벡터의 예는 pBI101, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19(클론텍)를 포함한다. 동물 발현 벡터의 예는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(클론텍)를 포함한다. 바람직하게는, 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터이다. 다른 양태에서, 재조합 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존이다.
- [0054] 숙주 세포(들)는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 진균류 또는 조류일 수 있거나, 또는 원핵 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포(들)는 배양된 세포 또는 1차 세포, 즉 유기체, 예를 들어 인간으로부터 직접적으로 단리된 세포일 수 있다. 숙주 세포(들)는 부착 세포 또는 현탁 세포, 즉 현탁액에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 DH5α 콜라이(*E. coli*) 세포, 차이니스 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등을 포함한다. TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 증폭 또는 복제할 목적으로, 숙주 세포는 바람직하게는 원핵 세포, 예를 들어 DH5α 세포이다. 재조합 TCR을 생산할 목적으로, 숙주 세포는 바람직하게는 포유동물 세포이다. 가장 바람직하게는, 숙주 세포는 인간 세포이다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직으로부터 유래할 수 있고, 임의의 발달 단계일 수 있지만, 숙주 세포는 바람직하게는 말초 혈액 림프구(PBL: peripheral blood lymphocyte) 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)이다. 보다 바람직하게는, 숙주 세포는 T 세포이다.
- [0055] 본원의 목적을 위해, T 세포는 임의의 T 세포, 예컨대 배양된 T 세포, 예를 들어 1차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주, 예를 들어 Jurkat, SupT1 등으로부터의 T 세포, 또는 포유동물로부터 수득된 T 세포일 수 있다. 포유동물

로부터 획득되는 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 기타 조직 또는 체액을 포함하나 이에 제한되지 않는 수많은 공급원으로부터 획득될 수 있다. T 세포는 또한 농축되거나 정제될 수 있다. 바람직하게는, T 세포는 인간 T 세포이다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고 임의의 발달 단계일 수 있으며, $CD4^+/CD8^+$ 이중 양성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T 세포, 예를 들어 Th_1 및 Th_2 세포, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포), 종양 침윤 림프구(TIL), 기억 T 세포(예를 들어, 중추 기억 T 세포 및 효과기 기억 T 세포), 나이브 T 세포 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 상기 방법은 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 발현하는 숙주 세포를 표적 항원에 대한 항원 특이성에 관하여 스크리닝하는 단계 및 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 선택하는 단계를 포함할 수 있고, 이때, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 단리된다. 항원 특이성에 대한 숙주 세포의 스크리닝 및 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역의 선택은 예를 들어 US 제2017/0218042호 및 US 제2017/0224800호에 기재된 바와 같은 공지된 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 추가 양태는 예를 들어 단일 세포 RNA 시퀀싱 및 TCR을 인실리코 재구성하기 위한 유전자 발현 프로파일의 후속 적용에 의해 표적 항원 특이적 TCR을 획득하는 방법을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 환자의 종양 샘플로부터 T 세포를 단리하는 단계; 농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계; 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 TCR CDR3을 시퀀싱하는 단계; 유전자 발현 프로파일을 갖는 별도의 단일 T 세포 샘플을 선택하는 단계; CDR3을 포함하는 알파 쇄 가변 영역을 유전자 발현 프로파일을 갖는 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩되는 CDR3을 포함하는 베타 쇄 가변 영역과 짝짓는 단계; 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 숙주 세포 내로 도입하고, 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 숙주 세포에 의해 발현시키는 단계; 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 발현하는 숙주 세포를 표적 항원에 대한 항원 특이성에 관하여 스크리닝하는 단계; 및 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 짝지어진 알파 쇄 가변 영역 및 베타 쇄 가변 영역을 선택하는 단계를 포함하고, 이때, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 단리된다. T 세포의 단리, T 세포의 분류, TCR CDR3의 시퀀싱, 별도의 단일 T 세포 샘플의 선택, 알파 및 베타 쇄 가변 영역의 짝짓기, 뉴클레오타이드 서열의 숙주 세포 내로의 도입, 숙주 세포의 스크리닝, 짝지어진 알파 및 베타 쇄 가변 영역의 선택, 및 유전자 발현 프로파일은 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 유전자 발현 프로파일일 수 있다.

[0057] 본 발명의 방법에 의해 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분은 입양 세포 치료법을 위한 세포를 제조하는 데 유용할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 한 양태는 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같이 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 단리하는 단계, 및 단리된 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 PBMC 내로 도입하여 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포를 획득하는 단계를 포함하는, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 집단을 제조하는 방법을 제공한다.

[0058] 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 재조합 발현 벡터)을 PBMC 내로 도입하는 단계는 상기 그린(Green) 등의 문헌에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 다양한 방식 중 임의의 방법으로 수행될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열을 PBMC 내로 도입하는데 유용한 기술의 비제한적 예는 형질전환, 형질도입, 형질감염 및 전기천공을 포함한다.

[0059] 본 발명의 한 양태에서, 상기 방법은 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 환자의 자가유래 조직인 PBMC 내로 도입하는 단계를 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법에 의해 식별 및 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분은 각 환자에 대해 개인화될 수 있다. 그러나, 또 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 재발성("핫스팟(hot-spot)")으로도 지칭됨) 암 특이적 돌연변이에 의해 인코딩되는 돌연변이된 아미노산 서열에 대한 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 식별하고 단리할 수 있다. 이와 관련하여, 상기 방법은 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 환자에게 동종이계인 PBMC 내로 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 단리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 동일한 MHC 분자와 관련하여 종양이 동일한 돌연변이를 발현하는 다른 환자의 PBMC 내로 도입하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 한 양태에서, PBMC는 T 세포를 포함한다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포, 예를 들어 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 T 세포일 수 있다. 특정 이론이나 기전에 얽매이지 않고, 덜 분화된 "어

린" T 세포는 더 분화된 "오래된" T 세포와 비교하여 더 큰 생체내 지속성, 증식 및 항종양 활성 중 하나 이상과 연관될 수 있다고 여겨진다. 따라서, 본 발명의 방법은 유리하게는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 식별 및 분리하고, TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 분리되어질 수 있는 "오래된" T 세포(예: 환자 종양에서의 효과기 세포)와 비교하여 더 큰 생체내 지속성, 증식 및 항종양 활성 중 하나 이상을 제공할 수 있는 "더 어린" T 세포 내로 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 도입할 수 있다.

[0061] 본 발명의 방법은 유리하게는, 예를 들어 단일 세포 전사체에 의해 본원에 기재된 유전자 발현 프로파일을 갖는 것으로 식별된 TCR 중 하나 이상 또는 모두를 수집하고, 이러한 모든 TCR을 풀링하고, 이들을 임상 T 세포 치료법 생성물로서 조합할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 또 다른 양태는 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 풀링된 집단을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 본원에 기재된 임의의 본 발명의 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계; (b) 농축된 집단에서의 T 세포를 별도의 단일 T 세포 샘플로 분류하는 단계; (c) 별도의 단일 T 세포 샘플에서의 TCR 상보성 결정 영역 3(CDR3)을 시퀀싱하는 단계; (d) CDR3을 포함하는 알파 채 가변 영역을 별도의 단일 T 세포 샘플의 핵산에 의해 인코딩된 CDR3을 포함하는 베타 채 가변 영역과 짝짓는 단계; (e) 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 내로 도입하고, 짝지어진 알파 채 가변 영역 및 베타 채 가변 영역을 PBMC에 의해 발현시키는 단계; 및 본원에 기재된 임의의 본 발명의 방법에 따라 제조된 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단의 복수의 별도의 단일 T 세포 샘플을 위한 뉴클레오타이드 서열의 시퀀싱, 짝짓기 및 도입을 수행함으로써, 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 풀링된 집단을 제공하는 단계를 포함한다. 뉴클레오타이드 서열의 분류, 시퀀싱, 짝짓기 및 도입은 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0062] 본 발명의 한 양태에서, TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 집단을 제조하는 방법은 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 PBMC의 수를 확장하는 단계를 추가로 포함한다. PBMC의 수를 확장하는 단계는 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 세포의 집단을 제조하는 방법은 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 PBMC의 수를 확장하는 단계를 포함하는 반면, 상기 방법은 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 방법은 T 세포의 수를 확장하는 단계를 포함하지 않는다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 분리되는 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다. 본 발명의 한 양태는 2개의 폴리펩티드를 포함하는 TCR(즉 폴리펩티드 채), 예컨대 TCR의 알파(α) 채, TCR의 베타(β) 채, TCR의 감마(γ) 채, TCR의 델타(δ) 채, 또는 이들의 조합을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는, 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같이, TCR의 하나 이상의 CDR 영역, 하나 이상의 가변 영역, 또는 α 및 β 채 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 TCR의 항원 결합 부분을 제공한다. 본 발명의 TCR의 폴리펩티드 또는 이의 항원 결합 부분은, TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 한, 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 제조된 분리된 세포의 집단을 제공한다. 세포의 집단은 분리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하지 않는 하나 이상의 다른 세포, 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, PBMC), 또는 T 세포 이외의 세포, 예를 들어 B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피 세포, 상피 세포, 근육 세포, 뇌 세포 등에 더하여 분리된 TCR을 발현하는 PBMC 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 이종 집단일 수 있다. 대안적으로, 세포의 집단은 실질적으로 동종의 집단일 수 있고, 이때, 이러한 집단은 분리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 PBMC를 주로 포함한다(예를 들어, 본질적으로 구성된다). 이러한 집단은 또한 세포의 클론 집단일 수 있으며, 이때, 집단의 모든 세포는 집단의 모든 세포가 분리된 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하도록 분리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 단일 PBMC의 클론이다. 본 발명의 한 양태에서, 세포의 집단은, 본원에 기재된 바와 같이, 분리된 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 PBMC를 포함하는 클론 집단이다. 분리된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 PBMC 내로 도입함으로써, 본 발명의 방법은 유리하게는 분리된 TCR을 발현하고 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 PBMC 세포를 높은 비율로 포함하는 세포의 집단을 제공할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 세포의 집단의 약 1% 내지 약 100%, 예를 들어, 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100%, 또는 전술된 값 중 임의의 두 값에 의해 정의된 범위는 분리된 TCR을 발현하고 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 PBMC 세포를 포함한다. 특

정 이론이나 기전에 얽매이지 않고, 단리된 TCR을 발현하고 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 PBMC 세포를 높은 비율로 포함하는 세포의 집단은 PBMC의 기능, 예를 들어 표적 세포의 파괴를 표적화하고/하거나 병태를 치료 또는 예방하는 PBMC의 능력을 방해할 수 있는 관련 없는 세포의 비율이 더 낮다고 여겨진다. 표적 세포는 예를 들어 암 세포 또는 바이러스 감염된 세포를 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분, 및 세포의 집단은 약학 조성물과 같은 조성물로 제형화될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명은 임의의 본 발명의 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분, 또는 세포의 집단 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분, 또는 세포의 집단을 또 다른 약학 활성제(들) 또는 약물(들), 예컨대 화학요법제, 예를 들어, 아스파라기나제(asparaginase), 부설판(busulfan), 카보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 플루오로우라실(flourouracil), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토크세이트(methotrexate), 파클리탁셀(paclitaxel), 리툽시맙(rituximab), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 등과 조합하여 포함할 수 있다.

[0066] 바람직하게는, 담체는 약학적으로 허용되는 담체이다. 약학 조성물과 관련하여, 담체는 고려되는 본 발명의 특정 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분, 또는 세포의 집단에 대해 통상적으로 사용되는 임의의 담체일 수 있다. 이러한 약학적으로 허용되는 담체는 당업자에게 잘 알려져 있고 대중에게 쉽게 이용가능하다. 약학적으로 허용가능한 담체는 사용 조건하에서 유해한 부작용이나 독성이 없는 것이 바람직하다.

[0067] 담체의 선택은 부분적으로 본 발명의 특정 TCR, 이의 항원 결합 부분 또는 세포의 집단에 의해 결정될 뿐만 아니라 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분 또는 세포의 집단을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 의해 결정될 것이다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물의 다양한 적합한 제형이 존재한다. 적합한 제형은 종양내, 경구, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 또는 복강내 투여를 위한 임의의 제형을 포함할 수 있다. 하나 이상의 경로를 사용하여 본 발명의 TCR 또는 세포의 집단을 투여할 수 있으며, 특정 경우에, 특정 경로는 다른 경로보다 더 즉각적이고 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

[0068] 바람직하게는, 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 또는 세포의 집단은 주사에 의해, 예를 들어 정맥내로 투여된다. 본 발명의 세포의 집단이 투여되는 경우, 주사용 세포에 대한 약학적으로 허용되는 담체는 임의의 등장성 담체, 예를 들어, 식염수(물 중 약 0.90% w/v의 NaCl, 물 중 약 300 mOsm/l NaCl, 또는 물 1 리터당 약 9.0 g의 NaCl), NORMOSOL R 전해액[애봇(Abbott), 일리노이주 시카고 소재], PLASMA-LYTE A[박스터(Baxter), 일리노이주 디어필드], 물 중 약 5% 텍스트로스, 또는 링거(Ringer)의 락트산염을 포함할 수 있다. 한 양태에서, 약학적으로 허용되는 담체는 인간 혈청 알부민으로 보충된다.

[0069] 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단, 및 약학 조성물은 병태를 치료 또는 예방하는 방법에 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 특정 이론이나 기전에 얽매이지 않고, 본 발명의 TCR 또는 이의 항원 결합 부분은, 세포에 의해 발현될 때 TCR 또는 이의 항원 결합 부분이 표적 항원을 발현하는 표적 세포에 대한 면역 반응을 매개할 수 있도록, 표적 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 여겨진다. 이와 관련하여, 본 발명은 (i) 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계; 및 포유동물의 병태를 치료하거나 예방하기에 효과적인 양으로 세포의 집단을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 병태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0070] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료하다" 및 "예방하다"라는 용어와 이로부터 파생된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 의미하는 것은 아니다. 오히려, 당업자가 잠재적인 이점 또는 치료 효과를 갖는 것으로 인식하는 다양한 정도의 치료 또는 예방이 존재한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 포유동물에서 병태의 임의의 수준의 치료 또는 예방을 위한 임의의 양을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 치료 또는 예방되는 병태의 하나 이상의 징후 또는 증후의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 치료 또는 예방에는 종양의 퇴행 축진이 포함될 수 있다. 또한, 본원의 목적을 위해, "예방"은 병태의 발병, 또는 이의 증후, 징후 또는 재발을 지연시킴을 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 목적을 위해, 투여되는 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단, 또는 약학 조성물의 양 또는 용량(예를 들어, 본 발명의 세포의 집단이 투여되는 경우 세포의 수)은 합리적인 시간 기간에 걸쳐 포유동물에서 예를 들어 치료학적 또는 예방학적 반응에 영향을 미치기에 충분해야 한다. 예를 들어, 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단 또는 약학 조성물의 용량은 표적 항원에 결합하거나 투여 시간으로부터 약 2 시간 또는 그 이상, 예를 들어 12 내지 24시간 또는 그 이상의 기간 동안 병태를 검출, 치료 또는 예방하기에 충분해야 한다. 특정 양태에서 기간은 훨씬 더 길 수 있다. 용량은 투여되는 본 발명의 특정 TCR, 이의 항원 결

합 부분, 세포의 집단 또는 약학 조성물의 효능 및 치료될 포유동물(예를 들어, 인간)의 병태, 뿐만 아니라 포유동물(예를 들어, 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.

[0072] 투여 용량을 결정하기 위한 많은 분석이 당업계에 공지되어 있다. 본 발명의 목적을 위해, 각각 상이한 용량의 T 세포가 제공되는 일련의 포유동물들 중에서 한 포유동물에게 소정의 용량의 이러한 T 세포를 투여할 경우 표적 세포가 용해되거나, 본 발명의 TCR, 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 T 세포에 의해 IFN- γ 가 분비되는 정도를 비교하는 것을 포함하는 분석은 포유동물에게 투여될 시작 용량을 결정하는 데 사용될 수 있다. 특정 용량의 투여 시 표적 세포가 용해되거나 IFN- γ 가 분비되는 정도는 당업계에 공지된 방법에 의해 분석될 수 있다.

[0073] 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단, 또는 약학 조성물의 용량은 또한 특정 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단, 또는 약학 조성물의 투여에 수반될지도 모르는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의해 결정될 것이다. 일반적으로 주치의는 연령, 체중, 일반적인 건강, 식이, 성별, 투여될 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단 또는 약학 조성물, 투여 경로, 및 치료되는 병태의 중증도와 같은 다양한 요인을 고려하여, 각 개별 환자를 치료할 본 발명의 TCR, 이의 항원 결합 부분, 세포의 집단 또는 약학 조성물의 투여량을 결정할 것이다.

[0074] 본 발명의 세포의 집단이 투여되는 한 양태에서, 주입당 투여되는 세포의 수는 예를 들어 100만 내지 1000억개 세포의 범위로 다양할 수 있지만; 이러한 예시적인 범위 미만 또는 초과 양은 본 발명의 범주 내에 있다. 예를 들어, 본 발명의 숙주 세포의 1일 용량은 약 100만 내지 약 1500억개 세포(예를 들어, 약 500만개 세포, 약 2500만개 세포, 약 5억개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억 개 세포, 약 300억 개 세포, 약 400억 개 세포, 약 600억 개 세포, 약 800억 개 세포, 약 1000억 개 세포, 약 1200억 개 세포, 약 1300억 개 세포, 약 1500억 개 세포, 또는 전술된 값 중 임의의 두 값에 의해 정의된 범위), 바람직하게는 약 1000만 내지 약 1300억개 세포(예를 들어, 약 2000만개 세포, 약 3000만개 세포, 약 4000만개 세포, 약 6000만개 세포, 약 7000만개 세포, 약 8000만개 세포, 약 9000만개 세포, 약 100억개 세포, 약 250억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포, 약 900억개 세포, 약 1000억개 세포, 약 1100억개 세포, 약 1200억개 세포, 약 1300억개 세포, 또는 전술된 값 중 두 값에 의해 정의된 범위), 보다 바람직하게는 약 1억개 세포 내지 약 1300억개 세포(예를 들어, 약 1억 2천만개 세포, 약 2억 5천만개 세포, 약 3억 5천만개 세포, 약 4억 5천만개 세포, 약 6억 5천만개 세포, 약 8억개 세포, 약 9억개 세포, 약 30억개 세포, 약 300억개 세포, 약 450억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포, 약 900억개 세포, 약 1000억개 세포, 약 1100억개 세포, 약 1200억개 세포, 약 1300억개 세포 또는 전술된 값 중 두 값에 의해 정의된 범위)일 수 있다.

[0075] 세포의 집단이 투여되는 본 발명의 방법의 목적을 위해, 세포는 포유동물에 대해 동종이게 또는 자가유래인 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 포유동물에 대하여 자가유래이다.

[0076] 본 발명의 또 다른 양태는 (i) 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 표적 항원에 대하여 항원 특이성을 갖는 T 세포의 농축된 집단을 제조하는 단계; 또는 (ii) 본 발명의 다른 양태와 관련하여 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 TCR 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 단리된 세포의 집단을 제조하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 병태의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조 방법을 제공한다.

[0077] 본 발명의 한 양태에서, 병태는 암이다. 암은 유리하게는 임의의 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근 육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관 또는 항문직장암, 안암, 간내 담관암, 관절암, 목, 담낭, 또는 흉막의 암, 코, 비강, 또는 중이의 암, 구강암, 질암, 외음부암, 담관암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관 유암종, 신경교종, 호지킨 림프종, 하인두암, 콩팥암, 후두암, 간암, 폐암(예: 비소세포 폐암), 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 구인두암, 난소암, 음경암, 췌장암, 복막, 장막 및 장간막의 암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신장암, 피부암, 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 요관암, 방광암, 고형암, 및 액체 종양을 포함하는 임의의 암일 수 있다. 바람직하게는, 암은 상피암이다. 한 양태에서, 암은 담관암종, 흑색종, 결장암, 폐암, 유방암, 또는 직장암이다.

[0078] 본 발명의 한 양태에서, 병태는 바이러스 병태이다. 본원의 목적을 위해, "바이러스 병태"는 사람에서 사람으로 또는 유기체에서 유기체로 옮겨질 수 있고 바이러스에 의해 유발되는 병태를 의미한다. 본 발명의 한 양태에서, 바이러스 병태는 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스, 헤파드나바이러스, 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 코로나바이러스, 오르토믹소바이러스, 파라믹소바이러스, 플라비바이러스 및 칼리시바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스에 의해 유발된다. 예를 들어, 바이러스 병태는 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 인플루엔자 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 엡슈타인-바르 바이러스, HPV, 수두 바이러스, 거대 세포 바이러스, A형 간

염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프자극성 바이러스, 칼리시바이러스, 아테노바이러스 및 아레나 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스에 의해 유발될 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 바이러스 병태는 본원에 기재된 임의의 바이러스에 의해 유발된 만성 바이러스 감염일 수 있다. 바이러스 병태는 예를 들어 인플루엔자, 페렴, 헤르페스, 간염, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 만성 피로 증후군, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS: sudden acute respiratory syndrome), 위장염, 장염, 심장염, 뇌염, 세기관지염, 호흡기 유행성, 수막염, HIV/AIDS, HPV 감염 및 단핵구증일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 바이러스 병태는 암 관련 바이러스에 의해 유발되는 바이러스 감염이다.

[0079] 본 발명의 방법에서 언급된 포유동물은 임의의 포유동물일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포유동물"은 마우스 및 햄스터와 같은 설치목의 포유동물, 및 토끼와 같은 중치목의 포유동물을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 고양이과(고양이) 및 개과(개)를 포함하는 육식 동물목에서 유래하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 포유동물은 소류(소) 및 돼지류(돼지)를 포함하는 우제목 또는 말류(말)를 포함하는 기제목에서 유래한다. 바람직하게는, 포유동물은 영장류, 세보이드(Ceboid) 또는 시모이드(Simoid)(원숭이)목 또는 유인원목(인간 및 유인원)으로부터 유래한다. 보다 바람직한 포유동물은 인간이다. 특히 바람직한 양태에서, 포유동물은 표적 항원을 발현하는 환자이다.

[0080] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시하지만, 물론 그 범주를 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0081] 실시예

[0082] 실시예 1 내지 12에 기재된 실험에 하기 재료 및 방법을 사용하였다.

[0083] 실험 설정/샘플 준비

[0084] 10X 제노믹스 5' 단일 세포 유전자 발현 프로파일링 및 TCR 시퀀싱(10x scTCR)/전사체 분석을 위한 샘플을 하기 방식으로 일관되게 제조하였다. TIL 수확물로부터 단일 세포 현탁액을 만들고 동결 보존하였다. 샘플을 해동하고 사이토카인이 없는 TIL 배지에서 밤새 휴지시켰다. CD4 양성 및/또는 CD8 양성의 생존 가능한 세포를 소니(Sony) 세포 분류기(MA900 또는 SH800)에 의해 분리하였으며, 일반적으로 총 ~30,000개의 T 세포이다. 10x scTCR 분석을 위해 NIH의 단일 세포 분석 핵심 시설(SCAF: Single Cell Analysis Core Facility)로 샘플을 전달하였다. SCAF는 원시 바코드 부착된 유전자 발현/TCR 데이터를 전달하였다. 원시 전사 데이터를 정규화하였다. 클러스터 깊이의 적절한 수준을 결정하기 위해 정규화된 데이터에 대해 품질 관리(QC: Quality control) 단계를 실행하였다. T-SNE를 전사체의 데이터에 대해 수행하였다. TCR을 전사체의 t-SNE 맵 상으로 투영하였다.

[0085] CITE-seq 분석을 위해, 냉동보존된 TIL을 해동하고 사이토카인이 없는 TIL 배지에서 휴지시켰다. 다음날 사세포 제거 키트(Dead Cell Removal Kit)[밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec), 독일 베르기슈 글라드바흐 소재]를 사용하여 TIL에서 사세포를 제거하고, 이지셉(EASYSEP) 인간 T 세포 분리 키트[스탬셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies), 캐나다 밴쿠버 소재]를 사용하여 T 세포를 추가로 정제하였다. 다음으로, T 세포를 형광색소 표지된 항-CD3 항체, 및 항-CD4, CD8a, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD27, CD107a, HLA-DR, CD39, CD103, CD69, CD134, CD137, CD244, CD272, CD357, CD279, CD274, CD223, CD366, KLRG1, TIGIT, CD185 및 CD278을 포함하나 이에 제한되지 않는 특징-바코딩(FBC: feature-barcoding) 항체로 염색하였다. 소니 세포 분류기(MA900 또는 SH800)는 CD3⁺ 세포를 분리하는 데 사용되었으며, 10X 단일 세포 라이브러리 생산 및 심층 시퀀싱을 위해 ~50,000개 T 세포를 SCAF에 전달하였다. 원시 시퀀스 데이터를 10X 셀 레인저(Cell Ranger)로 처리하였으며, 전사체, FBC 및 TCR VDJ 데이터를 병합하여 10X 루페(Loupe) 애플리케이션과 PARTEK FLOW 소프트웨어에 의해 분석하였다.

[0086] 실시예 1

[0087] 본 실시예는 단일 세포 전사체 분석을 사용하여 인간 직장암으로부터 신생항원 반응성 TCR을 분리하는 방법을 나타낸다.

[0088] 처음으로, 자가유래 신생항원 특이적 T 세포(돌연변이된 항원 및 TCR 서열 둘 다에 대해 분자적으로 정의됨)를 사용하여 신생항원 반응성을 갖는 T 세포의 마커를 연구하였다. 특히, 결장암, 및 폐암과 같은 통상적인 상피암의 TIL을 이용하여 이를 수행했다는 점은 주목할 만하다. 이것은 전사체적 접근법 뿐만 아니라 바코드 부착된 항체 기술(CITE-seq) 둘 다를 사용하여 수행되었다. 단일 세포 현탁액을 신선한 종양 표본의 효소적 분해에 의

해 만들었다. 직장암 환자(환자 4323)로부터 간 전이를 채취하였다. 이 환자의 경우, 이전에 기재된 TIL 스크리닝 기술을 사용하여 4개의 신생항원 반응성 CD8⁺ TCR을 미리 식별하였고[파크허스트(Parkhurst) 등의 문헌 "Cancer Discov.", 9(8): 1022-1035 (2019)], 모든 TIL 중 총 6.6%가 종양에 존재하였다. 유세포 분석을 사용하여 종양 분해물로부터 CD4 양성 및 CD8 양성 T 세포를 분리하였다. 10x scTCR을 SCAF에서 수행하였다. T-SNE를 전사체 데이터에 대해 수행하였다. TCR을 전사체의 t-SNE 맵 상으로 투영하였다. 결과는 도 1a-1c에 제시되어 있다.

[0089] 도 1a는 환자 4323으로부터의 T 세포에 대한 t-SNE 분석 결과를 도시한 것이다. 도 1a에서 볼 수 있듯이, 생성된 단일 세포 전사체 데이터의 tSNE 표현형 클러스터링은 7개의 별개의 표현형 클러스터가 분류된 TIL 내에 존재함을 보여주었다(도 1a; 클러스터 번호 0 내지 7).

[0090] 공지된 신생항원 반응성 TCR을 도 1a의 t-SNE 맵 상으로 투영하였다. 결과는 도 1b에 제시되어 있다. 도 1b에 제시된 바와 같이, 공지된 신생항원 반응성 TCR을 tSNE 도표 상에 중첩하면 거의 모든 반응성 TCR이 단일 클러스터, 즉 클러스터 5에 국한된다. 클러스터 5는 신생항원 반응성 TCR(NeoTCR) 클러스터로 지칭되었다.

[0091] 이러한 NeoTCR 클러스터는 CD39(ENTPD1), PD-1(PDCD1), TIGIT, CD69, LAG3, TIM3(HAVCR2), CTLA4 및 이들의 조합을 포함하는 다양한 활성화/억제 마커의 존재에 의해 지시되는 바와 같이 기능장애 CD8⁺ 세포 표현형을 나타내었다(도 1c).

[0092] 따라서, 이러한 NeoTCR 클러스터에서 시험되지 않은 다른 TCR도 신생항원 반응성일 수 있다고 가정되었다. 이 가설을 시험하기 위해, NeoTCR 클러스터에 있는 9개의 다른 TCR을 단일 세포 TCR 시퀀싱 데이터에 의해 전향적으로 인실리코 재구성하였다. 클러스터 5에서, 195개 세포는 공지된 신생항원 반응성 TCR을 발현하거나, 인실리코 재구성될 수 있는 TCR을 가졌다.

[0093] TCR을 pMSGV1 벡터 내로 클로닝하고, 건강한 공여자 PBL에서 발현시키고, (i) 환자의 신생항원을 인코딩하는 TMG로 전기전공되거나 (ii) 환자의 신생항원을 인코딩하는 펩티드의 푸올로 펄스화된 환자 4323의 수지상 세포(DC)에 대한 반응성에 관하여 스크리닝하였다. 이러한 스크리닝에서 9개의 알려지지 않은 신규 TCR 중 7개(77.77%)는 신생항원 반응성이었다.

[0094] 전체적으로, 클러스터 5에서의 세포의 97%는 신생항원 반응성이었다(도 2a). TCR 중 일부는 시퀀싱에 의해 한 번만 볼 수 있을 정도로 희귀하였다. 대조적으로, 비반응성 클론(본 연구 및 이러한 환자에 대한 신생항원 반응성 TCR을 식별하기 위한 이전 시도에서)은 모든 8개 클러스터에서 식별되었다(도 2b).

[0095] 실시예 2

[0096] 본 실시예는 다양한 활성화 마커에 대해 양성인 세포의 집단 내에서 신생항원 반응성이 풍부함을 나타낸다.

[0097] 실시예 1에서 환자 4323으로부터 수확한 TIL을 동결보존하였다. 세포를 해동하고 사이토카인 없이 밤새 휴식시켰다. 살아있는 CD3 세포를 PD-1(96웰 플레이트 1개), CD39(96웰 플레이트 1개), TIGIT(0.5개 플레이트) 또는 LAG3(0.5개 플레이트) 발현에 따라 단일 세포 중합효소 연쇄 반응(scPCR: single cell polymerase chain reaction) 및 TCR 재구성을 위하여 플레이트에 분류하였다. 마커의 발현에 대해 양성인 분류된 세포의 백분율은 다음과 같았다: PD-1(63.5%), CD39(27.0%), TIGIT(31.1%) 및 LAG3(0.74%). 분류된 세포를 IMMUNOSEQ 분석[어댑티브 바이오테크놀로지스(Adaptive Biotechnologies)]에 의해 시퀀싱하였다. 12개의 모든 신생항원 반응성 TCR은 다른 집단들 사이에서의 빈도에 대해 분석될 수 있었다.

[0098] FACS-분류된 집단의 어댑티브 시퀀싱의 후향적 분석을 수행하였다. 표 1은 각 집단 내 신생항원 반응성 TCR의 백분율을 보여준다. 후향적 분석은 다양한 활성화 마커에 대해 양성인 세포의 집단 내에서 신생항원 반응성의 농축을 보여주었다.

표 1

[0099]

TCR ID	별크 CD3 ⁺	PD-1 음성	PD-1 양성	CD39 음성	CD39 양성	TIGIT 음성	TIGIT 양성	CD39/PD -1 음성	CD39/PD -1 양성	TIGIT/P D-1 음성	TIGIT/P D-1 양성
1	3.21	0.48	13.54	0.00	19.88	0.00	14.13	0.00	19.92	0.00	17.12
2	2.03	0.10	9.81	0.04	10.74	0.15	8.37	0.00	12.50	0.00	13.23
5	1.56	0.00	8.15	0.04	10.04	0.10	8.76	0.00	14.84	0.00	11.67
3	1.30	0.00	6.22	0.00	9.64	0.05	7.26	0.00	16.41	0.00	10.89

8B1	0.18	0.00	0.97	0.00	1.19	0.05	0.79	0.00	0.39	0.00	0.78
12A2	0.16	0.00	0.41	0.00	0.40	0.00	0.08	0.00	0.78	0.00	1.17
4	0.09	0.00	0.28	0.00	0.80	0.05	0.08	0.12	0.00	0.00	0.39
6	0.09	0.00	0.28	0.00	0.50	0.00	0.71	0.00	0.39	0.00	0.78
9	0.08	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.39
7	0.05	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.32	0.00	1.17	0.00	0.00
8B2	0.07	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.02	0.10	0.14	0.00	0.20	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.39
전체	8.83	0.67	39.92	0.07	53.78	0.41	40.88	0.12	66.41	0.00	56.81

[0100] 실시예 3

[0101] 본 실시예는 단일 세포 전사체 분석을 사용하여 인간 결장암으로부터 신생항원-반응성 TCR을 분리하는 방법을 나타낸다.

[0102] 결장암 환자(환자 4324)로부터 제거된 폐 전이로부터 분류된 TIL에 대해 단일 세포 전사체 분석 및 TCR 시퀀싱을 수행하였다. 결과는 도 3a 내지 3c에 제시되어 있다. 이 환자의 경우, 3개의 신생항원 반응성 CD8⁺ TCR이 이전에 식별되었으며, 이는 종양 내 모든 TIL의 총 0.98%이다. 이러한 3개의 TCR은 돌연변이된 TP53을 인식하였다.

[0103] 환자 4324로부터의 TIL의 경우, 공지된 모든 신생항원 반응성 CD8⁺ TCR이 단일 표현형 클러스터(즉, 클러스터 6) 내에 농축되었을 뿐만 아니라(도 3b), 클러스터는 샘플 4323에서 관찰된 NeoTCR 클러스터와 다수의 마커를 공유하였다(즉, 표 2에 나열된 CD8⁺ 마커)(도 3c). 또한 NeoTCR 클러스터와 유사한 표현형을 갖는 CD4⁺ TIL을 포함하는 추가적인 클러스터(클러스터 4)가 존재하였다.

[0104] 4324의 NeoTCR 클러스터로부터 4개의 TCR을 재구성한 결과 돌연변이된 TP53에 대해 반응성을 갖는 1개의 TCR을 산출하였다. 4개의 TCR을 CD8⁺CXCL13⁺ 클러스터로부터 재구성하고 돌연변이 TP53(돌연변이-코딩된 아미노산을 포함하는 긴 펩티드 및 탠덤 미니유전자)에 대해 시험하였다. 1개의 TCR(즉, TCR 번호 5)이 양성이었다.

[0105] 4323 및 4324로부터의 CD8⁺ NeoTCR 클러스터에 공통적인 마커는 CD8⁺ 세포로부터의 TCR이 암 반응성인지의 여부를 예측하기 위해 단일 세포 전사체 데이터에 적용될 수 있는 CD8⁺ NeoTCR 시그니처로 컴파일링될 것이다. CD4⁺ NeoTCR 시그니처에 의해 동일한 시험이 진행될 것이다.

[0106] 10개의 새로운 TCR을 CD8⁺ 클러스터로부터 전향적으로 구성하였다. 15개의 새로운 TCR을 CD4⁺ 클러스터에서 전향적으로 구성하였다. 이는 이들이 신생항원 반응성인지 여부를 시험하기 위한 것이다.

[0107] 실시예 4

[0108] 본 실시예는 유방암으로부터의 공지된 CD4⁺ 신생항원 반응성 TIL이 CXCL13 발현에 의해 표시되는 표현형 클러스터로 자가-조립됨을 나타낸다.

[0109] 신생항원 반응성 TCR 시그니처가 CD4⁺ TIL에서 정확한 상태를 유지하는지의 여부를 시험하기 위해, 6개의 CD4⁺ 신생항원 반응성 TCR이 공지된 유방암 전이 샘플(환자 4322)로부터의 TIL 상에서 단일 세포 전사체 및 TCR 시퀀싱을 수행하였다. 결과는 도 4a 내지 4c에 제시되어 있다. 이러한 샘플에서, 모든 TIL의 2.4%가 반응성인 것으로 알려졌다(도 4a).

[0110] 공지된 CD4⁺ NeoAg 반응성 TCR을 발현하는 모든 세포는, CXCL13을 비롯하여 4323 및 4324에서의 NeoTCR 클러스터와 유사한 마커(즉, 표 2에 나열된 CD4⁺ 마커)를 발현하는 소정의 클러스터(즉, 클러스터 3)에서 발견되었다(도 4b의 상자 영역)(도 4c).

[0111] 실시예 5

[0112] 본 실시예는 폐암으로부터의 CD8⁺ 신생항원-반응성 TIL이 직장암으로부터의 TIL과 공동-클러스터를 형성함을 나

타낸다.

[0113] TIL 스크린이 반응성 TCR을 나타내는 2개의 외과적으로 절제된 비소세포 폐암(NSCLC) 종양으로부터 단리된 TIL에 대해 단일 세포 전사체/TCR 시퀀싱을 이전에 수행하였다(4234 및 4237, 도 5a).

[0114] 이들 NSCLC 샘플에 의한 4323 CD8⁺ 클러스터의 재클러스터링은 3개의 샘플 모두로부터의 반응성 세포가 동일한 클러스터에서 풍부함을 나타내었다(도 5b).

[0115] 이러한 NeoTCR-함유 클러스터는 이전 샘플에서 볼 수 있는 NeoTCR과 동일한 활성화/소진/체크포인트 마커에 대해 양성이었다(도 5c), 이는 CD8⁺ NeoTCR 시그니처가 위장 종양 내의 TIL에 제한되지 않고 폐암이 침윤된 환자에게도 광범위하게 적용됨을 제시한다.

[0116] 실시예 6

[0117] 본 실시예는 결장암으로부터의 공지된 CD4⁺ 신생항원 반응성 TIL이 CXCL13 발현에 의해 표시되는 표현형 클러스터로 자가 조립됨을 나타낸다.

[0118] 4개의 CD4⁺ 신생항원 반응성 TCR이 공지된 결장암(환자 4283)의 폐 전이로부터의 TIL에 대해 단일 세포 전사체 및 TCR 시퀀싱을 수행하였다. 10x 시퀀싱은 4개 세포 중 3개를 포획하였다(단지 총 6개 세포). 결과는 도 7a-7C에 제시되어 있다.

[0119] 공지된 CD4⁺ NeoAg-반응성 TCR을 발현하는 모든 세포는 CXCL13을 발현하는 소정의 클러스터(즉, 클러스터 2)에서 발견되었다(도 7b).

[0120] 실시예 7

[0121] 본 실시예는 표 2에 제시된 마커가 종양 분해로부터 종양 돌연변이 반응성 T 세포를 높은 신뢰도로 식별하는데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0122] 4323의 NeoTCR 클러스터에서 고도로 발현되는 유전자를 사용하여 "NeoTCR 시그니처"라고 하는 신생항원 반응성 TCR에 대하여 전사체의 유전자 발현 프로파일을 개발하였다. 4323으로부터의 TIL에 이러한 시그니처를 단일 세포 수준에서 적용하면 공지된 신생항원 반응성 T 세포와 다른 세포를 명확하게 구별할 수 있었다($P < 2 \times 10^{-16}$, 윌콕슨 순위-합 시험(Wilcoxon rank-sum test))(도 6). 따라서, NeoTCR 시그니처는 종양으로부터의 단일 T 세포의 점수를 매기기 위해 전향적으로 사용될 수 있다. NeoTCR 시그니처의 높은 점수를 기반으로, TCR을 합성하고 종양 반응성에 의해 시험할 수 있다.

[0123] 다른 환자의 본래의 tSNE 도표 상으로 Pt. 4323(도 6)으로부터 유래된 NeoTCR 시그니처의 95번째 백분위수를 발현하는 세포를 사용하여, NeoTCR 시그니처가 동일한 세포 클러스터 및 세포를 높은 신뢰도로 식별함을 보여주었다(도 3a-3c - 환자(Pt.) 4324, 도 4a 내지 4c - Pt. 4322, 및 도 5a 내지 5c - 3개의 환자 샘플, 즉 환자 4323, 4237 및 4234). 이들 결과는 도 8a-8C에 요약되어 있다(8A - 환자 4324, 8B - 환자 4322, 및 8C - 환자 4323, 4237, 및 4234).

표 2

[0124]

CD4 ⁺ CD8 ⁺ 마커	CD4 ⁺ 마커	CD8 ⁺ 마커
CXCL13	BATF	ALOX5AP
ITM2A	CD247	ARHGAP9
KLRB1	CXCL13	CARD16
TIGIT	DNPH1	CD3G
(-) LTB	DUSP4	CD8A
(-) LYAR	GYPC	CD8B
(-) RGCC	IFITM1	CLIC3
(-) S100A10	IGFLR1	CTSW
	ITM2A	CXCL13
	KLRB1	CXCR6
	LIMS1	GALNT2
	NMB	GZMB

	NR3C1	HLA-DPA1
	SH2D1A	HLA-DPB1
	SPOCK2	HLA-DRB1
	SUPT3H	HLA-DRB5
	TIGIT	HMG3
	TNFRSF18	ITGAE
	(-) CCL5	ITM2A
	(-) CD52	KLRB1
	(-) GSTP1	MPST
	(-) JUN	NAP1L4
	(-) LGALS1	NELL2
	(-) LTB	NSMCE1
	(-) LYAR	PTMS
	(-) PLP2	RAB27A
	(-) RGCC	RARRES3
	(-) S100A10	RBPJ
	(-) VIM	TIGIT
	(-) ZFP36	(-) ANXA1
		(-) EEF1B2
		(-) EMP3
		(-) IL7R
		(-) LGALS3
		(-) LTB
		(-) LYAR
		(-) RGCC
		(-) RPL36A
		(-) S100A10

[0125] 따라서, 표 2에 제시된 NeoTCR 시그니처에 나열된 마커를 사용하여 종양 분해로부터 종양 돌연변이 반응성 T 세포를 높은 신뢰도로 식별할 수 있다. 표 2의 첫 번째 열은 CD4⁺ 및 CD8⁺ 신생항원 반응성 세포에 공통적인 마커를 나열한다. 표 2의 두 번째 열은 CD4⁺ 신생항원 반응성 세포에 공통적인 마커를 나열한다. 표 2의 세 번째 열은 CD8⁺ 신생항원 반응성 세포에 공통적인 마커를 나열한다. 표 2에서 "(-)"가 선행된 마커는 신생항원 반응성과 음의 관계가 있다. 표 2에서 "(-)"이 선행되지 않은 마커는 신생항원 반응성과 양의 관계가 있다.

[0126] 실시예 8

[0127] 본 실시예는 CITE-seq(시퀀싱에 의한 전사체 및 에피토프의 세포 인덱싱) 및 항체를 사용하여 인간 직장암으로부터 신생항원 반응성 TCR을 분리하는 방법을 나타낸다.

[0128] CITE-seq는 항체 기반 세포 표면 분자 검출 뿐만 아니라 TCR 유전자 및 전사체 분석을 제공하는 단일 세포 분석 방법이다. CITE-seq를 사용하여, 전사체 단독 분석에 비해 더 민감하고 정량적인 세포 표면 분자 발현 데이터를 얻을 수 있다. 예를 들어, CITE-seq 접근법은 종양 샘플의 RNA 품질이 위태로운 경우에 유용할 수 있다.

[0129] CITE-seq 분석을 비소세포 폐암(NSCLC) 표본으로부터 유래된 3개의 단일 세포 현탁액에 대해 수행하였다. 먼저, CITE-seq 기반 tSNE 및 전사체 기반 tSNE에 의해 수득된 신생항원 반응성 CD8⁺ T 세포의 클러스터링을 비교하였다(도 9). 도 9에 도시된 바와 같이, 대부분의 경우, 항체 기반 tSNE 도표가 신생항원 반응성 T 세포의 더 우수한 클러스터링을 초래하였다.

[0130] 다음으로, 신생항원 반응성 T 세포에서 어떤 분자가 특이적으로 발현되었는지를 검사하였다. 그 결과를 표 3 내지 8 및 도 10에 나타내었다.

표 3

[0131]

환자 4234 (CITEseq에 의해 분석된 폐암)					
다른 CD8 ⁺ T 세포와 비교된 DOPEY2-반응성 CD8 ⁺ T 세포					
66개의 DOPEY2-반응성 CD8 ⁺ T 세포가 검출되었다. 4682개의 다른 CD8 ⁺ 세포가 검출되었다.					
항체-기반			전사체-기반		
	Log2 배수 변화	조정된 p-값		Log2 배수 변화	조정된 p-값
PD-1 ⁺	1.71	1.63e-73	TRAV25-2 ⁺	6.75	2.99e-24
Tim-3 ⁺	1.48	8.39e-57	TRBV5-6 ⁺	5.74	4.00e-18
CD39 ⁺	1.96	5.38e-51	CXCL13 ⁺	4.02	1.49e-6
CD137 ⁺	0.26	2.04e-2	HMGX1 ⁺	3.61	2.38e-4
			GZMB ⁺	2.72	2.34e-2
			NKG7 ⁺	2.59	3.17e-2

표 4

[0132]

환자 4234 (CITEseq에 의해 분석된 폐암)					
다른 CD8 ⁺ T 세포와 비교된 U2AF1-반응성 CD8 ⁺ T 세포					
15개의 U2AF1-반응성 CD8 ⁺ T 세포가 검출되었다. 4259개의 다른 CD8 ⁺ 세포가 검출되었다.					
항체-기반			전사체-기반		
	Log2 배수 변화	조정된 p-값		Log2 배수 변화	조정된 p-값
CD39 ⁺	2.16	2.19E-15	유의적 차이 없음		
PD-1 ⁺	1.51	1.36E-13			
Tim-3 ⁺	1.28	3.12E-11			

표 5

[0133]

환자 4234 (CITEseq에 의해 분석된 폐암)					
다른 CD8 ⁺ T 세포와 비교된 SLFN11-반응성 CD8 ⁺ T 세포					
15개의 SLFN11-반응성 CD8 ⁺ T 세포가 검출되었다. 3366개의 다른 CD8 ⁺ 세포가 검출되었다.					
항체-기반			전사체-기반		
	Log2 배수 변화	조정된 p-값		Log2 배수 변화	조정된 p-값
CD39 ⁺	2.16	3.86E-67	TRBV7-2 ⁺	7.00	1.00e-7
CD103 ⁺	1.51	4.57e-1	TRAV1-2 ⁺	4.87	1.94e-2
PD-1 ⁺	1.28	2.90e-2			

표 6

[0134]

환자 4237 (CITEseq에 의해 분석된 폐암)					
다른 CD8 ⁺ T 세포와 비교된 MLLT4-반응성 CD8 ⁺ T 세포					
43개의 MLLT4-반응성 CD8 ⁺ T 세포가 검출되었다. 4350개의 다른 CD8 ⁺ 세포가 검출되었다.					
항체-기반			전사체-기반		
	Log2 배수 변화	조정된 p-값		Log2 배수 변화	조정된 p-값
CD39 ⁺	6.03	1.11e-106	TRBV7-2 ⁺	6.19	4.28e-17
CD137 ⁺	3.18	5.15e-35	CXCL13 ⁺	4.65	1.86e-8
Tim-3 ⁺	1.68	1.982e-11	TRAV24 ⁺	4.69	1.78e-7
			KRT86 ⁺	4.30	2.56e-5
			HLA-DRA ⁺	3.29	3.34e-4
			HLA-DQA1 ⁺	3.34	5.83e-4
			4-1BB ⁺	3.44	6.81e-4
			GITR ⁺	3.50	7.24e-4
			HLA-DRB5 ⁺	3.10	1.90e-3
			HLA-DQB1 ⁺	3.13	2.61e-3
			HLA-DRB1 ⁺	2.96	2.67e-3
			STMN1 ⁺	3.17	7.69e-3

표 7

[0135]

환자 4237 (CITEseq에 의해 분석된 폐암)					
다른 CD8 ⁺ T 세포와 비교된 BPNT1 F12-반응성 CD8 ⁺ T 세포					
79개의 BPNT1 F12-반응성 CD8 ⁺ T 세포가 검출되었다. 다른 CD8 ⁺ 세포가 검출되었다.					
항체-기반			전사체-기반		
	Log2 배수 변화	조정된 p-값		Log2 배수 변화	조정된 p-값
CD39 ⁺	2.91	5.73e-101	TRBV6-6 ⁺	7.62	5.18e-42
PD-1 ⁺	1.96	1.01e-63	CXCL13 ⁺	8.27	3.51e-35
CD137 ⁺	1.82	8.14e-42	TRAV25 ⁺	6.85	6.26e-26
Tim-3 ⁺	1.47	3.80e-25	ENTPD1 ⁺	4.38	8.03e-11
CD134 ⁺	1.06	5.18e-13	SLC1A4 ⁺	3.98	6.00e-10
CCR7 ⁺	0.93	3.79e-12	NSMCE1 ⁺	3.64	1.21e-8
CD56 ⁺	0.96	4.90e-8	CARS ⁺	2.72	6.08e-4
CD103 ⁺	0.61	4.85e-6	CLIC3 ⁺	2.70	7.79e-4
CD45RO ⁺	0.52	1.88e-4	HDLBP ⁺	2.46	4.64e-3
			GALNT2 ⁺	2.50	5.01e-3
			TIGIT ⁺	2.25	2.56e-2
			DUSP4 ⁺	2.05	3.92e-2

표 8

[0136]

환자 4237 (CITEseq에 의해 분석된 폐암)					
다른 CD8 ⁺ T 세포와 비교된 BPNT1 F9-반응성 CD8 ⁺ T 세포					
79개의 BPNT1 F9-반응성 CD8 ⁺ T 세포가 검출되었다. 다른 CD8 ⁺ 세포가 검출되었다.					
항체-기반			전사체-기반		
	Log2 배수 변화	조정된 p-값		Log2 배수 변화	조정된 p-값
CD39 ⁺	2.97	6.54e-16	TRAV24 ⁺	8.38	1.43e-4
PD-1 ⁺	2.12	5.00e-11	CCNB1 ⁺	6.54	3.89e-4
CD137 ⁺	1.44	1.72e-4	CXCL13 ⁺	7.55	1.19e-2
Tim-3 ⁺	1.32	8.31e-4	TRBV5-1 ⁺	6.46	1.45e-2
CD134 ⁺	0.95	2.17e-2	PLK1 ⁺	6.33	1.45e-2
CCR7 ⁺	0.74	4.79e-2			

[0137]

이들 분석은 신생항원 반응성 CD8⁺ T 세포가 CD27, CD39, CD74, CD103, CD106, CD137, HLA-DR, PD-1, Tim-3 및 TIGIT와 같은 세포 표면 분자 중 하나 이상을 발현한다는 것을 보여주었다. 이들은 또한 다른 비-신생항원 반응성 CD8 세포와 비교하여 CCR7, CD8A, CD16, CD45RA, CD62L 및 IL7R의 더 낮은 세포 표면 분자 발현에 의해 표시되었다(도 11). 세포내 분자의 경우, 실시예 7에 기재된 NeoTCR 시그니처에 포함된 유전자에 더하여 AFAP1L2, ASB2, HMOX1, PDLIM4와 같은 유전자가 신생항원 반응성 세포에서 발현되었다.

[0138]

이러한 neoTCR 시그니처가 돌연변이 반응성인 이전에 알려지지 않은 TIL 및 TCR을 식별할 수 있다는 가설을 시험하기 위해, neoTCR-정의된 클러스터 내의 고 빈도 클론형을 선택하고 이들의 TCR 유전자를 합성하였다. 이들 유전자를 레트로바이러스 형질도입에 의해 PBL 내로 도입하였고, 후속적으로 자가유래 종양의 차세대 시퀀싱에 의해 식별된 신생항원 후보를 제시하는 수지상 세포와 공동 배양하였다(표 9 내지 11).

표 9

[0139]

Pt. 4234							
	%/CD3 ⁺	TRAV	TRAJ	TRBV	YTB	YRBJ	항원
1	0.61	TRAV12-2	TRAJ27	TRBV30	TRBD2	TRBJ2-2	DOPEY2
2	0.40	TRAV8-4	TRAJ47	TRBV14		TRBJ1-1	미측정
3	0.35	TRAV8-3	TRAJ20	TRBV3-1	TRBD2	TRBJ1-2	DOPEY2
4	0.35	TRAV27	TRAJ21	TRBV6-1	TRBD1	TRBJ1-1	PNPLA6
5	0.19	TRAV8-3	TRAJ20	TRBV19	TRBD1	TRBJ2-1	DOPEY2

[0140]

환자 4234의 경우, 이전에 알려지지 않은 조사된 5개의 TCR 클론형 중 4개가 신생항원 반응성이었다. 놀랍게도, 이들 모두는 CD3⁺ 세포에서 1% 미만으로 존재하였고, PNPLA6 반응성은 임의의 전통적인 TIL 스크리닝 방법으로도 식별되지 않았다.

표 10

[0141]

Pt. 4237							
TCR ID	%/CD3 ⁺	TRAV	TRAJ	TRBV	TRBD	TRBJ	항원
F12	0.69	TRAV25	TRAJ54	TRBV6-6	TRBD2	TRBJ2-1	BPNT1
1	0.58	TRAV4	TRAJ40	TRBV9		TRBJ2-3	
2	0.1	TRAV8-1	TRAJ39	TRBV7-6	TRBD2	TRBJ2-3	BPNT1
3	0.1	TRAV8-6	TRAJ39	TRBV7-6	TRBD2	TRBJ2-1	BPNT1

F9	0.08	TRAV24	TRAJ29	TRBV5-1	TRBD1	TRBJ1-1	BPNT1
4	0.06	TRAV1-2	TRAJ20	TRBV20-1	TRBD1	TRBJ1-2	BPNT1
5	0.02	TRAV29DV5	TRAJ43	TRBV12-5	TRBD1	TRBJ2-7	

[0142] 환자 4237의 경우, TCR F12 및 F9는 전통적인 TIL 스크리닝 방법으로 식별되었지만 클러스터에서 1위와 4위를 차지하는 고 빈도 클론형이다. neoTCR 클러스터링에 의해 선택된 5개의 정의되지 않은 다른 TCR 클론형 중 3개는 BPNT1 신생항원도 인식하는 것으로 입증되었다. 전체적으로, neoTCR 클러스터에 채류하는 가장 빈번한 TCR 클론형 6개 중 5개는 돌연변이된 BPNT1에 특이적으로 반응성이었다.

표 11

[0143]

환자 4369							
TCR ID	%/CD3 ⁺	TRAV	TRAJ	TRBV	TRBD	TRBJ	항원
MLLT4	0.46	TRAV24	TRAJ53	TRBV7-2		TRBJ2-3	MLLT4
1	0.13	TRAV29DV5	TRAJ37	TRBV7-2	TRBD1	TRBJ2-7	
2	0.09	TRAV24	TRAJ53	TRBV5-5	TRBD1	TRBJ2-5	MLLT4
3	0.07	TRAV13-1	TRAJ42	TRBV2	TRBD2	TRBJ2-1	
4	0.07	TRAV3	TRAJ30	TRBV6-5	TRBD2	TRBJ1-5	
5	0.06	TRAV21	TRAJ39	TRBV2	TRBD1	TRBJ2-7	MLLT4

[0144] 환자 4369의 경우, 최고 빈도 클론형은 전통적인 TIL 스크리닝으로 식별되었다. 빈도에 의해 선택된 5개의 추가적인 알려지지 않은 클론형 중 2개는 돌연변이된 MLLT4에 반응성이었다. 이러한 두 가지 새로운 MLLT4 반응성 클론형은 TCR 시퀀싱에 의해 전체 TIL 집단의 0.1% 미만으로 존재하였다. 이는 신생항원 반응성 T 세포를 선택함에 있어서 본 방법의 가능성을 보여준다. 이러한 클러스터 내의 다른 고 빈도 클론형이 항원의 암 생식계열 패밀리와 같은 아직 식별되지 않은 다른 종양 관련 항원을 인식할 수 있다.

[0145] 실시예 9

[0146] 본 실시예는 PD-1⁺/CD39⁺/TIGIT⁺ 세포에 대한 분류가 신생항원-반응성 CD8⁺ 세포를 고도로 농축할 수 있음을 나타낸다.

[0147] FACS를 사용하여 CD8, PD-1, CD39 및 TIGIT의 발현을 위해, 환자 4323으로부터의 세포의 2개의 플레이트를 분류하였다. 세포는 살아있는 CD3⁺CD8⁺를 통해 게이팅되었다. 140개의 판독이 용이한 TCR 베타 쇄 서열 중 123개가 신생항원 반응성 TCR인 것으로 알려졌다(88%)(표 12).

표 12

[0148]

TCR ID	별크 CD3 ⁺ (어댑티브로부터)	CD8 ⁺ PD-1 ⁺ /CD39 ⁺ /TIGIT ⁺
1	3.21	29.2 (41/140)
2	2.03	24.2 (34/140)
5	1.56	15.0 (21/140)
3	1.30	12.1 (17/140)
8B1	0.18	3.6 (5/140)
12A2	0.16	0
4	0.09	0.7 (1/140)
6	0.09	0.7 (1/140)
9	0.08	0.7 (1/140)
7	0.05	0
8B2	0.07	1.4 (2/140)
10	0.02	0.7 (1/140)
전체 공지된 반응성	8.83	87.9

[0149] 실시예 10

[0150] 본 실시예는 CXCL13⁺ 포획이 PD-1⁺/CD39⁺/TIGIT⁺로서 환자 4323으로부터 공지된 신생항원 반응성 CD8⁺ 세포의 유사한 농축을 초래한다는 것을 나타낸다.

[0151] 어떠한 기성품 CXCL13 포획 시약도 이용가능하지 않았지만, CXCL13은 특이적 자극/활성화 없이 ELISA에 의해 시험관내에서 검출가능한 것으로 보고되어 있다. 비오틴화된 항-CXCL13 단일클론 항체를 기성품 CD45-스트렙타비딘 접합체에 결합시켰다. 4323 종양 분해물을 해동하고 밤새, 또는 CD45-스트렙타비딘: CXCL13 바이오틴 사내 (in-house) 포획 항체와 함께 4시간 동안 항온처리하였다. 그런 다음 샘플을 세척하고 염소 IgG 또는 염소 항-CXCL13 2차 항체, 및 항-염소 IgG PE-접합된 검출 항체와 함께 항온처리하였다. 샘플을 세포 분류기(소니 MA900) 상에서 실행하였다. scPCR TCR 시퀀싱을 위해 CD8⁺CXCL13⁺ 세포(33)를 분류하였다. 분류된 33개 세포 중 28개의 판독이 용이한 CDR3 베타 서열이 식별되었다. 28개의 판독이 용이한 TCR 베타 채 서열 중 85.7%가 신생항원 반응성 TCR인 것으로 알려졌다(표 13). CXCL13 발현에 기반한 분류는 신생항원 반응성 CD4⁺ 세포에 대한 이상적인 표면 마커 세트가 없다는 문제를 방지할 수 있다.

표 13

[0152]

TCR ID	벌크 CD3 ⁺ (어댑티브로부터)	CD8 ⁺ PD-1 ⁺ /CD39 ⁺ /TIGIT ⁺	CXCL13 ⁺ 포획
1	3.21	29.2 (41/140)	25.0 (7/28)
2	2.03	24.2 (34/140)	14.3 (4/28)
5	1.56	15.0 (21/140)	28.6 (8/28)
3	1.30	12.1 (17/140)	10.7 (3/28)
8B1	0.18	3.6 (5/140)	3.6 (1/28)
12A2	0.16	0	0
4	0.09	0.7 (1/140)	3.6 (1/28)
6	0.09	0.7 (1/140)	0
9	0.08	0.7 (1/140)	0
7	0.05	0	0
8B2	0.07	1.4 (2/140)	0
10	0.02	0.7 (1/140)	0
전체 공지된 반응성	8.83	87.9	85.7

[0153] 실시예 11

[0154] 본 실시예는 CXCL13 발현 검정이 신생항원 반응성을 지시하는 공동-발현된 마커를 식별할 수 있음을 나타낸다.

[0155] 환자 4397로부터 전이성 항문암 TIL을 채취하였다. 종양 분해를 수행하였다. 세포를 밤새 CD45: CXCL13 이중특이성 항체로 즉시 염색하였다. 세포를 CXCL13 및 PD-1, CD39 및 TIGIT에 대해 염색하고 살아있는 CD3⁺을 통해 게이팅하였다. CD4⁺CXCL13⁺ 세포는 CD39⁺/TIGIT⁺/PD-1⁺ 세포에서 빈도가 가장 높았다(표 14). CD8⁺CXCL13⁺는 CD39⁺/TIGIT⁺/PD-1⁺ 세포에서 빈도가 가장 높았다(표 14).

표 14

[0156]

표면 마커	CD4 ⁺	CXCL13 ⁺ 을 통한 CD4 ⁺	CD8 ⁺	CXCL13 ⁺ 을 통한 CD8 ⁺
NONE	45.07	2.11	18.35	4.36
PD1 ⁺ 단독	2.48	2.11	1.98	0.00
CD39 ⁺ 단독	6.91	4.21	3.22	2.18
TIGIT ⁺ 단독	14.60	5.27	19.46	2.17
PD1 ⁺ /CD39 ⁺	1.76	0.00	2.85	4.36
PD1 ⁺ /TIGIT ⁺	4.43	11.54	9.66	4.35

CD39 ⁺ /TIGIT ⁺	17.34	44.24	15.18	21.74
PD1 ⁺ /CD39 ⁺ /TIGIT ⁺	5.87	30.50	24.77	60.86

[0157] **실시예 12**

[0158] 본 실시예는 단일 세포 분석을 사용하여 종양으로부터 신속한 신생항원 TCR 단리를 위한 작업 흐름을 나타낸다.

[0159] 실시예 1 내지 11에 제시된 바와 같이, 통상적인 상피암(결장직장 및 폐)으로부터의 클론에 의해 정의된 T 세포를 사용하여, 종양 관련 돌연변이 항원(신생항원)을 특이적으로 인식하는 T 세포의 시그니처를 식별하였다. 이는 단일 세포 전사체 기반 접근법에 의해 바코드 부착된 항체(CITE-seq)를 사용하여 수행되었으며, 다차원(tSNE) 도표 상에서 좁게 정의된 공간 내에서 이러한 세포를 클러스터링할 수 있다.

[0160] 이러한 neoTCR 시그니처를 사용하여, 공지된 신생항원 반응성 T 세포와 공동-클러스터링된 상기 동일한 표현형을 갖는 다른 세포를 조사하였고, 동일한 종양으로부터의 신생항원을 또한 인식하는 이전에 알려지지 않은 T 세포 클론을 매우 높은 빈도로 포함함을 밝혀내었다.

[0161] 이러한 기술은 공지된 신생항원을 인식하는 T 세포의 레퍼토리(repertoire)를 확장할 뿐만 아니라, 임의의 다른 통상적인 스크리닝 방법에 의해 면역원성으로 식별되지 않은 새로운 신생항원에 대하여 특이성을 갖는 T 세포를 식별할 수 있었다.

[0162] 이러한 접근법의 높은 민감도 및 특이성, 및 새로운 종양 표본의 TIL로부터 직접 수행된다는 특징은 돌연변이 반응성 T 세포를 찾는 통상적인 방법과 이를 구별한다.

[0163] 반응성 TCR의 서열을 신속하게 결정하는 능력은 또한 치료법을 위해 이러한 정보를 TCR-조작된 T 세포의 집단으로 번역한다는 데 큰 가치가 있다. 실시예 1 내지 11에 요약된 이들 여러 환자로부터 축적된 데이터를 사용하여, 종양의 조직에 관계없이 인간 종양으로부터 신속하게 TCR을 단리하기 위한 작업 흐름을 설계하였다. 이 작업 흐름은 도 12에 요약되어 있다.

[0164] **실시예 13**

[0165] 본 실시예는 새로운 종양 절제물로부터 HPV 16-반응성 TCR의 전향적 단리를 나타낸다.

[0166] 환자 4397(항문암)로부터의 T 세포를 PD-1, CD39 및 TIGIT 공동-발현에 의해 분류하고 TCR 시퀀싱에 적용하였다. 절제된 종양 표본이 HPV16 E4의 발현을 나타내므로, 상기 집단 내에서 볼 수 있는 상위 11개 TCR을 환자 신생항원 및 HPV 16 항원에 대해 시험하였다. 표 15는 CD39⁺PD1⁺TIGIT⁺ 분류된 집단 내의 상위 11개 TCR을 요약하고, TCR1은 강조 표시되어 있다. 표 15에서 숫자는 벌크 및 농축 집단 내의 백분율을 나타낸다.

표 15

[0167]

TCR ID	벌크 CD3	CD3 ⁺ PD-1 ⁺ /CD39 ⁺ /TIGIT ⁺
1	0.2	7.5 (12/159)
2	0.0	6.3 (10/159)
3	0.0	6.3 (10/159)
5	0.6	3.1 (5/159)
7	0.0	1.9 (3/159)
6	0.0	1.9 (3/159)
4	0.0	1.9 (3/159)
8	0.2	1.9 (3/159)
9	0.0	1.3 (2/159)
12	0.0	1.3 (2/159)
10	0.0	1.3 (2/159)

[0168] HPV16-유래된 펩타이드에 대한 표 15의 11개 TCR 각각의 스크리닝은 TCR ID 1(TCR1)에 의한 HPV16 E4에 대한 반응성을 보여주었다(도 13). TCR1의 추가의 시험은 HLA-B*13:02에 의해 제시된 CD8-제한된 HPV16 E4 최소 에피

토프 LQSSLHLTA(서열 번호 1)에 대한 반응성을 보여주었다.

[0169] 실시예 14

[0170] 본 실시예에는 단일 세포 전사체 분석을 사용하여 인간 암으로부터 신생항원-반응성 TCR을 분리하는 방법을 나타낸다.

[0171] 신생항원 반응성 T 세포 수용체(TCR)를 식별하기 위한 유전자 발현 프로파일을 다음과 같이 추가로 정련하였다. 다양한 종양 유형 및 조직에 걸쳐 있는 13개 또는 그 이상의 환자 샘플로부터의 45,000개 또는 그 이상의 종양 침윤 T 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 단일 세포 전사체 분석에 의해 분석하였다. 유전자 발현 프로파일은 이러한 모든 환자 T 세포에서 성공적으로 일관되게 검증되었다. 공통의 유전자에 더하여 CD4 및 CD8에 대한 신생항원 반응성 T 세포의 유전자 발현 프로파일은 표 16에 제시되어 있다.

표 16

NeoTCR+	CD4 ⁺ 마커	CD8 ⁺ 마커	CD4 ⁺ CD8 ⁺ 마커
ABI3+	ADI1+	AC243829.4+	AHI1+
AC243960.1+	AHI1+	ACP5+	CXCL13+
ACP5+	ARID5B+	APOBEC3C+	FABP5+
ADGRG1+	BATF+	CCL3+	NAP1L4+
AHI1+	CD4+	CCL4+	ORMDL3+
ASB2+	CMTM7+	CCL4L2+	PPP1R16B+
BST2+	CPM+	CCL5+	SH2D1A+
CARS+	CXCL13+	CD27+	TIGIT+
CCL4+	CYTH1+	CD8A+	TOX+
CD27+	ELMO1+	CD8B+	
CD2BP2+	ETV7+	CST7+	
CD82+	FABP5+	CTSW+	
CTSW+	FBLN7+	CXCL13+	
CXCL13+	FKBP5+	DUSP4+	
CXCR6+	GRAMD1A+	ENTPD1+	
DUSP4+	HIF1A+	FABP5+	
ENTPD1+	IL6ST+	GALNT2+	
GALNT2+	ITGA4+	GNLY+	
GATA3+	ITK+	GZMA+	
GPR25+	JAK3+	GZMB+	
GZMB+	KLRB1+	GZMH+	
HDLBP+	LEF1+	GZMK+	
HLA-DPA1+	LIMS1+	HAVCR2+	
HLA-DRB1+	MAF+	HCST+	
HMOX1+	MAL+	HLA-DMA+	
ID2+	MIR4435-2HG+	HLA-DPA1+	
IGFLR1+	MYL6B+	HLA-DPB1+	
ITGAL+	NAP1L4+	HLA-DRA+	
LAG3+	NMB+	HLA-DRB1+	
LINC01871+	NR3C1+	HLA-DRB5+	
LINC01943+	PASK+	HMOX1+	
MIS18BP1+	PGM2L1+	IFNG+	
MPST+	PIM2+	IGFLR1+	
NCF4+	PPP1CC+	ITGAL+	
NSMCE1+	SESN3+	JAML+	
PCED1B+	SH2D1A+	LAG3+	
PDCD1+	SOC31+	LINC01871+	
PHPT1+	STAT1+	LYST+	
PLEKHF1+	SYNE2+	MIR155HG+	
PRF1+	TBC1D4+	NKG7+	
PTMS+	TIGIT+	PLEKHF1+	
SLC1A4+	TLK1+	PRF1+	
SLF1+	TMEM123+	PTMS+	

SMC4+	TMEM70+	RGS1+	
SUPT3H+	TNIK+	SLF1+	
TIGIT+	TOX+	SMC4+	
TNFRSF18+	TSHZ2+	SUPT3H+	
TOX+	UCP2+	TIGIT+	
TRAF3IP3+	VOPP1+	TOX+	
YPEL2+	YPEL2+		

[0173] 전향적 맹검 환자 종양 샘플에서 돌연변이 반응성 T 세포를 식별하기 위해 NeoTCR 유전자 시그니처를 추가로 평가하였다. 단일 세포 전사체 시퀀싱 및 NeoTCR 시그니처의 적용으로부터 재구성된 TCR은 새로운 CD4 및 CD8 NeoTCR을 산출하였다. 전체적으로, 본 연구는 반응성이 식별된 12/12 환자의 시퀀싱된 TIL에서 종양 특이적 NeoTCR의 성공적인 농축 및 검출을 제공하였다. NeoTCR 유전자 시그니처는 또한 관련 없는 바이러스 특이적 T 세포와 구별되므로 종양과 관련이 없는 T 세포를 정확하게 구별할 수 있다.

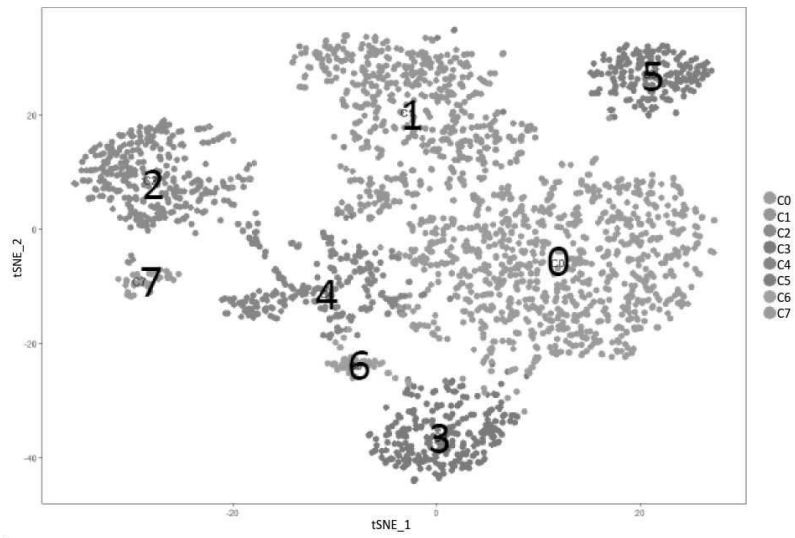
[0174] 본원에 인용된 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참고문헌은, 각 참고문헌이 개별적으로 및 구체적으로 참고로 포함되는 것으로 지시되고 그 전체가 본원에 제시된 것과 동일한 정도로 참고로 본원에 포함된다.

[0175] 본 발명을 설명하는 데 있어서(특히 하기 청구범위와 관련하여) 용어 "하나" 및 "한개" 및 "그" 및 "하나 이상", 및 유사한 지시체의 사용은, 본원에 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수 둘 다를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 하나 이상의 항목의 목록이 수반되는 "하나 이상"이라는 용어(예를 들어, "A 및 B 중 하나 이상")의 사용은, 본원에 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 나열된 항목들로부터 선택된 하나의 항목(A 또는 B) 또는 나열된 항목 중 둘 이상의 임의의 조합(A 및 B)을 의미하는 것으로 해석되어야 한다. "포함하는", "갖는", "포함되는" 및 "함유하는"이라는 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 개방형 용어(즉, "포함하지만 이에 제한되지 않는"을 의미함)로 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위에 대한 언급은, 본원에 달리 지시되지 않는 한 범위 내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 지칭하는 약식 방법으로서 역할을 하기 위한 것일 뿐이며, 각각의 별도의 값은 본원에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은, 본원에 달리 지시되거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 모든 예 또는 예시적인 언어(예를 들어, "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범주를 제한하지 않는다. 명세서의 어떤 언어도 청구되지 않은 요소를 본 발명의 실행에 필수적인 것으로 나타낸다고 해석되어서는 안 된다.

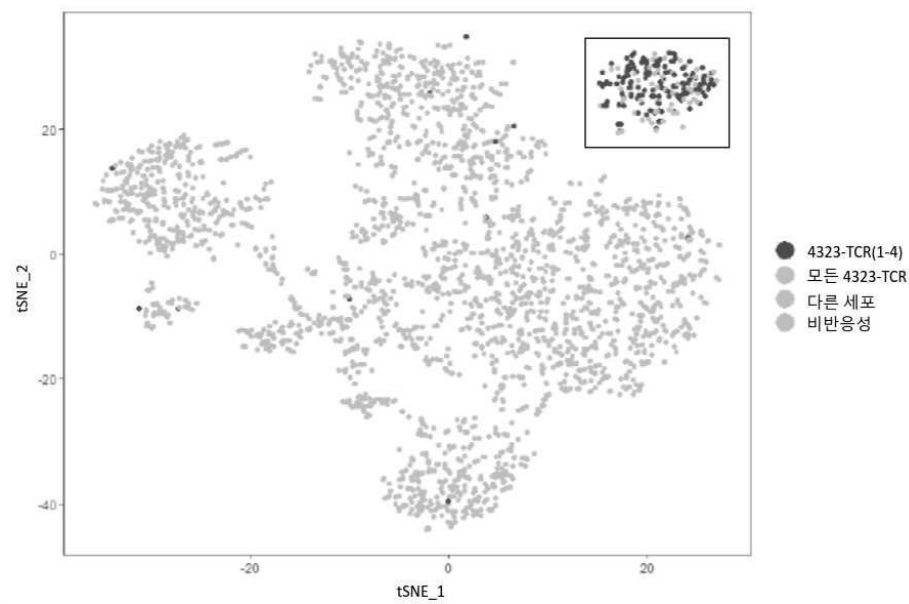
[0176] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최상의 방식을 포함하여 본 발명의 바람직한 양태가 본원에 기재된다. 이러한 바람직한 양태의 변형은 전술한 기재내용을 읽을 때 당업자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자들은 적절하다면 당업자가 그러한 변형을 사용하기를 기대하고, 본 발명자들은 본원에 구체적으로 기재된 것과 다르게 본 발명이 실시되기를 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법률이 허용하는 바에 따라 본원에 첨부된 청구범위에 인용된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 본원에 달리 지시되거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 본 발명의 모든 가능한 변형에서의 상기-기재된 요소의 임의의 조합은 본 발명에 포함된다.

도면

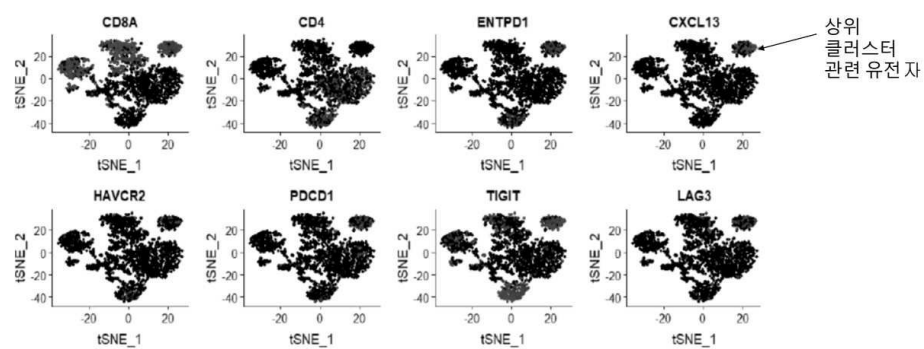
도면1a



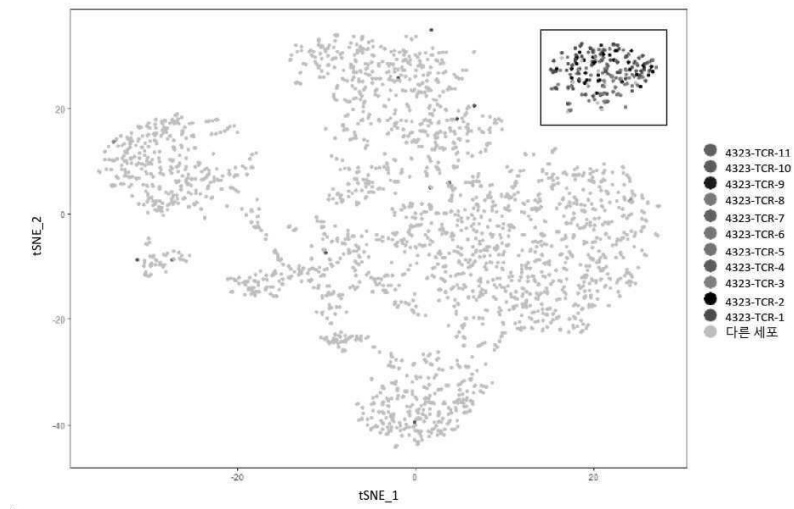
도면1b



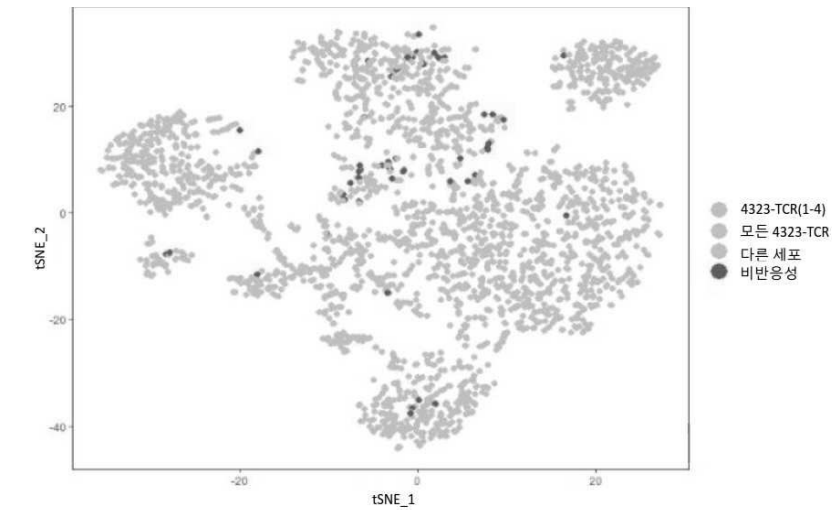
도면1c



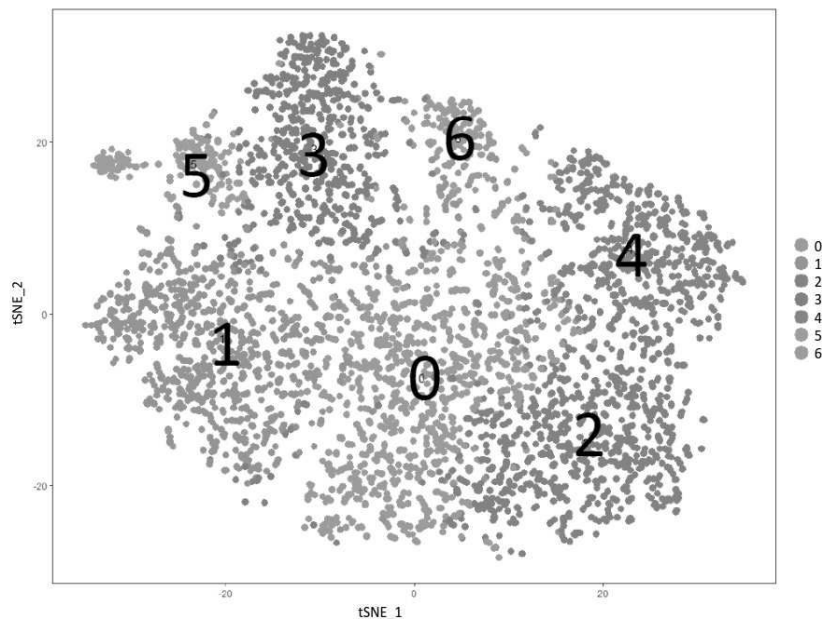
도면2a



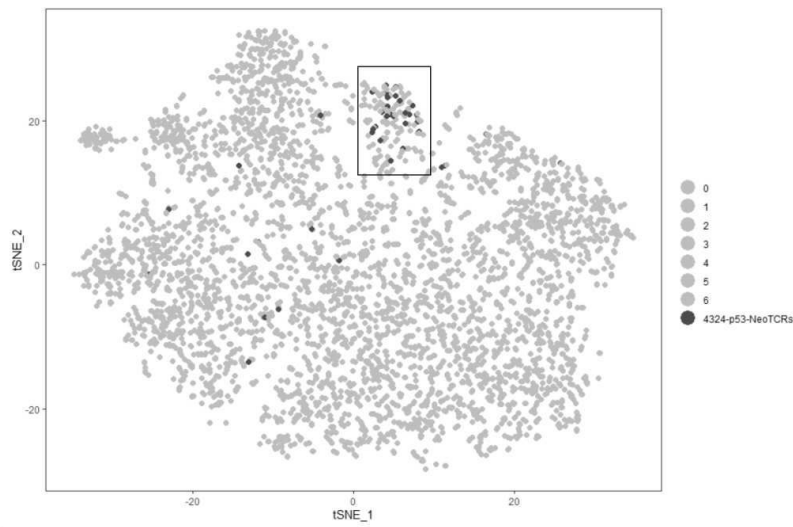
도면2b



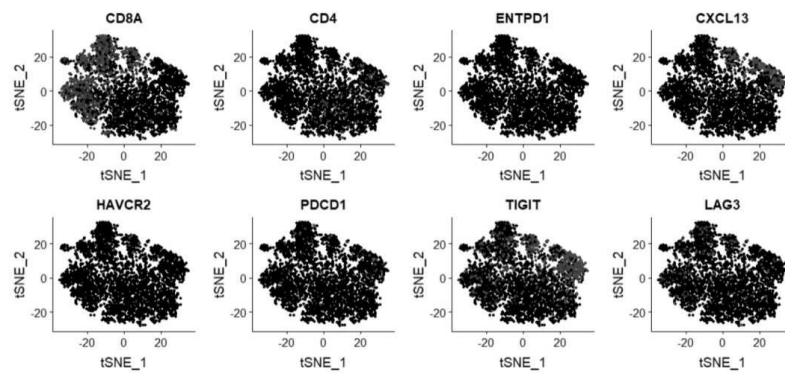
도면3a



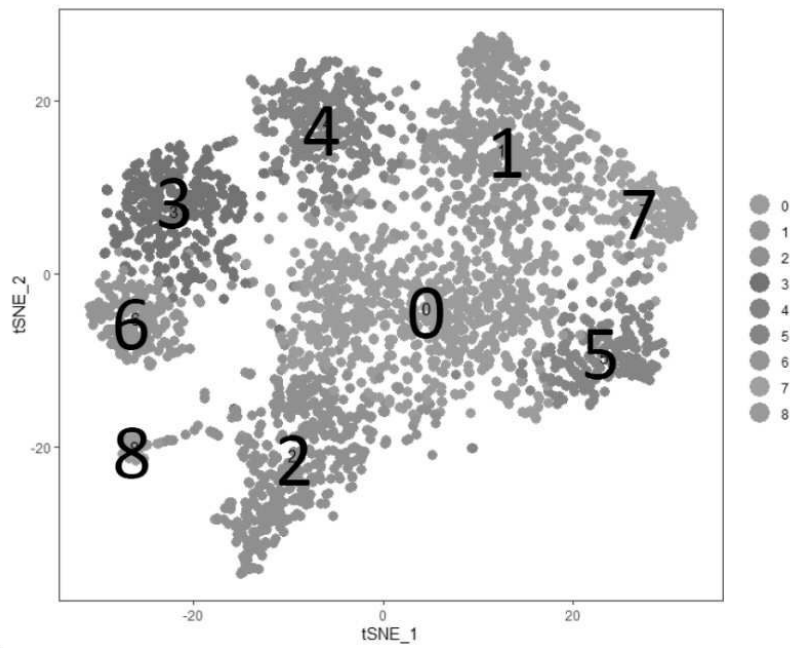
도면3b



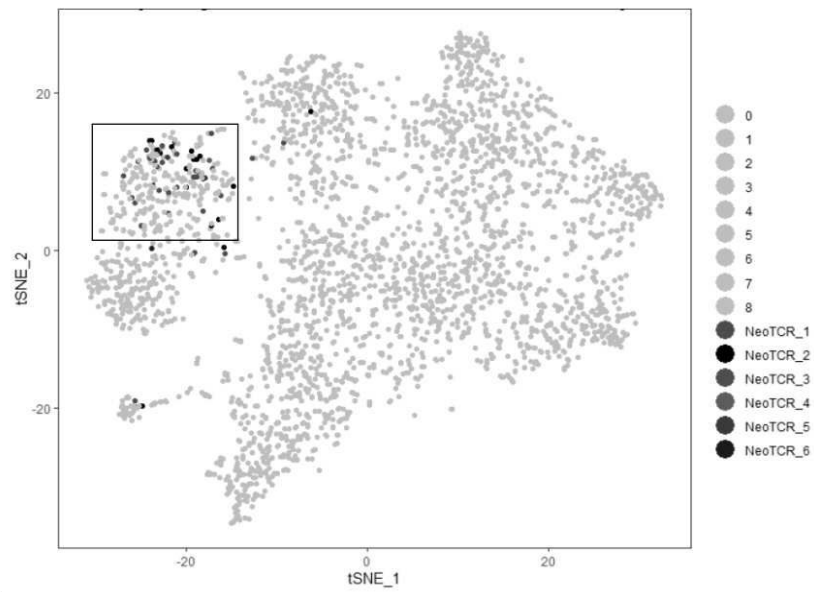
도면3c



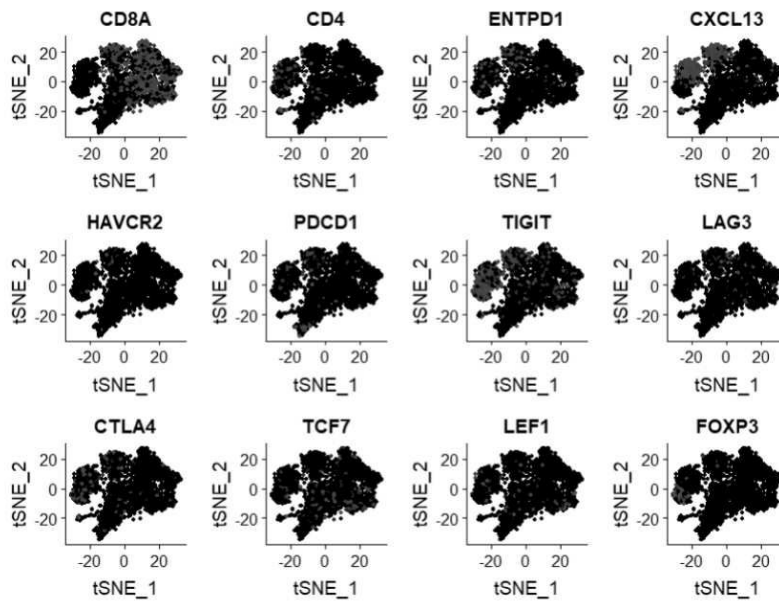
도면4a



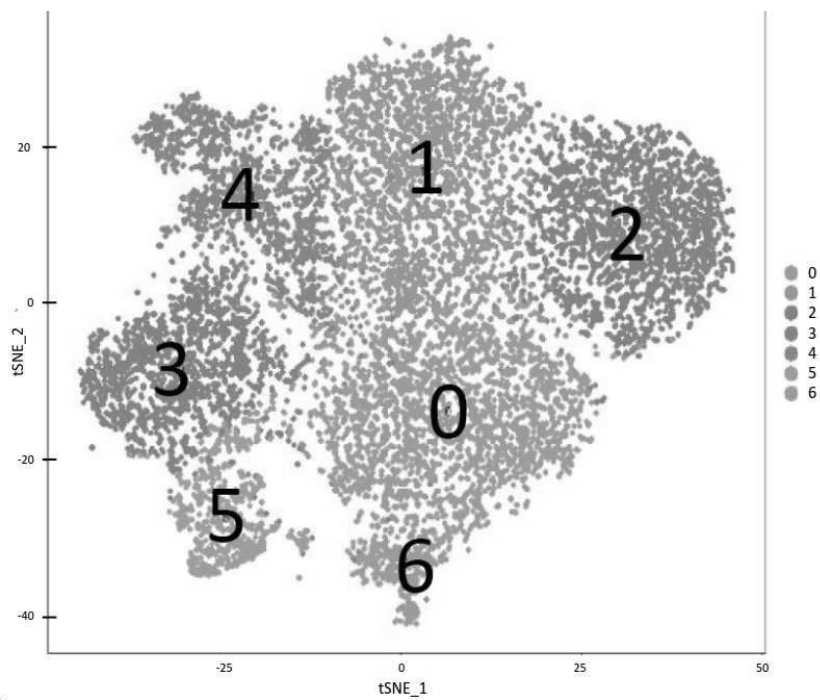
도면4b



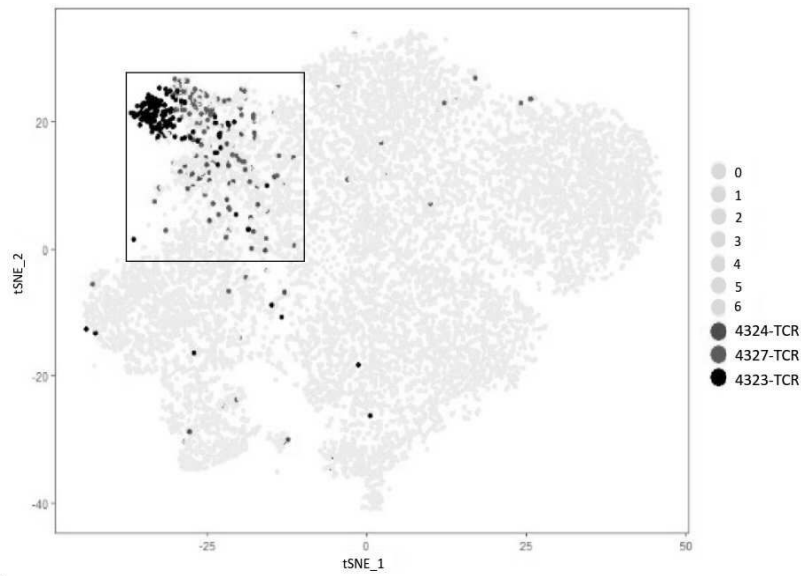
도면4c



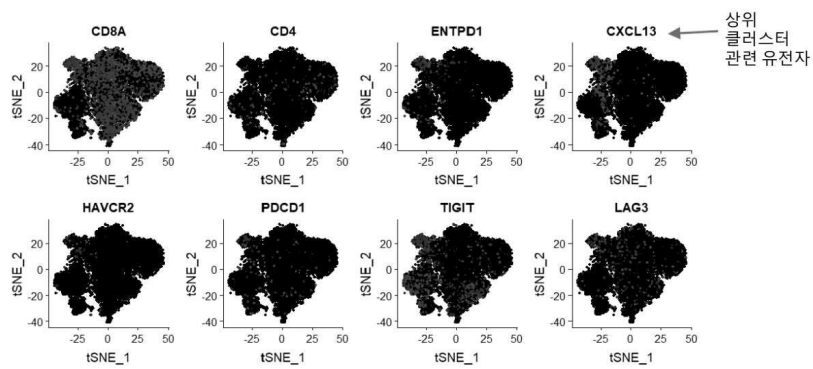
도면5a



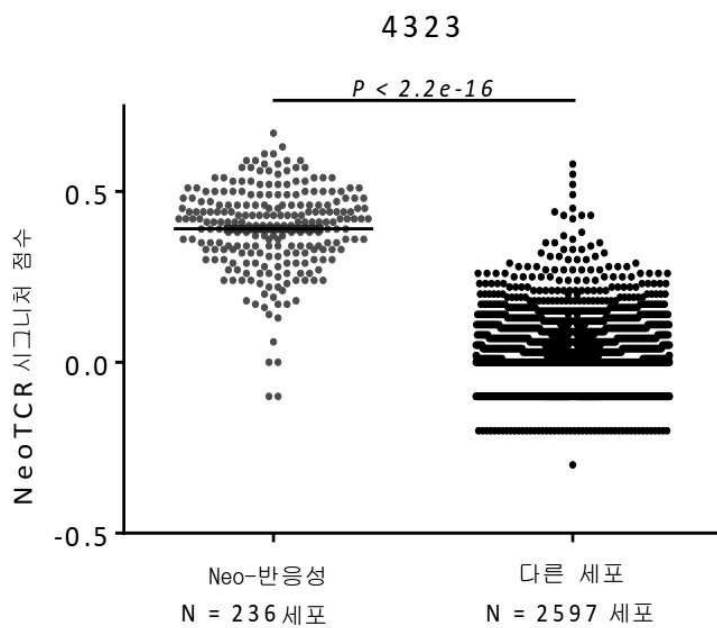
도면5b



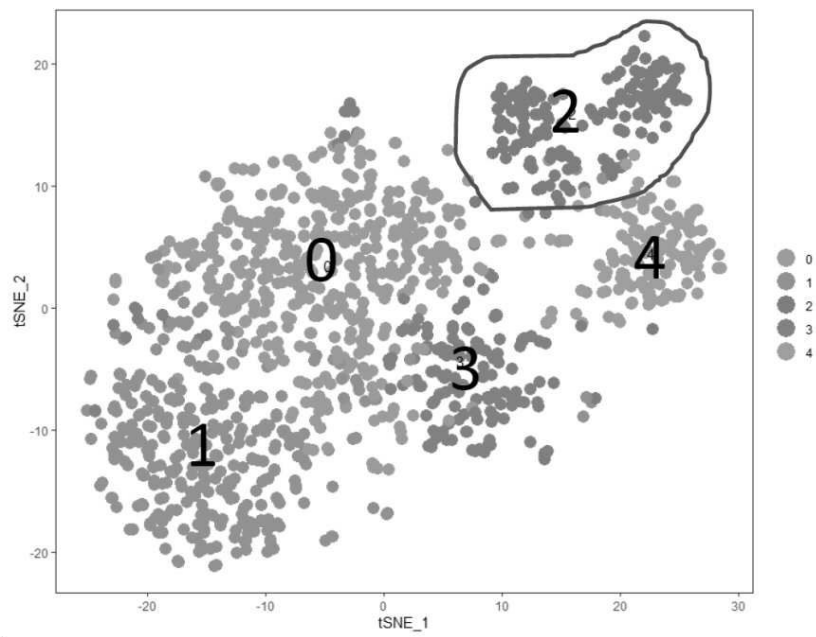
도면5c



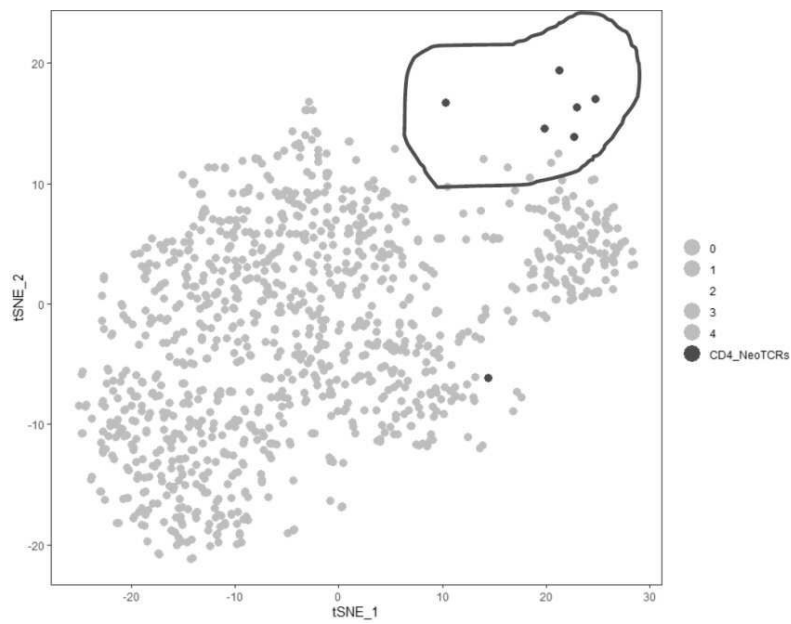
도면6



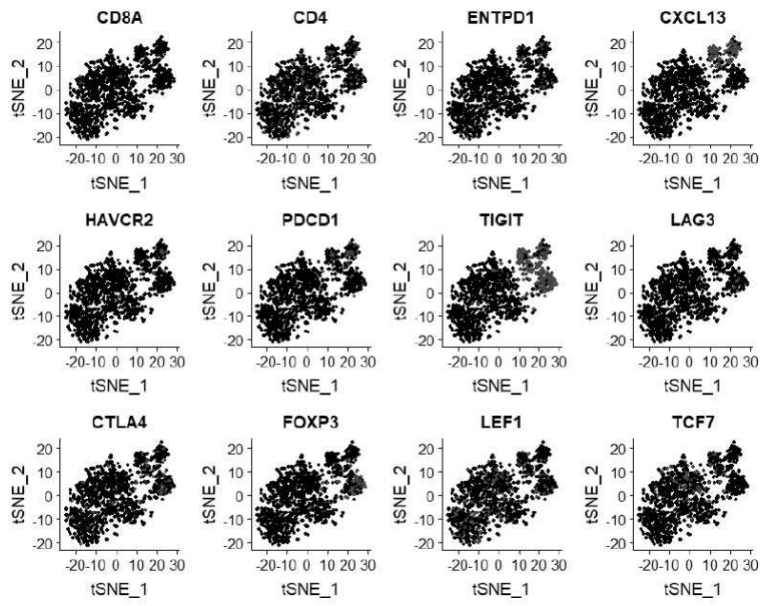
도면7a



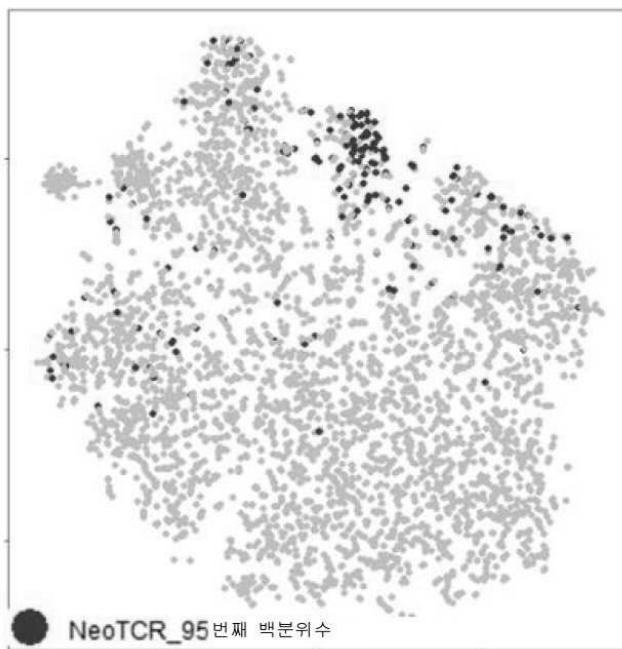
도면7b



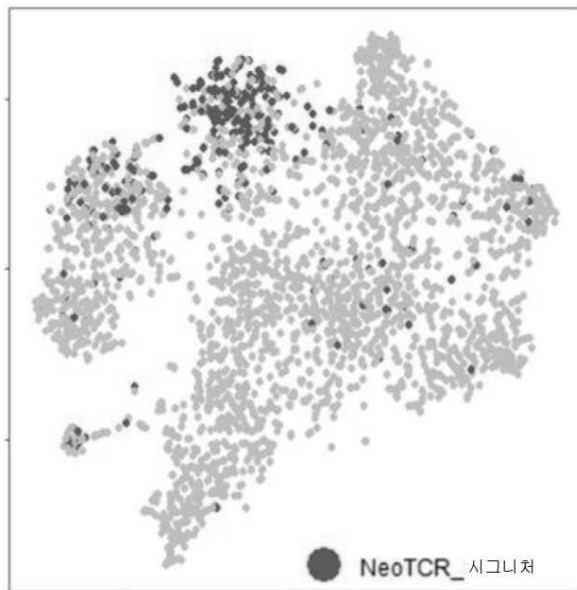
도면7c



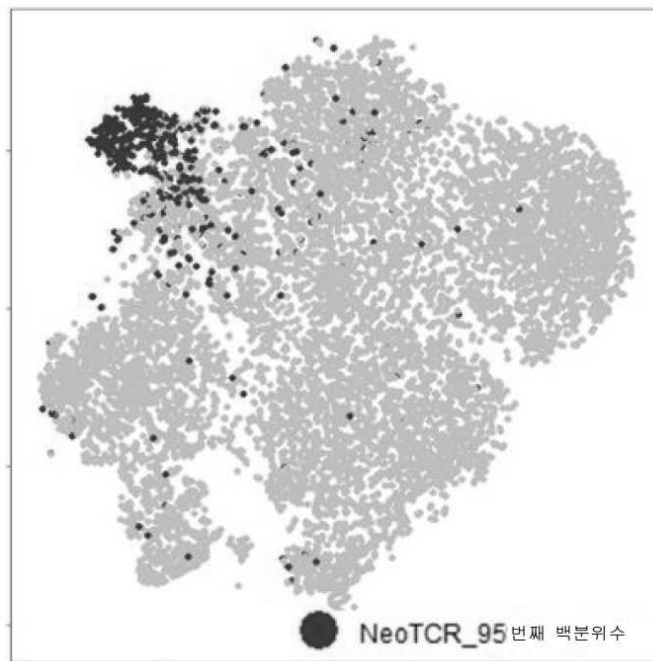
도면8a



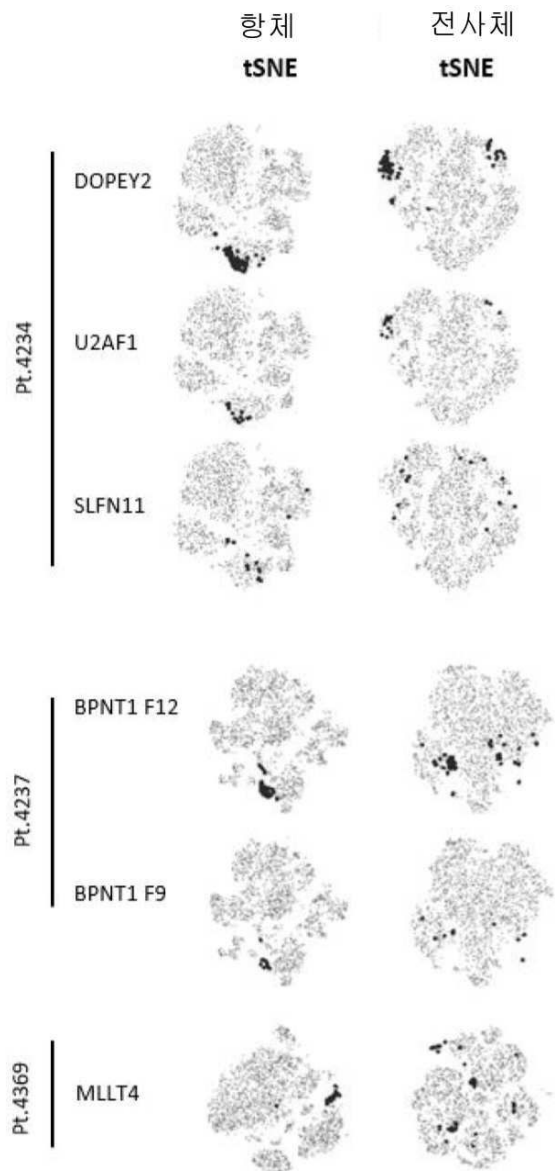
도면8b



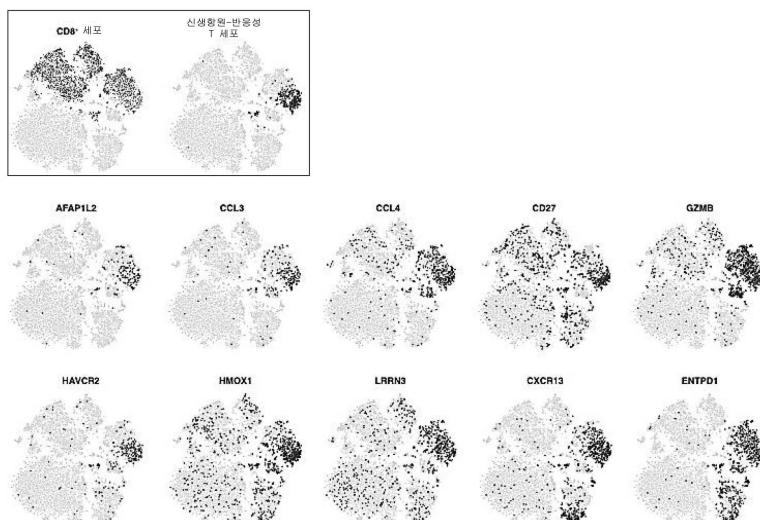
도면8c



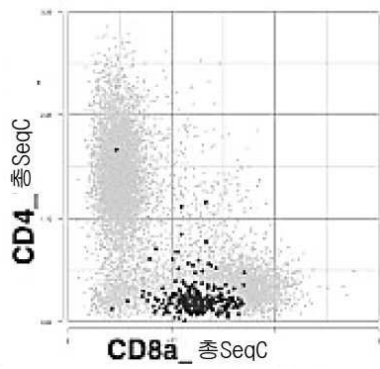
도면9



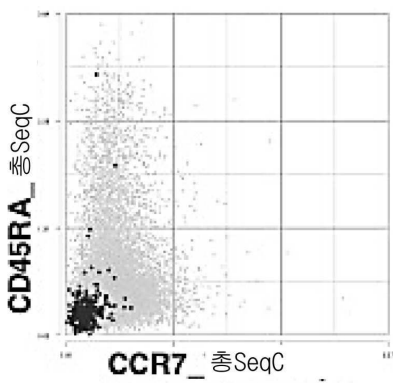
도면10



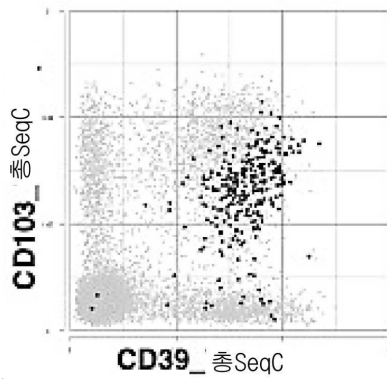
도면11a



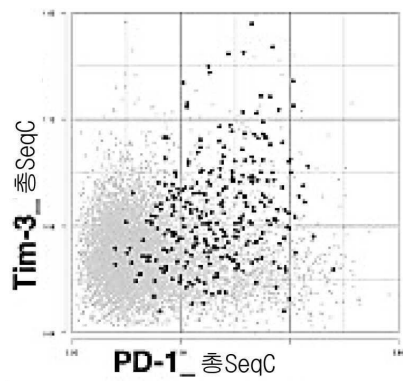
도면11b



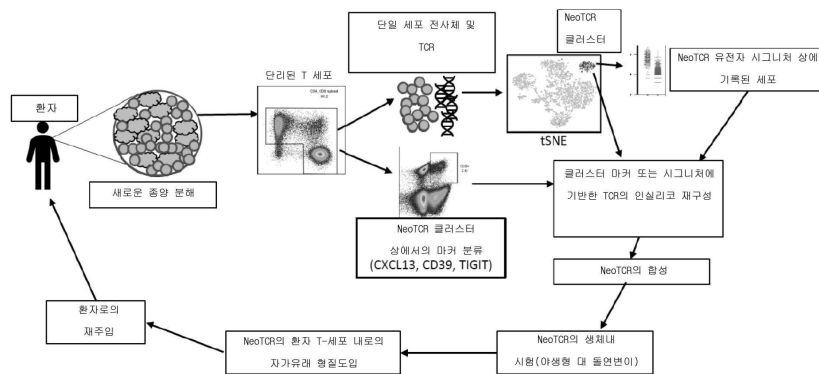
도면11c



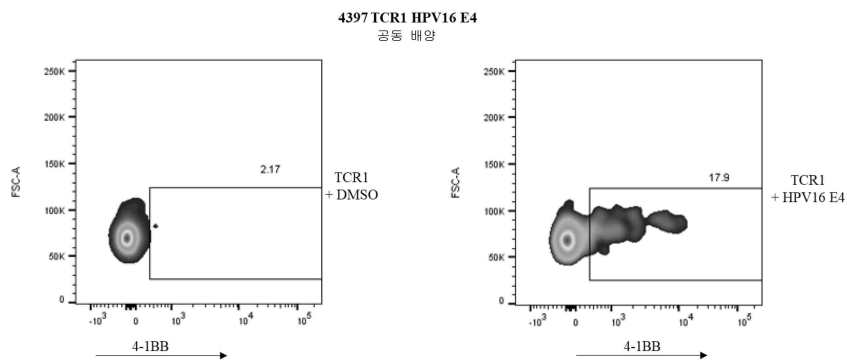
도면11d



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

<120> METHODS OF ISOLATING T-CELLS AND T-CELL RECEPTORS FROM TUMOR BY
SINGLE-CELL ANALYSIS FOR IMMUNOTHERAPY

<130> 753067

<140> PCT/US2021/023240

<141> 2021-03-19

<150> US 62/992,701

<151> 2020-03-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Human papillomavirus

<400> 1

Leu Gln Ser Ser Leu His Leu Thr Ala

1

5