(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0043840
(43) 공개일자 2018년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7010146
(22) 출원일자(국제) 2016년09월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/050850
(87) 국제공개번호 WO 2017/044672
국제공개일자 2017년03월16일
(30) 우선권주장
62/217,677 2015년09월11일 미국(US)

(71) 출원인
아게누스 인코포레이티드
미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 포브스 로드 3
(72) 발명자
다이크 마크 반
네덜란드, 3722제트에이치 빌토번, 가아일란 16
볼커 세이버트
독일, 79539 로에르라치, 튬링거 스트라쎄 261씨
스테인 로버트 벤자민
미국, 뉴욕 11235, 브루클린, 아파트 4아이, 155 오시아나 드라이브 이스트
(74) 대리인
손민

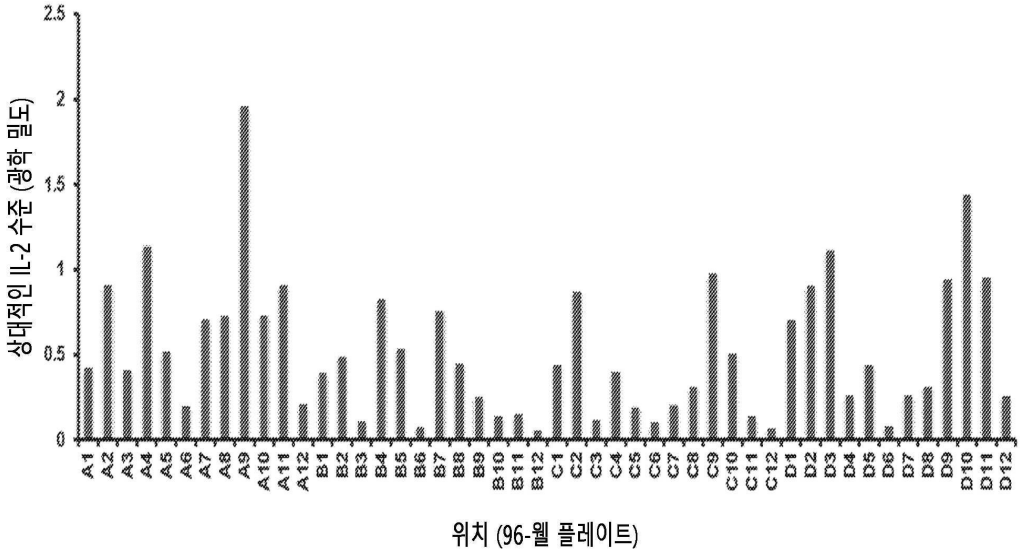
전체 청구항 수 : 총 127 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 숙주 세포 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본원에서는 기능적 T 세포 수용체(TCR)의 발현에 적합한 조작된 숙주 세포 및 이를 이용하여 원하는 펩타이드-MHC(major histocompatibility complex) 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR을 동정하기 위한 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
G01N 33/505 (2013.01)
G01N 33/56972 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 공동수용체(co-rececptor) 또는 이의 제1사슬을 코딩하는 제1폴리뉴클레오티드를 포함하는, 림프구 유래의 분리된 세포로, 상기 세포는 세포 표면에 CD3를 발현하지만, 내인성 TCR(T cell receptor)을 발현하지 않는 것인, 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CD3은 내인성 CD3인 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CD3은 재조합 CD3인 세포.

청구항 4

재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬을 코딩하는 제1폴리뉴클레오티드를 포함하는, 림프구 유래의 분리된 세포로, 상기 림프구는 iNKT(invariant NKT) 세포 또는 dNKT(diverse NKT) 세포인, 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 세포 표면에 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬을 발현하는 세포.

청구항 6

재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬을 코딩하는 제1폴리뉴클레오티드를 포함하는, 림프구 유래의 분리된 세포로, 상기 세포는 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에서 조절 가능하게 발현할 수 있는 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에 조절 가능하게 발현할 수 있는 세포.

청구항 8

제1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 내인성 공동수용체를 세포 표면에 발현하지 않는 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 내인성 공동수용체는 CD8 또는 CD4인 세포.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬은, 세포외 영역(extracellular region), 막 관통 영역(transmembrane region), 세포질 영역(cytoplasmic region)을 포함하고 있으며, 상기 세포외 영역은 막 관통 영역에 연결되고, 상기 막 관통 영역은 세포질 영역에 연결되어 있는 것인, 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포질 영역 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은 림프구와 동일한 종(species)으로부터 온 것인, 세포.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은 림프구와 상이한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은 림프구와 상이한 종인 인간으로부터 유래한 것인, 세포.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체는 CD8 또는 CD4인, 세포.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 재조합 공동수용체의 제2사슬을 코딩하는 제2폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제2사슬은 세포외 영역, 막 관통 영역, 및 세포질 영역을 포함하며, 상기 제2사슬의 세포외 영역은 제2사슬의 막 관통 영역에 연결되어 있고, 제2사슬의 막 관통 영역은 제2사슬의 세포질 영역에 연결되어 있는, 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 제2사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 공동수용체 사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 제2사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 공동수용체 사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 공동수용체 사슬은 림프구와 상이한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 자연발생 공동수용체 사슬은 림프구와 상이한 종인 인간으로부터 유래한 것인, 세포.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체는 CD8인, 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제1사슬의 세포질 영역은 서열번호 1의 183-212번 잔기의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두는 서열번호 1의 162-212번 잔기의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제1사슬의 세포외 영역은 서열번호 1의 1-161번 잔기의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제2사슬의 세포질 영역은 서열번호 2의 171-187번 잔기의 아미노산

서열을 포함하는, 세포.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제2사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두는 서열번호 2의 150-187번 잔기의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 27

제21항, 제25항 및 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제2사슬의 세포외 부분은 서열번호 2의 1-149번 잔기의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 재조합 보조 수용체는,

a) 인간 CD8α의 세포외 영역 및, 마우스(mouse) CD8α의 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8α 사슬, 및

b) 인간 CD8β 세포외 영역 및, 마우스 CD8β의 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8β 사슬, 을

포함하는 키메릭 CD8인, 세포.

청구항 29

a) 인간 CD8α의 세포외 영역 및 마우스 CD8α의 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8α 사슬을 코딩하는, 제2폴리뉴클레오티드 ; 및

b) 인간의 CD8β 세포외 영역과 마우스의 CD8β 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8β 사슬을 코딩하는, 제2폴리뉴클레오티드 ; 를

포함하는, 마우스의 림프구 유래의 분리된 세포로서, 상기 세포는 세포 표면에 CD3을 발현하지만, 내인성 TCR을 발현하지 않는 것인, 세포.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 키메릭 CD8α 사슬은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하며, 키메릭 CD8β 사슬은 서열번호2의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 키메릭 CD8α 사슬은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되며, 키메릭 CD8β 사슬은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는, 세포.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은 조절 가능한 것인, 세포.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 제1폴리뉴클레오티드는 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열(compatible site-specific recombination sequences) 의 제1쌍과 인접하고 있는(flanked by), 세포.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 제2폴리뉴클레오티드는 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍과 인접하고 있는, 세포.

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 제1폴리뉴클레오티드의 일부분은 막 관통 영역과 세포질 영역 모두를 코딩하며, 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍과 인접하고 있는, 세포.

청구항 36

제32항에 있어서, 상기 제2폴리뉴클레오티드의 일부분은 막 관통 영역과 세포질 영역 모두를 코딩하며, 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍과 인접하고 있는, 세포.

청구항 37

제33항 내지 제 36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍은, 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍과 교차반응(cross-react)하지 않는, 세포.

청구항 38

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은, 제1폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소(cognate site-specific recombinase)와 제1폴리뉴클레오티드 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 접촉으로 약화(attenuated)될 수 있는 것인, 세포.

청구항 39

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은, 제1폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소와 제1폴리뉴클레오티드 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 접촉으로 소거(abrogated)될 수 있는 것인, 세포.

청구항 40

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소를 코딩하는 제3폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 것인, 세포.

청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 제3폴리뉴클레오티드의 전사는 유도성 프로모터(inducible promoter)에 의해 조절되는 것인, 세포.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및 제2쌍은 lox 부위와 호환 가능하고, 동족 부위특이적 재조합 효소는 Cre 재조합 효소인 것인, 세포.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 lox 부위와 호환 가능한 쌍은, loxP 부위와 호환 가능한 쌍인 것인, 세포.

청구항 44

제32항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체는 CD8인 것인, 세포.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 제1폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 1-675번 잔기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 46

제44항에 있어서, 상기 제1폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 47

제44항에 있어서, 상기 제2폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 1-600번 폴리뉴클레오티드 서열 잔기를 포함하는 것인, 세포.

청구항 48

제44항에 있어서, 상기 제2폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 49

제44항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제1사슬은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제1사슬은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 51

제44항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제2사슬은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 재조합 공동수용체의 제2사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 53

제32항에 있어서, 상기 제1폴리뉴클레오티드의 전사는 유도성 프로모터에 의해 조절되는 것인, 세포.

청구항 54

제32항 또는 제53항에 있어서, 상기 제2폴리뉴클레오티드의 전사는 유도성 프로모터에 의해 조절되는 것인, 세포.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템(reporter system)을 추가로 포함하는 것인, 세포.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템은, NFAT(nuclear factor of activated T-cell) 시그널링, IL-2 시그널링, AP1(activator protein-1) 시그널링, NFκB/Rel 시그널링, 및 칼슘 플럭스(calcium flux)로 구성된 군으로부터 선택된, 하나 또는 그 이상의 세포의 활동 표지를 제공하는, 세포.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템은, 검출 가능한 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 영역을 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 세포.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 프로모터 영역은 NFAT(nuclear factor of activated T-cell) 반응 요소(response elements), AP1(activator protein-1) 반응 요소, NFκB/Rel 반응 요소로 구성된 군으로부터 선택된, 하나 또는 그 이상의 전사 반응 요소를 포함하는 것인, 세포.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 검출 가능한 마커는 형광 단백질, 세포 표면 마커, 및 항생제 선발 마커로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 세포.

청구항 60

제57항에 있어서, 상기 프로모터 영역은 IL-2 프로모터인, 세포.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 IL-2 프로모터는 최소(minimal) IL-2 프로모터인, 세포.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 IL-2 프로모터는 하나 또는 그 이상의 NFAT 결합 부위를 포함하는, 세포.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 IL-2 프로모터는 3개의 NFAT 결합 부위를 포함하는, 세포.

청구항 64

제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 가능한 마커는 EGFP(enhanced green fluorescent protein)인, 세포.

청구항 65

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 단일 세포로부터 유래한 것이고, 상기 세포가 적어도 10^5개 이상의 복수의 세포로 증식(expand)하고 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 코딩하는 별개의 폴리뉴클레오티드 벡터로 형질도입(transduced) 또는 형질전환(transfected)되어 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하는 재조합 TCR을 발현할 때, 형질도입 또는 형질전환 효율을 최대화하는 조건에서, 복수의 세포 중 적어도 20%가 세포 표면에 재조합 TCR을 발현하는, 세포.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 세포는 이전에 1회 또는 그 이상 횟수의 형질도입 혹은 형질전환이 된, 세포.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구는 T 세포, B 세포 또는 NK 세포인, 세포.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 림프구는 $CD8^+$ 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell), $CD8^+$ 조절 T 세포(regulatory T cell), $CD4^+$ 세포독성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼(helper) T 세포, 및 $CD4^+$ 조절 T 세포로 구성된 군으로부터 선택된 T 세포인, 세포.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구는 포유류 림프구인, 세포.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 림프구는 뮤린(murine) 림프구인, 세포.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 림프구는 RAG1 또는 RAG2 넉아웃(knockout) 뮤린 세포, 뮤린 미성숙 T 세포, 마우스 DO-11.10.7 58 α- β- (58-/-) 세포, 및 마우스 Bw5147 세포로 구성된 군에서 선택된 것인, 세포.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 림프구는 마우스 림프구인, 세포.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 재조합 TCR을 세포 표면에 추가로 발현하고, 재조합 TCR은 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하고, 상기 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬은 각각 가변 영역(variable region)과 비가변 영역(non-variable region)을 포함하고, 각 비가변 영역은 불변 영역(constant region), 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하고, 상기 각 사슬의 가변 영역은 불변 영역에 연결되어 있고, 불변 영역은 막 관통 영역에 연결되어 있고, 막 관통 영역은 세포질 영역에 연결되어 있는 것인, 세포.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 TCR 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 60%, 선택적으로 70, 80, 90 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 TCR 사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 75

제73항에 있어서, 상기 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 TCR 사슬의 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 TCR 사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 TCR α 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 전부의 아미노산 서열은, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 상기 TCR β 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 전부의 아미노산 서열은, 서열번호 16, 18 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 78

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 비가변 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 TCR 사슬의 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 상기 자연발생 TCR 사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것인, 세포.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 TCR α α 사슬의 비가변 영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 TCR β 사슬의 비가변 영역은, 서열번호 15, 17 및 19으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 세포.

청구항 81

제73항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가변 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 상이한 종으로부터 온 TCR 사슬의 상응하는 가변 영역으로부터 유래한 것인, 세포.

청구항 82

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의, 가변 영역 및 불변 영역 전부의 아미노산 서열은, 림프구와 상이한 종으로부터 온 TCR 사슬의 상응하는 영역으로부터 유래한 것인, 세포.

청구항 83

제81항 또는 82항에 있어서, 상기 림프구와 상이한 종으로부터 온 TCR은, 인간으로부터 유래한 것인, 세포.

청구항 84

제73항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 TCR은 공동 자극(co-stimulatory) 시그널링 영역을 포함하는 융합 분자인, 세포.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 공동 자극 시그널링 영역은 TCR α 사슬의 세포질 영역 또는 TCR β 사슬의 세포질 영역에 융합되어 있는 것인, 세포.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서, 상기 공동 자극 시그널링 영역은, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, LFA-1(lymphocyte function-associated antigen-10), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드로 구성된 군으로부터 선택된 공동 자극 분자의 시그널링 영역을 포함하는 것인, 세포.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 공동 자극 시그널링 영역은 CD28의 시그널링 영역, 4-1BB의 시그널링 영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 세포.

청구항 88

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 분자는 CD3ζ 시그널링 영역을 추가로 포함하는 것인, 세포.

청구항 89

제73항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 TCR의 발현은 (1) 적어도 하나의 항생제 선발 마커; (2) 적어도 하나의 스크리닝 마커; 또는 (3) 이들의 조합의 발현에 결합되어 있는, 세포.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 적어도 하나의 스크리닝 마커는 형광 단백질 또는 세포 표면 마커인, 세포.

청구항 91

제73항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 TCR은 태아 흉선(fetal thymus), 제대혈(cord blood), 암 환자로부터 분리된 TILs(tumor infiltrating lymphocytes), 백신 접종된 대상(subject), 관심 항원(antigen of interest)에 노출된 대상, 건강한 대상 및 합성 라이브러리로 구성된 군으로부터 선택된 공급원(source)에서 유래한 것인, 세포.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 백신 접종된 대상은 HPV 백신, EBV 백신 또는 암 백신 접종된 인간인, 세포.

청구항 93

제91항에 있어서, 상기 백신 접종된 대상은 관심 항원으로 면역화된 인간 MHC(major histocompatibility complex)를 발현하는 트랜스제닉(transgenic) 마우스인, 세포.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 백신 접종된 대상은 관심 항원으로 면역화된 HLA-A2를 발현하는 트랜스제닉 마우스인, 세포.

청구항 95

제73항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 (1) 재조합 TCR α 사슬 및 재조합 TCR β 사슬, (2) 재조합 TCR α 사슬 및 다수의 상이한 재조합 TCR β 사슬, (3) 재조합 TCR β 사슬 및 다수의 상이한 재조합 TCR α 사슬, 또는 (4) 다수의 상이한 재조합 TCR α 사슬 및 다수의 상이한 재조합 TCR β 사슬을 발현하는 것

인, 세포.

청구항 96

제73항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포를 복수로 포함하는, 세포 라이브러리.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 세포 라이브러리는 적어도 10^7, 10^8, 또는 10^9의 TCR 다양성을 갖는 것인, 세포 라이브러리.

청구항 98

원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에, TCR을 발현하는 세포를 분리하고, 분리된 세포의 TCR이 원하는 특성을 가졌다는 것을 확인하는 단계를 포함하는, 원하는 특성의 선별 과정에, 제73항 내지 제95항 중 어느 한 항에서의 복수의 세포, 또는 제96항 또는 제97항의 세포 라이브러리를 노출시키는 것을 포함하는, 원하는 특성을 가진 TCR의 분리 및 동정 방법.

청구항 99

(a) 제1항 내지 제72항 중 어느 한 항의 세포를 복수로 제공하는 단계,

(b) 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조를 세포에 형질전환 또는 형질도입하는 단계,

(c) 세포 표면에 TCR을 발현시키는 단계,

(d) 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선별하는 단계,

(e) 선별된 세포로부터 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 분리하는 단계, 및

(f) (e)단계에서 분리한, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 단계;

를 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 방법.

청구항 100

(a) 제1항 내지 제72항 중 어느 한 항의 세포를 복수로 제공하는 단계,

(b) 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조를 세포에 형질전환 또는 형질도입하는 단계,

(c) 세포 표면에 TCR을 발현시키는 단계,

(d) 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선별하는 단계,

(e) (d)단계에서 선별된 세포들 내의 재조합 공동 수용체 또는 그 사슬의 활성을 조절하는 단계,

(f) 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에, (e)단계에서 만들어진 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 추가로 선별하는 단계,

(g) (f)단계에서 선별된 세포로부터 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 분리하는 단계, 및

(h) (g)단계에서 분리된, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 단계 ;

를 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 (d)단계는 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 표면 발현 존재 하에 수행되고, 상기 (e)단계는 상기 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 표면 발현 소거(abrogation)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 (a)단계의 복수의 세포는 제33항 내지 제40항 중 어느 한 항의 세포를 포함하며, 상기 (e)단계에서, 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 세포 표면 발현 소거는 제1 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 부위특이적 재조합 서열을 동족 부위특이적 재조합 효소와 접촉시킴으로써 이루어지는, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 유도성 프로모터의 조절 하에 세포에서 발현되는 것인, 방법.

청구항 104

제102항에 있어서, 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 (e)단계 이전의 (d)단계에서 선별된 세포에 도입되는 것인, 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 형질전환 또는 형질도입에 의해 (d)단계에서 선별된 세포에 도입되어 부위특이적 재조합 효소를 코딩하는 구조를 발현하는 것인, 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 단백질로 도입되는 것인, 방법.

청구항 107

제102항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부위특이적 재조합 서열은 lox 부위이고 동족 부위특이적 재조합 효소는 Cre 재조합 효소인, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 부위특이적 재조합 서열은 lox 부위이고, 동족 부위특이적 재조합 효소는 단백질 형질도입 도메인을 포함하는 Cre 재조합 효소 융합 단백질인, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인은 HIV Tat으로부터 온 것인, 방법.

청구항 110

(a) 제1항 내지 제72항 중 어느 한 항의 세포를 복수로 제공하는 단계,

(b) 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조를 세포에 형질전환 또는 형질도입하는 단계,

(c) 세포 표면에 TCR을 발현시키는 단계,

(d) 관심 펩타이드와 복합체를 이룬 MHC 분자의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선별하는 단계로, 상기 MHC 분자는 야생형 MHC 분자의 변이체(variant)인 변이체 MHC 분자이고, 상기 변이체 MHC 분자는 공동수용체의 야생형 MHC 분자의 친화도와 비교하여 감소된 친화도로 공동수용체에 결합하는 것인 단계,

(e) (d)단계에서 선별된 세포로부터 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 분리하는 단계, 및

(f) (e)단계에서 분리된, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 단계 ;

를 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 상기 공동수용체는 CD8이고, 상기 변이체 MHC 분자는 야생형 MHC class I α 사슬의 변이체인 α 사슬을 포함하는 MHC 클래스 I 변이체 분자인 것인, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 공동수용체는 인간 CD8이고, 상기 MHC 클래스 I 변이체 분자는 야생형 HLA-A2 α 사슬의 변이체인 α 사슬을 포함하는 HLA-A2 변이체인 것인, 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 HLA-A2 변이체 α 사슬은, 성숙 단백질(mature protein) 서열에 따른 넘버링으로 A245V 돌연변이 또는 D227K/T228A 돌연변이를 포함하는 것인, 방법.

청구항 114

제98항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원하는 특성은, 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 높은 선택성(selectivity), 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 높은 친화도 및 원하는 펩타이드-MHC 복합체 존재 하에서 양성 기능 판독 값의 증명(demonstration of a positive functional readout)으로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 기능 판독값은 활성화 마커의 발현, 시그널링 경로의 유발, 사이토카인의 생성, 칼슘 플럭스, 증식, 및 리포터 시스템의 활성화로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 활성화 마커는 CD69 또는 CD137인, 방법.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 상기 복수의 세포는 제55항 내지 제64항 중 어느 한 항의 세포를 포함하며, 상기 기능 판독값은 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템의 활성화인, 방법.

청구항 118

제99항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 발현 구조는 (i) TCR α 사슬 및 TCR β 사슬, (ii) TCR α 사슬 및 다수의 상이한 TCR β 사슬, (iii) TCR β 사슬 및 다수의 상이한 TCR α 사슬, 또는 (iv) 다수의 상이한 TCR α 사슬 및 다수의 상이한 TCR β 사슬을 코딩하는 것인, 방법.

청구항 119

제98항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 포함하는 것인, 방법.

청구항 120

제98항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 무세포(cell free) 펩타이드-MHC 복합체인 것인, 방법.

청구항 121

제120항에 있어서, 상기 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 MHC 분자의 이량체(dimer), 4량체(tetramer), 또는 다량체(multimer)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 122

제98항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 세포 표면에 디스플레이(display)되는 것인, 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, 상기 세포는 포유류 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포인, 방법.

청구항 124

제122항에 있어서, 상기 세포는 T2 세포 또는 항원 제시(antigen presenting) 세포인, 방법.

청구항 125

제98항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드는 포스포펩타이드(phosphopeptide) 또는 포스포펩타이드 모조체(phosphopeptide mimetic)인 것인, 방법.

청구항 126

제99항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계에서, 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조는 PVC-211 뮤린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus)를 포함하는 레트로바이러스성 벡터 입자를 사용하여 세포에 형질도입되는 것인, 방법.

청구항 127

제99항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 TCR은 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하며, 상기 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬은 별개의 발현 구조에 의해 코딩되는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2015년 9월 11일 출원된 미국 가출원 번호 제 62/217,677호의 이익을 주장하며, 상기 출원은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본원은 TCR(T cell receptor)의 발현에 적합하도록 조작된 숙주 세포 및 이 세포들을 이용하여 원하는 펩타이드-MHC(major histocompatibility complex) 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR을 동정하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] **배경기술**

[0006] 포유류에서, 후천성 면역 체계(acquired immune system)는 두 가지 주요한 구성 요소를 포함한다 : 항체를 수반하는 체액성 면역 반응(humoral immune response), 및 T 세포를 수반하는 세포성 면역 반응(cellular immune response). T 세포는 후천적 세포성 면역(adaptive cellular immunity)의 주요한 매개자이며 MHC 분자에 결합한 펩타이드 에피토프(epitope)의 TCR-매개 인식을 통해 그들의 작용을 발휘한다. 면역 체계는 넓은 범위의 펩타이드-MHC 특이성을 포괄하는 다수의 T세포를 포함한다. 그러나, 흉선에서의 음성 및 양성 선별 과정은 T 세포 다양성의 제한을 야기하며, 생체 내에서의(in vivo) T 세포 반응성의 스펙트럼을 제한한다. 예를 들어, 음성 선별은 자가-항원 특이적인 고도의 친화성(high affinity) T 세포 레파토리의 제거를 야기하며, 이것은 종양 조직에 발현되는 자가 항원과 같은 바람직한 특이성을 가진 T 세포를 포함한다.

[0007] 암 면역 치료, 암세포에 대한 환자의 면역반응 증진은 큰 가능성을 갖는다. 능동 면역치료법(Active immunotherapy)은 종양 보유 환자의 내인성 면역 체계의 자극에 의해 수행된다. 수동, 또는 입양(adoptive) 면역치료법은 면역 능력이 있는(immune-competent) 세포를 환자에게 이식하는 것을 포함한다. 알려진 암 특이적 펩타이드-MHC복합체를 암환자의 T세포에 도입하는 유전자 치료 기술은 입양 면역 치료법의 한 가지 방법이다. 하지만, 이 방법은 적절한 친화성을 갖는 암-특이적 펩타이드-MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR을 얻는 데에 의존한다.

[0008] 따라서, 원하는 펩타이드-MHC 복합체(예를 들어, 암-특이적 펩타이드 항원을 포함하는 펩타이드-MHC 복합체)에 특이적으로 결합하는 신규한 TCR, 및 그러한 TCR을 발견하는 방법이 당 업계에 필요하다.

발명의 내용

[0009] **발명의 요약**

[0010] 본원은 기능성 TCR의 발현에 적합한 조작된 숙주 세포주 및 이 세포들을 이용하여 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR을 동정하는 방법을 제공한다.

[0011] 본원은 한 실시 양태로, 재조합 공동수용체(co-receptor) 또는 이의 제1사슬을 코딩하는 제1폴리뉴클레오티드를 포함하는, 림프구 유래의 세포(예를 들어, 분리된 세포)로, 상기 세포는 CD3을 세포 표면에 발현하지만, 내인성 TCR은 발현하지 않는 것인 세포를 제공한다. 특정 구현예로, CD3은 내인성 CD3이다. 특정 구현예로, CD3은 재조합 CD3이다. 특정 구현예로, 상기 세포는 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에 발현하거나, 및/또는 상기 세포는 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에 조절 가능하게 발현하거나, 및/또는 상기 세포는 내인성 공동수용체를 세포 표면에 발현하지 않거나, 및/또는 상기 내인성 공동수용체는 CD8 또는 CD4이다.

[0012] 본원은 다른 실시 양태로, 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 림프구 유래의 세포(예를 들어, 분리된 세포)로, 상기 림프구는 iNKT(invariant NKT)세포 또는 dNKT(diverse NKT)세포를 제공한다. 특정 구현예로, 상기 세포는 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에 발현한다. 특정 구현예로, 상기 세포는 내인성 공동수용체를 세포 표면에 발현하지 않거나, 및/또는 내인성 공동수용체는 CD8 또는 CD4이다.

[0013] 본원 발명의 다른 실시 양태로, 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 림프구 유래의 세포(예를 들어, 분리된 세포)로, 상기 세포는 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에 조절 가능하게 발현할 수 있는 세포를 제공한다. 특정 구현예로, 세포는 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬을 세포 표면에 조절 가능하게 발현한다. 특정 구현예로, 세포는 세포 표면에 내인성 공동수용체를 발현하지 않는다. 특정 구현예로, 내인성 공동수용체는 CD8 또는 CD4이다.

[0014] 다음의 각 구현예는 본원에 설명된 본 발명의 세포에 적용된다.

[0015] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬은, 세포외 영역, 막 관통 영역, 및 세포질 영역을 포함하며, 상기 세포외 영역은 막 관통 영역에 연결되어 있으며, 막 관통 영역은 세포질 영역에 연결되어 있다.

[0016] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일할 수 있으며, 상기 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것이다.

[0017] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 이에 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일할 수 있으며, 상기 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은 림프구와 동일한 종으로부터 온 것이다.

[0018] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 상이한 종으로부터 온, 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 특정 구현예로, 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은, 림프구와 상이한 종인 인간으로부터 유래한 것이다.

[0019] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포질 영역은, 림프구와 동일한 종으로부터 온, 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과, 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하거나, 및/또는 재조합 공동수용체, 또는 이의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 전부의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온, 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 전부의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하며, 또한, 재조합 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 상이한 종으로부터 온, 상응하는 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 한 구현예로, 자연발생 공동수용체 또는 이의 제1사슬은, 림프구와 상이한 종인 인간으로부터 유래한 것이다.

[0020] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체는 CD8 또는 CD4이다.

[0021] 특정 구현예로, 본원에 개시된 세포는 재조합 공동수용체의 제2사슬을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드를 추가로 더 포함하며, 상기 제2사슬은 세포외 영역, 막 관통 영역, 및 세포질 영역을 포함하고, 상기 제2사슬의 세포외 영역은 제2사슬의 막 관통 영역과 연결되어 있고, 제2사슬의 막 관통 영역은 제2사슬의 세포질 영역과 연결되어

있다. 특정 구현예로, 제2사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 특정 구현예로, 제2사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 특정 구현예로, 제2사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 상이한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 림프구와 상이한 종으로부터 온 자연발생 공동수용체 사슬은 인간으로부터 유래한 것일 수 있다.

[0022] 그러므로, 특정 구현예로, 제2사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은 림프구와 동일한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하거나, 및/또는 제2사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은 림프구와 동일한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하고, 또한 제2사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열은 림프구와 상이한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 공동수용체 사슬의 세포외 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 한 구현예로, 림프구와 상이한 종으로부터 온 자연발생 공동수용체 사슬은 인간으로부터 유래한 것일 수 있다.

[0023] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체는 CD8 이다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제1사슬의 세포질 영역은 서열번호 1의 183-212번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두는 서열번호 1의 162-212번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제1사슬의 세포외 영역은 서열번호 1의 1-161번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬의 세포질 영역은 서열번호 2의 171-187번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬의 막 관통 구역 및 세포질 영역 모두는 서열번호 2의 150-187번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬의 세포외 영역은 서열번호2의 1-149번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 따라서, 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제1사슬의 세포질 영역은 서열번호 1의 183-212번 잔기의 아미노산 서열을 포함하거나, 및/또는 재조합 공동수용체의 제1사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두는 서열번호1의 162-212번 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 것으로, 예를 들어, 상기 재조합 공동수용체의 제1사슬의 세포외 영역은 서열번호 1의 1-161번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 한 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬의 세포질 영역은 서열번호 2의 171-187번 잔기의 아미노산 서열을 포함하거나, 및/또는 재조합 공동수용체의 제2사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두는 서열번호 2의 150-187번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다. 한 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬의 세포외 영역은 서열번호 2의 1-149번 잔기의 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체는 키메릭 CD8로, a) 인간 CD8α 의 세포외 영역 및 마우스 CD8α 의 막 관통 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8α 사슬, 및 b) 인간 CD8β의 세포외 영역 및 마우스 CD8β의 막 관통 및 세포질 영역을 포함한다. 한 구현예로, 키메릭 CD8α 사슬은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 또한 키메릭 CD8β 사슬은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것으로, 예를 들어, 상기의 키메릭 CD8α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되며, 키메릭 CD8β 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된다.

[0025] 본원은 다른 실시 양태로, 또한 마우스 림프구 유래의, a) 인간 CD8α의 세포외 영역 및 마우스 CD8α의 막 관통 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8α사슬을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 b) 인간 CD8β의 세포외 영역 및 마우스 CD8β의 막 관통 및 세포질 영역을 포함하는 키메릭 CD8β사슬을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 분리된 세포를 제공하며, 상기 세포는 세포 표면에 CD3을 발현하지만 내인성 TCR은 발현하지 않는 것이다. 특정 구현예로, 키메릭 CD8α 사슬은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하며, 키메릭 CD8β 사슬은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 키메릭 CD8α 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되며, 키메릭 CD8β 사슬의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된다.

[0026] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은 조절 가능하다.

[0027] 특정 구현예로, 호환 가능한 부위특이적(compatible site-specific) 재조합 서열의 제1쌍은 제1폴리뉴클레오티

드에 인접(flank)한다.

[0028] 특정 구현예로, 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍은 제2폴리뉴클레오티드에 인접한다.

[0029] 특정 구현예로, 제1폴리뉴클레오티드의 일부분으로 막 관통 영역 및/또는 세포질 영역을 코딩하는 부분은, 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍에 인접한다.

[0030] 특정 구현예로, 제2폴리뉴클레오티드의 일부분으로 막 관통 영역 및/또는 세포질 영역을 코딩하는 부분은, 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍에 인접한다.

[0031] 특정 구현예로, 호환가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍은 호환가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍과 교차반응(cross-react)하지 않는다.

[0032] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은 제1폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소(cognate site-specific recombinase)와 제1뉴클레오티드 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 접촉으로 약화(attenuated)될 수 있다.

[0033] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은, 제1폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소와 제1폴리뉴클레오티드 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 접촉으로 소거(abrogated)될 수 있다.

[0034] 그러므로, 특정 구현예로, 호환가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍은 호환가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍과 교차반응하지 않는 것으로, 예를 들어, 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은 제1폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소(cognate site-specific recombinase)와 제1뉴클레오티드 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 접촉으로 약화(attenuated)될 수 있으며, 또는 상기 재조합 공동수용체 또는 이의 사슬의 표면 발현은, 제1폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1쌍 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 호환 가능한 부위특이적 재조합 서열의 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합 효소와 제1폴리뉴클레오티드 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 접촉으로 소거(abrogated)될 수 있다.

[0035] 특정 구현예로, 세포는 호환가능한 부위특이적 재조합 서열의 제1 및/또는 제2쌍을 인식하는 동족 부위특이적 재조합효소를 코딩하는 제3폴리뉴클레오티드를 추가로 더 포함한다. 특정 구현예로, 제3폴리뉴클레오티드의 전사는 유도성 프로모터(inducible promoter)에 의해 조절된다.

[0036] 특정 구현예로, 부위특이적 재조합 서열의 제1 및 제2쌍은 lox 부위와 호환가능한 쌍이며, 동족 부위특이적 재조합 효소는 Cre 재조합 효소이다.

[0037] 특정 구현예로, lox 부위의 호환가능한 쌍은 loxP 부위의 호환가능한 쌍이다. 그러므로, 한 구현예로, 부위특이적 재조합 서열의 제1 및 제2쌍은 lox 부위의 호환가능한 쌍이고, 또한 동족 부위특이적 재조합 효소는 Cre 재조합 효소로, 예를 들어, 상기 lox 부위의 호환가능한 쌍은 loxP 부위이다.

[0038] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체는 CD8이다. 특정 구현예로, 제1폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 1-675번 잔기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 제1폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 제2폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 1-600번 잔기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 제2폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제1사슬은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제1사슬은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 재조합 공동수용체의 제2사슬은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 그러므로, 본 발명의 한 구현예로, 재조합 공동수용체는 CD8으로, 예를 들어, 상기 제1 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 1-675번 잔기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 또는 제1 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 및/또는 제2폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 1-600번 잔기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 또는 제2폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 구현예로, 재조합 공동수용체는 CD8이고, 또한 재조합 공동수용체의 제1사슬은 서열번호 25 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나, 및/또는 재조합 공동수용체의 제2사슬은 서열번호 26 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0039] 특정 구현예로, 제1폴리뉴클레오티드의 전사는 유도성 프로모터에 의해 조절되거나, 및/또는 제2뉴클레오티드의 전사는 유도성 프로모터에 의해 조절된다.

[0040] 특정 구현예로, 세포는 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템(reporter system)을 추가로 더 포함한다. 특정 구현예로, 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템은 NFAT(nuclear factor of activated T-cell) 시그널링, AP1(activator protein-1)시그널링, NFκB/Rel 시그널링, 및 칼슘 플럭스(calcium flux)로 구성된 군으로부터 선택된 세포의 하나 또는 그 이상의 활성을 표지로 제공한다. 특정 구현예로, 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템은 검출 가능한 마커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 영역을 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 구현예로, 프로모터 영역은 NFAT(nuclear factor of activated T-cell) 반응 요소(response elements), AP1(activator protein-1) 반응 요소, 및 NFκB/Rel 반응 요소로 구성된 군으로부터 선택된, 하나 또는 그 이상의 전사 반응 요소를 포함한다. 특정 구현예로, 검출 가능한 마커는 형광 단백질, 세포 표면 마커, 및 항생제 선별 마커로 구성된 군으로부터 선택된 것이다. 특정 구현예로, 프로모터 영역은 IL-2 프로모터이다. 특정 구현예로, IL-2 프로모터는 최소(minimal) IL-2 프로모터이다. 특정 구현예로, IL-2 프로모터는 하나 또는 그 이상의 NFAT 결합 부위를 포함한다. 특정 구현예로, IL-2 프로모터는 3개의 NFAT 결합 부위를 포함한다. 특정 구현예로, 검출 가능한 마커는 EGFP(enhanced green fluorescent protein)이다. 특정 구현예로, 프로모터 영역은 3개의 NFAT 결합 부위를 갖는 IL-2 프로모터이고, 검출 가능한 마커는 EGPF이다.

[0041] 특정 구현예로, 세포는 단일 세포에서 유래하며, 상기 세포는 적어도 10^5개의 복수의 세포로 증식(expand)하고, TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 코딩하는 별개의 폴리뉴클레오티드 벡터로 형질도입 또는 형질전환되어, TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하는 재조합 TCR을, 형질도입 또는 형질전환 효율을 최대화하는 조건 하에, 최소한 20%의 세포들이 재조합 TCR을 세포 표면에 발현한다. 특정 구현예로, 세포는 이전에 1회 또는 그 이상 횟수의 형질도입 또는 형질전환이 된 것이다.

[0042] 특정 구현예로, 림프구는 T 세포, B 세포, 또는 NK 세포이다. 특정 구현예로, 상기 림프구는 $CD8^+$ 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell), $CD8^+$ 조절 T 세포(regulatory T cell), $CD4^+$ 세포독성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T 세포, 및 $CD4^+$ 조절 T 세포로 구성된 군으로부터 선택된 T 세포이다. 특정 구현예로, 림프구는 포유류 림프구이다. 특정 구현예로, 림프구는 뮤린(murine) 림프구이다. 특정 구현예로, 림프구는 RAG1 또는 RAG2 넉아웃(knockout) 뮤린 세포, 뮤린 미성숙 T 세포, 마우스 DO-11.10.7 58 α-β- (58-/-) 세포, 및 마우스 Bw5147 세포로 구성된 군에서 선택된 것이다. 특정 구현예로, 림프구는 마우스 림프구이다. 따라서, 본 발명의 세포의 다른 구현예로, 림프구는 T 세포, B 세포, 또는 NK 세포로, 예를 들어, 림프구는 $CD8^+$ 세포독성 T 세포, $CD8^+$ 조절 T 세포, $CD4^+$ 세포독성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T 세포, 및 $CD4^+$ 조절 T 세포로 구성된 군으로부터 선택된 T 세포이거나, 및/또는 상기 림프구는 포유류 림프구로, 예를 들어, 뮤린 림프구로, RAG1또는 RAG2 넉아웃(knockout) 뮤린 세포, 뮤린 미성숙 T 세포, 마우스 DO-11.10.7 58 α-β- (58-/-) 세포, 및 마우스 Bw5147 세포로 구성된 군에서 선택된 것과 같다. 한 구현예로, 림프구는 마우스 림프구이다.

[0043] 특정 구현예로, 세포는 재조합 TCR을 세포 표면에 추가로 더 발현하며, 재조합 TCR은 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하고, 상기 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬은 각각 가변 영역(variable region)및 비가변 영역(non-variable region)을 포함하고, 각 가변 영역은 불변 영역(constant region), 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하며, 상기 각 사슬의 가변 영역은 불변 영역에 연결되어 있고, 불변 영역은 막 관통 영역에 연결되어 있고, 막 관통 영역은 세포질 영역에 연결되어 있다. 특정 구현예로, 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 TCR 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 60%, 선택적으로 70, 80, 90, 또는 100% 동일하다. 특정 구현예로, 각TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온 자연발생 TCR 사슬의 상응하는 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%동일하다. 특정 구현예로, TCR α 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, TCR β 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 서열번호 16, 18 및 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 비가변 영역의 아미노산 서열은 림프구와 동일한 종으로부터 온 자연발생 TCR 사슬의 상응하는 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일하다. 특정 구현예로, TCR α 사슬의 비가변 영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예로, TCR β 사슬의 비가변 영역은 서열번호 15, 17 및 19로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함

한다.

[0044] 따라서, 특정 구현예로, 세포는 재조합 TCR을 세포 표면에 추가로 더 발현하며, 재조합 TCR은 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하고, 상기 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬은 각각 가변 영역 및 비가변 영역을 포함하고, 각 가변 영역은 불변 영역, 막 관통 영역 및 세포질 영역을 포함하며, 상기 각 사슬의 가변 영역은 불변 영역에 연결되어 있고, 불변 영역은 막 관통 영역에 연결되어 있고, 막 관통 영역은 세포질 영역에 연결되어 있다. 한 구현예로, 각TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온 상응하는 자연발생 TCR 사슬의 세포질 영역의 아미노산 서열과 적어도 60%, 선택적으로 70, 80, 90, 또는 100% 동일하다. 다른 구현예로, 각TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은, 림프구와 동일한 종으로부터 온 자연발생 TCR 사슬의 상응하는 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%동일한 것으로, 예를 들어, 상기 TCR α 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하거나, 및/또는 TCR β 사슬의 막 관통 영역 및 세포질 영역 모두의 아미노산 서열은 서열번호 16, 18 및 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예로, 각TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의 비가변 영역의 아미노산 서열은 림프구와 동일한 종으로부터 온 자연발생 TCR 사슬의 상응하는 비가변 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일한 것으로, 예를 들어, 상기 TCR α 사슬의 비가변 영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하거나, 및/또는 TCR β 사슬의 비가변 영역은 서열번호 15, 17 및 19로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0045] 특정 구현예로, 각 가변 영역의 아미노산 서열은 림프구와 상이한 종으로부터 온 TCR 사슬의 상응하는 가변 영역으로부터 유래한다. 한 구현예로, 림프구와 상이한 종으로부터의 TCR은 인간으로부터 온 것이다.

[0046] 특정 구현예로, 각 가변 영역의 아미노산 서열은 림프구와 상이한 종으로부터 온 TCR 사슬의 상응하는 가변 영역으로부터 유래한 것으로, 예를 들어, 상기 각 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬의, 가변 영역 및 불변 영역 모두는 림프구와 상이한 종으로부터 온 TCR 사슬의 상응하는 영역으로부터 유래한 것이다. 한 구현예로, 림프구와 상이한 종으로부터의 TCR은 인간으로부터 온 것이다.

[0047] 특정 구현예로, 재조합 TCR은 공동-자극(co-stimulatory) 시그널링 영역을 포함하는 융합 분자이다. 특정 구현예로, 공동 자극 시그널링 영역은 TCR α 사슬의 세포질 영역 또는 TCR β 사슬의 세포질 영역과 융합되어 있다. 특정 구현예로, 공동 자극 시그널링 영역은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, LFA-1(lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 공동 자극 분자의 시그널링 영역을 포함한다. 특정 구현예로, 공동 자극 시그널링 영역은 CD28의 시그널링 영역, 4-1BB의 시그널링 영역, 또는 이의 조합을 포함한다. 특정 구현예로, 융합 분자는 CD3ζ 시그널링 영역을 추가로 더 포함한다.

[0048] 그러므로, 특정 구현예로, 재조합 TCR은 공동 자극 시그널링 영역을 포함하는 융합 분자로, 예를 들어, 상기 공동 자극 시그널링 영역은 TCR α 사슬의 세포질 영역 또는 TCR β 사슬의 세포질 영역과 융합되어 있거나, 및/또는 상기 공동 자극 시그널링 영역은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, LFA-1(lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 공동 자극 분자의 시그널링 영역을 포함한다. 한 구현예로, 공동 자극 시그널링 영역은 CD28의 시그널링 영역, 4-1BB의 시그널링 영역, 또는 그의 조합을 포함하거나, 및/또는 융합 분자는 CD3ζ 시그널링 영역을 추가로 더 포함한다.

[0049] 특정 구현예로, 재조합 TCR의 발현은 (1) 적어도 하나의 항생제 선발 마커; (2) 적어도 하나의 스크리닝 마커; 또는 (3) 이들의 조합의 발현과 결합되어 있는 것으로, 예를 들어, 상기 적어도 하나의 스크리닝 마커는 형광 단백질 또는 세포 표면 마커이다.

[0050] 특정 구현예로, 재조합 TCR은 태아 흉선(fetal thymus), 제대혈(cord blood), 암 환자로부터 분리된 TILs(tumor infiltrating lymphocytes), 백신 접종된 대상(subject), 관심 항원(antigen of interest)에 노출된 대상, 건강한 대상 및 합성 라이브러리로 구성된 군으로부터 선택된 공급원(source)에서 유래한 것으로, 예를 들어, 상기 백신 접종된 대상은 HPV 백신, EBV 백신 또는 암 백신 접종된 인간이거나, 또는 백신 접종된 대상은 관심 항원으로 면역화된 인간 MHC(major histocompatibility complex)를 발현하는 트랜스제닉(transgenic) 마우스이거나, 및/또는 상기 백신 접종된 대상은 대상은 관심 항원으로 면역화된 HLA-A2를 발현하는 트랜스제닉 마우스이다.

[0051] 상기에서 설명한 본 발명의 특정 구현예로, 세포는 (1) 재조합 TCR α 사슬 및 재조합 TCR β 사슬, (2) 재조합 TCR α 사슬 및 다수의 상이한 재조합 TCR β 사슬, (3) 재조합 TCR β 사슬 및 다수의 상이한 재조합 TCR α 사슬, 또는 (4) 다수의 상이한 재조합 TCR α 사슬 및 다수의 상이한 재조합 TCR β 사슬을 발현하는 것이다.

[0052] 본원은 다른 양태로, 또한 본원에 개시된 세포 중 임의의 하나를 복수로 포함하는 세포 라이브러리를 제공한다. 특정 구현예로, 세포 라이브러리는 적어도 10^7, 10^8, 또는 10^9 의 TCR 다양성(diversity)을 갖는다. 본원은 다른 양태로, 본 발명의 세포 중 임의의 하나를 복수로 포함하는 세포 라이브러리에 관한 것으로, 상기 세포는 세포 TCR을 세포 표면에 추가로 더 발현한다. 본 발명의 세포에 대해 본원에 개시된 구현예는 또한 본 발명의 세포 라이브러리에 적용된다.

[0053] 본원은 다른 양태로, 또한 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에, TCR을 발현하는 세포를 분리하고, 분리된 세포의 TCR이 원하는 특성을 가졌다는 것을 확인하는 단계를 포함하는, 원하는 특성의 선별 과정에 본원에 개시한 임의의 하나의 세포 또는 세포 라이브러리를 노출시키는 것을 포함하는 원하는 특성을 가진 TCR을 분리 및 동정하는 방법을 제공한다. 상기 세포가 세포 표면에 세포 TCR을 추가로 더 발현하는 본 발명의 세포에 대해 본원에 개시된 구현예 및 세포 라이브러리에 대해 본원에 개시된 구현예는 또한 본 발명의 방법에도 적용된다.

[0054] 본원은 다른 양태로, 또한 (a) 개시된 세포들 중 어느 하나를 복수로 제공하는 단계, (b) 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조를 세포에 형질도입 또는 형질전환하는 단계, (c) 세포 표면에 TCR을 발현시키는 단계, (d) 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선별하는 단계, (e) 선별된 세포로부터 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 분리하는 단계, 및 (f) (e)단계에서 분리한, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 단계; 를 포함하는, 원하는 특성을 가진 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 세포에 대해 본원에 개시된 구현예는 또한 본 발명의 방법에도 적용된다. 바람직하게는, 방법은 인비트로(in vitro) 방법이다.

[0055] 본원은 다른 양태로, 또한 (a) 본원에 개시된 세포들 중 어느 하나를 복수로 제공하는 단계, (b) 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조를 세포에 형질도입 또는 형질전환하는 단계, (c) 세포 표면에 TCR을 발현시키는 단계, (d) 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선별하는 단계, (e) (d)단계에서 선별된 세포들 내의 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 활성을 조절하는 단계, (f) 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에, (e)단계에서 만들어진 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 추가로 선별하는 단계, (g) (f)단계에서 선별된 세포로부터 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 분리하는 단계, 및 (h) (g)단계에서 분리된, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 단계 ; 를 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 세포에 대해 본원에 개시된 구현예는 또한 본 발명의 방법에도 적용된다. 바람직하게는, 방법은 인비트로 방법이다.

[0056] 특정 구현예로, (d)단계는 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 표면 발현 존재 하에 수행되며, 또한 (e)단계는 상기 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 표면 발현 소거(abrogation)를 포함한다.

[0057] 특정 구현예로, (a)단계의 복수의 세포는 본원에 개시된 임의의 한 세포를 포함하며, (e)단계에서 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 세포 표면 발현은 제1 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 부위특이적 재조합 서열을 동족 부위특이적 재조합 효소와 접촉에 의해 소거된다. 특정 구현예로, 동족 부위특이적 재조합 효소는 유도성 프로모터의 조절 하에 세포에서 발현된다. 특정 구현예로, 동족 부위특이적 재조합 효소는 (e)단계 이전의 (d)단계에서 선별된 세포에 도입된다. 특정 구현예로, 동족 부위특이적 재조합 효소는 형질전환 또는 형질도입에 의해 (d)단계에서 선별된 세포에 도입되어 부위특이적 재조합 효소를 코딩하는 구조를 발현한다. 특정 구현예로, 동족 부위특이적 재조합 효소는 단백질로 도입된다. 특정 구현예로, 부위특이적 재조합 서열은 lox 부위이고 동족 부위특이적 재조합 효소는 Cre 재조합 효소이다. 특정 구현예로, 부위특이적 재조합 서열은 lox 부위이고, 동족 부위특이적 재조합 효소는 단백질 형질도입 도메인을 포함하는 Cre 재조합 효소 융합 단백질이다. 특정 구현예로, 단백질 형질도입 도메인은 HIV Tat이다. 따라서, 본 발명의 방법의 특정 구현예로, (d)단계는 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 표면 발현 존재 하에 수행되며, 또한 (e)단계는 상기 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 표면 발현 소거를 포함하는 것으로, 예를 들어, 상기 (a)단계의 복수의 세포는 본원에 개시된 임의의 한 세포를 포함하며, 상기 (e)단계에서 재조합 공동수용체 또는 그 사슬의 세포 표면 발현은 제1 및/또는 제2폴리뉴클레오티드의 부위특이적 재조합 서열을 동족 부위특이적 재조합 효소와 접촉에 의해 소거되거나, 및/또는 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 유도성 프로모터의 조절 하에 세포에서 발현된다. 또 다른 구현예로, 동족 부위특이

적 재조합효소는 e)단계 이전의 (d)단계에서 선별된 세포에 도입되며, 특히, 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 형질전환 또는 형질도입에 의해 (d)단계에서 선별된 세포에 도입되어 부위특이적 재조합 효소를 코딩하는 구조를 발현하거나, 또는 상기 동족 부위특이적 재조합 효소는 단백질로 도입된다. 특정 구현예로, 부위특이적 재조합 서열은 lox 부위이고 동족 부위특이적 재조합 효소는 Cre 재조합 효소로, 예를 들어, 상기 부위특이적 재조합 서열은 lox 부위이고 동족 부위특이적 재조합 효소는 단백질 형질도입 도메인을 포함하는 Cre 재조합 효소 융합 단백질로, 구체적으로 상기 단백질 형질도입 도메인은 HIV Tat이다.

[0058] 본원은 다른 양태로, 또한 (a) 본원에 개시된 세포들 중 어느 하나를 복수로 제공하는 단계, (b) 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조를 세포에 형질도입 또는 형질전환하는 단계, (c) 세포 표면에 TCR을 발현시키는 단계, (d) 관심 펩타이드와 복합체를 이룬 MHC 분자의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선별하는 단계로, 상기 MHC 분자는 야생형 MHC 분자의 변이체(variant)인 변이체 MHC 분자이고, 상기 변이체 MHC 분자는 공동수용체의 야생형 MHC 분자의 친화성과 비교하여 감소된 친화성으로 공동수용체에 결합하는 것인 단계, (e) (d)단계에서 선별된 세포로부터 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 분리하는 단계, 및 (f) (e)단계에서 분리된, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 단계 ; 를 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적어도 하나 동정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 세포에 대해 본원에 개시된 구현예는 또한 본 발명의 방법에도 적용된다. 바람직하게는, 방법은 인비트로(in vitro) 방법이다.

[0059] 상기 설명한 방법들 중 특정 구현예로, 공동수용체는 CD8이며 변이체 MHC 분자는 야생형 MHC class I α 사슬의 변이체인 α 사슬을 포함하는 MHC 클래스 I 변이체 분자인 것으로, 예를 들어, 상기 공동수용체는 인간 CD8이며 상기 MHC 클래스 I 변이체 분자는 야생형 HLA-A2 α 사슬의 변이체인 α 사슬을 포함하는 HLA-A2 변이체이거나, 및/또는 HLA-A2 변이체 α 사슬은, 성숙 단백질(mature protein) 서열에 따른 넘버링으로 A245V 돌연변이 또는 D227K/T228A 돌연변이를 포함하는 것이다.

[0060] 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 특정 구현예로, 원하는 특성은, 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 높은 선택성(selectivity), 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 높은 친화성 및 원하는 펩타이드-MHC 복합체 존재 하에서 양성 기능 판독 값의 증명(demonstration of a positive functional readout)으로 구성된 군으로부터 선택된 것이다. 특정 구현예로, 기능 판독값은 활성화 마커의 발현, 시그널링 경로의 유발, 사이토카인의 생성, 칼슘 플럭스, 증식, 및 리포터 시스템의 활성화로 구성된 군으로부터 선택된 것이다. 특정 구현예로, 활성화 마커는 CD69 또는 CD137이다. 특정 구현예로, 시그널링 경로는 NFAT 시그널링, IL-2 시그널링, 활성화 단백질-1 시그널링, 또는 NFκB/Rel 시그널링이다. 특정 구현예로, 사이토카인은 IL-2, TNF-α, 또는 IFN-γ이다. 특정 구현예로, 증식은 T세포의 증식이다. 특정 구현예로, 기능 판독값은 세포 내의 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템의 활성화다. 특정 구현예로, 리포터 시스템은 IL-2-EGFP 리포터 시스템이다. 그러므로, 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 특정 구현예로, 원하는 특성은, 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 높은 선택성(selectivity), 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 높은 친화성 및 원하는 펩타이드-MHC 복합체 존재 하에서 양성 기능 판독 값의 증명으로 구성된 군으로부터 선택된 것으로, 예를 들어, 상기 기능 판독값은 활성화 마커의 발현, 시그널링 경로의 유발, 사이토카인의 생성, 칼슘 플럭스, 증식, 및 리포터 시스템, 구체적으로 본 발명의 세포에 대해 상기 설명한 것과 같은 리포터 시스템의 활성화로 구성된 군으로부터 선택되며, 예를 들어, 상기 활성화 마커는 CD69 또는 CD137이다. 한 구현예로, 시그널링 경로는 NFAT 시그널링, IL-2 시그널링, 활성화 단백질-1 시그널링, 또는 NFκB/Rel 시그널링이다. 한 구현예로, 사이토카인은 IL-2, TNF-α, 또는 IFN-γ이다. 한 구현예로, 증식은 T세포의 증식이다. 한 구현예로, 기능 판독값은 세포 내의 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템의 활성화다. 한 구현예로, 리포터 시스템은 IL-2-EGFP 리포터 시스템이다.

[0061] 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 특정 구현예로, 복수의 발현 구조는 1) TCR α 사슬 및 TCR β 사슬, (2) TCR α 사슬 및 다수의 상이한 TCR β 사슬, (3) TCR β 사슬 및 다수의 상이한 TCR α 사슬, 또는 (4) 다수의 상이한 TCR α 사슬 및 다수의 상이한 TCR β 사슬을 코딩한다.

[0062] 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 특정 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 포함한다. 특정 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 무세포(cell free) 펩타이드-MHC 복합체이다. 특정 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 MHC 분자의 이량체(dimer), 4량체(tetramer), 또는 다량체(multimer)를 포함하는 것이다. 특정 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 세포 표면에 디스플레이(display)된다. 상기 설명한 본 발명의 방법들 중 어느 하나의 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 세포 표면에 표시(display)되며, 예를 들어, 상기 세포는 포유류 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포거나, 또는 세포는 T2 세포 또는 항원 제시(antigen presenting) 세포이다. 특정 구현예로, 세포는 포유류 세포, 효모 세포, 또는

곤충 세포이다. 특정 구현예로, 세포는 T2 세포 또는 항원 제시 세포이다. 그러므로, 상기 설명한 본 발명의 방법들 중 어느 하나의 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 포함하거나, 및/또는 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 무세포 펩타이드-MHC 복합체로, 특히 상기 원하는 펩타이드-MHC 복합체는 MHC 분자의 이량체(dimer), 4량체(tetramer), 또는 다량체(multimer)를 포함하는 것이다.

[0063] 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 특정 구현예로, 펩타이드는 인산펩타이드(phosphopeptide) 또는 인산펩타이드 모조체(phosphopeptide mimetic)이다.

[0064] 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 구현예로, (b)단계에서, 복수의 TCR을 코딩하는 복수의 발현 구조체는 PVC-211 뮤린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus)를 포함하는 레트로바이러스성 벡터 입자를 사용하여 세포에 형질도입되며, 상기 레트로바이러스성 벡터 입자는 TCR α 사슬 또는 TCR β 사슬을 코딩하는 레트로바이러스성 발현 구조체를 포함하는 것이다.

[0065] 상기 설명한 방법들 중 어느 하나의 특정 구현예로, 각각의 TCR은 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 포함하며, 상기 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬은 별개의 발현 구조체에 의해 코딩된다.

도면의 간단한 설명

[0066] **도면의 간단한 설명**

도 1은 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ chiC58αβ+ 세포와 항-CD3 및 항-CD28 항체를 밤새 공동 인큐베이션한 후 ELISA에 의해 측정된 배양 상청액의 상대적인 IL-2 수준을 나타내는 막대 그래프이다. y축은 광학 밀도(OD, Optical density) 신호를 나타낸다.

도 2A는 PE-라벨링된 HLA-A*0201 Mart-1 4량체 및 APC-라벨링된 항- TCR β 사슬의 항체를 키메릭 DMF4를 발현하는 AK-D10세포(AK-D10 chiDMF4) 및 키메릭 DMF5를 발현하는 AK-D10세포(AK-D10 chiDMF5)에서 공동 염색한 유세포 분석 도면이다. 4량체+ TCR+ 세포의 비율은 각 도면에 표시되어 있다. 가장 오른쪽 도면은 AK-D10 chiDMF4 세포 및 AK-D10 chiDMF5를 겹쳐서 나타낸(overlay) 것이다. 도 2B 및 2C는 AK-D10 chiDMF4 세포(도 2B) 또는 AK-D10 chiDMF5 세포(도 2C)와 Mart-1 펩타이드 ELAGIGILTV(서열번호 30)를 로딩한 DimerX(DimerX/Mart-1) 또는 아무 펩타이드도 가지고 있지 않은 DimerX 자체(DimerX)를 표시된 농도에서 밤새 인큐베이션한 후 ELISA에 의해 측정된 상대적인 IL-2 생성량을 나타낸 막대 그래프이다. y축은 광학 밀도 신호를 나타낸다. 도 2D 및 2E는 각각 아무 것도 로딩하지 않은 DimerX (회색 막대) 또는 (AK-D10 chiDMF4 및 AK-D10 chiDMF5에서) Mart-1 펩타이드 ELAGIGILTV(서열번호 30) 또는 (AK-D10 chiC58에서) NY-ESO-1 펩타이드 SLLMWITQV (서열번호 31)를 로딩한 DimerX (검은색 막대) 와 밤새 인큐베이션한 뒤 키메릭 TCR을 발현하는 AK-D10 세포의 IL-2 및 TNFα의 세포 내 염색 결과를 나타내는 막대 그래프이다. y축은 TCR+ IL-2+ (도 2D) 또는 TCR+ TNFα+ (도 2E) 세포의 비율을 나타낸다.

도 3 은 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포 표면의 키메릭 CD8의 발현 및 이어서 Cre 재조합 효소로 형질도입하여 세포 표면으로부터 키메릭 CD8을 제거하였음을 나타내는 유세포 분석 도면이다. chiCD8α+ chiCD8β+ 세포의 비율은 각 도면에 표시되어 있다.

도 4A, 4B, 및 4C는 키메릭 DMF4(chiDMF4) 또는 DMF5 (chiDMF5)를 발현하는 BB8 세포(MTCD8 mCD8αβ- chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+)에 HLA-A*02:01 Mart-1 4량체의 결합을 테스트하여 분석한 결과이다.

도 4A 및 4B는 키메릭 DMF4를 발현하는 BB8 세포들이 Cre 재조합 효소를 발현하도록 형질도입되었거나(아래) 형질도입되지 않은 경우(위)를 나타내는 유세포 분석 도면이다. X 및 Y축의 파라미터는 도면에 표시되어 있다. 도 4C는 키메릭 DMF4 또는 DMF5를 발현하는 BB8 세포에 HLA-A*02:01 Mart-1 4량체의 결합을 막대 그래프로 나타낸 것이다. 세포는 Cre 재조합 효소를 발현하도록 형질도입되었거나("CD8-" 로 표시함) 또는 형질도입되지 않았다("CD8+" 로 표시함). y축은 4량체 결합을 MFI(median fluorescence intensity)로 측정하여 유세포 분석으로 측정한 것을 나타낸다.

도 5는 항-CD3 항체(왼쪽) 또는 항-CD3 및 항-CD28 항체(오른쪽)로 인큐베이션한 후 AK-D10 세포("chiC58- "로 표시함), 또는 리포터 구조체 및 키메릭 TCR C58("chiC58+" 로 표시함)를 모두 발현하는 AK-D10 세포로부터 생성된 배양 상청액의 상대적인 IL-2 수준을 ELISA로 측정하여 나타낸 막대그래프이다. y축은 광학 밀도 신호를 나타낸다.

도 6A, 6B 및 6C는 EGFP 발현을 나타내는 유세포 분석 도면이다. 테스트된 세포들은 항-CD3 항체의 존재(도 6A)

또는 부존재(도 6A) 하에 인큐베이션한 IL-2 리포터 구조체 및 키메릭 TCR DMF4를 발현하는 AK-D10 세포(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF4+), 또는 항-CD3 항체로 인큐베이션한 IL-2 리포터 구조체만을 발현하는 AK-D10 세포(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+) (도 6C)이다. EGFP 양성 세포의 비율은 각 도면에 표시되어 있다.

도 7A, 7B, 및 7C는 IL-2 리포터 구조체 및 키메릭 TCR C259 (AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiC259+)를 발현하는 AK-D10 세포를 NY-ESO-1 펩타이드 SLLMWITQV (서열번호 31)로 펄스한 T2 세포와 인큐베이션하거나 (도 7A) 펄스되지 않은 T2 세포와 인큐베이션하거나 (도 7B), 또는 T2 세포 부존재 하에 인큐베이션(도 7C) 하고 TCR 및 EGFP 발현을 유세포 분석법으로 측정한 유세포 분석 도면이다. TCR^{high} EGFP+ 세포의 비율은 각 도면의 오른쪽 위 패널에 표시되어 있다. TCR^{low} EGFP+ 세포의 비율은 각 도면의 오른쪽 아래 패널에 표시되어 있다.

도 8은 리포터 구조체인 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP 및 키메릭 TCR C58(“chiC58” 로 표시함) 또는 C259(“chiC259” 로 표시함)를 발현하는 AK-D10 세포를 NY-ESO-1 펩타이드 SLLMWITQV (서열번호 31)로 펄스된 T2 세포와 공동 배양하거나, 펄스되지 않은 T2 세포로 공동 배양하고, TCR, EGFP, CD69 및 CD137의 발현을 분석하여 유세포 분석법으로 분석한 결과를 막대 그래프로 나타낸 것이다. TCR+ EGFP+ 세포, TCR+ CD69+ 세포, 또는 TCR+ CD137+ 세포의 비율을 나타내었다.

도 9A 및 9B는 리포터 구조체인 IL-2-(NFAT)3-EGFP 및 키메릭 TCR DMF4 (“chiDMF4” 로 표시함, 도 9A) 또는 DMF5(“chiDMF5” 로 표시함, 도 9B)를 발현하는 AK-D10 세포를 다양한 농도의 Mart-1 펩타이드 ELAGIGILTV (서열번호 30)로 펄스된 T2 세포와 공동 배양한 후 TCR 및 EGFP 발현을 유세포 분석법으로 측정하여 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. TCR+ EGFP+ 세포의 비율을 Mart-1 펩타이드의 농도에 대하여 플롯(plot)하였다.

도 10A 및 10B는 Cre 재조합 효소를 발현하도록 형질도입하거나(도 10A에 "chiDMF4 Cre" 및 도 10B에 "chiDMF5 Cre"로 표시함) 또는 형질도입하지 않은(도 10A에 "chiDMF4" 및 도 10B에 "chiDMF5"로 표시함) 키메릭 TCR DMF4 또는 DMF5를 발현하는 BB8 세포를 분석한 그래프이다. 세포들은 이어서 50 ㎍/ml, 5 ㎍/ml, 또는 0.5 ㎍/ml의 Mart-1 펩타이드 ELAGIGILTV(서열번호30) 로 펄스된 T2 세포와 공동 배양되었고, TCR, CD8 및 EGFP 발현을 유세포 분석을 이용하여 측정하였다. TCR+ EGFP+ 세포의 비율은 활성화 길이에 대하여 플롯되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] **상세한 설명**

[0068] 본원에는 면역 치료 활용의 항원-반응성 치료용 TCR의 빠른 동정 및 분리를 가능하게 하는 고도로 다양화된 T 세포 수용체(TCR) 세포 라이브러리의 생성 및 스크리닝 방법이 개시되어 있다.

[0069] 본 발명의 바람직한 구현예로, 본 발명에 따른 세포는 인간 배아 세포(human embryonic cell)가 아니다.

[0070] 본원에 기재된 "분리된 세포" 의 모든 경우는 분리될 수 있으나, 반드시 분리될 필요는 없는 세포도 추가로 고려된다. 본원에 기재된 "분리된 폴리뉴클레오티드"의 모든 경우는 분리될 수 있으나, 반드시 분리될 필요는 없는 폴리뉴클레오티드도 추가로 고려된다. 본원에 기재된 "세포"의 모든 경우는 분리될 수 있으나, 반드시 분리될 필요는 없는 세포도 추가로 고려된다. 본원에 기재된 "폴리뉴클레오티드"의 모든 경우는 분리될 수 있으나, 반드시 분리될 필요는 없는 폴리뉴클레오티드도 추가로 고려된다.

[0071] I. 정의

[0072] 본원에서 다르게 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 과학적 및 기술적 용어들은 당업계의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 잠재적인 모호성이 있는 경우, 본원에서 제공하는 정의가 사전 또는 외부 정의보다 우선시된다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함하고 복수형 용어는 단수형을 포함한다. 달리 기술되지 않는 한, “또는” 의 사용은 “및/또는” 을 의미한다. “포함한” 및 “포함되는” 과 같은 다른 형태뿐 아니라 “포함하는” 이라는 용어의 사용은 제한하는 것이 아니다.

[0073] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 “하나(a)”, “하나(an)” 및 “그(the)” 는 문맥상 명백하게 다르게 지시하지 않는 한, 복수 기준을 포함한다는 것을 유의해야 한다.

[0074] "약" 또는 "대략" 이라는 용어는 10% 이내를 의미하며, 보다 바람직하게는 주어진 값 또는 범위의 5% (또는 1% 또는 그것보다 적은) 이내를 의미한다.

[0075] 본원에서 사용된 용어 "분리된 세포" 는 그것의 인비보(in-vivo)위치로부터 제거된 세포를 말한다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 “T 세포 수용체” 및 “TCR”은 상호 교환적으로 사용되며, 완전한 길이의(full length) 이형이량체(heterodimeric) αβ 또는 γδ TCR, TCR의 항원-결합 단편(fragment) 및 TCR CDR 또는 가변 영역을 포함하는 분자를 말한다. TCR의 예는 완전한 길이의 TCR, TCR의 항원 결합 단편, 막 관통 및 세포질 영역이 없는 가용성(soluble) TCR, 플렉서블 링커(flexible linker)에 붙은 TCR의 가변 영역을 포함하는 단일-사슬 TCR, 조작된 다이설파이드(disulfide) 결합에 연결된 TCR 사슬, 단일 특이성(monospecific) TCR, 인간화된(humanized) TCR, 키메릭(chimeric) TCR, 재조합으로 만들어진 TCR, 및 합성 TCR을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 본 용어는 야생형 TCR 및 유전적으로 조작된 TCR(예를 들어, 제 1종(species)으로부터 유래한 TCR의 제1 부분 및 제2 종으로부터의 유래한 TCR의 제2 부분을 포함하는 키메릭 TCR 사슬)을 포함한다.

[0077] 본원에서 사용된 용어 “TCR 가변 영역(variable region)”은 TCR α 사슬의 TRAC 유전자 및 TCR β 사슬의 TRBC1 또는 TRBC2 유전자에 의해 코딩되는 비가변 영역(non-variable region)에 포함되지 않는 주어진 TCR의 아미노산 부분을 포함하는 것으로 이해된다. 몇몇 구현예로 TCR 가변 영역은, TCR α 사슬의 TRAV 유전자 또는 TRAJ 유전자, 또는 TCR β 사슬의 TRBD 유전자 또는 TRBJ 유전자에 의해 코딩되는, 주어진 TCR의 모든 아미노산을 포함한다.(예를 들어, T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8을 참고하라. 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.)

[0078] 본원에서 사용된 TCR에 관한 용어 “불변 영역(constant region)” 은 TCR α 사슬의 TRAC 유전자 및 TCR β의 TRBC1 또는 TRBC2 유전자에 의해 코딩되는 세포외 부분을 포함한다. 불변 영역이라는 용어는 TCR α 사슬의 TRAV 유전자 또는 TRAJ 유전자, 또는 TCR β 사슬의 TRBD 유전자 또는 TRBJ 유전자에 의해 코딩되는 TCR 가변 영역을 포함하지 않는다(예를 들어, T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8을 참고하라. 본 원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.)

[0079] 본원에서 사용된 용어 "재조합" 분자는, 그것이 발현된 세포에서는 자연적으로 존재하지 않는 분자를 말한다. 특정 구현예로, 재조합 분자, 예를 들어 공동수용체(co-receptor) 또는 이의 사슬은, 그것이 발현되는 세포와 상이한 종으로부터 온 것이다.

[0080] 본원에서 사용된 용어 "내인성(endogenous)" 분자는 그것이 발현된 세포에 자연적으로 존재하는 분자를 말한다.

[0081] 본원에서 사용된 용어 "공동 자극 시그널링 영역(co-stimulatory signaling region)" 은, 세포내 시그널링 이벤트를 담당하는 공동 자극 분자의 세포내 부분을 말한다.

[0082] 본원에서 사용된 재조합 단백질에 관한 용어 “세포외(extracellular)” 는 세포 바깥에 위치한 재조합 막 관통 단백질의 일부분 또는 부분들을 말한다.

[0083] 본원에서 사용된 재조합 단백질에 관한 용어 “막 관통(transmembrane)” 은 세포의 원형질막(plasma membrane)에 박힌(embedded) 재조합 단백질의 막 관통 일부분 또는 부분들을 말한다.

[0084] 본원에서 사용된 재조합 단백질에 관한 용어 “세포질(의)(cytoplasmic)” 는 세포의 세포질에 위치한 재조합 단백질의 일부분 또는 부분들을 말한다.

[0085] 본원에서 사용된 재조합 단백질에 관한 용어 “키메릭” 단백질은, 제1 재조합 단백질의 제1 영역이 선택적으로 펩타이드 링커와 함께 제2 재조합 단백질의 제2 영역과 인프레임으로 융합된 것을 말한다. 한 구현예로, 제1 및 제2 재조합 단백질은 동일한 종으로부터 온 것이고, 제1 영역은 제2영역과 상이한 것이다. 다른 구현예로, 제1 및 제2 재조합 단백질은 상이한 종으로부터 온 것이다.

[0086] 본원에서 사용된 용어 “CD3” 은 “분화 클러스터 3(cluster of differentiation 3)”, 또는 이의 기능적인 부분을 말한다. CD3의 예시는 CD3ε/CD3γ, CD3ε/CD3δ, 및 CD3ζ/CD3ζ.과 같은 3개의 이량체를 형성하는 여섯 폴리펩타이드를 포함하는 복합체를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0087] 본원에서 사용된 용어 “CD8”은 TCR의 공동수용체인 “분화 클러스터 8(cluster of differentiation 8)”, 또는 이의 기능적인 부분을 말한다. CD8의 예시는 CD8α/CD8β 이형이량체, CD8α/CD8α 동형이량체(homodimer) 및 CD8β/CD8β 동형이량체를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 본 용어는 야생형 CD8 및 유전적으로 조작된 CD8(예를 들어, 제1 종의 CD8로부터 온 제1 부분 및 제2종의 CD8로부터 온 제2 부분을 포함하는 키메릭 CD8 사슬을 포함하는 키메릭 CD8)을 포함한다.

[0088] 본원에서 사용된 용어 “CD4” 는 TCR의 공동수용체인 “분화 클러스터 4(cluster of differentiation 4)”,

또는 이의 기능적인 부분을 말한다. 본 용어는 야생형 CD4 및 유전적으로 조작된 CD4(예를 들어, 제1종의 CD4로부터 온 제1부분 및 제2종의 CD4로부터 온 제2부분을 포함하는 키메릭 CD4)를 포함한다.

[0089] 본원에서 사용된 용어 "공동수용체" 는 TCR과 함께 펩타이드-MHC 복합체에 결합하여 T 세포 활성화를 강력하게 하는 세포 표면 분자를 말한다. 공동수용체의 예시는, CD4 및 CD8을 포함하며, 이에 한정되지는 않는다.

[0090] 본원에서 사용된 용어 " IRES(internal ribosomal entry site) 요소"는 mRNA의 5′ 말단에 있을 필요가 없는 리보솜에 결합할 수 있는 구조를 말한다. 그러므로 이것은 리보솜을 mRNA 내의 두 번째 개시 코돈에서 바로 번역(translation)을 시작하도록 지시하여, 하나 이상의 폴리펩타이드가 하나의 mRNA에서 생성되는 것을 가능하게 할 수 있다. IRES요소의 예시는 폴리오바이러스(poliovirus), 라이노바이러스(rhinovirus), 뇌 심근염 바이러스(encephalomyocarditis virus), 구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus), A형 및 C형 간염(hepatitis) 바이러스(예를 들어, Mokrejs *et al.* (2006) Nucleic Acids Res. 34 (Database issue): D125-30를 참고하라. 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.)에서 분리된 IRES 요소를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0091] 본원에서 사용된 용어 "TCR 관여(TCR engagement)"는 TCR이 이의 리간드에 결합하는 것을 말한다. 특정 구현예로, 리간드는 펩타이드-MHC 복합체이다.

[0092] 본원에서 사용된 용어 "주요 조직 적합 유전자 복합체(major histocompatibility complex)" 및 "MHC"는 상호 교환적으로 사용되며 MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자를 말한다.

[0093] 본원에서 사용된 용어 "MHC 클래스 I" 는 MHC 클래스 I α 사슬 및 β2-마이크로글로불린(microglobulin)사슬의 이량체를 말하며, 용어 "MHC 클래스 II"는 MHC 클래스 II α 사슬 및 MHC 클래스 II β 사슬의 이량체를 말한다.

[0094] 본원에서 사용된 용어 "가용성(soluble) MHC"는 막 관통 및 세포질 영역이 없는 MHC 분자를 말한다.

[0095] 본원에서 사용된 용어 "펩타이드-MHC 복합체"는 당 업계에서 인지된 MHC의 펩타이드 결합 포켓에 결합된 펩타이드와 결합한 MHC 분자(MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II)를 말한다.

[0096] 본원에서 사용된 용어 "DO-11.10.7 58 α-β- 세포" 및 "58-/-세포"는 상호 교환적으로 사용되며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는Letourneur and Malissen Eur J Immunol. 1989; 19(12):2269-74에 설명된 마우스 T 세포 하이브리도마(hybridoma) 세포주를 말한다.

[0097] 본원에서 사용된 용어 "T2 세포"는 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Salter RD, *et al.* Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. Immunogenetics 21: 235-246, 1985에 설명된 인간 림프종 세포주를 말한다.

[0098] 본원에서 사용된 용어 "Bw5147 세포"는 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Ralph P. Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and theta^{+}-lymphomas: sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin. J. Immunol. 110: 1470-1475에 설명된 마우스 T 림프구 세포주를 말한다.

[0099] 본원에서 사용된 용어 "부위특이적(site-specific) 재조합"은 동족 부위특이적 재조합 효소(cognate site-specific recombinase)에 의해 단일 핵산 분자상의 두 가지 호환가능한(compatible) 서열 특이적 재조합 부위 사이에서 수행되는 재조합 이벤트를 말한다. 한 쌍의 부위특이적 재조합 부위는 그 쌍의 구성요소가 동족 부위특이적 재조합 효소에 의해 부위특이적 재조합 부위 간의 재조합을 지시할 수 있다면 "호환 가능"하다고 한다. 한 구현예로, 재조합 이벤트는 부위특이적 재조합 부위 사이에 오는 뉴클레오타이드 서열의 절단을 초래한다. 호환가능한 부위특이적 재조합 부위는 부위특이적 재조합 부위의 어느 한 쌍이 호환가능한 부위특이적 재조합 부위의 다른 쌍과 재조합할 수 없다면 "교차 반응하지 않는(non-cross-reactive)"다고 한다.

[0100] 본원에서 사용된 용어 "부위특이적 재조합 효소"는 부위특이적 재조합을 매개하는 효소를 말한다. 부위특이적 재조합 효소의 예시는 Cre 재조합 효소 및 FLP 재조합 효소를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. "동족(cognate)" 부위특이적 재조합 효소는 한 쌍의 호환가능한 서열 특이적 재조합 부위의 재조합을 인식하고 실시할 수 있는 재조합 효소를 말한다. 예를 들어, 박테리오파지 P1 Cre 재조합 효소는 lox 재조합 부위를 인식하는 반면 효모 FLP 재조합 효소는 FRT 재조합 부위를 인식한다.

[0101] 본원에서 사용된 용어 "Cre 재조합효소"는 박테리오파지 P1(Hamilton, D. L., et al., J. Mol. Biol. 178:481-486 (1984), 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)의 Cre 단백질의 부위특이적 재조합효소 활성

을 매개할 수 있는 단백질을 말한다. 박테리오파지 P1의 Cre 단백질은 “loxP” 서열로 알려진 특수 재조합 서열 간의 부위특이적 재조합을 매개한다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Hoess et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3398-3402 (1982) and Sauer, B. L., 미국특허 제 4,959,317호를 참고하라. 본 용어는 2개의 호환가능한 lox 부위간의 재조합을 수행하는 능력을 보유한 자연발생하는 Cre 재조합효소의 임의의 유도체를 포함한다.

[0102] 재조합 산물은 lox 부위의 위치 및 상대적 배향에 의존한다. 동일 배향을 갖는 2개의 lox 부위가 동일한 DNA 분자 내에 존재할 때, 2개의 lox 서열에 인접한 DNA 서열은 Cre 재조합효소에 의해 절단되어 원형 분자를 형성한다(절단 반응). 거꾸로, 2개의 lox 서열이 상이한 DNA 분자에 존재하고, 그 중 하나는 원형 DNA일 때, 원형 DNA는 lox 서열을 통해 다른 DNA 분자에 삽입된다(삽입 반응). 다른 구현예로, Cre 재조합효소는 최적화된 Cre 재조합 효소일 수 있다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 International Patent Application Publication No. WO 2014158593를 참고하라. 한 구현예로, Tat-Cre 재조합효소는 핵 편재 신호(nuclear localization signal)를 포함한다.

[0103] 본원에서 사용된 용어 "FLP 재조합효소"는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) FLP의 부위특이적 재조합효소 활성을 갖는 단백질을 말한다. 효모 2 μ DNA가 코딩하는 FLP 단백질은 한 쌍의 호환가능한 FRT 재조합 부위 간의 부위특이적 재조합을 매개한다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Babineau et al., J. Biol. Chem., 260, 12313-12319 (1985)를 참고하라. 본 용어는 2개의 호환가능한 FRT부위 간의 재조합을 수행하는 능력을 보유한 자연발생하는 FLP 재조합 효소의 임의의 유도체를 포함한다. 재조합 산물은 FRT 부위의 위치 및 상대적 배향에 의존한다. 동일 배향을 갖는 2개의 FRT 부위가 동일한 DNA 내에 존재할 때, 2개의 FRT 서열에 인접한 DNA 서열은 FLP 재조합효소에 의해 절단되어 원형 분자를 형성한다(절단 반응). 거꾸로, 2개의 FRT 서열이 상이한 DNA 분자에 존재하고, 그 중 하나는 원형 DNA일 때, 원형 DNA는 FRT 서열을 통해 다른 DNA 분자에 삽입된다(삽입 반응). 한 구현예로, FLP 재조합효소는 최적화된 FLP 재조합효소일 수 있다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 미국특허출원 제 2010/0050279호를 참고하라.

[0104] 한 구현예로, "부위특이적 재조합효소"라는 용어는 호환가능한 FRT 또는 lox 재조합 부위의 쌍을 재조합할 수 있는 Cre:FLP 융합 단백질을 말한다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Djukanovic *et al.* Plant Biotechnol J. 2008 Oct;6(8):770-81를 참고하라.

[0105] 본원에서 사용된 용어 “단백질 형질도입 도메인을 포함하는 재조합 융합 단백질”은 부위특이적 DNA 재조합효소 도메인을 포함하는 융합 단백질(Cre 또는 FLP와 같은), 단백질 형질도입 도메인(예를 들어, TAT, VP22, FGP 또는 Antp에서 유래한), 및 핵 편재 도메인을 말한다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 국제특허출원 WO 2003076561호를 참고하라. 한 구현예로, 재조합효소 융합 단백질은 HIV Tat 단백질의 기본 막 전좌 (translocation) 펩타이드와 융합한 Cre DNA 재조합효소 도메인, 또는 이의 세포 관통 단편을 포함하는 “TAT-Cre” 융합 단백질이다. 재조합 TAT-Cre 단백질은, 예를 들어, Excellgen (Cat. No.: EG-1001) 또는 EMD-Millipore (Cat. No.: SCR508)로부터 상업적으로 이용 가능하다.

[0106] 본원에서 사용된 용어 "lox 부위"는 업계에서 인식된 임의의 *lox* 재조합 부위, 또는 이의 변이체를 말하며, 이는 박테리오파지 P1의 loxP 부위의 34 bp(base pair) 뿐만 아니라 다양한 lox 부위 변이체를 포함하고, 여기에는 Lox 511, Lox 5171, Lox 2272, M2, M3, M7, M11, Lox71 및 Lox66(Missirlis *et al.* BMC Genomics 7: 73. 1471-2164, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)가 포함되나, 이에 한정되지는 않는다. 교차 반응하지 않는 호환가능한 돌연변이 lox 부위 쌍의 예시가 미국특허 제7,696,335호, 제 7,060,499호 및 7,696,335에 개시되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.

[0107] 본원에서 사용된 용어 "FRT 부위"는 업계에서 인식된 임의의 효모 FRT 재조합 부위, 또는 이의 변이체를 말하며, 이는 2개의 역전 반복(inverted repeats)된 13bp에 8bp의 스페이서 영역이 인접한 FRT 부위의 34bp를 포함한다. 예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Jayaram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 5875-5879 (1985); Umlauf S. W. *et al.*, EMBO Journal, 7, 1845-1852 (1988); Lee J. *et al.*, EMBO Journal, 18, 784-791, 1999 를 참고하라. 교차 반응하지 않는 호환가능한 돌연변이 FRT 부위 쌍의 예시가 미국특허 제 7,476,539 호 및 제 7,736,897호에 개시되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.

[0108] 본원에서 사용된 용어 "형질도입" 및 "형질도입된" 것은 숙주 세포 게놈에 레트로바이러스를 이용하여 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 말한다.

[0109] 본원에서 사용된 용어 "안정적으로 발현하는" 은 숙주 세포 게놈에 도입된 폴리뉴클레오타이드로부터 유전자가

발현하는 것을 말한다.

[0110] 본원에서 사용된 용어 “프로모터”는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 단백질 코딩 서열, 에 작동 가능하게 연결된 DNA의 조절 영역을 말한다. 프로모터는 전사 인자로 알려진 단백질에 의해 인식되는 특정 DNA 서열 및 반응 요소(response elements)를 포함한다. 이 인자들은 프로모터에 결합하고 RNA 폴리머라아제(polymerase) II를 소집(recruit)하여 다운스트림(downstream)의 뉴클레오티드 서열의 전사가 일어나도록 한다. 이어서, 단백질 코딩 서열을 포함하는 전사된 mRNA를 번역하여 발현된 단백질을 생산한다.

[0111] 본원에서 사용된 용어 "작동 가능한 연결"은 숙주 세포에서 단백질 코딩 영역의 전사를 가능하게 하는 프로모터 서열과 단백질 코딩 영역 사이의 배열을 말한다.

[0112] 본원에서 사용된 용어 “조절 가능한”은 단백질 코딩 영역의 전사가 음성적인(negative) 방법, 또는 “하향 조정(down-regulated)”, 또는 양성적인(positive) 방법, 또는 “상향 조정(up-regulated)”된 방식으로 활성화될 수 있다는 것을 의미한다. 한 구현예로, 단백질 코딩 서열의 발현은 유도성 프로모터에 의해 조절될 수 있다. 다른 구현예로, 단백질 코딩 서열의 표면 발현은 단백질 코딩 서열의 일부가 절단된 후 부위특이적 재조합에 의해 하향조정될 수 있다.

[0113] 본원에서 사용된 “돌연변이 유발(mutagenizing) 조건”은 세포에서 폴리뉴클레오티드의 유전적 변형을 야기하는 조건을 말한다. 제한 없는 돌연변이 유발 조건은 AID(activation-induced (cytidine) deaminase) 유전자를 발현하도록 조작된 세포를 포함한다.

[0114] 본원에서 사용된 용어 "특이적으로 결합하는"은 TCR이 항원(예를 들어, 펩타이드-MHC 복합체)에 결합하는 능력을 말하며 이러한 결합은 당 업계의 통상의 기술자가 이해할 수 있는 것이다. 예를 들어, 어떤 항원에 특이적으로 결합하는 TCR은 일반적으로 더 낮은 친화성으로 다른 항원에도 결합할 수 있으며, 예를 들면 면역 분석법(immunoassays), BIAcore® 및 다른 당업계에 알려진 어세이를 통해 이를 측정할 수 있다. 특정 구현예로, 어떤 항원에 특이적으로 결합하는 TCR은 그 TCR이 다른 항원에 결합할 때의 결합 상수(K_a)보다 적어도 2배, 5배, 10배, 50배, 100배, 500배, 1000배, 5000배, 또는 10000배 더 큰 결합 상수로 항원에 결합한다.

[0115] 본원에서 사용된 용어 "고도의 친화성"은 적어도 10^4 M^{-1}, 예를 들어, 적어도10^5 M^{-1}, 적어도 10^6 M^{-1}, 적어도 10^7 M^{-1}, 적어도 10^8 M^{-1}, 적어도 10^9 M^{-1}, 적어도 10^{10} M^{-1}, 적어도 10^{11} M^{-1}, 또는 적어도 10^{12} M^{-1}의 결합 상수(K_a)로 항원(예를 들어, 펩타이드-MHC 복합체)에 결합하는 TCR의 능력을 말한다.

[0116] 본원에서 사용된 용어 "높은 선택성"은 TCR이 다른 항원(예를 들어, 펩타이드-MHC 복합체)에 결합할 때의 Ka보다 적어도 5배, 10배, 100배, 500배, 1000배, 5000배, 또는 10000배 더 큰 결합 상수(K_a)로 원하는 항원(예를 들어, 원하는 펩타이드-MHC 복합체)에 결합하는 TCR의 능력을 말한다.

[0117] 본원에서 사용된 용어 “모조체(mimetic)”는 다른 분자의 활성 또는 활동과 생물학적인 활성 또는 활동을 모방하는 분자를 말한다. 모조체 분자의 예는 인산 모조체(phosphomimetic) 분자로 인산화된 분자의 활성 또는 활동을 모방한다. 따라서 인산펩타이드 모조체는, 인산화된 펩타이드의 활동 또는 활성을, 예를 들어, 인산화된 펩타이드의 인산화된 아미노산 잔기를 인산 모조체 잔기로 대체함으로써 모방한 펩타이드이다. 인산 모조체군 또는 잔기의 예시로 O-보레이노포스포(O-boranophospho), 보로노(borono), O-다이싸이오포스포(O-dithiophospho), 포스포르아마이드(phosphoramide), H-포스포네이트(H-phosphonate), 알킬포스포네이트(alkylphosphonate), 포스포로싸이올레이트(phosphorothiolate), 포스포다이싸이올레이트(phosphodithiolate) 및 포스포로플루오리데이트(phosphorofluoridate) 가 있으며, 이 중 임의의 것은 Tyr, Thr, Ser, Arg, Lys, 또는 His 잔기에서 유래할 수 있다. 특정 구현예로, Asp 또는 Glu 잔기는 인산 모조체로 사용될 수 있다. Asp 또는 Glu 잔기는 펩타이드에서 인산-Tyr(phosphor-Tyr), 인산-Thr, 인산-Ser, 인산-Arg, 인산-Lys 및/또는 인산-His 잔기를 대체할 수 있다.

[0118] 본원에서 사용된, 당업계에서 인식된 방법, 예를 들어 RT-PCR 또는 유세포 분석법을 사용하여 내인성 TCR의 발현을 검출할 수 없는 세포는 내인성 TCR을 "발현하지 않는" 세포이다. 본원에서 사용된, 당업계에서 인식된 방법, 예를 들어 RT-PCR 또는 유세포 분석법을 사용하여 내인성 CD4 또는 CD8의 수준을 검출할 수 없는 세포는 내인성 CD4 또는 CD8을 "발현하지 않는" 세포이다.

[0119] 본원에서 사용된, 단백질의 표면 발현이 “소거된(abrogated)” 것은 이전에 세포 표면에 단백질을 발현한 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 세포가 더 이상 세포 표면에

단백질을 발현하지 못하거나, 및/또는 주어진 세포에서 단백질의 표면 발현 수준이 적어도85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 감소한 것을 말한다.

[0120] 본원에서 사용된 용어인 TCR 세포 라이브러리의 "TCR 다양성(diversity)" 이란 TCR α 사슬 아미노산 서열과 TCR β 사슬 아미노산 서열의 별개의 조합을 포함하는, 세포 표면에서 발현되는 TCR의 수를 말한다.

[0121] 하기에서, 본 발명의 세포, 세포 라이브러리 및/또는 방법의 바람직한 구현예를 제공한다.

[0122] Ⅱ.TCR 디스플레이에 적합한 숙주 세포주의 제조

[0123] *1) TCR 유전자 라이브러리 발현 및 세포 표면 디스플레이를 위한 숙주세포주의 선별*

[0124] 본원에 개시된 TCR 디스플레이 기술은 숙주 세포 표면의 기능성 T 세포 수용체의 발현 및 적절한 조립(assembly)를 위해 적합한 환경을 제공하는 숙주 세포주를 사용한다. 또한, 예를 들어, 높은 형질 도입 효율 및 신속한 증배 시간(doubling time)에 있어, 선택된 숙주 세포주가 번역 후 변형(post-translational modification)(예를 들어, 글리코실화(glycosylation), 팔미토일화(palmitoylation) 및/또는 인산화(phosphorylation))이 일어나고 발생기(nascent) 단백질의 적절한 접힘을 보장하는 샤페론(chaperone) 단백질과의 상호작용이 일어나는 세포 구획(compartment)으로의 단백질 트래피킹(trafficking)을 충실하게 재현하는 것이 유리하다. 부속 막단백질(accessory membrane protein)은 CD3가 세포 표면에서 발현된 TCR의 조립을 안정화시키는 막 침착(membrane disposition)을 촉진한다. 또한, 조립된 TCR 단백질의 펩타이드-MHC 복합체 인식 및 시그널링 활성은 공동수용체, 표면 발현된 CD3뿐 아니라 예를 들어, CD2 및 LFA-1과 같은 부착 및 부속 단백질에 의존한다.

[0125] 한 구현예로, 숙주 세포는 척추 세포(vertebrate cell)로, 바람직하게는 포유류에서 온 것이며, 마우스 또는 인간을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 다른 구현예로, 숙주 세포는 림프구에서 유래한 것으로, 예를 들면 T 또는 B 림프구 계통의 세포이다. 한 구현예로, 숙주 세포는 T 전구세포, 발달 중인 T 세포 또는 성숙 T 림프구로부터 유래한 것일 수 있다.

[0126] 한 구현예로, T 세포 계통의 숙주 세포는 태아 간(fetal liver), 배아 흉선(embryonic thymus), 성체 흉선 또는 흉선종(thymoma)으로부터 분리될 수 있다. T 림프구는 또한 배아줄기세포(embryonic stem cells), 유도만능줄기세포(iPS(induced pluripotent stem) cells), 성체줄기세포(adult stem cells) 또는 $CD34^+$ 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는, 다능성 줄기세포(pluripotent stem cell)로부터 분화된 T 세포일 수 있다.

[0127] 다른 구현예로, 숙주 세포는 조절 유전자의 파괴로 T 세포 발달의 정해진 단계에서 차단되어 있는 T 전구 세포의 축적이 일어난 넉아웃(knockout) 마우스와 같은, 유전적으로 조작된 T 림프구로부터 유래한 것일 수 있다(Bradley *et al*. Mamm. Genome 2012 Oct;23(9-10):580-6, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다). T 세포 발달이 정지된 돌연변이 마우스의 예는 SCID 마우스 및 GATA3, RAG1, RAG2, ku80, TCRβ, CD3epsilon, Lck/Fyn 이중 낙아웃, ZAP-70/Syk 이중 낙아웃, LAT, SLP-76, GADS, VAV1/2/3 삼중 낙아웃, TCRα, CD3δ, RAG1/RAG2 이중 낙아웃 또는 ZAP-70의 침묵 돌연변이(null mutation)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다(Miosge and Goodnow, *Immunology and Cell Biology* (2005) 83, 318-335, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다).

[0128] 한 구현예로, 숙주 세포는, 예를 들어 $CD8^+$ 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell), $CD8^+$ 조절 T 세포(regulatory T cell), $CD4^+$ 세포독성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T (T_H1, T_H2, T_H3, T_H17, Th9, 또는 T_{FH} 아형(subtype)을 포함한다), $CD4^+$ 조절 T 세포 또는 iNKT(invariant NKT) 세포일 수 있다. 다른 구현예로, 숙주 세포는 B 세포 또는 NK 세포일 수 있다.

[0129] 상기 제시된 숙주 세포들 중 일차배양세포(primary cell)는 텔로머라아제 역전사 효소(Telomerase Reverse Transcriptase)의 레트로바이러스성 형질전환(Barsov, E.V., Methods Mol Biol. 2009;511:143-58, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다) 및 당 업계에서 잘 알려진 기술에 의해 세포주로 불멸화될 수 있다(예를 들어, 공개된 미국특허출원 제2005/0123521호, 제2010/0279401호, 및 국제 PCT 출원 PCT/US1989/001526, 또는 Robek, M.D. and Ratner, L., Virology, 1999, 73: 4856-4865를 참고하라. 본원에서 각각 그 전체가 참고문헌으로 인용된다). 상기 서술된 필수 속성을 보유한 불멸화된 숙주 세포주는 이어서 본원에 개시된 것과 같이 TCR 활성 이후의 증배 시간, 레트로바이러스성 형질 도입 효율 및 IL-분비 또는 리포터 활성에 기초하여 선별된다.

[0130] 한 구현예로, 숙주 세포는 T 세포 수용체를 조립하고 발현하는 데 필요한 세포내 구성 요소를 보유하고 있는 뮤린(murine) pre-B 1624-5 세포주로부터 유래할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제8,748,353호를 참고하라. 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다).

[0131] 다른 구현예로, 숙주 세포는 기능성 T 세포 수용체 알파/베타 사슬을 세포 표면에 발현하지 않지만, CD3을 그 세포 표면에 발현하는 세포인 마우스 DO-11.10.7 58 α- β- (58-/-) 세포로부터 유래한 것일 수 있다.

[0132] 다른 구현예로, 숙주 세포는 기능성 T 세포 수용체 알파/베타 사슬을 발현하지 않는 뮤린 흉선종 세포주 Bw5147로부터 유래한 것일 수 있다.

[0133] *2) 숙주 세포주에서 내인성 유전자 발현의 유전적 파괴*

[0134] TCR 세포 라이브러리 스크린의 특정 실험적 디자인에 따라, 형질도입된 T 세포 수용체 라이브러리 및/또는 공동수용체(예를 들어, CD4 및/또는 CD8)와의 간섭을 피하기 위해 하나 또는 그 이상의 TCR 활성 및 항원-MHC 인식에 관련되어 있는 숙주 세포 내인성 유전자의 발현이 제거(abolish)되었다.

[0135] 숙주 세포에서의 유전자 침묵(silencing)은 당 업계에 잘 알려진 여러 가지 방법을 이용하여 이루어질 수 있다.

[0136] 예를 들어, 더 이상 세포 표면 마커를 세포 표면에 발현하지 않는 돌연변이 숙주 세포주는, 예를 들어 화학적 돌연변이 유별 인자(chemical mutagen), 감마선 조사(gamma irradiation) 를 이용한 체세포 돌연변이 유발(mutagenesis) (예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Letourneur and Malissen Eur J Immunol. 1989;19(12):2269-74에 기술된 58α-/β- 세포주) 또는 트랜스포존-매개 삽입 돌연변이(transposon-mediated insertional mutagenesis) (예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 미국특허 제8,592,211호 및 제7,767,454호에 설명된 것) 에 의해 생성될 수 있다. 이어서, 결과물인 돌연변이 숙주 세포주는 FACS 선별에 의해 세포 표면 마커 발현의 결함을 스크리닝할 수 있다.

[0137] 타겟 내인성 유전자의 발현은 또한 유전자좌-특이적(locus-specific)동형접합성 재조합(homologous recombination)을 통한 통상적인 넉아웃에 의해 제거될 수 있다(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 미국특허 제5,530,178호(CD8 넉아웃 마우스) 또는 미국특허 제5,698,765호(CD4 넉아웃 마우스)를 참고하라).

[0138] 또한, 선별된 임의의 내인성 타겟 유전자의 발현은 맞춤형 징크 핑거(designer zinc finger)(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 미국특허 제8,106,255호(일반적 방법론) 및 미국특허 제8,956,828호(징크 핑거 단백질 뉴클라아제(nuclease)를 이용한 T 세포 수용체 유전자의 목표된 파괴)에 설명되어 있다), TALENs(transcription activator-like effector nucleases) (예를 들어, 미국특허 제8,614,092호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다) 또는 CRISPR/cas 게놈 편집 시스템(예를 들어, 미국특허 제8,697,359호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는, 다수의 게놈 편집 기술을 이용하여 삭제될 수 있다..

[0139] 한 구현예로, 숙주 세포 내인성 유전자 발현은, Cre 재조합 효소(예를 들어, 미국특허 제4,959,317호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다) 또는 FLP 재조합 효소(예를 들어, 미국특허 제5,885,836호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는, 부위-지정(site-directed) 재조합 기술을 이용하여 제거될 수 있다.

[0140] 다른 구현예로, 타겟 유전자의 숙주 세포 발현은 RNAi(RNA interference; 예를 들어, 미국특허 제8,329,463호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)에 의해 침묵될 수 있다. 예를 들어, shRNAs(sequence-specific small-hairpin RNAs)는 내인성 TCR 유전자 및/또는 공동수용체(예를 들어, TCR-α 및 TCR-β, 예를 들어 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 미국특허출원 공개번호 2012/0321667를 참고하라)를 억제하는 것으로 나타난다. 하나 또는 그 이상의 이 단백질들의 발현을 차단함으로써, T 세포는 더 이상 TCR 복합체의 하나 또는 그 이상의 주요 구성요소를 생성할 수 없게 되며, 이로써 TCR 복합체를 불안정화시키고 기능성 TCR의 세포 표면 발현을 방지한다.

[0141] 한 구현예로, 상기 서술한 방법론 중 어느 하나는 그 세포 표면에 내인성 TCR을 발현하지 않는 T 림프구 유래의 숙주 세포주를 생성하도록 구현된다.

[0142] 한 구현예로, T 림프구 유래의 숙주 세포주는 내인성 TCR (즉, TCRα 및 TCRβ) 또는 내인성 CD4를 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 $TCR\alpha^{-}/\beta^{-}$ $CD4^{-}$ 숙주 세포라고 표현한다).

[0143] 다른 구현예로, 마우스 T 림프구 유래의 숙주 세포주는 마우스 TCR(즉, mTCRα및 mTCRβ) 또는 마우스 CD4를 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 mTCRα^-/β^- $mCD4^-$ 숙주 세포라고 표현한다).

[0144] 다른 구현예로, T 림프구 유래의 숙주 세포주는 내인성 TCR (즉, TCRα 및 TCRβ) 또는 내인성 CD8(예를 들어, CD8α 및 CD8β) 을 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 TCRα^-/β^- $CD8^-$ 숙주 세포라고 표현한다).

[0145] 다른 구현예로, 마우스 T 림프구 유래의 숙주 세포주는 마우스 TCR(즉, mTCRα 및 mTCRβ) 또는 마우스 CD8(예를 들어, mCD8α 및 mCD8β)을 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 mTCRα^-/β^- $mCD8^-$ 숙주 세포라고 표현한다).

[0146] 다른 구현예로, T 림프구 유래의 숙주 세포주는 내인성 TCR(즉, TCRα 및 TCRβ) 또는 내인성 MHC I를 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 TCRα^-/β^- MHC I^- 숙주 세포라고 표현한다).

[0147] 다른 구현예로, 마우스 T 림프구 유래의 숙주 세포주는 마우스 TCR(즉, mTCRα 및 mTCRβ) 또는 마우스 MHC I를 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 mTCRα^-/β^- mMHC I^- 숙주 세포라고 표현한다).

[0148] 다른 구현예로, T 림프구 유래의 숙주 세포주는 내인성 TCR(즉, TCRα 및 TCRβ) 또는 내인성 MHC II를 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 TCRα^-/β^- MHC II^- 숙주 세포라고 표현한다).

[0149] 다른 구현예로, 마우스 T 림프구 유래의 숙주 세포주는 마우스 TCR(즉, mTCRα 및 mTCRβ) 또는 마우스 MHC II를 그 세포 표면에 발현하지 않는다(본원에서 mTCRα^-/β^- mMHC II^- 숙주 세포라고 표현한다).

[0150] *3) 재조합 T 세포 공동수용체를 발현하는 숙주 세포주의 제조*

[0151] 막 관통 당단백질 CD8 및 CD4는 항원 반응이 각각 MHC 클래스 I 및 II 단백질(Major Histocompatibility Complex, 인간에서는 HLA라고 부르기도 한다)에 의해 제한되는 T 림프구 개체군의 분명한 특징이다. CD4는 세포 표면에 단량체(monomer)로 발현되는 반면, CD8은 이량체(dimer)로 발현된다. CD4 및 CD8은 그들의 동족(cognate) MHC에 결합함으로써 T 세포 수용체의 공동수용체로서 작용하고, 이로써 항원 펩타이드가 결합해 있는 MHC가 T 세포 수용체에 관여 (engagement)하도록 한다. $CD4^+$ T 세포는 MHC 클래스 II 분자와 결합하여 항원에 반응하고, $CD8^+$ T 세포는 MHC 클래스 I 분자에 결합하여 항원에 반응한다. 인비트로(in vitro)연구(Laugel *et al.*, J. Biol. Chem. 2007;282(33):23799-810, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)는 CD8 공동수용체는 결합 및 해리 속도 모두에 대한 영향을 통해, 차선의 TCR/펩타이드-MHC I 친화성에 있어서 결합 효율을 실질적으로 향상시킨다는 것을 나타낸다. TCR, 펩타이드-MHC I 및 CD8사이의 3분자 상호 작용은 또한 협동적인 것으로 나타났다(Jiang et al., Immunity. 2011;34(1):13-23). 공동수용체 의존성은 그러므로 TCR/펩타이드-MHC I 친화성에 반비례한다(inversely correlated).

[0152] TCR 세포 라이브러리 스크린 동안 T 세포 수용체의 펩타이드-MHC 복합체에 대한 친화성을 평가하기 위해, TCR α^-/β^- CD4 또는 CD8 음성 $CD3^+$ 숙주 세포가 재조합 CD4 또는 CD8 공동수용체를 발현하도록 조작될 수 있다.

[0153] 한 구현예로, TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 재조합 CD4를 발현하도록 조작될 수 있다(예를 들어, 인간 CD4 : UniProtKB - P01730, 마우스 CD4 : UniProtKB - P06332).

[0154] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 재조합 키메릭 CD4를 발현하도록 조작될 수 있다.

[0155] 다른 구현예로, 인간 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 재조합 마우스 CD4 단백질의 세포외 영역 (예를 들어, UniProtKB - P06332의 27-394번 잔기) 을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0156] 다른 구현예로, 마우스 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 재조합 인간 CD4 단백질의 세포외 영역(예를 들어, UniProtKB - P01730의 26-396번 잔기)을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0157] 다른 구현예로, 인간 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 인간 CD4 막 관통 및 세포질 영역과 인프레임으로 융합된 마우스 CD4 폴리펩타이드의 세포외 영역을 갖는 재조합 키메릭 CD4 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0158] 다른 구현예로, 비인간 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 인간 CD4 폴리펩타이드의 세포외 영역과 인프레임으로

융합된 비인간 CD4 막 관통 및 세포질 영역을 갖는 재조합 키메릭 CD4 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0159] 다른 구현예로, 마우스 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 인간 CD4 폴리펩타이드의 세포외 영역과 인프레임으로 융합된 마우스 CD4 막 관통 및 세포질 영역을 갖는 재조합 키메릭 CD4 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0160] 키메릭 인간/마우스 CD4의 인간 세포외 영역을 코딩하는 아미노산 서열은 야생형 인간 CD4의 상응하는 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일할 수 있다.

[0161] 키메릭 인간/마우스 CD4의 마우스 막 관통 영역 및 세포질 영역을 코딩하는 아미노산 서열은 야생형 마우스 CD4의 상응하는 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일할 수 있다.

[0162] 또 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 재조합 CD8α 및 CD8β를 발현하도록 조작될 수 있다.

[0163] 마우스 CD8α 및 CD8β 아미노산 서열의 예시를 하기에 열거하였다.

마우스 CD8α 폴리펩타이드 이소폼(isoform) 1 (UniProtKB: P01731-1):

KPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGSVSQGCSWLFQNSSSKLPQPTFVVYMA
SSHNKITWDEKLNSSKLFSAMRDTNNKYVLTLNKFSKENEGYYFCSVISNSVMYFSS
VVPVLQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIW
APLAGICVALLLSLIITLI*CYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV* (서열번호 21)(볼드체: 세포외 영역; 일반: 막 관통 ; 이탤릭체 : 세포질 영역)

마우스 CD8β 폴리펩타이드 (UniProtKB: P10300):

LIQTPSSLLVQTNHTAKMSCEVKSISKLTSIYWLRERQDPKDKYFEFLASWSSSKGV
LYGESVDKKRNIILESSDSRRPFLSIMNVKPEDSDFYFCATVGSPKMVFGTGTKLTV
VDVLPTTAPTKKTTLKMKKKKQCPFPHPETQKGLTCSLTTLSLLVVCILLLLAFLGV
AVYF*YCVRRRARIHFMKQFHK* (서열번호 22) (볼드체 : 세포외 영역 ; 일반 : 막 관통 ; 이탤릭체 : 세포질 영역)

[0164]

[0165] 인간 CD8α 및 CD8β 아미노산 서열의 예시를 하기에 열거하였다.

인간 CD8α 폴리펩타이드 이소폼 1 (UniProtKB: P01732-1):

SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKP
KAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPA
KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVIT*LYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV* (서열번호 23)
(볼드체: 세포외 영역; 일반: 막 관통 ; 이탤릭체 : 세포질 영역)

인간 CD8β 폴리펩타이드 이소폼 (UniProtKB: P10966-1):

LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKG
TIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVV
DFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAI*H*
LCCRRRRARLRFMKQFYK (서열번호 24) (볼드체: 세포외 영역 ; 일반:
막 관통 ; 이탤릭체 : 세포질 영역)

[0166]

[0167] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 재조합 인간/마우스 키메릭 CD8α 및 인간/마우스 키메릭 CD8β를 발현하도록 조작될 수 있다(chiCD8αβ^+).

[0168] 다른 구현예로, 인간 TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 마우스 CD8α 및 마우스 CD8β의 세포외 영역을 갖는 재조합 키메릭 CD8 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0169] 다른 구현예로, 마우스 TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 인간 CD8α 및 인간 CD8β의 세포외 영역을 갖는 재조합 키메릭 CD8 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0170] 다른 실시예에서, 재조합 키메릭 인간/마우스 CD8α 및 인간/마우스 CD8β 폴리펩타이드는 인간 CD8α 세포외 영역이 마우스 CD8α 막 관통 및 세포질 영역과 인프레임으로 융합되고 인간 CD8β 세포외 영역이 마우스 CD8β 막 관통 및 세포질 영역과 인프레임으로 융합되도록 조작될 수 있다.

[0171] 키메릭 인간/마우스 CD8α 및 인간/마우스 CD8β 폴리펩타이드의 인간 세포외 영역을 코딩하는 아미노산 서열은 각각 상응하는 야생형 인간 CD8α 및 CD8β 의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일할 수 있다.

[0172] 키메릭 인간/마우스 CD8α 및 인간/마우스 CD8β 폴리펩타이드의 마우스 막 관통 영역 및 세포질 영역을 코딩하는 아미노산 서열은 각각 상응하는 야생형 마우스 CD8α 및 CD8β 의 아미노산 서열과 적어도 90%, 선택적으로 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일할 수 있다.

[0173] 관련된 폴리펩타이드의 동정(identify)은 알려진 방법에 의해 용이하게 수행될 수 있다. 그러한 방법은, 본원에서 그 모든 내용이 참고문헌으로 인용되는, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds. Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math, 48:1073 (1988), 에 설명된

내용을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 2개의 폴리펩타이드의 관련성 또는 퍼센트 동일성을 결정하는 방법은 테스트된 서열 사이에 가장 큰 일치성을 제공하도록 디자인되었다. 2개의 서열 사이의 동일성을 결정하기 위한 바람직한 방법은 GAP을 포함하는 GCG 프로그램 패키지(Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984), 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis., BLASTP, BLASTN, 및 FASTA(Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990), 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. BLASTX 프로그램은 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 및 다른 출처로부터 공개적으로 이용 가능하다(BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.*, supra (1990)). 잘 알려진 스미스 워터맨 알고리즘(Smith Waterman algorithm) 또한 동일성을 결정하는 데 이용될 수 있다.

[0174] 한 구현예로, 키메릭 CD8α 및 CD8β 는 각각 서열번호 1 및 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0175] TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포에서의 발현을 위해, 선별된 CD8α 및 CD8β 코딩 영역은, 예를 들면 레트로바이러스성 또는 렌티바이러스성(lentiviral) 발현 카세트 등, 발현 카세트의 적합한 프로모터의 다운스트림으로 클로닝될 수 있다.

[0176] TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포에서의 발현을 위해, 선별된 CD4 코딩 영역은, 예를 들면 레트로바이러스성 또는 렌티바이러스성 발현 카세트 등, 발현 카세트의 적합한 프로모터의 다운스트림으로 클로닝될 수 있다.

[0177] 프로모터는 TCR 세포 라이브러리 스크린의 디자인에 따라 구성적(constitutive) 또는 조절 가능한(regulatable) 프로모터일 수 있다.

[0178] 구성적 프로모터의 예시적 구현예는 폴리오마 (polyoma), 아데노바이러스 (adenovirus), CMV (cytomegalovirus) 및 SV40(simian virus)에서 온 바이러스성 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 예시적인 구성에서, 단백질 코딩 서열은 인간 CMV IE 프로모터의 업스트림(즉, 5') 및 SV40 폴리(A) 신호의 다운스트림(즉, 3')에 인접한다. 인간 CMV IE 프로모터는 Boshart *et al.* (1985) Cell 41:521 530에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다. 이용될 수 있는 다른 흔한 발현 프로모터는 HSV-TK 프로모터, β-actin 프로모터 및 EF-1α 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 특정 구현예로, 구성적 프로모터는 T 세포 특이적, 예를 들면, CD3δT 세포 특이적 프로모터일 수 있다.

[0179] 적합한 조절 가능 발현 시스템은 예를 들어, 비-유도(non-induced)된 상태에서 낮은 수준의 기본 발현; 다발성 반응을 촉진하지 않는 유도제(inducers) ; 유도된 상태에서 높은 수준의 발현; 관심 핵산 후보의 고도로 특이적인 유도; 및 유도된 발현 수준의 조절과 같은 특성을 갖는다. 조절 가능 발현 시스템의 예시는, Tet 유도 시스템(Tet inducible system) (예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Gossen *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547 5551; Gossen *et al.* (1995) Science 268:1766 1769를 참고하라), FK506/라파마이신(rapamycin) 유도 시스템(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4604 4607를 참고하라), RU486/미페프리스톤(mifepristone) 유도 시스템(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Wang *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences (1994) 91(17):8180-4를 참고하라), 큐메이트(cumate) 유도 시스템(Mullick *et al.* BMC Biotechnol. 2006 Nov 3;6:43, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다) 또는 엑디손(ecdysone) 유도 시스템(검토를 위해, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Rossi *et al.* (1989) Curr. Op. Biotech. 9:451 456을 참고하라) 과 같은 특성을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 오늘날 많은 구성적, 조직-특이적 및 유도성 프로모터는 Origene, Promega, Invitrogen, System Biosciences 및 Invivogen과 같은 판매처로부터 상업적으로 이용 가능하다.

[0180] 특정 구현예로, CD8α 및 CD8β 는 별개의 발현 벡터에 클로닝된다.

[0181] 다른 구현예로, CD8α 및 CD8β의 발현은 동일한 레트로바이러스성 발현 구조에 연결될 수 있다. 이것은 예를 들면 CD8α 및 CD8β 또는 그 단편을 하나의 프로모터로부터 발현하여, CD8α 및 CD8β 또는 그 단편을 코딩하는 영역을 IRES 요소로 분리함으로써 이루어질 수 있다.

[0182] 대안으로, CD8의 2개의 사슬의 공동-발현(co-expression)은 별개의 2개의 발현 카세트를 단일 레트로바이러스성 백본(backbone)으로 클로닝하여, 각각 별개의 결합 단백질 사슬의 발현을 개별적으로 제어함으로써 이루어질 수 있다.

[0183] 다른 구현예로, CD8α 및 CD8β 사슬은 반대 방향으로 전사 활성을 부여하는 양방향 프로모터를 이용하여 동일한 벡터로부터 발현될 수 있다. 이 옵션은 근접한 프로모터의 발현 수준에 부정적인 영향을 줄 수 있는 프로모

터 간섭이 일어나지 않는다는 이점이 있다.

[0184] 스크리닝 전략에 따라, 공동수용체 발현 카세트는 공동수용체 코딩 영역 또는 코딩 영역의 일부와 인접하는 부위특이적 재조합 서열을 포함하도록 디자인될 수 있다. 그러므로, TCR 음성, 공동수용체 음성인 숙주 세포에 형질 도입된 공동수용체 발현 카세트를 통합(integration)하면, 숙주 세포 내의 상응하는 부위특이적 재조합 효소를 발현함으로써 2개의 부위특이적 재조합 부위 사이의 뉴클레오티드 서열은 절단된다.

[0185] 다른 구현예로, 공동수용체 발현 카세트는 공동수용체의 코딩 영역의 번역을 방해하기 위해 삽입된 부위특이적 재조합 서열에 인접한 개입(intervening) DNA 서열을 포함한다. 이어서, 공동수용체 유전자 번역은 부위특이적 재조합 효소 매개의 부위특이적 재조합 서열 사이에 위치한 개입 DNA 서열 절단에 의해 복구될 수 있다.

[0186] 본 발명에서 이용되는 예시의 부위특이적 재조합 시스템은 CRE-LOX 또는 FLP/FRT 시스템(Ann. Rev. Biochem. (2006) 75: 567-605 and Gaj *et al*. Biotechnol Bioeng. 2014 Jan; 111(1): 1-15에서 리뷰됨, 본원에서 그 전체를 참고문헌으로 인용한다) 을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0187] 적절한 부위특이적 재조합 효소의 발현은 상기 설명한 것처럼 구성적, T 세포 특이적 또는 유도성 프로모터에 의해 유발될 수 있다.

[0188] 다른 구현예로, 부위특이적 재조합 효소는 융합 단백질, 예를 들어 Tat-Cre 융합 단백질(Joshi *et al*. Genesis (2002) 33:48-54; Peitz *et al*., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4489-94, 본원에서 그 내용 전체를 참고문헌으로 인용한다)로서 TCR α^-/β^- 숙주 세포에 전달될 수 있다. TAT-Cre는 인비트로 조건에서 섬유 아세포(fibroblast) 및 뮤린 배아줄기세포에서 95% 이상의 재조합 효율을 유도하는 것으로 나타났다.

[0189] 다른 구현예로, Cre 재조합효소는 에스트로겐 수용체의 리간드 결합 도메인에 연결될 수 있다(예를 들어, 본원에서 그 전체를 참고문헌으로 인용하는 Feil *et al*., (1996) PNAS 93:10887-10890 를 참고하라). 이것은 세포에 타목시펜(tamoxifen)을 처리하여 Cre의 핵 전위(nuclear translocation)를 가능하게 한다.

[0190] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $mCD8^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 키메릭 인간/마우스 CD8α 코딩 영역 및 CD8β 인간/마우스 코딩 영역($chiCD8\alpha\beta^+/flox^+$)의 마우스 막 관통 및 세포질 영역에 인접하는 lox 재조합 부위를 포함하는 공동수용체 발현 카세트로 형질도입된다.

[0191] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $mCD4^-$ $CD3^+$ 숙주 세포는 키메릭 인간/마우스 CD4 코딩 영역($chiCD4^+/flox^+$)의 마우스 막 관통 및 세포질 영역에 인접하는 lox 재조합 부위를 포함하는 공동수용체 발현 카세트로 형질도입된다.

[0192] *4) 항원-MHC 특이적 TCR 시그널링 측정을 위한 하나 또는 그 이상의 리포터 구조체를 가지는 숙주 세포주 유도체의 제조*

[0193] T 세포 수용체 복합체는 여러 개의 서브유닛을 갖는 복합체로, 가변 TCRαβ또는 TCRγδ이형이량체(heterodimer) 및 그 세포질 영역에 ITAMs(immunoreceptor tyrosine based activation motifs)를 함유한 비가변 신호 전달 서브유닛을 갖는다(예를 들어, CD3). 펩타이드-MHC 복합체에 의한 TCR 관여는 Src 타입의 타이로신 인산화 효소(tyrosine kinase)인 Lck와 CD4 또는 CD8 공동수용체의 결합 및 CD3의 세포내 영역의 각 ITAM 모티프 내의 2개의 타이로신의 인산화를 유발한다. Syk 타입의 타이로신 인산화 효소인 ZAP70은 이어서 Lck에 의해 활성화된 ITAM 모티프에 결합한다. 그 후, 신호는 세린/트레오닌 (serine/threonine) 단백질 인산가수분해 효소 (phosphatase) (예를 들어, 칼모듈린(calmodulin)-칼시뉴린(calcineurin)을 통한 칼슘 시그널링), 세린/트레오닌 (serine/threonine) 단백질 인산화효소(예를 들어, PKC, MAPK 상과(super family) 및 유사한 다양한 어댑터 단백질(예를 들어, LAT 및 SLP-76)을 통해 전달된다. 이러한 이벤트는 궁극적으로 각각이 초기 사이토카인(cytokine)(예를 들어, 인터루킨(interleukin(IL-2, -4, -6, 및 -17와 같은 것), TNF-α, 및 IFN-γ) 생성 유도에 중추적 역할을 하는 3개의 주요 전사 인자인 NFκB, NFAT 및 AP-1 의 활성화를 일으키며, 이는 활성화된 T 림프구의 클론 확장에 필요하다.

[0194] 펩타이드/MHC-TCR 반응성 리포터 구조체를 숙주 세포에 도입함으로써, 재조합으로 발현된 TCR 및/또는 펩타이드-MHC 복합체와 공동수용체 간의 상호작용 및 이어지는 유도된 T 세포 시그널링 활성은 리포터 판독값을 통해 실시간으로 측정될 수 있다.

[0195] 시그널링 활성의 판독값을 제공하는 리포터 단백질은 당 업계에 자명하며, 세포 표면 마커 및 생물발광(루시퍼라아제(luciferase)) 또는 형광 단백질(예를 들어, GFP (green fluorescent protein), EGFP(enhanced green

fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein) 및 RFP(red fluorescent protein), 최근 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용되는 Senutovitch et al. Exp. Biol. Med. (2015)에 의해 리뷰됨) 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0196] 특정 구현예로, TCR 활성화에 의해 유도된 각 시그널링 이벤트는 적절한 TREs(transcription response elements), 예를 들어 NFκB/Rel, NFAT 또는 AP-1, 를 갖는 프로모터를 사용함으로써 개별적으로 모니터링될 수 있다. 신호 전달 경로 GFP 또는 루시퍼라아제 리포터 배열은 현재 Sambio Sciences/Qiagen, Addgene 및 Invitrogen에서 상업적으로 이용 가능하다. 각 TREs, 또는 그의 조합은, 숙주 세포에서 발현될 수 있다.

[0197] Ⅲ. 세포 TCR 디스플레이 라이브러리의 제조

[0198] TCR α 가변 영역 Vα 및 Jα 유전자, 및 TCR β 가변 영역 Vβ, Jβ 및 Dβ 유전자를 포함하는 DNA의 공급원을 제공하기 위해, poly A^+ RNA는 예를 들어, 인간 태아 흉선(fetal thymus), 제대혈, 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocytes) (환자로부터), HPV(human papillomavirus) 백신, EBV(Epstein-Barr virus)백신, 또는 암 백신과 같은 백신이 접종된 환자, 또는 관심 항원으로 백신 접종된 HLA-A2 트랜스제닉(transgenic) 마우스로부터 준비될 수 있다.

[0199] TCRβ 사슬을 코딩하는 cDNA는 예를 들어, Vβ 및 DJβ 재배열을 마친 전구-T 세포(pre-T lymphocytes)로부터, 분리된 mRNA로부터 생성될 수 있다. 이 림프구들은 $CD44^{low}$ $CD25^+$ DN3 또는 DN4 $CD44^-$ $CD25^-$ T 림프구일 수 있다.

[0200] TCRα사슬을 코딩하는 cDNA는 예를 들어, Vα 및 Jα 재배열을 마친 미성숙 이중 양성 T 림프구로부터 분리된 mRNA로부터 생성될 수 있다. 이 림프구들은 $CD4^+$ $CD8^+$ $CD3^{low}$ T 림프구일 수 있다.

[0201] 준비된 cDNA는 PCR(polymerase chain reaction)-기반의 TCR 가변 영역의 증폭에 주형(template)으로 사용될 수 있다. 분리된 TCRα 및 TCRβ 가변 영역 ORF(open reading frames)산물은 발현 시스템에 클로닝되어 내인성 TCR을 세포 표면에 발현하지 않는 숙주 세포의 표면에 기능성 형태로 가변 영역 유전자의 유전자 산물을 발현할 수 있도록 한다.

[0202] 분리된 발현 구조체에 의해 코딩되는 TCR의 발현을 위해, 바람직하게 상이한 폴리펩타이드 사슬의 발현은 상이한 선별 마커에 연결되며, 이로써 상응하는 발현 구조체의 개별적인 선별이 가능하다.

[0203] 형질도입 또는 형질전환된 숙주 세포의 선별에 유용한 항생제에 내성을 부여하는 선별 마커는, 예를 들어, 퓨로마이신(puromycin), 네오마이신(neomycin), 하이그로마이신 B(hygromycin B), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 히스티디놀(histidinol), 블레오마이신(bleomycin) 및 펠로마이신(phelomycin)에 저항성인 유전자를 포함한다. 세포 표면 단백질 및 형광 단백질은 또한 선별 마커로 사용되기에 적합하다.

[0204] 한 구현예로, 인간 TCRα 또는 TCRβ 의 가변 영역을 코딩하는 cDNA 서열은 PCR에 의해 증폭되어 키메릭 TCRα 또는 TCRβ 발현 벡터 백본에 클로닝될 수 있다.

[0205] 구체적으로, TCR α 발현 카세트는 프로모터, 인간 TCR 신호 서열, 마우스 TCRα 비가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 이어지는 클로닝 부위를 포함한다. 인간 TCRα 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 TCR α cDNA라이브러리에서 PCR에 의해 증폭되어 TCRα 발현 카세트의 클로닝 부위에 클로닝되어 마우스 TCR α 비가변 영역과 인프레임으로 존재하게 된다. 결과물인 라이브러리는 이어서 *E. coli*에 형질도입되며, 플라스미드 DNA는 숙주 세포에 도입되어 재조합 키메릭 인간/마우스 TCR α라이브러리를 생성한다.

[0206] 유사한 방법으로, TCR β 발현 카세트는 프로모터, 인간 TCR 신호 서열, 마우스 TCR β 비가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 이어지는 클로닝 부위를 포함한다. 인간 TCR β 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 TCR cDNA 라이브러리에서 PCR에 의해 증폭되어 TCR β 발현 카세트의 클로닝 부위에 클로닝되어 마우스 TCR β 비가변 영역과 인프레임으로 존재하게 된다. 결과물인 라이브러리는 이어서 *E. coli*에 형질도입되며, 플라스미드 DNA는 숙주 세포에 도입되어 재조합 키메릭 인간/마우스 TCR β 라이브러리를 생성한다.

[0207] 한 구현예로, TCRα 또는 TCRβ의 세포외 영역을 코딩하는 cDNA 서열은 PCR에 의해 증폭되어 키메릭 TCRα 또는 TCRβ 발현 벡터 백본에 클로닝될 수 있다.

[0208] 구체적으로, TCRα 발현 카세트는 프로모터, 인간 TCR 신호 서열, 마우스 TCR α 막 관통 및 세포질 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 이어지는 클로닝 부위를 포함한다. 인간 TCR α 세포외 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 TCR α cDNA 라이브러리에서 PCR에 의해 증폭되어 TCR α 발현 카세트의 클로닝 부위에 클로닝되어

마우스 TCR α 막 관통 및 세포질 영역과 인프레임으로 존재하게 된다. 결과물인 라이브러리는 이어서 *E. coli*에 형질도입되며, 플라스미드 DNA는 숙주 세포에 도입되어 재조합 키메릭 인간/마우스 TCR α 라이브러리를 생성한다.

[0209] 유사한 방법으로, TCR β 발현 카세트는 프로모터, 인간 TCR 신호 서열, 마우스 TCR β 막 관통 및 세포질 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 이어지는 클로닝 부위를 포함한다. 인간 TCR β 세포외 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은TCR β cDNA 라이브러리에서 PCR에 의해 증폭되어 TCR β 발현 카세트의 클로닝 부위에 클로닝되어 마우스 TCR β 막 관통 및 세포질 영역과 인프레임으로 존재하게 된다. 결과물인 라이브러리는 이어서 *E. coli*에 형질도입되며, 플라스미드 DNA는 숙주 세포에 도입되어 재조합 키메릭 인간/마우스 TCR β 라이브러리를 생성한다.

[0210] 특정 구현예로, 공동 자극 분자의 시그널링 영역은 TCR α 및/또는 TCR β 세포질 영역의 C 말단에 융합된다. 공동 자극 분자는 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, LFA-1(lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, 또는 CD83, TCR ζ 사슬 또는 이의 임의의 조합에 특이적으로 결합하는 리간드로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0211] 한 구현예로, TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포주는 TCR α 유전자 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환되어 안정한 형질전환체 (transformant)를 선별한다. 형질전환체의 TCRα의 발현은 RT-PCR 분석으로 확인될 수 있다. 결과물 클론들을 모아 TCR β 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환하여 2중 형질전환체를 선별한다.

[0212] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포주는 먼저 TCR β 유전자 라이브러리로, 다음에 TCR α 유전자 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환된다.

[0213] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포주는 TCR α 유전자 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환되어 안정한 형질전환체를 선별한다. 형질전환체의 TCRα의 발현은 RT-PCR 분석으로 확인될 수 있다. 결과물 클론들을 모아 TCR β 유전자 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환하여 안정한 2중 형질전환체를 선별한다.

[0214] 다른 구현예로, TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포주는 먼저 TCR β 유전자 라이브러리로, 다음에 TCR α 유전자 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환된다.

[0215] 특정 구현예로, TCR 유전자 라이브러리는 숙주 세포주에 레트로바이러스성 형질도입에 의해 도입된다. 레트로바이러스성 형질도입은 대다수의 레트로바이러스로 형질도입된 세포가 단지 하나의 재조합 레트로바이러스성 구조체에 의해 유전적으로 변형되는 것을 보장하도록 조작되어 적어도 하나의 TCR 단백질의 클론성 발현을 일으킬 수 있다. 한 구현예로, 레트로바이러스성 형질도입은 MOI(multiplicity of infection)를 이용하여 조절될 수 있다. MOI는 10, 1, 0.5, 0.1 또는 더 작을 수 있다. 다른 구현예로, 레트로바이러스성 형질도입은 형질도입 이후 5-6%보다 적은 세포들이 레트로바이러스성 발현 벡터가 코딩하는 재조합 단백질을 발현하는 것을 보장할 수 있도록 조작될 수 있다.

[0216] 상이한 발현 벡터로부터의 TCR α 및 TCR β 사슬의 별개의 발현은 TCR α 사슬을 코딩하는 발현 벡터의 다양한 콜렉션과 TCR β 사슬을 코딩하는 다양한 콜렉션 간에 무작위적으로 조합될 수 있다는 이점을 제공한다. 이 TCR α 및 TCR β 사슬 셔플링 (shuffling) 은 TCR α 및 TCR β 사슬 콜렉션의 총 숫자가 제한되어 있음에도 불구하고 결합 특이성의 매우 큰 다양성을 만들어낸다(예를 들면, 10^4 개의 상이한 TCR α 사슬이 10^4개의 상이한 TCR β 사슬과 무작위적으로 조합되면 이론적으로 각각 구별되는 특이성을 갖는 10^8개의 TCR을 만든다).

[0217] 상보적인 재조합 TCR α 및 TCR β 사슬을 받은 TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 또는 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 리포터 숙주 세포는 기능성 TCR을 세포 표면에 발현하며, FACS(fluorescence-activated cell sorting) 또는 MACS(magnetic activated cell sorting)에 의해 농축(enrich)되어 고도로 다양한 세포 TCR 디스플레이 라이브러리(display library)를 생성할 수 있다.

[0218] Ⅳ. 세포 TCR 디스플레이 라이브러리의 스크리닝

[0219] 본원에서는 내인성 TCR을 발현하지 않는 숙주 세포를 상이한 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조체의 라이브러리

로 형질도입 또는 형질전환시켜 상이한 재조합 TCR을 그 세포 표면에 발현하는 세포들을 갖는 재조합 TCR 세포 라이브러리를 생성하고, 세포 라이브러리 내에서 원하는 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 세포를 선별하고, 원하는 특성의 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조를 분리 및 동정하는 것을 포함하는, 원하는 특성을 갖는 재조합 TCR의 분리 및 동정 방법을 개시하고 있다.

[0220] 원하는 특성의 예시는, 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 고도의 선택성, 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 고도의 친화성 및 원하는 펩타이드-MHC 복합체 존재 하에 양성 기능성 판독값의 증명을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0221] *1) 공동수용체 세포 표면 발현의 존재 또는 부존재 하에 TCR 디스플레이 라이브러리의 스크리닝*

[0222] 본원에서는 공동수용체, 예를 들면 CD4 또는 CD8, 의 표면 발현의 존재 또는 부존재 하에 원하는 펩타이드-MHC에 특이적으로 결합하는 TCR(T cell receptor)을 코딩하는 핵산을 적어도 하나 분리 및 동정하는 방법을 개시한다.

[0223] 한 구현예로, 재조합 공동수용체를 발현하는 마우스 TCR α^-/β^- 공동수용체 $CD3^+$ 숙주 세포는 본원에서 개시하는 것과 같이 재조합 TCR α 및 TCR β 유전자 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환된다. 이어서, TCRα/β 표면 발현을 갖는 형질전환체가 선별된다. 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 원하는 친화성 또는 선택성으로 (본원에서 공동수용체 의존성 결합자라고 말한다) 결합하는 세포 표면 재조합 TCR 단백질을 발현하는 숙주 세포들은 비결합성 숙주 세포 집단으로부터 FACS 또는 MACS로 농축된다. 이어서, 공동수용체의 존재하에 원하는 친화성 또는 선택성으로 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 TCR을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 PCR에 의해 분리되어 시퀀싱될 수 있다.

[0224] 특정 구현예로, 재조합 공동수용체 또는 재조합 공동수용체의 일부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 부위특이적 재조합 부위에 인접할 수 있다. 공동수용체 의존성 결합자 집단에서 고도의 친화성 TCR을 발현하는 숙주 세포주를 동정하기 위해, 본원에서 개시하는 것과 같이 동족 부위특이적 재조합효소를 이용해 재조합 공동수용체 발현 카세트는 제거되며 더 이상 재조합 공동수용체를 표면에 발현하지 않는 세포들이 농축된다. 이 공동수용체 음성 세포 집단은 이어서 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 세포 표면 재조합 TCR 단백질(본원에서 공동수용체 비의존성 결합자라고 말한다)에 대해 다시 스크리닝된다. 이어서 공동수용체의 부존재 하에 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 TCR을 코딩하는 뉴클레오티드 시퀀스는 PCR에 의해 분리되어 시퀀싱될 수 있다.

[0225] 한 구현예로, 재조합 공동수용체의 활성은 조절될 수 있다. 한 구현예로, 재조합 공동수용체의 세포 표면 발현은 유도성 프로모터를 이용하여 조절될 수 있다. 다른 구현예로, 재조합 공동수용체의 세포 표면 발현은 Cre/loxP 시스템을 이용하여 조절될 수 있다. 이어서, TCR 라이브러리는 전술한 바와 같이 재조합 공동수용체의 발현 감소의 함수로 원하는 펩타이드-MHC 복합체에 대한 결합에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0226] MHC 클래스 I 또는 II 단백질에 결합되어 T 세포에 제시될 수 있는 임의의 T 세포 항원은 TCR 디스플레이 라이브러리 스크리닝에 이용될 수 있다. 펩타이드 항원은 화학적으로 합성되거나 자연 공급원으로부터 유래할 수 있다. 한 구현예로, 펩타이드 항원은 종양 세포로부터 유래한 것이다.

[0227] 본원에 개시된 방법 및 구성은 관심 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 발현, 스크리닝 및 동정에 넓게 적용될 수 있다. 그러나, 자연 발생하거나 인공적으로 조작된 TCR의 임의의 (기능성) 절편도 이용될 수 있다. 완전한 길이의(full-length) TCR과 관련하여, 예를 들면, 부위 또는 영역 지시적 돌연변이 유발, 상이한 TCR로부터의 자연발생 서열의 융합, CDR 서열의 무작위화, DNA 셔플링 및 실수유발PCR(error-prone PCR)에 의해 생성된, 인위적으로 조작되거나 디자인된 TCR 결합 영역의 변형이 이용될 수 있다.

[0228] *a) CD8 의존성 TCR 활성화*

[0229] 한 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리는 특정 9-내지 11-mer 펩타이드 형태의 다양한 MHC 클래스 I 대립 유전자에 관하여 어떤 T 세포 에피토프(epitope)에 대한 결합에 관해 분석된다.

[0230] 한 구현예로, 적절한 TCR을 갖는 세포는 포획(capture)되어 FACS에 의해 농축되고 α 및 β 사슬이 회복되어 특성화될 수 있다.

[0231] 다른 구현예로, 각각의 TCR의 세포 표면 발현에 의한 펩타이드-MHC 클래스 I 관여는 활성화 마커(예를 들어, CD69 또는 CD137)의 발현, 시그널링 경로의 유발(예를 들어, NFAT 시그널링, IL-2 시그널링, AP-1 시그널링 또

는 NFκB/Rel 시그널링), 사이토카인(예를 들어, IL-2, TNF-α, 또는 IFN-γ)의 생성, 칼슘 플럭스(calcium flux), 세포 증식(예를 들어, T 세포 증식), 및 리포터 시스템의 활성화(예를 들어, IL-2-EGFP 리포터 시스템)에 의해 측정될 수 있다.

[0232] 공동수용체로서, CD8은 또한 TCR 신호 전달을 촉진하기 위해 TCR과 동일한 MHC 클래스 I분자의 α3 도메인에 결합할 수 있다. 돌연변이 유발 데이터는 인간 MHC 클래스 I α 사슬의 223-229번 잔기가 CD8-MHC 클래스 I 상호작용에 필수적임을 나타낸다(Salter *et al*. Nature 345:41-46 1990).

[0233] 본원에서 개시하고 있는 TCR 세포 라이브러리를 이용하여, 원하는 펩타이드-MHC 클래스 I 복합체의 T 세포 관여에 있어서 CD8-α3 상호작용의 역할을 조사할 수 있다.

[0234] 한 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 마우스 TCR α^-/β^- $CD8^+$ $CD3^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리는 숙주 세포 라이브러리는 인간 MHC 클래스 I α3 도메인의 223-229번 잔기에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 원하는 펩타이드-인간/마우스 키메릭 MHC 클래스 I 단백질과 접촉할 수 있다. 이어서 GFP^+ 세포가 FACS에 의해 분리되고 재조합 TCR의 가변 영역이 PCR에 의해 증폭되고 시퀀싱된다.

[0235] 다른 구현예로, 인간 MHC 클래스 I α3 도메인의 223-229번 잔기에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 펩타이드-인간/마우스 키메릭 MHC 클래스 I 단백질은 세포, 예를 들어 항원제시세포, 에 발현될 수 있다.

[0236] b) CD8 비의존성 TCR 활성화

[0237] 다른 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포에 2회의 스크리닝 프로토콜을 수행한다.

[0238] 제1회에서, TCR 세포 라이브러리는 키메릭 인간/마우스 CD8의 세포 표면 발현 존재 하에 펩타이드-MHC I 활성화에 대해 스크리닝된다. 키메릭 CD8 공동수용체의 존재 하에 타겟 펩타이드-MHC I 복합체와 결합하는 양성 TCR 세포 클론이 이어서 동정된다.

[0239] 제2회에서, 동정된 양성 TCR 세포 클론에 Cre 재조합효소의 전달로 재조합 키메릭 CD8 공동수용체를 제거시키고 뒤이어 CD8 공동수용체를 세포 표면에서 제거한다.

[0240] 더 이상 CD8을 그 세포 표면에 발현하지 않는 FACS 분류된 양성 TCR 세포 클론은 다시 펩타이드-MHC I 활성에 대해 스크리닝된다. CD8 공동수용체의 부존재 하에 타겟 펩타이드-MHC I 복합체와 결합하는 양성 TCR 세포 클론은 이어서 고도의 친화성 결합자에 의해 동정된다.

[0241] 다른 구현예로, MHC I α3 도메인의 223-229번 잔기에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 원하는 펩타이드-MHC I 복합체에 결합하는 고도의 친화성 TCR을 분리한다.

[0242] 한 구현예로, 재조합 TCR을 세포 표면에 발현하는 마우스 TCR α^-/β^- $CD8^-$ $CD3^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리는 인간 MHC 클래스 I α3 도메인의 223-229번 잔기에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 원하는 펩타이드-인간/마우스 키메릭 MHC 클래스 I 단백질과 접촉할 수 있다. TCR 활성은 리포터 판독값, 즉, GFP 생성에 의해 평가된다. 이어서 GFP+ 세포가 FACS에 의해 분리되고 재조합 TCR의 가변 영역이 PCR에 의해 증폭되고 시퀀싱된다.

[0243] 다른 구현예로, 인간 MHC 클래스 I α3 도메인의 223-229번 잔기에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 갖는 원하는 펩타이드-인간/마우스 키메릭 MHC 클래스 I 단백질은 세포, 예를 들어 항원제시세포, 에 발현된다.

[0244] *c) CD4 의존성 TCR 활성화*

[0245] 한 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리는 직접적으로 또는 간접적으로 형광으로 표지된 다양한 MHC 클래스 II 대립 유전자와 관련하여 어떤 T 세포 에피토프에 대한 결합을 검정한다.

[0246] 한 구현예로, 적절한 TCR을 갖는 세포는 포획되어 FACS에 의해 농축되고 α 및 β 사슬이 회복되어 특성화될 수 있다.

[0247] 다른 구현예로, 각각의 TCR의 세포 표면 발현에 의한 펩타이드-MHC 클래스 II 관여는 활성화 마커(예를 들어, CD69 또는 CD137)의 발현, 시그널링 경로의 유발(예를 들어, NFAT 시그널링, IL-2 시그널링, AP-1 시그널링 또

는 NFκB/Rel 시그널링), 사이토카인(예를 들어, IL-2, TNF-α, 또는 IFN-γ)의 생성, 칼슘 플럭스(calcium flux), 세포 증식(예를 들어, T 세포 증식), 및 리포터 시스템의 활성화(예를 들어, IL-2-EGFP 리포터 시스템)에 의해 측정될 수 있다.

[0248] 다른 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 TCR α^-/β^- $CD4^+$ $CD3^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리는 변이체 MHC II의 CD4에 대한 결합이 약화 또는 소거된 하나 또는 그 이상의 돌연변이 인간 β-사슬 β2 도메인을 갖는 펩타이드-키메릭 MHC II 단백질의 제시 후 TCR 활성화에 대해 스크리닝될 수 있다(Rolf Li-Yun KonigHuang & Ronald N. Germain (1992) Nature 356, 796 ? 798, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다).

[0249] 다른 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 TCR α^-/β^- $CD4^+$ $CD3^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리는 세포 표면에 발현된 펩타이드-chiMHCII 제시 후 TCR 활성화에 대해 스크리닝 될 수 있다.

[0250] *d) CD4 비의존성 TCR 활성화*

[0251] 다른 구현예로, 재조합 TCR을 발현하는 TCR α^-/β^- $CD4^-$ $CD3^+$ $chiCD4/flox^+$ TRE-GFP 숙주 세포 라이브러리에 2회의 스크리닝 프로토콜을 수행한다.

[0252] 제1회에서, TCR 세포 라이브러리는 키메릭 인간/마우스 CD4의 세포 표면 발현 존재 하에 펩타이드-MHC II 활성화에 대해 스크린된다. 키메릭 CD8 공동수용체의 존재 하에 타겟 펩타이드-MHC II 복합체와 결합하는 양성 TCR 세포 클론이 이어서 동정된다.

[0253] 제2회에서, 동정된 양성 TCR 세포 클론에 Cre 재조합효소의 전달로 재조합 키메릭 CD4 공동수용체를 제거시키고 뒤이어 CD4 공동수용체를 세포 표면에서 제거한다.

[0254] 더 이상 CD4을 그 세포 표면에 발현하지 않는 FACS 분류된 양성 TCR 세포 클론은 다시 펩타이드-MHC II 활성화에 대해 스크리닝되었다. 이어서, CD4 공동수용체의 부존재 하에 타겟 펩타이드-MHC II 복합체와 결합하는 양성 TCR 세포 클론을 동정한다.

[0255] *e) TCR 가변 영역의 인비트로(in vitro) 진화*

[0256] 지시된 단백질 진화는 펩타이드-MHC특이적인 TCR을 생성하는 데 있어서 매우 강력한 도구이다. 과정은 TCR의 돌연변이가 동족 펩타이드-MHC 복합체(야생형 TCR 세포에 특이적인 원래의 항원)와 상이한 특성(예를 들어, 증가된 친화성 및/또는 강화된 시그널링 능력)을 갖도록 TCR을 조작 또는 수정하는 것을 포함한다. 그러므로, 하나 또는 그 이상의 CDR에 있어서 야생형 TCR은 돌연변이화된 라이브러리의 생성을 위해 주형으로 사용될 수 있으며, 상이한 특성을 갖는 돌연변이체(예를 들어, 증가된 친화성 및/또는 강화된 시그널링 능력)는 동족 펩타이드-MHC 복합체에 결합함으로써 선별될 수 있다.

[0257] 한 구현예로, TCR α/β의 가변 영역은 시토신(cytosine)염기를 탈 아민화시켜 티민(thymine)으로 인식되는 우라실(uracil)염기를 생성하는 효소인 AID (Activation-induced cytidine deaminase) 의 존재하에 체세포 과다돌연변이 (somatic hypermutation) 에 의해 돌연변이화될 수 있다. AID를 인비트로 돌연변이 유발에 이용하는 방법은 예를 들면, 본원에서 그 전체를 참고문헌으로 인용하는 미국 특허 제 8,685,897호 및 제8,603,950호에 개시되어 있다.

[0258] 고도의 친화성의 몇몇 예시는 약 10^{-4} M 및 10^{-12} M 사이의 타겟 리간드에 대한 평형 결합 상수 및 모든 개별 값 및 그 안의 범위를 포함한다. 이 범위는 야생형 친화성으로 알려진 것(10^{-4} 에서 10^{-6} M) 및 지시된 진화에 의해 분리된 것(약 10^{-12} M) 사이의 친화성을 포함한다.

[0259] 당업계의 통상의 기술자는 본원에 기재된 어세이와 관련된 표준 돌연변이 유발 기술을 통해 변형된 TCR 서열을 얻어 그것들을 특정한 결합 친화성 및/또는 특이성에 대해 테스트할 수 있다. 당 업계에 알려진 유용한 돌연변이 유발 기술은 새로운(de novo) 유전자 합성, 올리고뉴클레오티드-지시 돌연변이 유발(oligonucleotide-directed mutagenesis), 영역-특이적 돌연변이 유발, 링커 스캐닝 돌연변이 유발(linker-scanning mutagenesis) 및 PCR에 의한 부위-지시적 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis) (예를 들어, Sambrook *et al.* (1989) and Ausubel *et al.* (1999)를 참고하라)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0260] 변이체 TCR 코딩 서열을 얻는 데 있어서, 당업계에서 통상의 기술자는 TCR 유래의 단백질이 생물학적 활성의 결실 또는 감소 없이, 특정 아미노산 치환, 첨가, 결실 및 번역 후 변형에 의해 변형될 수 있다는 것을 인식할 것

이다. 구체적으로, 하나의 아미노산을 유사한 크기, 전하(charge), 극성(polarity) 및 형태를 가진 다른 아미노산으로 치환하는 것인 보존적 아미노산 치환은 단백질 기능을 크게 변화시키지 않는다는 것이 잘 알려져 있다.

[0261] 가변 영역의 어떤 영역 또는 영역들에서의 추가적인 돌연변이는 안정화된 단백질을 얻을 수 있다. 한 구현예로, 하나 또는 그 이상의 추가적인 돌연변이가 TCR α 사슬 또는 β 사슬의 CDR1, CDR2, HV4, CDR3, FR2, 및 FR3에 존재한다. 돌연변이 유발에 이용된 영역은 지시된 진화(directed evolution)에 의해 결정될 수 있으며, 여기서 결정 구조 또는 분자 모델이 관심 리간드(예를 들어, 항원)와 상호작용하는 TCR의 영역을 생성하는 데에 사용된다. 다른 실시예에서, TCR과 리간드 사이의 원하는 상호작용을 조작하기 위해 아미노산을 추가 또는 결실함으로써 가변 영역의 형태가 변할 수 있다.

[0262] *2) 펩타이드-변이체 MHC 복합체의 존재 또는 부존재 하에 세포 TCR 디스플레이 라이브러리의 스크리닝*

[0263] 본원에서는 내인성 TCR을 발현하지 않는 숙주 세포를 상이한 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조의 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환시켜 상이한 재조합 TCR을 그 세포 표면에 발현하는 세포들을 갖는 재조합 TCR 세포 라이브러리를 생성하고, 관심 펩타이드와 복합체를 이룬, 야생형 MHC 사슬의 변이체 MHC 분자로, 변이체 MHC 사슬은 공동수용체의 야생형 MHC 사슬의 친화성과 비교하여 감소된 친화성으로 공동수용체에 결합하는 것인 MHC 분자의 존재 하에 원하는 특성의 TCR을 발현하는 세포를 선별하고, 원하는 특성을 갖는 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조를 분리 및 동정하는 방법을 개시하고 있다.

[0264] 원하는 특성의 예시는, 원하는 펩타이드-변이체 MHC 복합체에 대한 고도의 선택성, 원하는 펩타이드-변이체 MHC 복합체에 대한 고도의 친화성 및 원하는 펩타이드-변이체 MHC 복합체 존재 하에 양성 기능성 판독값의 증명을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0265] *a)펩타이드-변이체 MHC I 복합체에 의한 TCR활성화*

[0266] 한 구현예로, 내인성 TCR을 발현하지 않는 숙주 세포를 상이한 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조의 라이브러리로 형질전환 또는 형질도입시켜 상이한 재조합 TCR을 그 세포 표면에 발현하는 세포들을 갖는 재조합 TCR 세포 라이브러리를 생성하고, 세포 라이브러리 내에서 원하는 펩타이드-변이체 MHC I 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 세포를 선별하고, 상기 MHC I 분자는 야생형 MHC I α 사슬의 변이체 MHC I α 분자로, 변이체 MHC I α 사슬은 공동수용체의 야생형 MHC I α 사슬의 친화성과 비교하여 감소된 친화성으로 CD8 공동수용체에 결합하는 것이며, 원하는 특성의 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조를 분리 및 동정하는 것을 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR(T cell receptor)이 분리 및 동정된다.

[0267] 원하는 특성의 예시는, 원하는 펩타이드-변이체 MHC 복합체에 대한 고도의 선택성 또는 고도의 친화성을 갖는 TCR(T cell receptor)을 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다.

[0268] 한 구현예로, 재조합 TCR은 원하는 펩타이드-변이체 MHC I 복합체의 존재 하에, 예를 들어 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템의 활성화인, TCR 활성화 기능 판독값을 측정함으로써 선별될 수 있다.

[0269] 한 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC I 복합체는 무세포(cell free) 펩타이드-MHC I 복합체이다. 한 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC I 복합체는 2량체, 4량체 또는 다량체이다. 한 구현예로, 원하는 펩타이드-MHC I 복합체는 예를 들어 포유류 세포, 효모 세포 또는 곤충 세포인, 세포 표면에 발현된다. 한 구현예로, 포유류 세포는 T2세포이다.

[0270] 한 구현예로, 변이체 MHC I α 사슬은 HLA-A2 α 사슬의 변이체이다. 한 구현예로, 변이체 MHC I 분자는 CD8 공동수용체에 결합을 약화 또는 차단하는 MHC I α 사슬의 α 3영역의 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 변이체 MHC I 분자는 성숙 단백질(mature protein) 서열에 따른 넘버링으로 A245V 돌연변이 또는 D227K/T228A 돌연변이를 가질 수 있다.

[0271] α3 영역 돌연변이의 예시는, 예를 들어, Pittet *et al*. J Immunol. 2003 171(4):1844-9 ; Dutoit *et al*. J Immunol. 2003 170(10):5110-7 및 미국 특허공보 제 2004/0146520호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.

[0272] 한 구현예로, 원하는 펩타이드-변이체 MHC I 복합체는 무세포 펩타이드-MHC I 복합체이다. 한 구현예로, 원하는 펩타이드-변이체 MHC I 복합체는 2량체, 4량체 또는 다량체이다. 한 구현예로, 원하는 펩타이드-변이체 MHC I 복합체는 예를 들어 포유류 세포, 효모 세포 또는 곤충 세포인, 세포 표면에 발현된다. 한 구현예로, 포유류 세포는 T2세포이다.

[0273] *b) 펩타이드-변이체 MHC II 복합체에 의한 TCR 활성화*

[0274] 한 구현예로, 내인성 TCR을 발현하지 않는 숙주 세포를 상이한 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조의 라이브러리로 형질도입 또는 형질전환시켜 상이한 재조합 TCR을 그 세포 표면에 발현하는 세포들을 갖는 재조합 TCR 세포 라이브러리를 생성하고, 세포 라이브러리 내에서 원하는 펩타이드-변이체 MHC II 복합체의 존재 하에 원하는 특성을 갖는 세포를 선별하고, 상기 MHC II 분자는 야생형 MHC II β 사슬의 변이체 MHC II β 분자로, 변이체 MHC II β 사슬은 공동수용체의 야생형 MHC II의 β 사슬의 친화성과 비교하여 감소된 친화성으로 CD4 공동수용체에 결합하는 것이며, 원하는 특성의 재조합 TCR을 코딩하는 발현 구조를 분리 및 동정하는 것을 포함하는, 원하는 특성을 갖는 TCR(T cell receptor)이 분리 및 동정된다.

[0275] 한 구현예로, 변이체 MHC 클래스 II β 사슬은 변이체 MHC II의 CD4에 대한 결합을 약화 또는 소거시키는 β2 도메인의 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다(Rolf Li-Yun KonigHuang & Ronald N. Germain (1992) Nature 356, 796-798, 본원에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다).

[0276] 원하는 특성의 예시는, 원하는 펩타이드-변이체 MHC II복합체에 대한 고도의 선택성 또는 고도의 친화성을 갖는 TCR(T cell receptor)을 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다.

[0277] 재조합 TCR은 원하는 펩타이드-변이체 MHC II복합체의 존재 하에, 예를 들어 하나 또는 그 이상의 리포터 시스템의 활성화인, TCR 활성화 기능 판독값을 측정함으로써 선별될 수 있다.

[0278] 한 구현예로, 원하는 펩타이드-변이체 MHC II 복합체는 무세포 펩타이드-MHC II 복합체이다. 한 구현예로, 원하는 펩타이드-변이체 MHC II 복합체는 2량체, 4량체 또는 다량체를 포함한다. 한 구현예로, 원하는 펩타이드-변이체 MHC II 복합체는, 예를 들어 포유류 세포, 효모 세포 또는 곤충 세포인, 세포 표면에 발현된다. 한 구현예로, 포유류 세포는 APC(antigen-presenting cell)이다.

[0279] V. 실시예

[0280] 하기의 실시 예는 본 발명의 특정 구현예를 예시하고 설명하기 위한 것이다. 그러나, 청구항의 범위는 여기에 설명된 예에 의해 어떤 방식으로도 제한되지 않는다. 개시된 구현예에 대한 다양한 변경 및 수정은 당 업계의 통상의 기술자에게 자명하며, 이러한 변경 및 수정은 벡터 패키징(packaging), 세포주와 관련된 것 및/또는 발명의 사상 및 첨부된 청구범위의 범위를 벗어나지 않고 이루어지는 방법을 포함하지만 여기에 한정되지는 않는다.

[0281] 본 발명의 실시는 달리 지시가 없는 한, 당 업계의 통상적인 분자생물학적 및 면역학적 기술을 사용한다. 이러한 방법들은 통상의 기술자에게 자명하며, 다음의 문헌에서 충분히 설명되어 있다 : 예를 들어, Bailey, J. E. and Ollis, D. F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986; Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1991-2015), including all supplements; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2015), including all supplements; Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); and Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). 본원에서 그 내용 전체가 참고문헌으로 포함된다.

[0282] 실시예 1 : TCR 디스플레이에 적합한 뮤린 T 세포주(murine T cell line)의 제조

[0283] TCR 디스플레이를 위한 T 숙주세포주의 발달을 위해, MTCD8(murine thymoma derived TCR negative mouse CD8) 세포주가 시작점으로 사용되었다. MTCD8 세포는 SF-IMDM(Amimed) 배지에 2% FCS(fetal calf serum, Amimed)과 0.1% 베타-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol)을 보충하여, 삼각 플라스크(멀티트론 표준 배양기, 80 rpm, INFORS HT) 또는 필터 캡 셀 배양 플라스크(Cellstar) 에서 37° C 10% 이산화탄소 조건 하에 배양되었다.

[0284] MTCD8 세포주는 하기에 설명한 것과 같이, 포유류 TCR 디스플레이를 위한 수용체 세포주를 생성하기 위해 변형되었다.

[0285] *1) 인간-마우스 키메릭 CD8을 발현하는 MTCD8-유래 세포주의 제조*

[0286] MTCD8 세포에서 인간 TCR을 발현하게 하기 위해, CD8 α 및 β 사슬들은 MTCD8 세포에서 키메릭 단백질로 발현되었으며, 이 단백질은 인간 CD8 세포외 영역과 마우스 CD8 막 관통 영역과 세포내 영역을 융합한 것을 포함한다. 결과물인 키메릭 CD8 α (chiCD8α) 및 CD8β (chiCD8β)은 각각 서열번호 1 및 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0287] 간략하게, chiCD8α과 chiCD8β 유전자들은 각각 복제 불가능한(replication-incompetent) 레트로바이러스 입자에 각각 패키징되었다. HEK 293 세포(ATCC)는 세 개의 각각 다른 벡터로 함께 형질전환되었다 : gag-pol 유전자를 코딩하는 pVPack 벡터(pVPack vector system, Stratagene), PVC 211 env gene을 코딩하는 두 번째 벡터 및 키메릭 CD8α 또는 CD8β를 코딩하는 레트로바이러스의 벡터. 형질전환은 FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Applied Science)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 이루어졌다. 생성된 레트로바이러스 상청액(supernatant)은 2일 내지 3일 이후 수확되어 MTCD8 세포 형질도입에 직접 사용되었다.

[0288] 키메릭 CD8α와 CD8β를 발현하는 MTCD8 세포(MTCD8 chiCD8αβ+)는 항-인간 CD8α FITC (eBioscience, Cat. No.: 11-0086)와 항-인간 CD8β APC (BD Biosciences, Cat. No.: 641058)를 이용하여 FACS (fluorescence-activated cell sorting)를 통해 농축(enrich)하였다. BD FACSAria I 또는 II와 FACSDiva software(Becton-Dickinson)를 이용하여 FACS를 수행하였다. FACS 농축의 각 단계는 세포 1.0×10^6 개당 조정된 양의 FITC- 또는 APC-라벨된 항체를 이용하여, 30분간 4° C에서 수행하였다. MTCD8 세포에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 비특이적 결합자를 찾아내기 위해, 키메릭 CD8을 발현하지 않는 MTCD8 세포가 사용되었다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2% FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다. 적절한 농축 단계를 거친 후, MTCD8 chiCD8αβ+을 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 검출할 수 있게 되었다.

[0289] *2) MTCD8세포 또는 그 유도 세포로부터 마우스의 CD8 감소*

[0290] MTCD8 세포 또는 상기에서 생성된 키메릭 CD8을 발현하는 MTCD8 세포를 FACS를 이용하여 분류하여, 마우스 CD8α 또는 CD8β를 발현하지 않는 세포들을 농축시켰다. 항-마우스 CD8α APC (BD Biosciences, Cat. No.: 561093), 항-마우스 APC CD8β PE(BD Biosciences, Cat. No.: 550798), 항-인간 CD8α PE(eBioscience, Cat. No.: 12-0086) 및 항-인간 CD8β APC(BD Biosciences, Cat. No.: 641058)와 같은 항체를 사용하였다. BD FACSAria I 또는 II와 FACSDiva software(Becton-Dickinson)를 이용하여 FACS를 수행하였다. FACS 농축의 각 단계는 세포 1.0×10^6 개당 조정된 양의 PE- 또는 APC-라벨된 항체를 이용하여, 30분간 4° C에서 수행되었다. MTCD8 세포 또는 유도체에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2 % FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다.

[0291] 적절한 농축 단계를 거친 후, 마우스 CD8을 발현하지 않는 MTCD8을 유세포 분석에 의해 검출할 수 있게 되었으며 (MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- 및 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+) 단일 T세포는 96-웰 플레이트(well plates)에 분류되었다. 이 단일 T세포들은 일 주일 정도 이내에 T 세포 클론으로 자라났으며, 이 클론의 세포들은 마우스 CD8을 그들 표면에 더 이상 발현하지 않았다.

[0292] 이어서, 이들 단일 세포 클론을 마우스 CD8α 및 CD8β의 표면 발현의 결여 및 적용 가능한 경우 키메릭 CD8α 및 CD8β의 양성 표면 발현을 확인하기 위해 유세포 분석하였다. 유세포 분석은 96-웰 플레이트(Cellstar)에서 수행하였다. 모든 유세포 분석 데이터는 FlowJo 소프트웨어(Treestar)를 이용하여 분석하였다.

[0293] *3) 형질도입효율, APC 백그라운드, 시그널링 능력에 따른 클론의 선별*

[0294] 본 실시예에서는, (i) MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+과 (ii) MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- 의 클론 중, (i) 높은 형질 도입 효율, (ii) 낮은 APC 백그라운드 및 (iii) 강한 TCR-매개 시그널링 능력과 같은 특징을 갖는 적합한 클론들이 선택되었다.

[0295] 간략하게, MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+세포 및 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- 세포들은 레플리카 플레이트(replica plate)로 만들어진 후 키메릭 TCR C58 (MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ chiC58αβ+ and MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- chiC58αβ+)의 α및 β 사슬을 발현하도록 형질 도입되었다. C58은 미국특허 제 8,367,804호(여기서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)의 c58c61을 말하는 것으로, HLA-A*0201에서 NY-ESO-1로부터 유래한 펩타이드 특이적인 TCR이다. C58은 인간 가변 영역이 뮤린 비가변 영역과 융합하여, 적절한 앵커링과 뮤린 CD3과의 상호작용 및 적절한 뮤린 시그널링 경로 유발을 보장하는 키메릭 TCR로 발현되었다. 키메릭 C58의 α와 β 사슬은 각각 서열번호 7 및 8의 아미노산을 포함한다. 형질도입된 세포들을 30분 간격으로 4° C에서, 세포 1.0×10^6 개당 조정된 양의 항-마우스 TCR PE를 이용하여 염색하였다. MTCD8 세포 또는 유도체에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 비특이적 결합자를 찾아내기 위해, TCR 음성인 MTCD8 세포를 사용하였다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은

2 % FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다. 유세포 분석은 FACSCalibur에 의해 수행되었고 데이터는 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석되었다. 대부분의 클론은 형질도입 이후 TCR 발현에 0-30%의 양성을 보였다. 형질도입 효율이 높은 클론(TCR 발현 양성이 20-30%인 것)과 APC 백그라운드 염색이 낮은 것들이 선별되었다(데이터는 제시하지 않음).

[0296] 상기 생성한 것과 같은 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ chiC58αβ+과 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- chiC58αβ+ 세포들을 활성화한 후 강한 TCR-매개 시그널링 능력을 갖는 클론을 동정하기 위해 IL-2 발현을 테스트하였다. 간략하게, 세포들은 플레이트에 결합된 항-CD3 항체(eBioscience, Cat. No.:16-0032)와 가용성(soluble) 항-CD28 항체(eBioscience, Cat. No.: 16-0281)에 의해 활성화되었다. 상청액을 수확하여, 마우스 IL-2 ELISA 키트(eBioscience, Cat. No.: 88-7024)를 사용하여 IL-2 발현을 테스트하였다. 도 1은 한 테스트에서 각각의 클론의 예시적인 IL-2 생성 데이터를 나타낸다. IL-2 생성을 강하게 나타낸 클론만을 선별하였다.

[0297] 선별된 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ 클론은 AK-D10이라고 이름붙였으며, 선별된 MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- 클론은 LOT-D08이라고 이름붙였다.

[0298] *4) AK-D10 세포에서 키메릭 DMF4와 DMF5의 발현*

[0299] 다음으로, HLA-A*0201에서 MART-1 반응성 TCR인 키메릭 DMF4 및 DMF5가, 상기에서 생성한 AK-D10 세포(MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+)에서 발현되었다. DMF4와 DMF5 TCR은 미국특허 제8,088,379호(여기서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다)에 설명되어 있는 것이다. DMF4와 DMF5는 적절한 뮤린 CD3과의 상호작용과 뮤린 시그널링 경로 유발을 보장하는 인간 가변 영역과 뮤린 비가변 영역이 융합한 키메릭 TCR로 발현되었다. 키메릭 DMF4의 α 및 β 사슬은 각각 서열번호 9 및 10의 아미노산 서열을 포함한다. 키메릭 DMF5의 α 및 β 사슬은 각각 서열번호 11 및 12의 아미노산 서열을 포함한다. 키메릭 DMF4 또는 DMF5 TCR α 및 β 사슬 유전자는 각각 복제 불가능한 레트로바이러스 입자에 각각 패키징되었다. HEK 293 세포(ATCC)는 세 개의 각각 다른 벡터로 함께 형질전환되었다 : gag-pol 유전자를 코딩하는 pVPack 벡터(pVPack vector system, Stratagene), PVC 211 env gene을 코딩하는 두 번째 벡터 및 키메릭 CD8α 또는 CD8β 사슬을 코딩하는 레트로바이러스의 벡터. 형질전환은 FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Applied Science)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 이루어졌다. 생성된 레트로바이러스 상청액은 3일 이후 수확되어 AK-D10 세포 형질도입에 직접 사용되었다.

[0300] 키메릭 DMF4 또는 DMF5를 발현하는 AK-D10 세포(AK-D10 chiTCRαβ+)들은 HLA-A*0201 Mart-1 (ELAGIGILTV) (서열번호 30) 4량체 PE (MBL, Cat. No.: T01008) 및 햄스터 항-마우스 TCR β 사슬 항체 APC(BD Biosciences, Cat. No.: 553174)를 사용하여 FACS에 의해 농축되었으며, BD FACSAria I 또는 II와 FACSDiva softare(Becton-Dickinson)를 사용하여 FACS를 수행하였다. FACS 농축의 각 단계는 세포 1.0×10^6 개당 조정된 양의 PE- 또는 APC-라벨된 항체를 이용하여, 30분동안 4° C에서 수행되었다. AK-D10 세포에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커 BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 비특이적 결합자를 찾아내기 위해, TCR 음성인 AK-D10 세포를 사용하였다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2 % FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다.

[0301] 적절한 농축 단계를 거친 후, DMF4 또는 DMF5를 발현하는 AK-D10 세포는 유세포 분석에 의해 검출할 수 있게 되었다. 도 2A는 PE-라벨링된 HLA-A*0201 Mart-1 4량체와 APC-라벨링된 항-TCR β사슬 항체를 공동 염색한 것이다. DMF5가 DMF4보다 높은 친화도를 보인다는 사실과 일치하게, 유사한 TCR 발현 레벨 하에서, 키메릭 DMF4를 발현하는 세포들보다 키메릭 DMF5를 발현하는 세포들이 펩타이드-MHC 4량체에 더 강한 결합력을 보였다.

[0302] *5) TCR/펩타이드-MHC 상호작용과 TCR-매개 시그널링 세기 간의 상관관계*

[0303] 본 실시예에서는, 상기에서 제조한 키메릭 DMF4 또는 DMF5를 발현하는 AK-D10 세포들을 펩타이드-MHC 복합체를 이용하여 활성화시킨 후 IL-2 생성을 테스트하였다. DimerX(BD Biosciences, Cat. No.: 551263)는 마우스 IgG_1의 VH 영역과 융합된 3개의 세포외 MHC(major histocompatibility complex) class I HLA-A2 영역으로 구성된 융합 단백질이다. DimerX는 HLA-A2에 제한된 임의의 펩타이드로 로딩할 수 있다. 펩타이드 로딩은 DimerX와 필요한 펩타이드를 37° C에서 밤새 인큐베이션하여 이루어진다.

[0304] 키메릭 DMF4 또는 DMF5를 표면에 발현하는 AK-D10 세포들은 Mart-1 펩타이드 ELAGIGILTV(서열번호 30)를 다른 농도(2 μg/ml, 1 μg/ml, and 0.5 μg/ml)로 로딩한 DimerX를 사용하여 활성화된다. 간략하게, 96-웰 플레이트에 DimerX/펩타이드 복합체를 코팅하여 37° C에서 3시간 인큐베이션한 후, PBS로 세척한다. 이어서, 키메릭 DMF4 또는 DMF5를 발현하는 1×10^5 AK-D10 세포들을 150 μl의 SF-IMDM에 다시 현탁(suspend)한 후, 96-웰 플

레이트에 첨가한다. 밤새 인큐베이션한 후, 상청액의 IL-2 발현을 마우스 IL-2 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다(eBioscience, Cat. No.: 88-7024). 키메릭 DMF4(도 2B) 또는 키메릭 DMF5(도 2C)를 발현하는 AK-D10 세포에서, DimerX/펩타이드 복합체는 용량 의존적인 IL-2 생성을 유도했다. 아무 펩타이드도 가지고 있지 않은 DimerX 자체는 음성 대조군(negative control)으로 사용되었다.

[0305] 위에 설명한 어세이와 유사하게, 어세이에서 키메릭 DMF4, DMF5, 또는 C58을 발현하는 AK-D10 세포들을 DimerX/펩타이드 복합체를 사용하여 활성화하였고 ICS(intracellular cytokine staining)를 이용하여 IL-2와 TNFα 생성을 테스트하였다. 간략하게, 염색 5시간 전, 세포에 모넨신(monensin)을 처리하였다(eBioscience, Cat. No.: 00-4505). 이어서 세포를 고정하고 제조업자의 지시에 따라 세포내 염색을 위해 Cytofix-Cytoperm(BD Biosciences, Cat. No.: 554714)으로 침투시켰다. 유세포 염색은 세포 1.0×10^6 개당 조정된 양의 항-마우스 IL-2 PE(eBioscience, Cat. No.: 12-7021) 또는 항-마우스 TNFα PE(eBioscience, Cat. No.: 12-7321)를 이용하여, 30분 동안 4° C에서 수행되었다. AK-D10 세포에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. DimerX/펩타이드 활성 없이 키메릭 TCR을 발현하는 AK-D10 세포들은 음성 대조군으로 사용되었다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2 % FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다. 그 후 세포들을 유세포 분석하였다. TCR 양성 세포들을 게이트하여(gated) TCR+ IL-2+ 및 TCR+ TNFα+ 세포들의 비율은 FlowJo 소프트웨어(Treestar)를 이용하여 측정되었다. ELISA에서 검출된 IL-2 생성과 일치하게, 키메릭 TCR을 발현하는 세포들은 DimerX/펩타이드 복합체를 이용한 활성화 이후, 양성 IL-2(도 2D) 및 TNFα(도 2E) 세포내 염색을 나타냈다.

[0306] 실시예 2: 세포 TCR 디스플레이 라이브러리 생성

[0307] 실시예에서 설명된 스크리닝 시스템은, 포유류 세포, 예를 들어 MTCD8 세포나 그 유도체에서 레트로바이러스 매개의 완전한 길이의(full-length) TCR 발현을 기초로 한다. TCR α와 β 사슬 라이브러리는 연속적인 형질도입(consecutive transduction)에 의한 별개의 벡터에 의해 발현된다. 레트로바이러스 형질도입(transduction)은 포유류 세포의 안정적인 유전자 변형을 위한 효율적인 방법이다. 세포당 형질도입된 α 또는 β 사슬의 수는 각 세포가 평균적으로 생성하는 바이러스성 역가(titer)의 MOI(multiplicity of infection)를 변경하여 조절될 수 있다. 예를 들어, 단 하나의 α 및/또는 β 사슬, 하나의 α 사슬 및 다수의 β 사슬, 하나의 β 사슬 및 다수의 α 사슬들, 또는 다수의 α 및 β 사슬들이 포함될 수 있다. IRES(Internal ribosome entry site)를 통해, 관심 유전자(TCR α 또는 β 사슬)의 발현을 리포터 유전자에 전사적으로(transcriptionally) 결합시키는 TCR α 또는 β 사슬의 별개의 레트로바이러스성 발현 벡터가 생성된다. 예시적인 리포터 유전자들은, 인간 CD6과 CD7과 같은 표면 단백질, 및 퓨로마이신(puromycin) 저항성 유전자와 같은 항생제 저항 유전자를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0308] *1) 높은 다양성을 갖는 인간 TCR 유전자 라이브러리의 생성*

[0309] 인간 공여자로부터 온 백혈구 성분(leukapheresis materials)을 MACS 또는 이와 유사한 방법에 의해 분리하여 얻은 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포들은 TCR α 또는 β 유전자 라이브러리를 만드는 데에 사용되었다. 세포의 출처는 건강한 성인 공여자와 제대혈(cord blood)을 포함하였다. 그 밖의 세포 공급원은 태아 흉선(fetal thymus), 암 환자로부터 분리된 TILs(tumor infiltrating lymphocytes), 백신을 맞은 환자로부터의 PBMCs 등이 포함될 수 있다.

[0310] 분리된 T 세포로부터 전체 mRNA를 얻었고, cDNA는 SMARTer® RACE 5’/3’ cDNA 합성 키트를 이용하여 합성하였다(Clontech Laboratories, Cat. No.: 634860). 목표치인 적어도 1.0×10^9 집락형성단위(Colony-forming units)의 높은 복잡성(complexity)을 달성하기 위하여, 라이브러리 형성(library construction)은 α 또는 β 사슬 패밀리마다 각각 생성되었다. TCR α 또는 β 패밀리의 가변 영역을 패밀리-특이적 프라이머로 PCR 증폭하고, 제한 효소로 절단한 후, 레트로바이러스성 TCR α 또는 β 발현 벡터에 라이게이션시켰다. 빈(empty) 레트로바이러스성 TCR α와 β 사슬 발현 구조체는, α 또는 β 사슬의 비가변 영역 코딩 정보와 제한효소에 이웃한 비가변 영역 업스트림(upstream)에 코딩하지 않는 서열(non-coding stuffer sequence)을 포함하는데, 이것은 인간 또는 합성 유래의 TCR α 및 β를 코딩하는 구역을 클로닝함으로써 대체할 수 있다. 뮤린 숙주세포주가 인간 TCR을 디스플레이하는 경우, TCR 발현 벡터는 뮤린 TCR 비가변 영역과 융합한 인간 TCR 가변 영역을 포함하도록 구성되어, 적절한 앵커링과 뮤린 CD3과의 상호작용, 적절한 뮤린 시그널링 경로 유발을 보장한다. 선별된 TCR들로부터 유래한 단일 TCR α와 β 코딩 구역은, 세포 표면에 특정한 재조합 TCR을 발현하는 세포를 만들도록 클로닝되었다. 뿐만 아니라, 이 방법은 TCR α 및 β 사슬 특이적 프라이머를 사용한 인간 T 세포 공급원으

로부터의 RT-PCR을 통해 분리되었거나, 유전자 합성을 통해 생성된, TCR α 및 β 사슬의 다양한 레파토리를 디스플레이하는 세포들을 생성하였다.

[0311] *E.coli* DH10B는 라이게이션된 TCR α 또는 β 사슬 라이브러리로 형질전환하여 LB(Amp) 한천 플레이트(agar plate)에 플레이팅하였다. 박테리아 콜로니를 수집하여 플라스미드 DNA를 정제하였다. 모든 TCR α 또는 β 패밀리의 DNA 표본을 모았다. NGS(Next-generation sequencing)을 수행하여 결과물인 TCR α 또는 β 사슬 라이브러리의 품질을 제어하였다. NGS 분석에서, 다중화 작업에서 Illumina의 MiSeq을 사용하는 시퀀싱 반응에, 정제된 PCR 산물 1-3μg을 사용하였다. 얻어진 시퀀스 데이터는 완전한 TRAV-, TRAJ-, TRBV-, TRBD-, TRBJ-판독을 위해 필터링되었고, CD-HIT 응용 프로그램 세트를 사용하여 클러스터 분석이 수행되었다(www.cd-hit.org). 시퀀싱된 전체 유전자 대비 TCR α 또는 β 패밀리의 상대적인 발현 비율이 분석되었다.

[0312] *2) 높은 다양성을 갖는 인간 TCR 세포 라이브러리의 제조*

[0313] 뮤린 흉선종 유래의 TCR 음성 세포주 MTCD8과 그 유도체(예를 들어, 위에서 생성된 LOT-D08과 AK-D10세포)가, MLV 외피를 갖는 외생(ecotropic) 레트로바이러스 분자에 의한 높은 형질 도입율에 부분적으로 기초하여, 인간 TCR 세포 라이브러리의 숙주세포주로 선정되었다. MTCD8 세포들은 내인성 마우스 TCR 발현이 결핍되어 있으며, 인간 TCR의 발현, 결합(pairing), 접힘, 시그널링 및 표면 디스플레이에 필요한 모든 세포 구성요소를 포함하고 있다. 뿐만 아니라, 이 세포들은 현탁액(suspension)에서도 자라고, 증배 시간이 약 10-12 시간으로 매우 짧아 빠르게 증식(expansion)하는 것이 가능하다.

[0314] 이어지는 실시예에 예시되는 것은 TCR 세포 라이브러리를 두 단계로 생성한 것이다 : TCR β 사슬은 1단계(phase)에, TCR α 사슬은 2단계에 도입되었다.

[0315] *3) 레트로바이러스 입자 제조*

[0316] TCR α 및 β 사슬 유전자 라이브러리는 복제 불가능한 레트로바이러스 입자에 각각 별개로 패키징되었다. HEK 293 세포(ATCC)는 세 개의 각각 다른 벡터로 함께 형질전환되었다 : gag-pol 유전자를 코딩하는 pVPack 벡터(pVPack vector system, Stratagene), PVC 211 env gene을 코딩하는 벡터 및 레트로바이러스성 TCRα-IRES-인간 CD7 또는 TCRβ-IRES-인간 CD6 발현 벡터. 형질전환은 FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Applied Science)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 이루어졌다. 생성된 레트로바이러스 상청액은 3일 뒤 수확되어, 바로 사용되거나 -80° C에서 냉동 보관되었다. MTCD8 세포에 형질도입 테스트를 수행하여 인간 CD7 또는 CD6을 세포 표면에 발현하는 형질도입된 MTCD8 세포의 수를 측정함으로써, TCR α 또는 β 사슬의 레트로바이러스성 입자 스톡의 레트로바이러스성 입자 역가를 실험적으로 결정하였다. 적정 결과에 따라, 형질도입된 세포 당 TCR α 및 β 사슬의 원하는 평균 카피수를 산출하는 희석 정도를 계산하였다. 대략 5% 또는 그보다 적은 형질도입율은 >90%의 α or β 사슬의 단일 카피 도입을 일으킨다. 이어서, 30° C에서 3시간 동안 MTCD8 세포 또는 그 유도체를 레트로바이러스 상청액으로 스핀-형질도입(spin-transduce)하였다. TCR α 및 β 사슬 유전자 라이브러리는 또한 별개로 연속적으로 형질도입되었다. 형질도입은 6-웰 플레이트(Cellstar)에서 플레이트 당 1.5 × 10^8 개의 세포로, Eppendorf 원심분리를 이용하여 수행되었다. 형질도입 이후, 세포들을 1ml당 3.0 × 10^6 개 세포 농도로 삼각플라스크로 옮겨, 24시간 동안 증식(expand)시켰다.

[0317] *4) TCR β 사슬의 형질 도입 (1단계)*

[0318] 본 실시예에서는, 제대혈(최대 3 x 10^8 개의 다른 β사슬)로부터, a) 생식세포계열(germ line)과 100% 일치하며 b) 인간 말초혈액(peripheral blood)의 일반적인 분포와 일치하는 비율로 모든 알려진 기능적 β 유전자 패밀리를 나타내는 TCR β 사슬을 선별하였다. TCRβ-IRES-인간 CD6 레트로바이러스성 발현 벡터를 복제 불가능한 레트로바이러스 입자에 패키징하여, MTCD8 세포 또는 그 유도체에 형질도입하는 데 사용하였다. 성공적인 β 사슬 유전자 도입(gene transfer)과 이어지는 발현은 세포 표면의 인간 CD6 존재로 증명되었다. 형질도입 이후, 약 6%의 세포는 인간 CD6을 발현하였으며, 이는 단일 β 사슬 유전자의 성공적인 도입과 발현을 나타낸다. TCR β 사슬 발현 세포들은 FACS를 이용하여 CD6 양성 세포를 농축함으로써 분리되었다. 분류 후, TCR β 사슬 발현 세포들을 회수하여 2일 간 증식(expand)시켰다. 증식된 TCR β 사슬 세포 라이브러리는 바로 사용 가능한 용량으로 냉동되었다. CD6 이외의 셀렉션 마커들도 사용될 수 있다.

[0319] *5) TCR α 사슬의 형질 도입 (2단계)*

[0320] TCR α 사슬 유전자 라이브러리는 2단계에 도입되었다. TCR β 사슬 구조체와 유사하게, TCR α 유전자들은 IRES에 결합된 인간 CD7 마커 유전자와 공동 발현되었다. 인간 CD7 마커는 빈 MTCD8 세포에서 생성된 레트로바

이러스성 입자 함유 상청액의 적정을 허용하여, 5% 미만의 형질도입된 세포들이 TCR α 사슬을 발현하도록 한다. 이러한 조건 하에, 약 90%의 세포가 하나의 도입된 TCR α 사슬을 포함한다.

[0321] TCR α-사슬 라이브러리의 형질 도입 후, 항-마우스 TCRβ-PE 항체를 사용하여 세포를 염색하고 유세포 분석하였다. TCR-발현 세포들은 항-바이오틴 마이크로비드를 이용한 MACS(magnetic activated cell sorting)에 의해 분리되었다. 각 TCA α 사슬 형질도입에서 FACS 또는 MACS 후 약 3.0-5.0 x 10^9개의 살아있는 세포가 회수되었다. 이 세포들의 85% 이상이 표면에 TCR을 발현하였다. 세포들을 회수한 후 2일 간 증식시켰다.

[0322] *6) 세포 라이브러리의 품질 관리(Quality control)*

[0323] 마지막으로, 증식 단계의 끝부분에, 모든 세포를 모아, 하나의 bag 당 약 1.0×10^9 개의 생존 가능한(viable) 세포를 cryobag에 넣어 -80° C에서 냉동하였다.

[0324] 형질도입당 10개의 단일 세포 클론의 게놈 DNA로부터 통합된 TCR α 또는 β 유전자 및 그 인접 벡터 영역을 증폭하고, PCR 산물을 바로 시퀀싱함으로써, 세포 당 하나의 TCR α 또는 하나의 TCR β 유전자 카피를 통합 한 세포의 비율을 분석하였다. TCR 산물이 분명하게 판독 가능한 TCR α 또는 β 유전자 서열을 산출한다면, 오리지날 세포에는 하나의 유전자 카피만이 존재한다고 결론내렸다. 공동으로 증폭된 공통 벡터 영역 이후 적어도 두 개의 상이한 TCR α 또는 β 유전자 서열의 중첩이 나타나는 경우, 그 세포 내에는 적어도 2개의 TCR α 또는 TCR β 카피가 존재한다고 결론내렸다. 이 분석을 통해, TCR 세포 라이브러리에서 숙주 세포 내에 TCR α 하나 및 TCR β 유전자 카피 하나만이 통합된 세포의 비율을 알 수 있었다.

[0325] *7) 높은 다양성을 갖는 뮤린 TCR 유전자 라이브러리의 제조*

[0326] 대안으로, TCR α 및 β 유전자 라이브러리는 동물로부터 분리된 TCR에 기초하여 생성될 수 있다(예를 들어, 관심 타겟에 면역화된 HLA-A2 트랜스제닉 마우스(mice)). 뮤린 TCR 유전자 라이브러리는 상기 서술한 인간 TCR 라이브러리와 비슷하게 생성될 수 있다. 이어서, TCR을 내인성으로 발현하지 않으면서 뮤린 TCR을 세포 포면에 디스플레이하는 세포를 함유하는 세포 라이브러리를 생성하는 비슷한 프로토콜이 이어질 수 있다.

[0327] 실시예 3: 펩타이드-MHC 복합체를 이용한 TCR 세포 라이브러리의 스크리닝

[0328] *1)스크리닝 프로토콜*

[0329] 재조합 펩타이드-MHC 복합체를 구입하거나 합성하여, 사용하기 전에 기능이 제대로 발휘되는지 품질확인을 하였다. 상기에서 생성된 TCR 세포 라이브러리는 FACSDiva 소프트웨어로 BD FACSAria I 또는 II를 사용하여 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)에 의해 라벨링(예를 들어,형광 라벨)된 펩타이드-MHC 복합체(예를 들어, MHC 4량체, MHC 덱스트라머(dextramers), 또는 펩타이드를 로딩하는 DimerX)를 사용하여 스크리닝하였다. 형광 라벨된 항-TCR 항체는 TCR 발현 레벨을 시각화하기 위하여 사용되었다. 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 먼저, 세포 1.0×10^6 개당 조정된 양의 형광 라벨된 MHC 테트라머 또는 DimerX/펩타이드 복합체를 이용하여 TCR 세포 라이브러리의 스크리닝을 30분간 4° C에서 수행되었다. 비특이적 결합자를 제거하기 위해, 첫 번째 스크리닝에서 양성을 나타낸 히트(hits)들은 조정된 양의 MHC 4량체와 음성 대조군 펩타이드 또는 펩타이드를 포함하지 않은 DimerX와, 1.0×10^6 개의 세포당 15분간 4° C 에서 인큐베이션되었다. 음성 대조군 펩타이드 또는 펩타이드를 포함하지 않은 DimerX와 MHC 4량체에 결합한 세포는 걸러져 나갔다(gated out). 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2 % FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300 rpm, 10분간 원심 분리하여 수행하였다.

[0330] 적절한 증량 단계를 거친 후, 관심 항원을 명확하고 특이적으로 인식하는 TCR을 발현하는 MTCD8 세포 또는 그 유도체의 집단은 유세포 분석에 의해 관찰되며, 단일 T 세포는 96-웰 플레이트에 분류하였다. 이 단일 T 세포들은 약 일주일 이내에 T 세포 클론으로 자라났다.

[0331] 이어서, 이 단일 세포 클론은 유세포 분석을 통해, 관심 항원에 결합하고 있으며 비특이적 백그라운드 결합을 하지 않는다는 것을 명확히 하였다. 또한, 이 단일 세포 클론에 발현된 TCR들의 시그널링과 다른 펩타이드-MHC 복합체와의 교차반응성(cross-reactivity)과 같은 다른 특성을 분석하였다.

[0332] 관심 펩타이드-MHC와의 결합에 기초한 TCR 발현 세포 스크리닝에 추가하여, 또한 관심 펩타이드-MHC 복합체의 존재 하에, 기능적 판독값(예를 들어, 활성화 마커의 발현, 시그널링 경로의 유발, 사이토카인(cytokine)의 생산, 칼슘 플럭스(flux), 세포 증식(proliferation) 및 리포터 어세이의 활성화)에 기초하여 TCR 발현 세포를 스

크리닝할 수 있다. 결합 스크리닝의 히트들은 기능 스크리닝의 히트와 비교하여, 관심 펩타이드-MHC 복합체에 특이적으로 결합하고 관련된 시그널링 경로를 개시하는 TCR을 확인할 수 있다.

[0333] 제대혈 또는 태아 흉선의 T세포로부터 유래한 TCR 라이브러리에서 자가 항원에 대한 TCR을 확인할 수 있다. 미성숙 T 세포가 많이 존재한다는 것이 그 이유의 일부일 수 있다. 이 세포들은 무수히 많은 자가 항원에 대한 TCR을 발현하며, 아직 면역계 성숙의 일부분인 T 세포 내성 체크포인트에서 제거되지 않았다. 관심 펩타이드-MHC와의 결합에 기초한 2단계 스크리닝과, 그 후의 펩타이드가 없는 MHC 분자 또는 음성 대조군 펩타이드를 가진 MHC에 대한 역 스크리닝에 의해, 비특이적 반응을 하지 않는(non-poly-reactive) TCR들이 농축된다.

[0334] 자가반응하는 TCR의 자연적인 발생에 이어, TCR 라이브러리로부터 자가반응 TCR을 분리하는 가능성(likelihood)에 두 번째 메커니즘이 기여할 수 있다. 상기 서술한 것과 같이, TCR 라이브러리가 생성되면, 인간 공여자로부터 온 T 세포에 나타나 있는 오리지날 동족(cognate) TCR α 및 β 쌍이 분리되며, 각 α 또는 β 사슬은 비-오리지날(non-original) 다수의 상보적인 β 또는 α 사슬과 각각 다시 쌍을 이룬다. 이 방식은 새로 발현되는 TCR이 상이한 친화성 또는 자가-항원에 보이는 특이성과 같은 변형된 특성을 가질 수 있게 한다.

[0335] 까다로운 항원-특이적 스크리닝 방법과 결합하여 고도의 다양성을 갖는 TCR 라이브러리는 인간의 자가-항원 또는 자가 항원과 매우 유사한 항원을 타겟으로 하는 TCR의 분리 및 확인을 가능하게 한다.

[0336] *2) TCR α 및 β 사슬 유전자의 회수*

[0337] TCR α 및 β 유전자들은 각각의 T 세포 클론으로부터 플레이트-기초의(plate-based) PCR 증폭에 의해 회복된다 : T 세포들은 용해(lyse)되고 TCR α 및 β 사슬 가변 영역의 PCR이, 게놈 DNA의 사전 분리 없이, 세포 용해액에서 바로 각각 수행된다. TCR α 또는 β 사슬을 코딩하는 증폭된 PCR 산물은, 그 후 Type IIS 제한효소를 사용하여 한 번의 제한/라이게이션 단계를 거쳐 적절한 발현 벡터에 풀(pool)로 클로닝된다. 병행하여, PCR 산물도 시퀀싱하였다 : T세포 클론이 α 및 β 사슬의 단일 카피를 포함하고 있다면, 이 단계에서 믿을 만한 시퀀스 정보를 얻을 수 있었을 것이다. T 세포 클론이 2개 또는 그 이상의 통합된 TCR α 및/또는 β 사슬을 포함한 경우, 각 사슬은 표준 벡터(standard vector)에 클로닝하여 따로 시퀀싱하였다. 결과물인 라이게이션된 플라스미드 풀은 E.coli에 형질전환시켰고, DNA는 사전 플레이팅 없이 형질전환된 세포 풀로부터 미니프렙(miniprep)을 다량 수행하여 회수시켰다. 이 단계에서 확인된 TCR의 결합 친화도, 특이성, 시그널링 능력, 및/또는 다른 특성을 추가로 분석하였다.

[0338] *3) 대체 세포 라이브러리 구성*

[0339] 본원에서 개시하고 있는 것과 같은 MTCD8 유도체의 레트로바이러스성 형질도입에 의한 TCR 유전자 도입(gene transfer)의 높은 효율성은, 특정 용도로 사용자에 의해 정의된 다양한 유형의 세포 라이브러리의 생성을 가능하게 한다.

[0340] *4) 새로운(de novo) 스크리닝을 위한 멀티카피 TCR α 및/또는 β 사슬 라이브러리*

[0341] 감염 다양성을 변화시킴으로써, 수용체 MTCD8 세포 또는 유도체의 게놈에 통합된 TCR α 및 β 사슬 유전자의 평균 수는 조절될 수 있다. 이러한 방법은 다음과 같은 변형에 사용되었다.

[0342] 최대 수준의 TCR 다양성을 포괄하는 세포 라이브러리를 생성하기 위해, 라이브러리들은 세포마다 다수의 상이한 TCR α 사슬과 다수의 상이한 TCR β 사슬을 표현하도록 구성되었다. 주어진 세포의 TCR α 및 β 사슬들의 전부가 생산적으로 짝을 이루는 것은 아니며, 그로 인해 몇몇은 표면에 발현되지 않는다. 그렇지만, 세포마다 다양한 옵션을 제공함으로써, 형질도입된 세포 중 세포 표면에 최소한 하나의 기능성(functional) TCR을 갖는 비율은 증가하였다. 이 멀티카피 라이브러리 디자인은 두 가지 이점을 제공한다 : 첫째, 라이브러리 생성 과정이 더 효율적이다(더 적은 드롭아웃(droup-out)), 둘째, 결과물인 라이브러리의 TCR 다양성은 단일-카피 라이브러리에 비해 상당히 높을 수 있다. 잠재적으로 추가적인 장점은 동일 TCR을 T 세포 표면에 많이 발현하는 것을 감소시켜 일어나는 결합활성 효과(avidity effect)로, 이론상으로는 더 높은 친화도를 갖는 TCR 동정으로 이어질 수 있다.

[0343] 멀티카피 라이브러리를 사용하려면 주어진 T 세포 클론에서 어떤 TCR α 사슬이 어떤 β 사슬과 쌍을 이루는지 확인하는 두 번째 단계가 필요하다. 실시예와 같은 접근으로, α 및 β 쌍을 회수시키는 프로세스가 정해졌다 : 타겟-특이적인 결합을 보이는 단일 T 세포들을 분류하고, 양성 T 세포 클론도 같이 모았으며, 이렇게 모은 타겟 특이적 T 세포들로부터 온 TCR α 및 β 사슬 전부는 상기 서술한 것과 같은 회수 과정을 거쳐 회수시켰다. 또한 두 번째 세포 라이브러리는, 단일 카피 형식으로 복구된 TCR α 및 β의 훨씬 더 작아진 집합과 연결하여 생

성되었다. 더 작고 더 집중된 세포 라이브러리에 다시 TCR 스크리닝을 반복하였고, 관심 TCR들은 상기 서술한 것과 같은 단계를 거쳐 회수시켰다. 결합하여, 이 두 단계는 처음의 단일 카피 라이브러리를 사용하는 것과 비교하여 더 큰 TCR 다양성의 적용 범위를 허용할 것이다.

[0344] *5) 유도 선별(Guided selection)*

[0345] 유도 선별이란 원하는 특징을 가진 TCR(예를 들어, 마우스 TCR, 인간 환자로부터 분리된 TCR 또는 신규한 스크리닝에 의해 분리한 TCR)을 가지고 시작하여, 이어서 개별 사슬들을 교체하는 스크리닝 과정이다. 예시의 연구에 따르면, 원래의 TCR β 사슬은 원래의 TCR α 사슬을 TCR β 사슬 라이브러리와 함께 스크리닝함으로써 대체되었고, 이어서 선별된 TCR β 사슬을 다양한 TCR α 사슬 라이브러리와 함께 스크리닝하여 상보적인 새로운 인간 TCR α 사슬을 발견하였다(또는 그 반대). TCR α 및 β 사슬 유전자가 별도의 발현 라이브러리에 있다는 사실과, 레트로 바이러스 형질 도입 프로세스의 높은 효율로 인해, 모든 TCR 합성물에서 새로운 라이브러리를 신속하게 생성할 수 있다.

[0346] 실시예 4 : CD8 의존성 및 비의존성 스크리닝

[0347] CD8은 2량체를 형성하며, 한 쌍의 CD8 사슬로 구성되어 있다. CD8 α 사슬과 CD8 β 사슬로 구성된 CD8이 가장 일반적인 형태이다. CD8 α 사슬의 세포외 IgV-유사 영역은 MHC class I 분자의 α3 부분과 상호작용한다. 이러한 상호작용은 항원특이적 활성화 과정 동안 세포독성 T 세포의 TCR과 타겟 세포의 펩타이드-MHC 복합체가 더 긴밀하게 결합하도록 한다. T세포 활성화의 특이성은 펩타이드-MHC 복합체와 TCR의 상호작용에 달려 있다. CD4와 CD8 같은 공동수용체를 통한 신호나, 또는 CD28 및 CD80/CD86 같은 공동 자극 상호작용(co-stimulatory interactions)은 TCR 시그널의 규모 및/또는 지속 시간을 증가시키는 증폭제로 작용하며, 독립적으로 작용하지 않는다. 상이한 TCR들은 CD8 결합과 시그널링에 상이한 정도의 의존성을 보인다. 일반적으로, CD8-비의존성 TCR은 펩타이드-MHC 복합체에 높은 친화성을 갖는 경향이 있다. 어떤 TCR의 친화성을 높임으로써, 이 TCR에 의해 매개되는 T 세포 활성을 CD8-의존성에서 CD8-비의존성으로 변화시키는 것이 가능하다. 또한, CD8-비의존성은 치료법으로서 가용성 TCR을 개발하기 위한 바람직한 특징이다. 따라서 라이브러리 스크리닝과 클론 특성화 동안, 디스플레이 라이브러리/세포 클론 상의 CD8 발현을 조절하거나 없앰으로써 TCR 또는 TCR 라이브러리의 CD8 의존 수준을 조사할 수 있는 것이 중요하다. 이것은 동일한 세포 또는 세포 집단에서 CD8이 결합 강도와 특이성과, 그 결과 TCR과 MHC-펩타이드 복합체 간에 일어나는 세포내 시그널링 이벤트에 미치는 상대적 영향을 직접적으로 평가할 수 있게 해 준다.

[0348] 이런 스크리닝 시스템은 Cre/loxP 시스템을 이용할 수 있다. Cre 재조합 효소는 P1 박테리오파지(Bacteriophage)로부터 유래된 타이로신 재조합 효소(tyrosine recombinase enzyme)이다. 이 효소는 토포이소머라아제(topoisomerase) I과 유사한 메커니즘을 사용하여 두 DNA 인식 부위(loxP 부위들) 간에 일어나는 부위특이적 재조합을 촉진한다. 34 bp(base pair) loxP 인식 부위는 8 bp의 스페이서(spacer) 영역에 이웃하는13bp 앞뒤역순상동서열(palindromic sequence) 두 개로 구성된다. 동일한 방향을 향하는 두 loxP 부위 사이의 DNA는 원형 루프로 잘라질 것이다.

[0349] 본 실시예에 따르면, 막 관통 영역 및 세포질 영역에 이웃하여 loxP 부위를 포함하는 키메릭 CD8α 및 CD8β는 LOT-D08 세포에서 발현되었다. Cre-매개 재조합 시, 키메릭 CD8α 및 CD8β의 막 관통 영역과 세포질 영역은 잘리게 되고 결과적으로 숙주 T 세포는 막에 결합한 키메릭 CD8을 발현하지 않는다.

[0350] *1) loxP 부위에 이웃한 키메릭 CD8을 발현하는 LOT-D08 세포의 제조*

[0351] 마우스 CD8 막 관통 영역과 세포질 영역에 융합한 인간 CD8 세포외 영역을 포함하는 키메릭 CD8α 및 CD8β는 추가로 마우스 막 관통 영역과 세포질 영역에 이웃하는 두 개의 loxP자리를 포함하도록 변형되었다(chiCD8α^{flox} 및 chiCD8β^{flox}).

[0352] chiCD8α^{flox}및 chiCD8β^{flox} 유전자들은 각각 복제 불가능한 레트로바이러스 입자들에 별개로 패키징되었다. HEK 293 세포(ATCC)는 세 개의 각각 다른 벡터로 함께 형질전환되었다 : gag-pol 유전자를 코딩하는 pVPack 벡터(pVPack vector system, Stratagene), PVC 211 env gene을 코딩하는 두 번째 벡터 및 chiCD8αflox 및 chiCD8βflox 를 코딩하는 레트로바이러스성 발현 벡터. 형질전환은 FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Applied Science)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 이루어졌다. 생성된 레트로바이러스 상청액(supernatant)은 3일 이후 수확되어 LOT-D08 세포 형질도입에 직접 사용되었다.

[0353] chiCD8α^{flox}및 chiCD8β^{flox}를 발현하는 LOT-D08 세포(LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+)는 항-인간 CD8α FITC (eBioscience, Cat. No.: 11-0086)와 항-인간 CD8β APC (BD Biosciences, Cat. No.: 641058)를 이용하여 FACS (fluorescence-activated cell sorting, 형광 활성 세포 분류)를 통해 농축하였다. BD FACSAria I 또는 II와 FACSDiva software(Becton-Dickinson)를 이용하여 FACS를 수행하였다. FACS 농축의 각 단계는 세포 1.0 × 10^6 개당 조정된 양의 FITC- 또는 APC-라벨된 항체를 이용하여, 30분간 4° C에서 수행하였다. MTCD8 세포에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 비특이적 결합자를 찾아내기 위해, LOT-D08 세포가 사용되었다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2% FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다.

[0354] 이어서, 생성된 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포들을 유세포 분석하여 chiCD8α^{flox} 및 chiCD8β^{flox}의 표면 발현을 확인하였다. BD FACSAria I 또는 II와 FACSDiva software(Becton-Dickinson)를 이용하여 유세포 분석을 수행하였다. 모든 유세포 분석 데이터는 FlowJo 소프트웨어(Treestar)를 이용하여 분석하였다.

[0355] *2) chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포 내에서 Cre 유전자의 발현*

[0356] 상기에서 생성한 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포들은 Cre 재조합 효소를 코딩하는 발현 벡터로 형질도입되었다. Cre의 발현 후, 세포 클론들은 키메릭 CD8의 표면 발현 결핍을 확인하기 위해 유세포 분석되었다.

[0357] Cre 재조합효소 유전자는 복제 불가능한 레트로바이러스 입자들에 패키징되었다. HEK 293 세포(ATCC)는 세 개의 각각 다른 벡터로 함께 형질전환되었다: gag-pol 유전자를 코딩하는 pVPack 벡터(pVPack vector system, Stratagene), PVC 211 env 유전자를 코딩하는 벡터 및 Cre-IRES-퓨로마이신(puromycin) 저항성 유전자를 코딩하는 레트로바이러스성 벡터. 형질전환은 FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Applied Science)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 이루어졌다. 생성된 레트로바이러스 상청액(supernatant)은 3일 이후 수확되어 바로 사용되거나 -80° C에서 냉동되었다. LOT-D08 세포에 형질도입 테스트를 수행하고 형질도입된 LOT-D08 세포의 퓨로마이신 저항성을 측정함으로써 Cre 레트로바이러스성 입자 스톡의 레트로바이러스성 입자 역가를 실험적으로 결정하였다. Cre 재조합효소는 튜브 하나 당 5 × 10^5 개의 세포를 갖는 1.5ml Eppendorf 튜브에 도입되었다. 형질도입에 이어, 세포들은 1ml당 1 × 10^5의 세포 농도로 필터 캡 세포 배양 플라스크(Cellstar)에 옮겨졌고, 24시간 동안 37° C, 10% CO_2 조건 하에 선별 시작을 위해 퓨로마이신을 첨가하기 전에, 24시간 동안 증식하였다.

[0358] 항-인간 CD8α 및 항-인간 CD8β 항체를 이용하여 Cre를 발현하는 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포들(LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ Cre+)을 유세포 분석하여 이 세포들이 세포 표면에 키메릭 CD8을 발현하지 않는다는 것을 확인하였다. MTCD8 유도체에 대한 검출 항체의 Fc 영역의 백그라운드 결합을 제거하기 위해 Fc 수용체 블로커(BD Biosciences, Cat. No.: 553142)가 사용되었다. 라벨링 반응 사이의 모든 세척은 2% FCS가 함유 된 PBS (PAA)에서 4 ℃에서 300g, 5분간 원심 분리하여 수행하였다. 유세포 측정기(flow cytometer)데이터는 FlowJo 소프트웨어(Treestar)를 사용하여 분석하였다. 도 3에 나타난 것처럼, Cre 재조합 효소의 형질도입은 세포 표면의 CD8 발현을 효율적으로 제거하였다.

[0359] *3) TCR과 펩타이드-MHC복합체 결합의 CD8 의존성*

[0360] 다음으로, Cre 재조합효소 매개의 CD8 결실의 영향이 TCR/펩타이드-MHC 상호작용에서 측정되었다. 본 실시예에서 사용한 디스플레이 세포는 EGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 IL-2 프로모터와 3개의 NFAT 결합 부위를 포함한 리포터 구조체가 형질 도입된 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포이다. 키메릭 TCR DMF4 또는 DMF5를 발현하는 BB8 세포들은 상기에 설명한 것과 같이 Cre재조합 효소를 발현하도록 형질도입되었다 0.2 μg/ml 의 iTAg 4량체/PE-HLA-A*02:01 Mart-1 (ELAGIGILTV) (서열번호 30)) (MBL, Cat. No.: T01008) 를 사용하여 Cre 발현을 나타내거나 나타내지 않는 세포들을 염색하였다. TCR 발현은 항-마우스 TCRβ 항체 (BD Biosciences, Cat. No.: 553174) 를 이용하여 조사하였다. 표면 CD8 발현의 존재 또는 부존재는 항-인간 CD8α-PE (eBioscience, Cat. No.: 12-0086)를 이용하여 확인하였다. 염색 이후, FACSCalibur (BD Biosciences)를 이용하여 세포를 세척하고 분석하였다.

[0361] Cre 발현이 표면 TCR 수준에 영향을 주지 않는 반면(도 4A 및 4B), CD8 발현이 Cre 재조합 효소에 의해 제거(abolish)될 때 키메릭 DMF4와 Mart-1/HLA-A*0201 4량체의 결합은 30% 감소하였다(도 4C). 반면에, 키메릭 TCR

DMF5의 높은 친화성은 CD8의 존재 또는 부존재하에 4량체와 유사한 결합을 나타냈다(도 4C). 이 연구는 loxP-인접한 CD8을 발현하는 디스플레이 세포가 TCR의 CD8-의존성을 조사하는 데 사용될 수 있다는 것을 증명한다. 이 연구에서 사용된 4량체는, MHC의 CD8에 대한 결합 세기를 감소시키는 것으로 나타난(예를 들어, Bodinier *et al.*, Nat Med. 2000 Jun;6(6):707-10를 참고하라. 여기서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다.) MHC 중쇄(MHC heavy chain) α3 도메인의 A245V 돌연변이를 포함한다. 더 강한 CD8 결합을 갖는 야생형 4량체를 사용함으로써 민감도를 높이고, CD8의 존재 또는 부존재에 따른 TCR/4량체 결합의 더 작은 차이점도 발견할 수 있을 것이다.

[0362] *4) Cre/loxP 시스템을 이용한 CD8 의존성 및 비의존성 스크리닝*

[0363] 상기에 설명한 것과 같이, 다양한 TCR 세포 라이브러리를 생성하기 위해 리포터 구조체가 존재 또는 부존재하는 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포들을 사용하였다. 좀 더 구체적으로, 먼저 생성된 TCR α 및 β 사슬 유전자 라이브러리를 복제 불가능한 레트로바이러스 입자에 각각 별개로 패키징하여 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 세포에 차례로 형질도입하였다. 상기에 설명한 것과 같이, 결과물인 세포 라이브러리를 품질확인하고 관심 펩타이드-MHC 복합체를 이용하여 스크리닝하였다.

[0364] 추가로, CD8 비의존성 TCR을 확인하기 위해, 상기에 스크리닝한 펩타이드-MHC복합체에 결합하는 세포들에 앞서 설명한 Cre-IREs-퓨로마이신 저항성 유전자 구조를 형질도입하였다. Cre 재조합효소 발현에 이어, chiCD8α 및 chiCD8β의 막 관통 영역과 세포질 영역을 삭제하였고, CD8은 세포 표면에 더 이상 발현되지 않게 되었다.

[0365] 퓨로마이신 선별에 이어, 조정된 양의 관심 MHC-펩타이드 복합체를 이용하여 TCR을 발현하는 LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ Cre+ 세포를 다시 스크리닝하였고, 이어서 전술한 방법을 사용하여 TCR α 및 β 사슬 유전자를 회수시켰다.

[0366] 스크리닝 캠페인 내에서 CD8 양성 및 CD8 음성 시스템을 전환할 수 있는 능력으로, LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ 디스플레이 세포주는 CD8-비의존성 높은 친화성 TCR 뿐만 아니라 CD8-의존적인 낮은 또는 중간 단계의 친화성 TCR을 쉽게 확인하는 데 사용할 수 있는 다양한 시스템을 제공한다.

[0367] *5) 돌연변이 MHC 분자를 이용한 CD8-의존성 및 비의존성 스크리닝*

[0368] 대안으로, CD8을 구성적으로 발현하는 세포를 사용할 때, CD8-의존성 및 비의존성 스크리닝은 야생형 MHC 클래스 I 분자 또는 CD8/MHC 클래스 1 상호작용에 영향을 주는 MHC 클래스 1 돌연변이를 사용함으로써 이루어질 수 있다. 펩타이드-MHC/TCR 상호작용에 영향을 주지 않으면서 CD8 결합만 소거시키는 HLA-A2 D227K/T228A 및 CD8에 대한 HLA-A2의 결합을 완전히 제거하지 않으면서 감소시키는 HLA-A2 A245V를 포함하여 많은 수의 MHC 클래스 I 돌연변이가 확인되었다. TCR 세포 라이브러리는 관심 펩타이드를 로딩한 HLA-A2 A245V 돌연변이 또는 HLA-A2 D227K/T228A 돌연변이를 포함한 4량체에 대해 스크리닝될 수 있다. 대안으로, 2단계 스크리닝 방법이 사용된다. 이 방법에서는, CD8 및 TCR을 세포 표면에 발현하는 TCR 세포 라이브러리가 관심 펩타이드를 로딩한 야생형 HLA-A2를 포함한 4량체를 사용하여 먼저 스크리닝된다. 양성 히트들은 이 제1단계에서 동정되고 다시 관심 펩타이드를 로딩한 HLA-A2 A245V 돌연변이 또는 HLA-A2 D227K/T228A 돌연변이를 포함한 4량체에 대해 스크리닝된다. CD8-비의존성 높은 친화성 TCR들은 분리되고 동정될 수 있다.

[0369] 실시예5 : 리포터 분석을 이용한 TCR 세포 라이브러리의 스크리닝

[0370] TCR 세포 라이브러리는 또한 펩타이드-MHC 복합체와의 상호작용 기능성 결과에 기초하여 스크리닝될 수 있다. 가능한 판독값은 사이토카인 생성(예를 들어, IL-2, TNF-α, 또는 IFN-γ) 뿐만 아니라 활성화 마커(예를 들어, CD69 또는 CD137)의 발현, 시그널링 경로의 유발(예를 들어, NFAT 시그널링, IL-2시그널링, 활성화 단백질-1(activator protein-1)시그널링, 또는 NFκB/Rel 시그널링), 칼슘 플럭스(calcium fluxing), 세포 증식(예를 들어, T세포의 증식)을 포함한다.

[0371] 대안으로, 디스플레이 세포주 유도체는 하나 또는 그 이상의 리포터 구조체를 발현하는 것으로 생성될 수 있다. 일반적으로 사용되는 리포터 구조체는 타겟 프로모터(예를 들어, NFAT 결합 부위를 포함하는 IL-2 프로모터, NFκB 전사 반응 요소를 포함하는 NFκB 프로모터, 또는 TPA-유도성 전사 반응 요소를 구성하는 활성화 단백질-1 프로모터)의 조절 하에 선택표지(selectable marker)(예를 들어, 형광 또는 발광(luminescent) 단백질, 표면-발현 단백질, 또는 항생제 저항성 마커)를 코딩한다.

[0372] 본 실시예에서는, IL-2-EGFP 리포터 구조체를 포함하는 디스플레이 세포주 유도체가 생성되었다. T 세포 활성화

및 IL-2 신호 전달 캐스케이드(cascade)가 이어서 활성화된 후, IL-2 프로모터가 활성화되어 EGFP 합성으로 이어진다. 판독값, 예를 들어 이 경우에는 EGFP 발현은, 유세포 분석 등을 이용한 IL-2 시그널링의 양적 또는 질적 측정에 사용될 수 있다. 리포터 구조체는 레트로바이러스를 이용해 상기에 생성한 AK-D10 디스플레이 세포주에 형질도입된다.

[0373] 비슷한 리포터 구조체는 또한 LOT-D08 세포 및 상기에 생성한 chiCD8α^{flox} 및 chiCD8β^{flox} 를 발현하는 LOT-D08 세포와 같은 다른 디스플레이 세포에 도입될 수 있다.

[0374] *1) IL-2 리포터 구조체를 포함하는 AK-D10 세포의 생성*

[0375] T 세포 활성화의 기능 판독값으로 IL-2 생성을 이용할 가능성이 있는지 테스트하기 위해 연구가 수행되었다. 간략하게, AK-D10 세포 또는 키메릭 TCR C58을 발현하는 AK-D10 세포가 항-CD3 항체 또는 항-CD3/항-CD28 항체 칵테일을 이용하여 자극되었고 IL-2 생성 측정을 통해 활성화 검사를 하였다. 항-CD3 항체(eBioscience, Cat. No.:16-0032) 또는 항-CD3 및 항-CD28(eBioscience, Cat. No.: 16-0281) 항체가 96-웰 플레이트에 5 μg/ml 농도로 코팅되어 3시간 동안 37° C에서 인큐베이션 하였다. 이어서, 1 x 10^5 개의 세포를 200 μl의 SF-IMDM에 다시 현탁한 후 각 웰에 첨가하여 24시간 동안 37° C, 10% CO_2 조건 하에 인큐베이션 하였다. C58을 발현하거나 발현하지 않는 활성화된 AK-D10의 배양 상청액에서 마우스 IL-2 ELISA 키트(eBioscience, Cat. No.: 88-7024)를 이용하여 IL-2 생성을 조사하였다.

[0376] 항-CD3 또는 항-CD3/항-CD28 항체 자극 하에서, TCR을 발현하지 않는 AK-D10 세포를 제외하고, 키메릭 TCR C58을 발현하는 AK-D10 세포만이 IL-2를 분비하였다(도 5).

[0377] T세포 활성의 유용한 기능 판독값으로 IL-2 생성이 사용될 수 있다는 것을 확인한 후, AK-D10 세포들은 IL-2-EGFP 리포터 구조체를 발현하도록 형질도입되어 IL-2 생성의 대용 판독값을 제공하였다. 최소(minimal) IL-2 프로모터, 3개의 NFAT 결합 부위를 포함하는 IL-2 프로모터, 또는 여섯 개의 NFAT 결합 부위를 포함하는 IL-2 프로모터가 EGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는(각각 mIL-2-EGFP, IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP, 및 IL-2-$(NFAT)_6$-EGFP) 3개의 리포터 구조체가 생성되었다. 리포터 구조체는 셀렉션 마커로 하이그로마이신 B(hygromycin B) 저항성 유전자를 포함한다. 리포터 구조체 유전자는 복제불가능한 레트로바이러스 입자에 각각 별개로 패키징되었다. HEK 293 세포(ATCC)는 세 개의 각각 다른 벡터로 함께 형질전환되었다 : gag-pol 유전자를 코딩하는 pVPack 벡터(pVPack vector system, Stratagene), PVC 211 env gene을 코딩하는 벡터 및 세 개의 리포터 구조체 중 하나를 코딩하는 레트로바이러스성 벡터. 형질전환은 FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Applied Science)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 이루어졌다. 생성된 레트로바이러스 상청액은 3일 이후 수확되어 상기 생성된 AK-D10 세포의 형질도입에 직접 사용되었다. 리포터 구조를 발현하는 AK-D10 세포들은 작용 농도(working concentration)인 800 μg/ml의 하이그로마이신 B항생제를 사용하여 선별되었다. 4일의 선발 시간이 지난 후, 하이그로마이신 저항성 AK-D10 세포들로부터의 단일 T 세포들을 96-웰 플레이트에 분류하였다. 이 단일 T 세포들은 약 일주일 이내에 T 세포 클론으로 자라났다. 이어서, 이 단일세포 클론들은 TCR로 형질도입 되었으며, 동족 펩타이드-MHC 복합체 또는 항-CD3 항체로 활성화되고, 유세포 분석하여 EGFP 발현으로 증명되는 리포터 유전자가 발현되었음을 확인하였다.

[0378] *2) 항-CD3 항체를 이용한 IL-2 리포터 구조체를 포함하는 AK-D10 세포의 활성화*

[0379] 본 실시예에서, AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF4+ (IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP리포터 구조와 키메릭 TCR DMF4를 발현하는 AK-D10 세포) 들이 상기에 설명한 것과 같이 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 존재 또는 부존재 하에 활성화되었고 유세포 분석을 이용하여 EGFP 발현을 조사하였다. 모든 유세포 분석 데이터는 FlowJo 소프트웨어(Treestar)를 이용하여 분석하였다. IL-2 리포터 구조체를 발현하지만 재조합 TCR을 발현하지 않는 AK-D10 세포가 음성 대조군으로 사용되었다.

[0380] EGFP 발현으로 증명되는 IL-2 리포터 구조체의 활성화는, 항-CD3 항체와 함께 배양된 DMF-4 발현 세포에서만 관찰되었다(도 6A). 항-CD3 항체의 부존재(도면 6B) 또는 TCR 발현의 부존재(도 6C) 하에 최소 리포터 활성이 검출되었다.

[0381] *3) 펩타이드로 펄스된 T2 세포를 이용한, IL-2 리포터 구조체를 포함한 AK-D10 세포 또는 BB8 세포의 활성화*

[0382] 다음으로, 펩타이드로 펄스된 T2세포에 의해 IL-2 리포터 구조체 및 재조합 TCR을 발현하는 AK-D10 세포 또는 BB8 세포의 활성화를 조사하기 위한 일련의 연구를 수행하였다.

[0383] 첫 번째 연구에서, NY-ESO-1 특이적 TCR인 2개가 테스트되었다 : 위에서 설명한 C58 및 HLA-A*0201에서 NY-ESO-1로부터 유래한 펩타이드 특이적인 TCR인 C259. 참고로, 예를 들면, Rapoport *et al.*, Nat Med. 2015, 21(8): 914-921; Robbins *et al.*, J Clin Oncol. 2011, 29(7): 917-924; Robbins *et al.*, J Immunol. 2008, 180(9): 6116-6131; 및 U.S. Patent No. 8,008,438이 있으며, 각 문서는 여기서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다. C259는 적절한 앵커링과 뮤린 CD3과의 상호작용 및 적절한 뮤린 시그널링 경로 유발을 보장하는 키메릭 TCR로 발현되었다. 키메릭 C259의 α 및 β 사슬은 아미노산 서열 서열번호 35 및 36을 각각 포함한다.

[0384] T2 세포(200 μl PBS에 1.0 x 10^6 개의 세포)들은 50 μg/ml의 NY-ESO-1 항원 펩타이드인 SLLMWITQV(서열번호 31) (IBA Lifesciences, Cat. No.: 6-7013-901)으로 3시간동안 37° C에서 펄스되었다. 다음으로, 5.0 x 10^4 개의 AK-D10 세포들이 형질도입되어 IL-2 리포터 구조체를 발현하였고 키메릭 TCR C58(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiC58+) 또는 키메릭 TCR C259(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiC259+) 가 5.0 x 10^4 개의 펄스된 T2와 함께 200 μl SF-IMDM 배지에서 16시간동안 37° C , 10% CO_2 조건 하에 인큐베이션 되었다. 대조군으로, AK-10 유도체 역시 펄스되지 않은 T2세포의 존재 또는 T2세포의 부재 하에 인큐베이션 되었다. 인큐베이션 이후, 항-마우스 TCRβ 항체 (BD Biosciences, Cat. No.: 553174)를 이용하여 TCR 발현을 위해 세포들을 염색하였다. T 세포 활성화 마커인 CD69 및 CD137의 발현을 평가하기 위해, 세포들을 항-마우스 CD69-BV421(Biolegend, Cat. No.: 104528) 및 항-마우스 CD137-APC (eBioscience, Cat. No.: 17-1371)을 사용하여 염색하였다. 이어서 세포들을 유세포 분석하였다. TCR 양성 세포들은 게이트화되었고 TCR+ EGFP+, TCR+ CD69+, 및 TCR+ CD137+ 세포의 비율은 FlowJo 소프트웨어(Treestar) 를 이용하여 결정하였다.

[0385] 동족 펩타이드로 펄스된 T2세포와의 공동 인큐베이션(Co-incubation)은 IL-2 리포터 구조체의 활성화를 강화시켰으며 이것이EGFP 발현에 의해 증명되었다(도 7A-7C 및 도8). 일관하여, 펄스된 T2 세포와의 공동 배양(co-culture)은 또한 T 세포 활성화 마커인 CD69 및 CD137의 발현을 상향조절(upregulate)한다. 주목할 것은, 표면 TCR 발현은 활성화와 함께 하향조절(downregulate)되었으며, IL-2 리포터 분석은 특히 시그널링 능력이 우수한 TCR 확인에 유용하다는 것을 강조한다. 스크리닝에 기반한 결합, 예를 들어 MHC 4량체의 사용은, 만약 강화된 4량체 결합이 TCR 표면 발현 하향조절에 의한 상쇄보다 더 크다면 아마도 덜 유익할 것이다.

[0386] 두 번째 연구에서, 동족 펩타이드의 용량 적정으로 펄스된 T2 세포를 사용하여 IL-2-EGFP 리포터 구조체의 민감성을 조사하였다. 간략하게, 22.0 x 10^6개의 T2 세포들이 Mart-1 항원 펩타이드 ELAGIGILTV (서열번호 30) (P&E, Cat. No.: EP04197) 으로 0.125 μM 내지 256 μM 농도 범위에서 3시간동안 37° C 하에 펄스되었다. 펩타이드 펄스를 위하여, 음성 대조군 펩타이드 ILLWQPIPV(서열번호 34) (Genscript, 맞춤 주문)가 총 펩타이드 농도인 512 μM를 유지하기 위해 첨가되었다. 이어서, IL-2 리포터 구조체 및 키메릭 TCR DMF4 또는 키메릭 TCR DMF5를 발현하도록 형질도입된 5.0 x 10^4 개의 AK-D10 세포 (AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF4+ 또는 AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF5+)가 5.0 x 10^4 개의 펄스된 T2세포와 200 μl SF-IMDM 배지에서 12시간동안 37° C, 10% CO_2 조건에서 공동 배양되었다. TCR 발현을 위해 항-인간 TCRα/β-APC (BD Biosciences, Cat. No.: 563826)를 사용하여 세포들을 염색하였고 유세포 분석하였다. TCR 양성 세포들은 게이트화되고 TCR+ EGFP+ 세포의 비율은 FlowJo software (Treestar)를 이용해 결정하였다.

[0387] 도 9A 및 9B에 나타난 것과 같이, 동족 펩타이드로 펄스된 T2 세포들은 용량 의존적 방법으로 IL-2-EGFP 리포터 구조체를 활성화시켰다.

[0388] 세 번째 연구는 IL-2-EGFP 리포터 구조체의 활성화가 T2 세포를 펄스하는 데 사용된 펩타이드 농도, 활성화 길이 및 CD8의 존재 또는 부존재와 같은 인자들에 어떻게 영향을 받는지 관찰하였다. T2 세포(200 μl PBS에 5.0 x 10^5 개의 세포)는 50 μg/ml, 5 μg/ml, 또는 0.5 μg/ml의 Mart-1 항원 펩타이드 ELAGIGILTV (서열번호 30) (P&E, Cat. No.: EP04197)로 3시간 동안 37° C에서 펄스되었다. 키메릭 TCR DMF4 또는 DMF5를 발현하는 BB8 세포(MTCD8 mCD8αβ- chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+) 는 형질도입되어 Cre 재조합 효소를 발현하거나 형질도입되지 않았다. 다음으로, 5.0 x 10^4 개의 BB8 유도체를 5.0 x 10^4개의 펄스된 T2 세포와 200 μl SF-IMDM 배지에서 0 시간에서 25 시간까지 37° C, 10% CO_2 조건에서 공동 인큐베이션하였다. 이어서 세포들을 TCR과 CD8을 위해 항-마우스 TCRβ-APC (BD Biosciences, Cat. No.: 553174) 및 항-인간 CD8-PE (BD

Biosciences, Cat. No.: 555635)를 이용하여 염색하고 유세포 분석하였다. TCR 양성 세포들은 게이트화되고 TCR+ EGFP+ 세포의 비율은 FlowJo 소프트웨어(Treestar)를 이용해 결정하였다.

[0389] 도 10A 및 10과 같이, IL-2-EGFP 리포터 구조체의 활성화는 측정된 지속시간 내의 시간 함수로 나타난다. 활성화 정도는 T2 세포들이 펄스된 동족 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. CD8 염색은 Cre 재조합 효소가 성공적으로 표면 CD8 발현을 삭제하였음을 확인했고(데이터는 제시하지 않음), 이것은 펩타이드 펄스된 T2 세포에 의해 유발된 IL-2 시그널링 활성화를 감소시켰다.

[0390] 실시예 6 : 인간 공여자로부터 TCR의 분리

[0391] 본 실시예에서, 인간으로부터 온 T 세포들은 관심 타겟 특이적인 TCR에 대해 스크리닝되었다. 더 구체적으로, HPV E6 or E7 유래의 펩타이드 특이적인 TCR들이 인간 공여자로부터 분리되었다. E6 또는 E7에 대한 백신을 접종한(vaccinated) 인간으로부터 온 T 세포들은 또한 E6 또는 E7 유래 펩타이드 특이적인 TCR을 분리하기 위해 사용되었다.

[0392] *1) 인 비트로(in vitro)에서 자극된 인간 T 세포로부터 TCR 분리*

[0393] 표준 방법을 사용하여 인간 T 세포들을 PBMC로부터 분리하였다. HPV E6 또는 E7 유래의 펩타이드 특이적인 TCR을 동정하기 위해, 분리된 T 세포들을 (i) JPT 펩타이드로부터 펩타이드 풀 PepMix™ HPV 16 (E6 또는 E7 단백질) 이 로딩된 자가 이식한 수지상 세포, (ii) HPV E6 또는 E7로부터 유래된 HLA-A2 제한된 펩타이드가 로딩된 T2 세포, 또는 (iii) 펩타이드-MHC 복합체(E6 또는 E7 유래의 펩타이드를 로딩한 DimerX). 후자의 두 가지 경우에는, E6-유래 펩타이드 KLPQLCTEL(서열번호 31) 및 E7-유래 펩타이드 GTLGIVCPI(서열번호 32)가 T2 세포 및 DimerX를 로딩하는 데 사용되었다. 대안으로, 분리된 T 세포는 또한 관심 항원을 코딩하는 IVT(in vitro-transcribed) RNA로 형질전환한 항원표시세포를 이용하여 활성화될 수 있다.

[0394] 이어서, 활성화된 세포들은 수확되어, T 세포 특이적인 항체(항-CD8 또는 항-CD4 항체)뿐만 아니라 형광-컨쥬게이션된 항-IFNγ B항체(Secretion Assay Kit, Miltenyi Biotec)로 염색되었고, IFNγ/CD8 또는 IFNγ/CD4에 이중 양성인(double positive) 세포들을 벌크 분류(bulk sorted)하거나 단일 세포 분류하였다. BD FACSAria 유세포 측정기(BD Biosciences)를 이용하여 분류를 수행하였다. 대안으로, 활성화된 세포들은 항-IL2-항체와 항-CD8 또는 항-CD4 항체를 함께 이용하여 염색되었으며, 이어서 IL-2/CD8 또는 IL-2/CD4 이중 양성 세포들을 분류하였다.

[0395] 분류된 벌크 또는 단일 활성화된 T 세포들은 예를 들면 재조합 IL-2, 항-CD3/항-CD28 항체, 또는 동족 펩타이드-MHC 복합체를 이용해 증식하였다. 단일 세포 또는 벌크 분류된 항원특이적 CD8+ 또는 CD4+ T 림프구로부터 TCR α 및 β 사슬이 직접 클로닝된다. 클로닝된 TCR은 곧바로 기능 분석 테스트에 사용되거나 라이브러리 생성에 사용된다.

[0396] *2) 관심 펩타이드-MHC 복합체를 이용하여 T 세포로부터 TCR 분류*

[0397] 표준 방법을 사용하여 인간 T 세포들을 PBMC로부터 분리하였다. 분리된 T 세포는 E6-유래 펩타이드 KLPQLCTEL (서열번호 31) 또는 E7-유래 펩타이드 GTLGIVCPI (서열번호 32) 를 로딩하는 DimerX로 염색되었으며, BD FACSAria 유세포 측정기(BD Biosciences)를 이용하여 벌크 또는 단일 세포 분류되었다. T 세포의 활성화는 수행하지 않았다.

[0398] 벌크 또는 단일 세포 분류된 T 세포들은, 예를 들면 재조합 IL-2, 항-CD3/항-CD28 항체, 또는 분류에 사용된 특이적 펩타이드-MHC 복합체를 사용하여 증식하였다. 단일 세포 또는 벌크 분류된 항원특이적 CD8+ 또는 CD4+ T 림프구로부터 TCR α 및 β 사슬이 직접 클로닝된다. 클로닝된 TCR은 곧바로 기능 분석 테스트에 사용되거나 라이브러리 생성에 사용된다.

[0399] [표 1] 예시의 공동수용체, TCR, MHC 및 펩타이드 항원의 아미노산 서열

서열번호	설명 (다른 지시가 없으면, 단백질 서열임)	서열
1	키메릭 CD8α	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPA KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSRKR VCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
2	키메릭 CD8β	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDAS RFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVV DFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPLSL LVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK
3	loxp 부위를 갖는 키메릭 CD8α (뉴클레오티드 서열)	AGCCAGTTCAGAGTGTCCCCCCTGGACAGAACCTGGAA CCTGGGCGAGACAGTGGAACTGAAGTGCCAGGTGCTGC TGAGCAACCCCACCAGCGGCTGTAGCTGGCTGTTCCAG CCTAGAGGCGCCGCTGCCAGCCCTACCTTTCTGCTGTA CCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCCGCCGAGGGCCTGG ACACCCAGAGATTCAGCGGCAAGAGACTGGGCGACACC TTCGTGCTGACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGA GGGCTACTACTTCTGCAGCGCCCTGAGCAACAGCATCA TGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCC AAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCC AGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGC CCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCAC ACAAGAGGCCTGGACTTCGCCTGCGACATAACTTCGTA TAGCATACATTATACGAAGTTATCTATCTGGGCTCCAC TGGCCGGCATTTGTGTGGCACTGCTGCTGTCCCTGATC ATCACCCTGATCTGCTACCACAGATCCCGGAAGCGCGT GTGCAAGTGCCCTAGACCACTCGTGCGGCAGGAAGGCA AGCCCAGACCCAGCGAGAAGATTGTCTGAATAACTTCG TATAGCATACATTATACGAAGTTAT

[0400]

서열번호	설명 (다른 지시가 없으면, 단백질 서열임)	서열
4	loxp 부위를 갖는 키메릭 CD8β (뉴클레오티드 서열)	CTGCAGCAGACCCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACCAA CAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCCAAGATCAGCC TGAGCAACATGAGAATCTACTGGCTGAGACAGAGACAG GCCCCCAGCAGCGACAGCCACCACGAGTTTCTGGCCCT GTGGGACAGCGCCAAGGGCACCATCCATGGCGAGGAAG TGGAACAGGAAAAGATCGCCGTGTTCAGGGACGCCAGC AGATTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAGGA CAGCGGAATCTACTTCTGCATGATCGTGGGCAGCCCCG AGCTGACCTTCGGCAAGGGAACACAGCTGAGCGTGGTG GACTTCCTGCCTACCACCGCCCAGCCCACCAAGAAGTC TACCCTGAAGAAAAGAGTGTGCAGACTGCCCAGACCCG AGACACAGAAAGGCCCTCTGTGCAGCCCTATAACTTCG TATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCTGAGCCTGCT GGTCGTGTGCATCCTCCTGCTGCTGGCTTTTCTGGGCG TGGCCGTGTACTTCTACTGCGTGCGGAGAAGGGCCAGG ATCCACTTTATGAAGCAGTTCCACAAATGAATAACTTC GTATAGCATACATTATACGAAGTTAT
5	loxp 부위를 갖는 키메릭 CD8α (아미노산 서열)	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPA KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDITSYSIHYTKLSIWAPLAGICVALLLSLI ITLICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
6	loxp 부위를 갖는 키메릭 CD8β (아미노산 서열)	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDAS RFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVV DFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITS YSIHYTKLSLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRAR IHFMKQFHK
7	키메릭 C58 α 사슬	KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQ DPGKGLTSLLLITPWQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLY IAASQPGDSATYLCAVRPLLDGTYIPTFGRGTSLIVHP YIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM ESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDI FKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVM GLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
8	키메릭 C58 β 사슬	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQD PGMGLRLIHYSVAIQTTDQGEVPNGYNVSRSTIEDFPL RLLSAAPSQTSVYFCASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLE DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPD HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLR VSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQ NISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSGLVLMAMVKKKNS

[0401]

서열번호	설명 (다른 지시가 없으면, 단백질 서열임)	서열
9	키메릭 DMF4 α 사슬	GQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWYKQD PGEGPVLLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRKDSFLNI SASIPSDVGIYFCAGGTGNQFYFGTGTSLTVIPYIQNP EPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTF ITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETN ATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS
10	키메릭 DMF4 β 사슬	DAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTENHRYMYWYRQD PGHGLRLIHYSYGVKDTDKGEVSDGYSVSRSKTEDFLL TLESATSSQTSVYFCAISEVGVGQPQHFGDGTRLSILE DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPD HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLR VSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQ NISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSTLVVMAMVKRKNS
11	키메릭 DMF5 α 사슬	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQ YSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLI RDSQPSDSATYLCAVNFGGGKLIFGQGTELSVKPYIQN PEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGT FITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKET NATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRI LLLKVAGFNLLMTLRLWSS
12	키메릭 DMF5 β 사슬	IAGITQAPTSQILAAGRRMTLRCTQDMRHNAMYWYRQD LGLGLRLIHYSNTAGTTGKGEVPDGYSVSRANTDDFPL TLASAVPSQTSVYFCASSLSFGTEAFFGQGTRLTVVED LRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV SATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQN ISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSTLVVMAMVKRKNS
13	마우스 TCR α 사슬 비가변영역 (A0A075B662)	XIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM ESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDI FKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVM GLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS X can be any amino acid x는 임의의 아미노산일 수 있다
14	마우스 TCR α 사슬 막 관통 및 세포질 영역	SVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0402]

[0403]

서열번호	설명 (다른 지시가 없으면, 단백질 서열임)	서열
15	마우스 TCR β 사슬 비가변영역 (Trbc1) (A0A0A6YWV4)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFP DHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRL RVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVT QNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS x는 임의의 아미노산일 수 있다
16	마우스 TCR β 사슬 (Trbc1) 막 관통 및 세포질 영역	EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS
17	마우스 TCR β 사슬 비가변영역 (Trbc1) (A0A075B5J3)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFP DHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRL RVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVT QNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSTLVVMAMVRNR x는 임의의 아미노산일 수 있다
18	마우스 TCR β 사슬 (Trbc1) 막 관통 및 세포질 영역	EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVRNR
19	마우스 TCR β 사슬 비가변영역 (Trbc2) (A0A075B5J4)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFP DHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRL RVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVT QNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSGLVLMAMVKKKNS x는 임의의 아미노산일 수 있다
20	마우스 TCR β 사슬 (Trbc2) 막 관통 및 세포질 영역	EILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVKKKNS
21	마우스 CD8α 이소폼 (isoform) 1	KPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGSVSQGCSW LFQNSSSKLPQPTFVVYMASSHNKITWDEKLNSSKLFS AMRDTNNKYVLTLNKFSKENEGYYFCSVISNSVMYFSS VVPVLQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCR PRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLI CYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
22	마우스 CD8β	LIQTPSSLLVQTNHTAKMSCEVKSISKLTSIYWLRERQ DPKDKYFEFLASWSSSKGVLYGESVDKKRNIILESSDS RRPFLSIMNVKPEDSDFYFCATVGSPKMVFGTGTKLTV VDVLPTTAPTKKTTLKMKKKKQCPFPHPETQKGLTCSL TTLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQF HK

[0404]

서열번호	설명 (다른 지시가 없으면, 단백질 서열임)	서열
23	인간 CD8α 이소폼 1	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPA KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR RRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV
24	인간 CD8β 이소폼 1	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDAS RFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVV DFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITL GLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQFYK
25	loxp 부위를 갖는 키메릭 CD8α (아미노산 서열)	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPA KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDITSYSIHYTKLXIWAPLAGICVALLLSLI ITLICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV X는 S, F, L, Y, C, 또는 W
26	loxp 부위를 갖는 키메릭 CD8β (아미노산 서열)	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDAS RFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVV DFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITS YSIHYTKLXLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRAR IHFMKQFHK X는 S, F, L, Y, C, 또는 W
27	HLA-A2 α 사슬	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRV DLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYH QYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHV AEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMT HHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDT ELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGL PKPLTLRWEPSSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVA AVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTACKV
28	HLA-A2 α 사슬 A245V	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRV DLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYH QYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHV AEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMT HHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDT ELVETRPAGDGTFQKWVAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGL PKPLTLRWEPSSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVA AVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTACKV

서열번호	설명 (다른 지시가 없으면, 단백질 서열임)	서열
29	HLA-A2 α 사슬 D227K/T228A	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRV DLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYH QYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHV AEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMT HHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQKA ELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGL PKPLTLRWEPSSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVA AVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTACKV
30	Mart-1 펩타이드	ELAGIGILTV
31	E6 펩타이드	KLPQLCTEL
32	E7 펩타이드	GTLGIVCPI
33	NY-ESO-1 펩타이드	SLLMWITQV
34	펩타이드	ILLWQPIPV
35	키메릭 C259 α 사슬	QEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQD PGKGLTSLLLIPFWQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI AASQPGDSATYLCAVRPLYGGSYIPTFGRGTSLIVHPY IQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTME SGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIF KETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMG LRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
36	키메릭 C259 β 사슬	AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDP GMGLRLIHYSVSVGMTDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLR LLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLED LRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV SATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQN ISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSTLVVMAMVKRKNS

[0405]

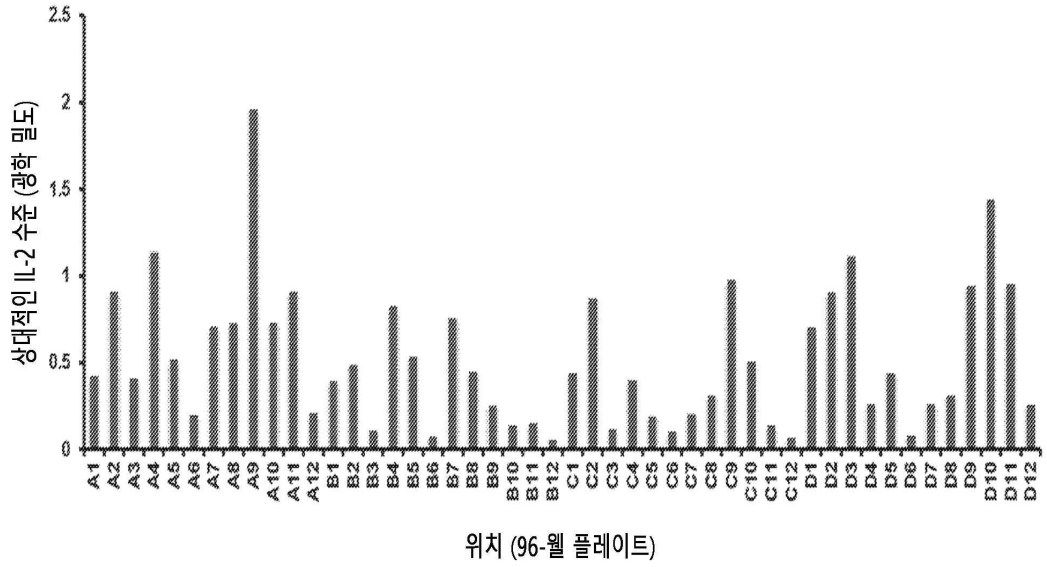
[0406] 본 발명은 본원에 기술된 특정 구현예에 의해 범위가 한정되지 않는다. 실제로, 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 기술된 것에 추가하여 상세한 설명에 더해 본 발명의 다양한 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 상기 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속한다.

[0407] 본원에서 확인된 임의의 특허, 특허 출원, 출판물, 또는 기타 개시 자료는 각각의 개별적 참고문헌(예를 들어, 특허, 특허 출원, 출판물, 또는 기타 개시 자료)이 전체로서 모든 목적을 위해 참고문헌으로 포함되는 것으로 구체적이고, 개별적으로 명시된 것과 동일한 정도로, 전체로서 모든 목적을 위해 본원에서 참고문헌으로 포함된다. 여기에 참고문헌으로 포함되었지만 여기에 설명된 기존의 정의, 진술, 또는 기타 개시 자료와 충돌하는 모든 자료 또는 그 일부는, 참고 자료에 의해 포함된 것과 본원 내용 사이에 어떠한 충돌도 발생하지 않는 범위 내에서만 참고문헌으로 포함된다.

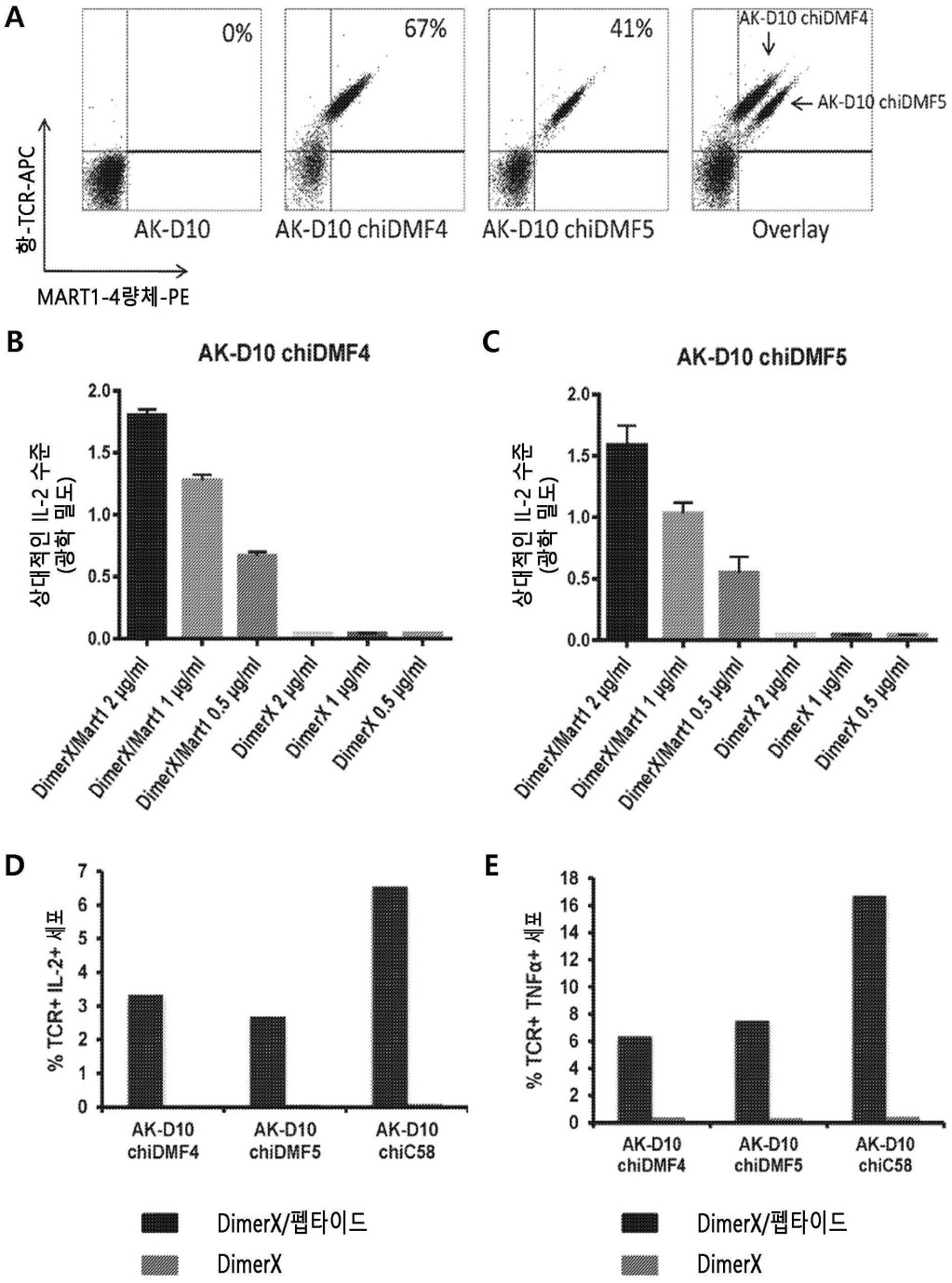
[0408] 다른 구현예는 다음의 청구범위 내에 있다.

도면

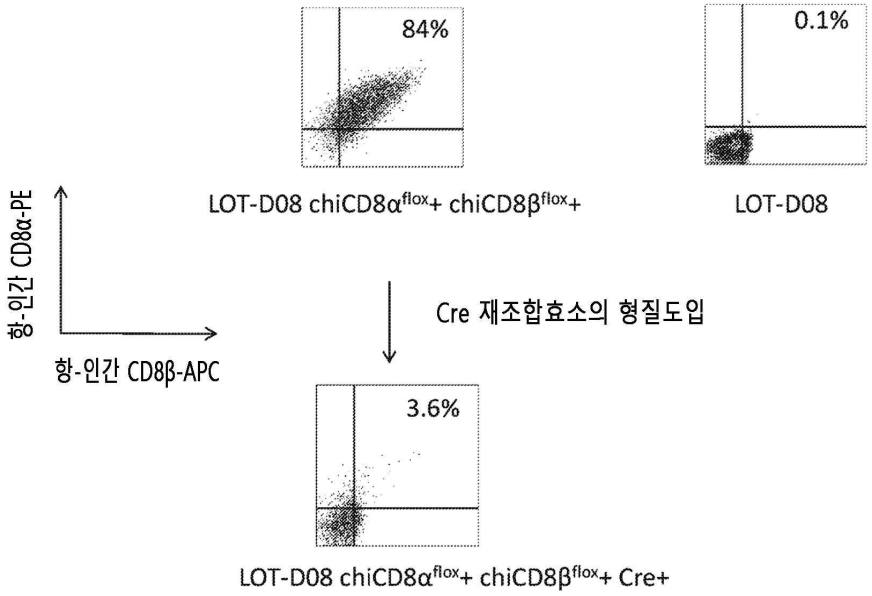
도면1


상대적인 IL-2 수준 (광학 밀도)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12 C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10 D11 D12
위치 (96-웰 플레이트)

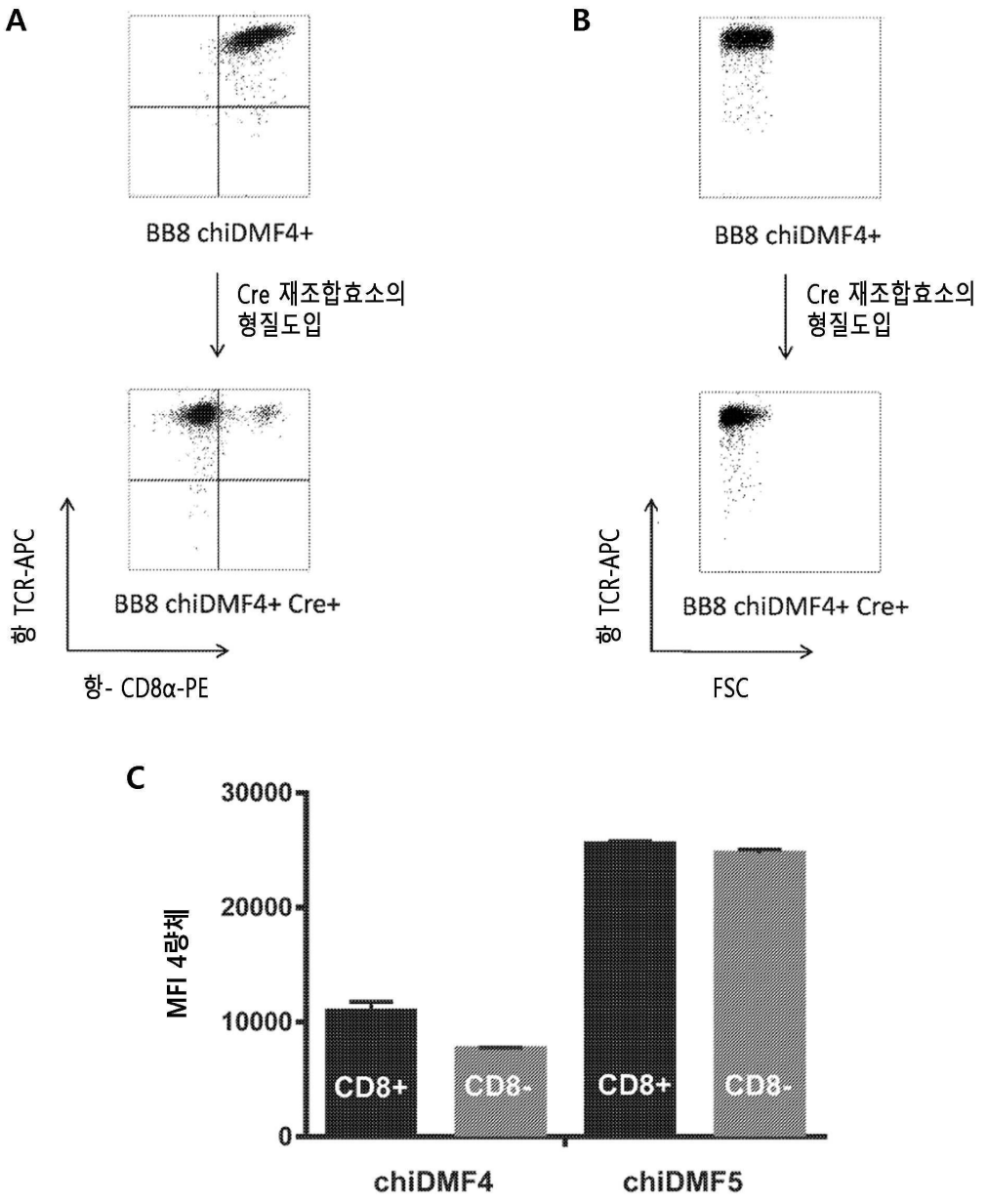
도면2


A
0%
67%
41%
AK-D10 chiDMF4
AK-D10 chiDMF5
항-TCR-APC
MART1-4량체-PE
AK-D10
AK-D10 chiDMF4
AK-D10 chiDMF5
Overlay
B
AK-D10 chiDMF4
상대적인 IL-2 수준 (형광 밀도)
DimerX/Mart1 2 μg/ml
DimerX/Mart1 1 μg/ml
DimerX/Mart1 0.5 μg/ml
DimerX 2 μg/ml
DimerX 1 μg/ml
DimerX 0.5 μg/ml
C
AK-D10 chiDMF5
D
% TCR+ IL-2+ 세포
AK-D10 chiDMF4
AK-D10 chiDMF5
AK-D10 chiC58
DimerX/펩타이드
DimerX
E
% TCR+ TNFα+ 세포
DimerX/펩타이드
DimerX

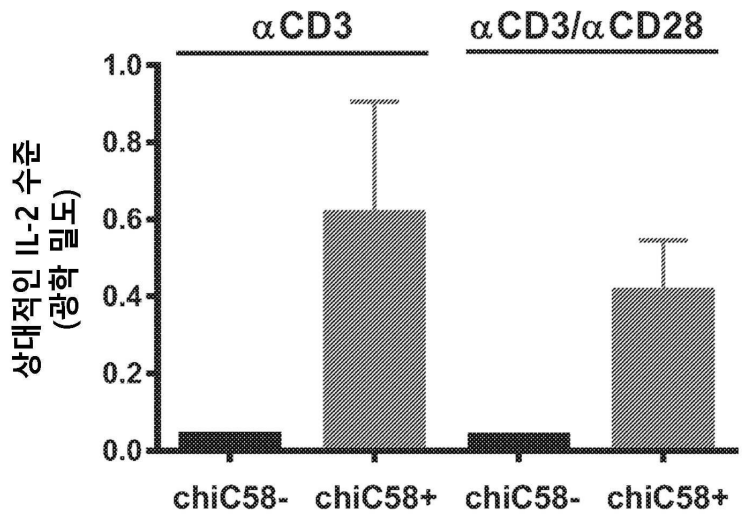
도면3


84%
0.1%
LOT-D08 chiCD8α^flox+ chiCD8β^flox+
LOT-D08
항-인간 CD8α-PE
항-인간 CD8β-APC
Cre 재조합효소의 형질도입
3.6%
LOT-D08 chiCD8α^flox+ chiCD8β^flox+ Cre+

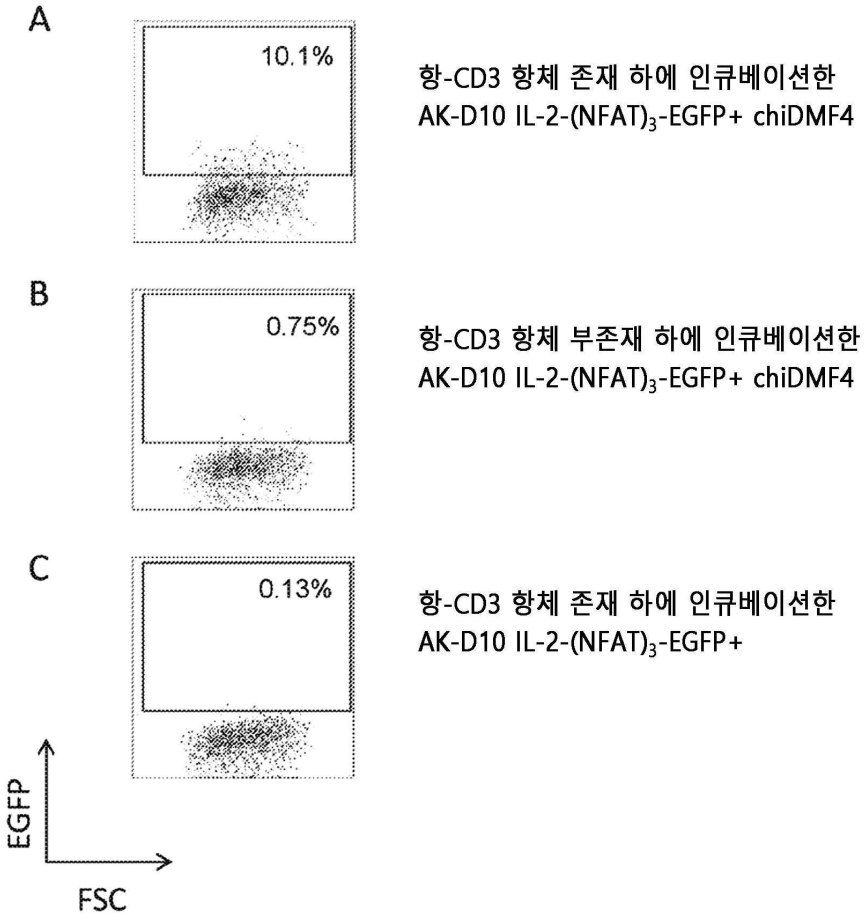
도면4


A
BB8 chiDMF4+
Cre 재조합효소의
형질도입
BB8 chiDMF4+ Cre+
항 TCR-APC
항- CD8α-PE
B
BB8 chiDMF4+
Cre 재조합효소의
형질도입
BB8 chiDMF4+ Cre+
항 TCR-APC
FSC
C
MFI 4량체
30000
20000
10000
0
CD8+
CD8-
CD8+
CD8-
chiDMF4
chiDMF5

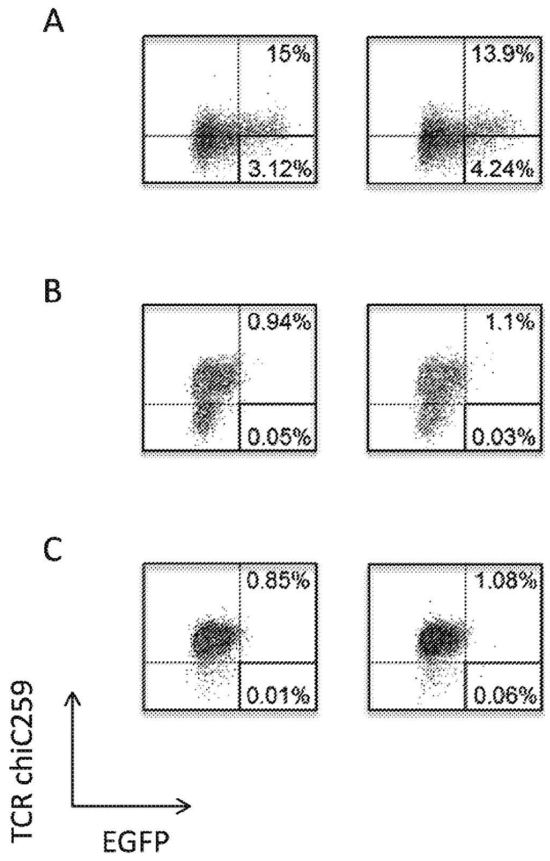
도면5


αCD3
αCD3/αCD28
상대적인 IL-2 수준 (형광 밀도)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
chiC58-
chiC58+
chiC58-
chiC58+

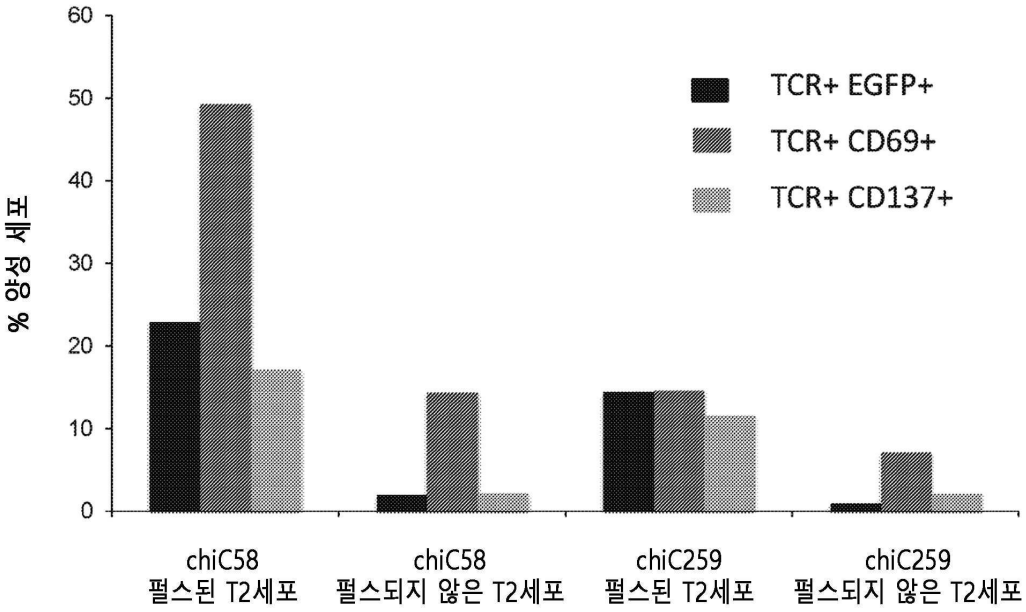
도면6


A
10.1%
항-CD3 항체 존재 하에 인큐베이션한
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+ chiDMF4
B
0.75%
항-CD3 항체 부존재 하에 인큐베이션한
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+ chiDMF4
C
0.13%
항-CD3 항체 존재 하에 인큐베이션한
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+
EGFP
FSC

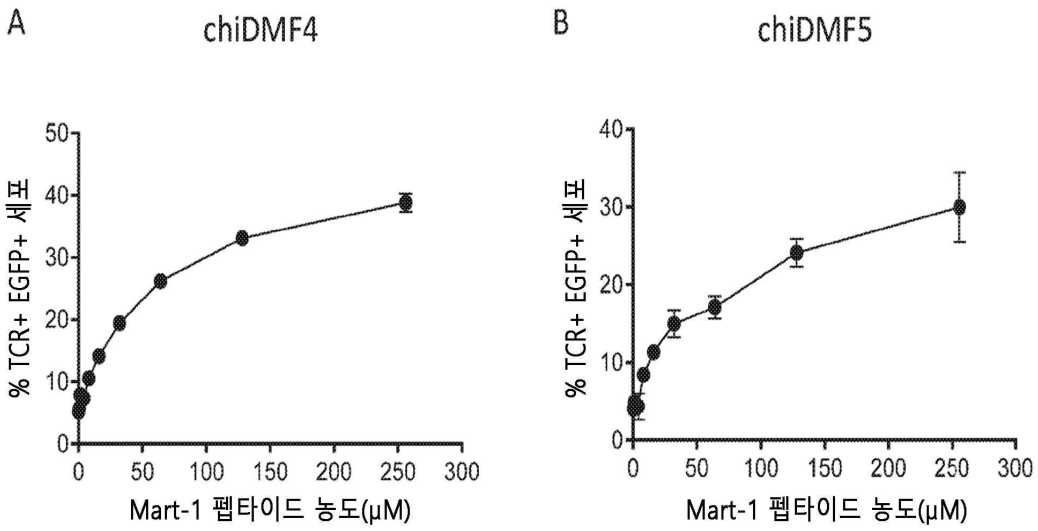
도면7


A
15%
3.12%
13.9%
4.24%
펄스된 T2 세포
B
0.94%
0.05%
1.1%
0.03%
펄스되지 않은 T2세포
C
0.85%
0.01%
1.08%
0.06%
T2 세포 부존재
TCR chiC259
EGFP

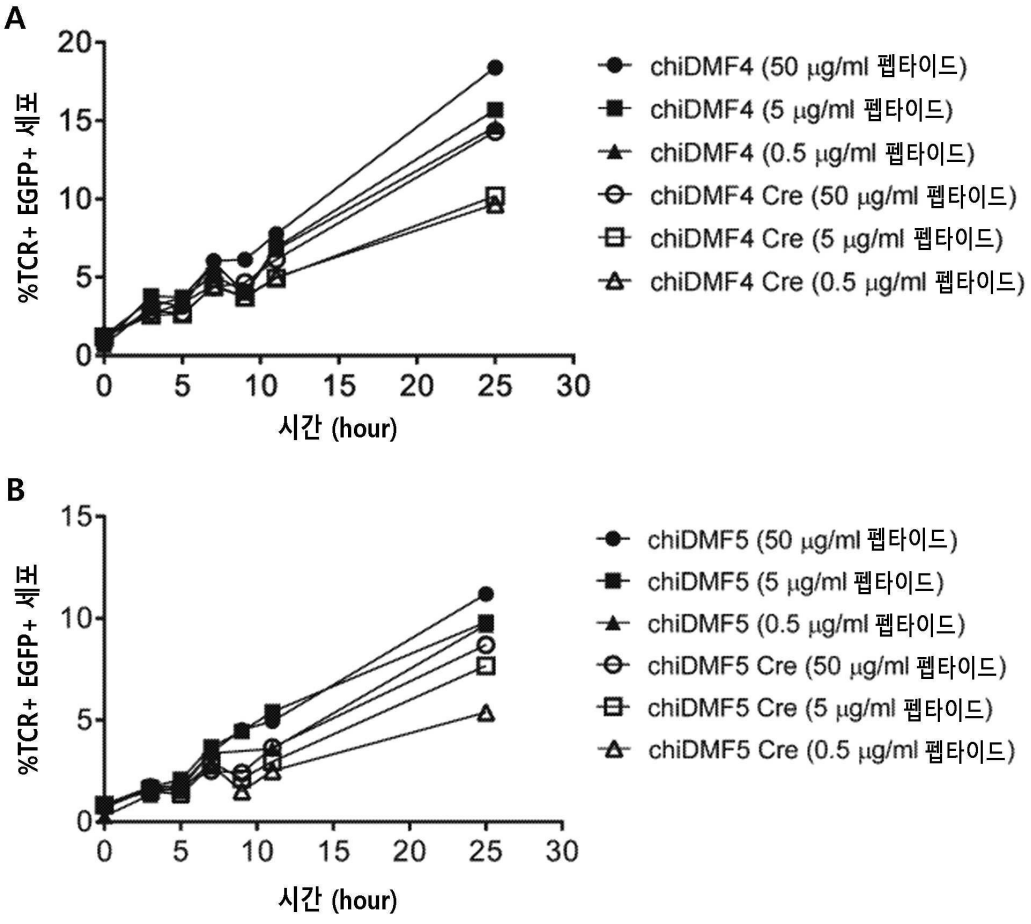
도면8


60
50
40
30
20
10
0
% 양성 세포
TCR+ EGFP+
TCR+ CD69+
TCR+ CD137+
chiC58
펄스된 T2세포
chiC58
펄스되지 않은 T2세포
chiC259
펄스된 T2세포
chiC259
펄스되지 않은 T2세포

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> Agenus Inc.

<120> ENGINEERED HOST CELLS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> IPA180221-US

<150> US 62/217,677

<151> 2015-09-11

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8a

<400> 1

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
145 150 155 160

Asp Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser
165 170 175

Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys
180 185 190

Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser
195 200 205

Glu Lys Ile Val
210

<210> 2

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8b

<400> 2

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
65 70 75 80

Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
85 90 95

Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Leu Ser Leu Leu Val Val Cys Ile Leu Leu Leu
145 150 155 160

Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg

165 170 175

Ala Arg Ile His Phe Met Lys Gln Phe His Lys

180 185

<210> 3

<211> 709

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8a with loxp sites (nucleotide sequence)

<400> 3

agccagttca gagtgtcccc cctggacaga acctggaacc tgggcgagac agtggaactg 60

aagtgccagg tgctgctgag caaccccacc agcggctgta gctggctgtt ccagcctaga 120

ggcgccgctg ccagccctac ctttctgctg tacctgagcc agaacaagcc caaggccgcc 180

gagggcctgg acacccagag attcagcggc aagagactgg gcgacacctt cgtgctgacc 240

ctgagcgact tcagaagaga gaacgagggc tactacttct gcagcgccct gagcaacagc 300

atcatgtact tcagccactt cgtgcccgtg tttctgcccg ccaagcctac cacaacccct 360

gcccctagac ctcctacccc agcccctaca atcgccagcc agcctctgtc tctgaggccc 420

gaggcttgta gaccagctgc tggcggagcc gtgcacacaa gaggcctgga cttcgcctgc 480

gacataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcta tctgggctcc actggccggc 540

atttgtgtgg cactgctgct gtccctgatc atcaccctga tctgctacca cagatcccgg 600

aagcgcgtgt gcaagtgccc tagaccactc gtgcggcagg aaggcaagcc cagacccagc 660

gagaagattg tctgaataac ttcgtatagc atacattata cgaagttat 709

<210> 4

<211> 634

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8b with loxp sites (nucleotide sequence)

<400> 4

ctgcagcaga cccccgccta catcaaggtg cagaccaaca agatggtcat gctgagctgc 60

gaggccaaga tcagcctgag caacatgaga atctactggc tgagacagag acaggccccc 120

agcagcgaca gccaccacga gtttctggcc ctgtgggaca gcgccaaggg caccatccat 180

ggcgaggaag tggaacagga aaagatcgcc gtgttcaggg acgccagcag attcatcctg 240

aacctgacca gcgtgaagcc cgaggacagc ggaatctact tctgcatgat cgtgggcagc 300

cccgagctga ccttcggcaa gggaacacag ctgagcgtgg tggacttcct gcctaccacc 360

gcccagccca ccaagaagtc taccctgaag aaaagagtgt gcagactgcc cagacccgag 420

acacagaaag gccctctgtg cagccctata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 480

tctctgagcc tgctggtcgt gtgcatcctc ctgctgctgg cttttctggg cgtggccgtg 540

tacttctact gcgtgcggag aagggccagg atccacttta tgaagcagtt ccacaaatga 600

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 634

<210> 5

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8a with loxp sites (amino acid sequence)

<400> 5

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu Ser Ile Trp Ala

165 170 175

Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr

180 185 190

Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg

195 200 205

Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val

210 215 220

<210> 6

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8b with loxp sites (amino acid sequence)

<400> 6

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val

1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val

50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu

65 70 75 80

Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met

85 90 95

Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser

100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr

115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly

130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu
145 150 155 160
Ser Leu Ser Leu Leu Val Val Cys Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu
165 170 175
Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile His
180 185 190
Phe Met Lys Gln Phe His Lys
195

<210> 7
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric C58 alpha chain
<400> 7
Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15
Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30
Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45
Leu Ile Thr Pro Trp Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

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

Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser

130 135 140

Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp

145 150 155 160

Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala

165 170 175

Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys

180 185 190

Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr

195 200 205

Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn

210 215 220

Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe

225 230 235 240

Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

245 250

<210> 8

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric C58 beta chain

<400> 8

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Ala Ile Gln Thr Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Ile Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser

65 70 75 80

Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Leu
85 90 95
Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val
100 105 110
Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu
115 120 125
Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
130 135 140
Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val

145 150 155 160
Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
165 170 175
Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser
180 185 190
Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln
195 200 205
Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys
210 215 220

Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
225 230 235 240
Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
245 250 255
Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
260 265 270
Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 9

<211
> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DMF4 alpha chain

<400> 9

Gly Gln Gln Leu Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln Glu Gly
1 5 10 15

Glu Asp Val Ser Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn Thr Trp
20 25 30

Leu Trp Tyr Lys Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Ile Ala
35 40 45

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

50 55 60

Phe Gly Ile Thr Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala Ser Ile
65 70 75 80

Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Thr Gly Asn Gln
85 90 95

Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val Ile Pro Tyr Ile Gln
100 105 110

Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp
115 120 125

Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro
130 135 140

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
145 150 155 160

Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn
165 170 175

Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr
180 185 190

Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser

195 200 205

Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly
210 215 220

Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr
225 230 235 240

Leu Arg Leu Trp Ser Ser

245

<210> 10

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DMF4 beta chain

<400> 10

Asp Ala Gly Ile Thr Gln Ser Pro Arg His Lys Val Thr Glu Thr Gly

1 5 10 15

Thr Pro Val Thr Leu Arg Cys His Gln Thr Glu Asn His Arg Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly His Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Tyr Gly Val Lys Asp Thr Asp Lys Gly Glu Val Ser Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Thr Ser Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ile Ser Glu Val

85 90 95

Gly Val Gly Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Ser Ile

100 105 110

Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu

115 120 125

Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys

130 135 140

Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val

145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr

165 170 175

Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser

180 185 190

Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln
195 200 205
Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys
210 215 220

Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
225 230 235 240
Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
245 250 255
Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
260 265 270
Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 11

<211
> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric DMF5 alpha chain

<400> 11

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

50 55 60
Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80
Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Phe Gly Gly Gly
85 90 95
Lys Leu Ile Phe Gly Gln Gly Thr Glu Leu Ser Val Lys Pro Tyr Ile
100 105 110

Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln
115 120 125

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

195 200 205
Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met
210 215 220
Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met
225 230 235 240
Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245

<210> 12
<211> 285
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric DMF5 beta chain
<400> 12
Ile Ala Gly Ile Thr Gln Ala Pro Thr Ser Gln Ile Leu Ala Ala Gly

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

Ser Val Ser Arg Ala Asn Thr Asp Asp Phe Pro Leu Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Ala Val Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Ser
85 90 95
Phe Gly Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val Val
100 105 110
Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
115 120 125
Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140
Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

145 150 155 160
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
165 170 175
Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
180 185 190
Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
195 200 205
His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
210 215 220

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
225 230 235 240
Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
245 250 255
Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
260 265 270
Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285
<210> 13
<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> X can be any amino acid

<400> 13

Xaa Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
1 5 10 15

Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile
20 25 30

Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr
35 40 45

Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala
50 55 60

Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr
65 70 75 80

Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr
85 90 95

Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser
100 105 110

Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu
115 120 125

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn
1 5 10 15

Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
20 25

<210> 15

<211> 173

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> X can be any amino acid

<400

> 15

Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala

65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
165 170

<210> 16

<211> 28

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr
1 5 10 15

Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
20 25

<210> 17

<211> 171

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> X can be any amino acid

<400> 17

Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly

115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160
Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Arg Asn Arg
165 170

<210> 18
<211> 26
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 18
Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr

1 5 10 15
Leu Val Val Met Ala Met Val Arg Asn Arg
20 25

<210> 19
<211> 173
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> VARIANT
<222> (1)
<223> X can be any amino acid
<400> 19
Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15
Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

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

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro

100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly

115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu

130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser

145 150 155 160

Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser

165 170

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Gly

1 5 10 15

Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser

20 25

<210> 21

<211> 220

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Lys Pro Gln Ala Pro Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala

1 5 10 15

Glu Leu Gly Gln Lys Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val

20 25 30

Ser Gln Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro

35 40 45

Gln Pro Thr Phe Val Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr

50 55 60

Trp Asp Glu Lys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Met Arg Asp
65 70 75 80
Thr Asn Asn Lys Tyr Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn

85 90 95
Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe
100 105 110
Ser Ser Val Val Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys
115 120 125
Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln
130 135 140
Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr
145 150 155 160

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
165 170 175
Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr
180 185 190
His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg
195 200 205
Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
210 215 220
<210> 22
<211> 192
<212> PRT

<213> Mus musculus
<400> 22
Leu Ile Gln Thr Pro Ser Ser Leu Leu Val Gln Thr Asn His Thr Ala
1 5 10 15
Lys Met Ser Cys Glu Val Lys Ser Ile Ser Lys Leu Thr Ser Ile Tyr
20 25 30
Trp Leu Arg Glu Arg Gln Asp Pro Lys Asp Lys Tyr Phe Glu Phe Leu
35 40 45
Ala Ser Trp Ser Ser Ser Lys Gly Val Leu Tyr Gly Glu Ser Val Asp

50 55 60

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

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

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

165 170 175

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg

180 185 190

Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser

195 200 205

Leu Ser Ala Arg Tyr Val

210

<210> 24

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val

1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val

50 55 60

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

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

<210> 25
<211> 224

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chimeric CD8a with loxp sites (amino acid sequence)
<220><221> VARIANT
<222> (173)
<223> X can be S, F, L, Y, C, or W
<400> 25
Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
20 25 30
Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe

35 40 45
Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp

50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu Xaa Ile Trp Ala

165 170 175

Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr

180 185 190

Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg

195 200 205

Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val

210 215 220

<210> 26

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric CD8b with loxp sites (amino acid sequence)

<220><221> VARIANT

<222> (161)

<223> X can be S, F, L, Y, C, or W

<400> 26

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val

1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
20 25 30
Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
35 40 45
Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
50 55 60
Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu

65 70 75 80
Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
85 90 95
Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110
Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
115 120 125
Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu
145 150 155 160
Xaa Leu Ser Leu Leu Val Val Cys Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu
165 170 175
Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile His
180 185 190
Phe Met Lys Gln Phe His Lys
195
<210> 27
<211> 341
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<
400> 27
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg

35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr

50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr

65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln

85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly

100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu

115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys

130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys

165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His

180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe

195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln

210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg

245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu

260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile

275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala
290 295 300
Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr
305 310 315 320
Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu
325 330 335
Thr Ala Cys Lys Val
340

<210> 28
<211> 341
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HLA-A2 alpha chain A245V

<400> 28
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45
Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60
Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr

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

130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160
Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175
Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190
Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205
Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln

210 215 220
Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240
Phe Gln Lys Trp Val Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255
Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270
Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile
275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala
290 295 300
Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr
305 310 315 320
Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu
325 330 335
Thr Ala Cys Lys Val
340

<210> 29
<211> 341
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-A2 alpha chain D227K/T228A

<400> 29

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

65 70 75 80
Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95
Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110
Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160
Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175
Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190
Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205
Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln

210 215 220
Thr Gln Lys Ala Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg

245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu

260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile

275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala

290 295 300

Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr

305 310 315 320

Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu

325 330 335

Thr Ala Cys Lys Val

340

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mart-1 peptide

<400> 30

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 31

Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 32

Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

33

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Leu Leu Trp Gln Pro Ile Pro Val

1 5

<210> 35

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric C259 alpha chain

<400> 35

Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly Glu

1 5 10 15

Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Leu

20 25 30

Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu Leu

35 40 45

Ile Pro Phe Trp Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala Ser

50 55 60

Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln

130 135 140

Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys

145 150 155 160

Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile

165 170 175

Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu

180 185 190

Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu

195 200 205

Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu

210 215 220

Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn

225 230 235 240

Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

245 250

<210> 36

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric C259 beta chain

<400> 36

Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln

1 5 10 15

Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser

```
             20                  25                  30
Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser

         35                  40                  45
Val Ser Val Gly Met Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn
     50                  55                  60
Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala
 65                  70                  75                  80
Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly
                 85                  90                  95
Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
        115                 120                 125
Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
    130                 135                 140
Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
145                 150                 155                 160
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
                165                 170                 175
Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala

            180                 185                 190
Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
        195                 200                 205
His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
    210                 215                 220
Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
225                 230                 235                 240
Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
                245                 250                 255

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
            260                 265                 270
```

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser

275 280 285