



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0078497
(43) 공개일자 2020년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7011102
(22) 출원일자(국제) 2018년10월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2018/053045
(87) 국제공개번호 WO 2019/081902
국제공개일자 2019년05월02일
(30) 우선권주장
1717578.7 2017년10월26일 영국(GB)
1806155.6 2018년04월16일 영국(GB)

(71) 출원인
유니버시티 칼리지 카디프 컨설턴츠 리미티드
영국, 카디프 씨에프24 0다이, 뉴포트 로드 30-36
(72) 발명자
세웰 앤드류
영국, 카디프 사우스 글라모건 씨에프14 0제트비,
라니웬, 16 밀 로드
돌튼 게리
영국, 카디프 사우스 글라모건 씨에프24 3이에이,
로스, 35 로즈 스트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

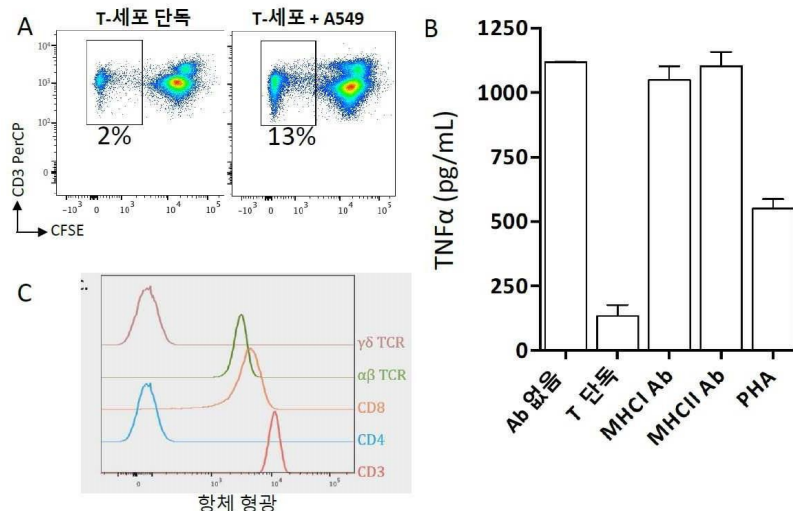
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 신규의 T-세포 수용체

(57) 요약

본 개시는 신규의 T-세포 수용체(TCR), 특히 그의 적어도 하나의 상보성-결정 영역(CDR); 상기 TCR을 발현하는 T-세포; 상기 TCR을 발현하는 클론; 상기 TCR을 암호화하는 벡터; 상기 TCR의 가용성 버전; 상기 TCR, 상기 세포, 상기 클론 또는 상기 벡터를 포함하는 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신; 암을 치료하기 위한 상기 TCR 또는 상기 세포 또는 상기 클론 또는 상기 벡터 또는 상기 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신의 용도; 및 상기 TCR, 상기 TCR을 포함하는 상기 세포, 상기 클론, 상기 벡터, 상기 약학 조성물, 면역원제, 이중특이성 항체 또는 백신을 사용하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(CDR) CAYRSVAVNARLMF(서열번호 1) 또는 이와 적어도 88%의 동일성(identity)을 공유하는 CDR; 및/또는 (CDR) CASSEARGLAETF DTQYF(서열번호 2) 또는 이와 적어도 88%의 동일성을 공유하는 CDR을 포함하거나 이로 이루어진 상보성-결정 영역(complementarity-determining region)을 특징으로 하는 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 2

제1항에 있어서,
2개의 CDR을 모두 포함하는 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,
하기의 상보성-결정 영역 중, 임의의 조합을 포함하여, 하나 이상을 포함하거나 이로 이루어진 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR):

TSESDYY(CDR1 α) 서열번호 3

ATEN(CDR2 α) 서열번호 4

MGHDK(CDR1 β) 서열번호 5

SYGVNS(CDR2 β) 서열번호 6

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
점막-관련된 불변성 T 세포(MAIT 세포)에 의해 발현되거나 또는 상기 세포와 관련된 TCR이 아닌 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSTYDT**TSESDYY**LFWYKQPSPRQMILVIRQEAYKQQA**ATEN**RFSVNFQKAASFSLKISDSQLGDAAMYF**CAYRSVAVNARLM**
MGGDGTQLVVKPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
PESS(서열번호 7)를 추가로 포함하거나 이로 이루어진 α 체 또는 상기와 적어도 88%의 동일성을 공유하는 알파 체인 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

EADIYQTPRYLVIIGTKKITLCSQT**MGHDK**MYWYQQDPGMELHLIH**SYGVNS**TEKGDLSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYL**CASSEARGLAETF**
TDQYFGPGTRLTVLEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFW
QDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVISAEAWGRAD(서열번호 8)를 추가로 포함하거나 이로 이루어진 β 체 또는 상기와 적어도 88%의 동일성을 공유하는 베타 체인 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

가용성인 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,
MR1-제한된 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR).

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR을 발현하는 T-세포.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR을 발현하는 T-세포 클론.

청구항 11

제9항에 있어서,
MC.7.G5 클론인 T-세포 클론.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR을 암호화하는 벡터.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR 또는 제9항에 따른 세포 또는 제10항 또는 제11항에 따른 클론 또는 제12항에 따른 벡터를 포함하는 약학 조성물 또는 면역원제(immunogenic agent) 또는 이중특이성 항체 또는 백신.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서; 제9항에 있어서; 제10항 또는 제11항에 있어서; 제12항에 있어서; 또는 제13항에 있어서, 암 치료에 사용하기 위한, TCR; 세포; 클론; 벡터; 또는 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신.

청구항 15

제14항에 있어서,
암이 결장직장암, 폐, 신장, 전립선, 자궁경부, 흑색종(피부), 뼈, 난소, 유방 및 혈액암을 포함하거나 또는 이로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 암 치료에 사용하기 위한, TCR; 세포; 클론; 벡터; 약학 조성물, 면역원제, 이중특이성 항체 또는 백신.

청구항 16

치료할 개체에게 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR 또는 제9항에 따른 세포 또는 제10항 또는 제11항에 따른 클론 또는 제12항에 따른 벡터 또는 제13항에 따른 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신을 투여함을 포함하는, 암의 치료 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,
암이 결장직장암, 폐, 신장, 전립선, 자궁경부, 흑색종(피부), 뼈, 유방, 난소 및 혈액암을 포함하거나 또는 이로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서,

TCR, 세포, 클론, 벡터, 약학 조성물, 면역원제, 이중특이성 항체 또는 백신을 항-종양제와 함께 투여하는 방법.

청구항 19

암을 치료하기 위한 약제의 제조에서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR 또는 제9항에 따른 세포 또는 제10항 또는 제11항에 따른 클론 또는 제12항에 따른 벡터의 용도.

청구항 20

a) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TCR 또는 제9항에 따른 세포 또는 제10항 또는 제11항에 따른 클론 또는 제12항에 따른 벡터 또는 제13항에 따른 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신을

b) 추가의 암 치료제

와 함께 포함하는, 암의 치료를 위한 병용 치료제.

[청구항 20]

본 명세서에 실질적으로 기재된 바와 같은 TCR, 세포, 클론, 벡터, 약학 조성물, 면역원제, 이중특이성 항체 또는 백신.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는 신규의 T-세포 수용체(TCR), 특히 그의 적어도 하나의 상보성-결정 영역(complementarity-determining region; CDR); 상기 TCR을 발현하는 T-세포; 상기 TCR을 발현하는 클론; 상기 TCR을 암호화하는 벡터; 상기 TCR의 가용성 버전; 상기 TCR, 상기 세포, 상기 클론 또는 상기 벡터를 포함하는 약학 조성물 또는 면역원제(immunogenic agent) 또는 이중특이성 항체 또는 백신; 암을 치료하기 위한 상기 TCR 또는 상기 세포 또는 상기 클론 또는 상기 벡터 또는 상기 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신의 용도; 및 상기 TCR, 상기 세포, 상기 클론, 상기 벡터, 상기 TCR을 포함하는 상기 약학 조성물, 면역원제, 이중특이성 항체 또는 백신을 사용하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명자들은 집단-불변성 주 조직적합성 복합체 부류 관련 단백질(MR)1을 통해 암세포를 인식하는, 암 치료에 유효한 신규 부류의 T-세포를 발견하였다. 이러한 신규 T-세포의 식별은 특이적인 인간 백혈구 항원(HLA)의 요구 없이 암세포를 인식하는 T-세포를 탐색하는 실험으로부터 유래하였다. 상기 HLA 유전자좌는 오늘날 기재된 17,000개 이상의 상이한 대립유전자에 따라 대단히 가변적이다. 이와 같이, HLA를 통해 작용하는 임의의 치료학적 접근법은 단지 소수의 환자에서만 유효할 수 있다. 대조적으로, 모든 인간 집단은 MR1을 발현한다.

[0003] 공지된 MR1-제한된 T-세포의 주요 유형을 점막-관련된 불변성 T-세포(MAIT)라 지칭한다. MAIT는 마이코박테리아 리보플라빈 생합성의 중간체를 인식하는 것으로 공지되어 있다. 본 발명자들의 실험실 및 다른 실험실에 의한 최근의 연구는 상이한 MR1-결합된 리간드를 인식하는 다른 유형의 MR1-제한된 T-세포가 또한 존재함을 입증하였다. 본 명세서에 기재된 연구는, 본 발명자들의 신규의 T-세포 부류가 MR1을 통한 표적 특이성을 갖지만 상기 TCR은 MR1 자체에 또는 공지된 감염성 리간드가 로딩된 MR1에 결합하지 않고, 오히려 상기 T-세포는 상기 MR1 결합 홈내의 암-특이성 리간드를 인식하며; MR1은 상기 TCR에 암-특이성 또는 암-상향조절된 리간드를 제공함을 보인다.

[0004] 본 발명자들의 신규의 T-세포 클론, MC.7.G5는 선암종 폐포 기저상피 세포주, A549(정보에 대해서 ATCC[®] 참조 CCL-185)에 오합치된 HLA인 건강한 공여체로부터의 T-세포의 선별 중에 발견되었다. 실험적 접근법은 T-세포를 A549 세포와 배양하고 이어서 상기 A549 세포에 반응하여 증식된 T-세포를 단리하고 클로닝함을 수반하였다. 추가의 연구는 상기 MC.7.G5 T-세포 클론이 암세포, 더욱이 다수의 기관 및 조직 유형으로부터의 암세포를 인식하여 사멸시킬 수 있음을 보였으며, 따라서 상기 클론은 대부분 유형의 암을 치료할 가능성이 있음을 보였다.

- [0005] 공지되고 도 12에 도시된 바와 같이, TCR은 통상적으로 불변성 CD3 ϵ 분자와 결합하여 완전한 기능성 TCR을 형성하는 고 가변성 알파(α) 및 베타(β) ϵ 로 이루어진 디설파이드-결합된 막-고정된 이중이량체성 단백질이다. 상기 수용체를 발현하는 T 세포를 $\alpha:\beta$ (또는 $\alpha\beta$) T 세포라 칭한다.
- [0006] 상기 α 및 베타 β ϵ 는 불변(C) 영역 및 가변(V) 영역을 포함하는 세포외 도메인으로 구성된다. 상기 불변 영역은 세포막에 근접하고, 이어서 막관통 영역 및 짧은 세포질 꼬리가 있는 반면, 가변 영역은 상기 리간드에 결합한다. 대부분의 $\alpha\beta$ T 세포에 대한 리간드는 MHC 분자에 결합된 펩티드이다.
- [0007] TCR α - ϵ 및 β - ϵ 모두의 가변 도메인은 각각 상보성 결정 영역(CDR)이라 칭하는 3개의 가변 영역을 갖는다. 또한 통상적으로 항원과 접촉하지 않고 따라서 CDR로 간주되지 않는 β - ϵ 상의 추가적인 가변성 영역(HV4)이 존재한다. 일반적으로, 상기 항원-결합 부위는 TCR α - ϵ 및 β - ϵ 의 CDR 루프에 의해 형성된다. CDR1 α 및 CDR2 α 는 개별적인 V α 유전자에 의해 암호화되는 반면, CDR1 β 및 CDR2 β 는 개별적인 V β 유전자에 의해 암호화된다. 상기 TCR α - ϵ 의 CDR3는 V 영역 및 결합 영역의 결합 부근의 뉴클레오티드 부가 및 제거에 대한 가능성으로 인해 고가변성이다. 상기 TCR β - ϵ CDR3는 다양성(D) 유전자를 추가로 포함할 수 있으므로 훨씬 더 큰 변화 능력을 갖는다.
- [0008] CDR3는 가공된 항원 인식을 담당하는 주요 CDR이지만, 알파 ϵ 의 CDR1은 또한 항원 펩티드의 N-말단 부분과 상호 작용하고 β - ϵ 의 CDR1은 상기 펩티드의 C-말단 부분과 상호 작용하는 것으로 나타났다.
- [0009] 2015년에, 약 9050만명이 암에 걸렸다. 1년에 약 1410만건의 새로운 사례가 발생한다(흑색종 이외의 피부암은 포함하지 않음). 암은 인간 사망의 약 880만건의 사망(15.7%)을 야기한다. 남성에서 가장 흔한 유형의 암은 폐암, 전립선암, 결장직장암 및 위암이다. 여성에서 가장 흔한 유형의 암은 유방암, 결장직장암, 폐암 및 자궁경부암이다. 흑색종 이외의 피부암이 매년의 전체 신규암에 포함된다면, 이는 사례의 대략 40%를 차지할 것이다. 아동에서는 급성 림프모구성 백혈병 및 뇌종양이 아프리카(비-호지킨 림프종이 더 종종 발생한다)를 제외하고 가장 흔하다. 2012년에, 15세 이하의 아동 약 165,000명이 암으로 진단되었다. 암의 위험성은 나이에 따라 현저하게 증가하며 다수의 암은 선진국에서 더 흔하게 발생한다. 보다 많은 사람이 오래 살고 개발도상국에서는 생활양식의 변화가 발생함에 따라 비율이 증가하고 있다. 암의 금융 비용은 2010년 현재 매년 1조1600억 달러(USD)로 추산되었다. 상기 질병을 치료하거나 근절할 보다 양호하고 보다 안전한 방법을 제공할 필요가 발생한다. 이상 조직을 사멸시키는 신체의 자연 방어 시스템을 사용하는 면역요법이 화학적인 중재보다는 더 안전한 것으로 인정되고 있으나, 유효하기 위해서는 상기 면역요법은 암 특이적이어야 한다. 더욱이, 임의의 유형의 암에 대해 유효한 면역요법의 발견은, 상기 요법을 다수의 상이한 유형의 암을 앓고 있는 개체에게 투여할 수 있을 뿐만 아니라(즉 상기는 범-집단 적용을 가질 것이다) 한 가지가 넘는 유형의 암을 앓고 있는 한 명의 개체에 게도 투여할 수 있기 때문에 대단히 이로울 것이다. 추가로, MHC-제한되지 않은 면역요법의 식별은 또한 상기를 MHC 조직 유형에 관계 없이 임의의 개체에게 투여할 수 있음을 의미하기 때문에 대단히 유리할 것이다.
- [0010] 본원에서 본 발명자들이 식별한 T-세포는 제한성 MR1 분자의 편재된 발현으로 인해 상기 세포가 임의의 유형의 암에 대해 유효하고 MHC-제한되지 않으며 따라서 범-집단 적용을 갖는다는 점에서 상기의 유리한 특징들을 갖는다.
- 발명의 내용**
- [0011] 본 발명의 첫 번째 태양에 따라, (CDR) CAYRSVAVNARLMF(서열번호 1) 및/또는 CASSEARGLAFTDTQYF(서열번호 2)를 포함하거나 또는 이로 이루어진 상보성-결정 영역을 특징으로 하는 종양 특이성 T-세포 수용체(TCR)를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 바람직한 실시태양에서 상기 CDR은 (CDR) CAYRSVAVNARLMF(서열번호 1) 및/또는 CASSEARGLAFTDTQYF(서열번호 2) 또는 이들과 적어도 88%, 예를 들어 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성(identity)을 공유하는 CDR을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0013] 본 명세서에 기재된 CDR은 상기 TCR의 CDR3를 나타내며 따라서 가공된 항원 또는 리간드의 인식을 담당하는 주요 CDR이다. 다른 CDR(CDR1알파, CDR2알파, CDR1베타 및 CDR2베타)은 생식계열에 의해 암호화된다. 따라서, 본 발명은 추가로 이들 다른 CDR, 즉 CDR1알파, CDR2알파, CDR1베타 및 CDR2베타 중 하나 이상을 추가로 포함하는 TCR에 관한 것이다.
- [0014] 상응하게, 바람직한 실시태양에서 상기 TCR은 하기의 상보성-결정 영역 중, 임의의 조합을 포함하여, 하나 이상을 포함하거나 또는 이로 이루어진다:

- [0015] TSESDYY(CDR1 α) 서열번호 3
- [0016] ATEN(CDR2 α) 서열번호 4
- [0017] MGHDK(CDR1 β) 서열번호 5
- [0018] SYGVNS(CDR2 β) 서열번호 6
- [0019] 본 명세서에서 종양 특이성 TCR에 대한 언급은, MR1의 상황에서 종양 세포 또는 종양 세포 리간드를 특이적으로 인식하고 이에 의해 활성화되지만 MR1의 상황에서 비-종양 세포 또는 비-종양 세포 리간드에 의해서는 활성화되지 않는 TCR에 대한 것이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 실시태양에서 상기 TCR은 α 채 및 β 채를 갖는 $\alpha\beta$ TCR이며 상기 α 채의 상기 CDR은 CDR: CAYRSAVNARLMF(서열번호 1) 또는 이와 적어도 88%, 예를 들어 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 공유하는 CDR을 포함하거나 또는 이로 이루어지고; 상기 β 채의 상기 CDR은 CDR: CASSEARGLAFTDTQYF(서열번호 2) 또는 이와 적어도 88%, 예를 들어 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 공유하는 CDR을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 상응하게, 상기 TCR은 상기 CDR 중 하나 또는 둘 다를 포함할 수 있고 바람직한 실시태양에서 상기 CDR을 모두 포함한다.
- [0021] 더욱 추가의 바람직한 실시태양에서 상기 TCR은, MHC-제한되지 않고 오히려 MR1, 대안의 MHC-유사 분자의 상황에서 종양 특이성 리간드에 결합한다는 점에서 통상적이지 않다. 지금까지, MR1-제한된 $\alpha\beta$ T-세포는 오직 점막-관련된 불변성 T 세포(MAIT 세포)뿐인 것으로 생각되었으나, 본 발명자들은 본 명세서에서 상기 MAIT TCR α 채를 발현하지 않는 MR1-제한된 T-세포의 추가의 부류가 존재하며, 더욱이 유리하게 상기 T-세포 및 그의 TCR이 종양 특이적이지만(즉 종양 세포에는 반응하지만 비-종양 세포에는 반응하지 않는다) 놀랍게도 기원이나 조직 유형이 무엇이든간에 임의의 종양을 식별할 수 있고 따라서 범-암 치료 가능성을 가질 수 있음을 입증한다. 더욱이, 상기 T-세포 및 그의 TCR이 MHC-제한되지 않는다는 사실은 상기가 범-집단 치료 가능성을 가지며 따라서 대단히 중요한 신규의 암 요법을 나타냄을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 추가의 바람직한 실시태양에서 상기 TCR α 채는
- [0023] AQTVTQSQPEMSVQEAETVLTSLCTYDT**TSESDYY**LFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQ**Q**ATENRFSVNFQKAASFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRSAVNARLMFGDGTQLVVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESS(서열번호 7) 또는 이와 적어도 88%, 예를 들어 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0024] 본 발명의 추가의 바람직한 실시태양에서 상기 TCR β 채는
- [0025] EADIYQTPRYLVIGTGKKITLCSQ**TMGHDK**MYWYQDPGMELHLIH**Y**SYGVNSTEKGDLSSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYL**CASSEARGLAFTDTQYF**GPGTRLTVLEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVFYGLSENDEWTQDRAKPVTVISAEAWGRAD(서열번호 8) 또는 이와 적어도 88%, 예를 들어 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0026] (상기 단락에서, 굵고 밑줄 친 내용은 CDR을 나타낸다)
- [0027] 본 발명의 더욱 추가의 바람직한 실시태양에서 상기 TCR은 상기 TCR α 채 및 상기 TCR β 채를 포함한다.
- [0028] 더욱 추가의 바람직한 실시태양에서, 상기 TCR은 가용성 TCR 또는 sTCR이고, 따라서 막관통, 및 이상적으로는 또한, 세포내 도메인이 없다.
- [0029] 본 발명의 더욱 또 다른 바람직한 실시태양에서 상기 TCR은 본 명세서에 기재된 기능성을 갖는 키메라 수용체의 부분이다.
- [0030] 본 발명의 추가의 태양에 따라, 이상적으로는 가용성 또는 막 양립성 형태, 즉 막관통 영역 및 세포내 영역을 갖는 형태로 본 발명의 상기 TCR을 발현하는 T-세포를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라, 이상적으로는 가용성 또는 막 양립성 형태, 즉 막관통 영역 및 세포내 영역을 갖는 형태로 본 발명의 상기 TCR을 발현하는 T-세포 클론을 제공한다. 바람직하게 상기 클론은 본 명세서에 기재된 바와 같은 MC.7.G5 클론이다.
- [0032] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라 본 발명의 상기 TCR을 암호화하는 벡터를 제공한다.

- [0033] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라 상기 TCR 또는 세포 또는 클론 또는 벡터를 포함하는 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체 또는 백신을 제공한다.
- [0034] 바람직한 실시태양에서 상기 약학 조성물 또는 면역원제 또는 이중특이성 항체를 임의의 암, 이상적으로는 결장 직장암, 폐, 신장, 전립선, 방광, 자궁경부, 흑색종(피부), 뼈, 유방, 난소 또는 혈액암의 치료에 사용한다.
- [0035] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라 암을 치료하기 위한 상기 TCR 또는 세포 또는 클론 또는 벡터의 용도를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라 상기 TCR 또는 세포 또는 클론 또는 벡터를 치료할 개체에게 투여함을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.
- [0037] 이상적으로 상기 암은 임의의 유형의 것이나 특히 결장직장암, 폐, 신장, 전립선, 방광, 자궁경부, 흑색종(피부), 뼈, 유방, 난소 또는 혈액암이다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 방법에서 상기 TCR, 세포, 클론 또는 벡터를 항-종양제, 예를 들어 비제한적으로 이중특이성 항체와 함께 투여한다.
- [0039] 본 명세서에서 이중특이성 항체에 대한 언급은 2개의 상이한 유형의 항원에 동시에 결합할 수 있는 인공 단백질인 이중특이성 단클론 항체(BsMAb, BsAb)를 지칭한다.
- [0040] 한편으로, 상기 TCR은 이중특이성 항체의 부분을 형성할 수 있으며, 여기에서 상기 이중특이성 항체는 암세포상의 그의 리간드와의 결합을 위한 상기 TCR, 및 또한 킬러 T-세포와 같은 면역 세포와 결합하고 따라서 이를 활성화시키는 면역 세포 활성화 성분 또는 리간드를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라 암을 치료하기 위한 약제의 제조에서 상기 TCR 또는 세포 또는 클론 또는 벡터의 용도를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 더욱 추가의 태양에 따라
- [0043] a) 상기 TCR 또는 세포 또는 클론 또는 벡터를
- [0044] b) 추가의 암 치료제
- [0045] 와 함께 포함하는, 암 치료를 위한 병용 치료제를 제공한다.
- [0046] 하기의 청구범위 및 본 발명의 선행 기재에서, 표현이나 필요한 암시를 나타냄으로 인해 문맥상 요구됨을 제외하고, "포함하다"란 단어 또는 "포함하는"과 같은 변형은 포괄적인 의미로, 즉 서술된 특징의 존재를 명시하지만 본 발명의 다양한 실시태양에서 추가의 특징의 존재 또는 부가를 제외하지 않는데 사용된다.
- [0047] 본 명세서에 인용된 임의의 특허 또는 특허 출원을 포함한 모든 참고문헌은 본 명세서에 참고로 인용된다. 임의의 참고문헌이 종래 기술을 구성함을 인정하는 것은 아니다. 더욱이, 종래 기술 중 임의의 기술이 당해 분야의 통상적인 일반적인 지식의 부분을 구성함을 인정하는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 각 태양의 바람직한 특징은 다른 태양 중 어느 하나와 관련하여 기재되는 바와 같을 수 있다.
- [0049] 본 발명의 다른 특징은 하기의 실시예로부터 자명해질 것이다. 일반적으로 말하자면, 본 발명은 본 명세서(첨부된 청구범위 및 도면을 포함하여)에 개시된 특징 중 임의의 신규의 것, 또는 임의의 신규의 조합으로 확장된다. 따라서, 본 발명의 특정 태양, 실시태양 또는 실시예와 함께 기재된 특징, 정수, 특성, 화합물 또는 화학적 부분은 서로 양립할 수 없지 않은 한, 본 명세서에 기재된 임의의 다른 태양, 실시태양 또는 실시예에 적용 가능한 것으로 이해해야 한다.
- [0050] 더욱이, 달리 서술되지 않는 한, 본 명세서에 개시된 임의의 특징은 동일하거나 또는 유사한 목적으로 제공되는 대안의 특징에 의해 교체될 수 있다.
- [0051] 본 명세서의 기재 및 청구항 전체를 통해, 단수는 문맥상 달리 요구되지 않는 한 복수를 포함한다. 특히, 부정관사가 사용되는 경우, 본 명세서는 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수뿐만 아니라 복수를 고려하는 것으로서 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 이제 본 발명의 실시태양을 하기를 참조하여 단지 예로서 기재할 것이며, 여기에서:

도 1은 MC.7.G5가 어떻게 단리되었는가 및 그의 초기 특성화를 도시한다. A. T-세포를 염료 CFSE로 표지하고, 2주간 A549와 배양하였다. CFSE 형광의 감소는, 증식되어 A549 반응성 T-세포가 단리될 수 있게 하는 T-세포를 나타내었다. B. TNF α 의 방출에 근거한, A549 세포에 대한 MC.7.G5 반응성이 MHC 부류 I 또는 II에 대한 항체의 차단에 의해 방해되지 않았다. 분석으로부터의 상등액을 분석을 위해 TNF α ELISA에 의해 수확하였다. C. MC.7.G5 클론의 항체 표현형분석 패널은 상기가 $\gamma \delta - \alpha \beta + CD8+$ 임을 보였다(도 16A에서 반복됨).

도 2는 MC.7.G5가 정상(비-암) 세포에 반응하지 않음을 도시한다. 실험은 흑색종 세포주 MM909.24(MC.7.G5의 암 표적) 및 4개의 1차(비-종양, 불멸화되지 않은) 세포주에 반응하는 클론 MC.7.G5로부터의 TNF α 방출을 비교한다. SMC3는 평활근 세포주이고; CIL-1은 섬모 상피세포이고, MCR5는 hTERT 형질도입된 섬유아세포 세포주이고; Hep2는 간세포 세포주이다. (정상 세포주는 도 15 및 17에서 또한 시험됨).

도 3은 MC.7.G5 TCR α 및 β 쇄의 서열을 도시한다.

도 4는 클론 MC.7.G5가 광범위한 종양 표적에 반응함을 도시한다. 종양 패널에 대한 MC.7.G5 반응을 도시하는 T 세포 활성화 분석으로부터 수확되고 TNF α 및 MIP1 β 생성에 대해 검사된 상등액. B. 도시된 T-세포 대 암세포의 비에서 암세포의 특이적인 사멸을 도시하는 크로뎀 방출 분석. 오차 막대와 함께 중복 수행된 A&B.

도 5는 클론 MC.7.G5의 리간드로서 MR1을 식별하는데 사용된 전장 게놈 CRISPR 접근법에 의한 유전자 포획법(gene trapping)을 도시한다. MC.7.G5 클론 CRISPR 라이브러리 선별에 대한 데이터는 도 13에 도시한다.

도 6은 클론 MC.7.G5가 MR1을 통해 표적 특이성을 보임을 도시한다. A. MR1 항체는 A549 세포의 인식을 차단하였다. ELISA에 의한 TNF α 및 MIP1 β 생성. B. A549c9 및 흑색종 MM909.24c4 MR1 녹아웃(CRISPR/Cas9 기술)은 MC.7.G5에 의해 인식되지 않았다. C. MR1 녹아웃 A549c9 세포 또는 1차 세포주 MRC5의 특이적인 사멸은 없었다. MM909.24wt 및 A549wt의 사멸을 또한 도시한다. D. 렌티바이러스 형질도입에 의한 상기 세포주에서의 MR1의 과발현은 인식을 약간 증대시킨다. LCL 계통 pt146은 MR1을 과발현하도록 형질도입되는 경우에조차 클론 MC.7.G5에 의해 인식되지 않는다. 상기 MR1의 일부는 세포 표면에서 존재하며 MR1 항체로 검출될 수 있다(우측).

도 7은 클론 MC.7.G5가 MAIT 리간드 MR1-5-(2-옥소프로필리덴아미노)-6-d-리비틸아미노우라실(MR1-5-OP-RU)의 사랑체 형태 또는 MR1 아세틸-6-포르밀프테린(Ac-6-FP)으로 염색되지 않음을 도시한다. 병행 실험에서 MAIT 클론은 MR1-5-OP-RU 사랑체로 잘 염색되었다. PBMC 집단에서 MR1-5-OP-RU로 염색되는 세포의 소집단이 또한 존재한다. PBMC 샘플내에 검출 가능한 MAIT 세포가 존재할 것으로 예상된다. 상기 결과는 MC.7.G5 TCR이 MR1 자체 또는 공지된 감염성 리간드가 로딩된 MR1에 결합하지 않음을 나타내며 상기 T-세포가 MR1 결합 홈내 암-특이성 리간드를 인식함을 암시한다. 반복된 사랑체 염색 실험을 '빈' MR1의 경우를 포함하여 도 14E에 도시한다.

도 8은 Ac-6-FP 및 M.smeg 감염이 세포 표면에서 MR1의 발현을 증대시킴에도 불구하고 클론 MC.7.G5에 의한 인식을 감소시킴을 도시한다. A549 또는 MM909.24 세포와 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Ac-6-FP와의 12시간 배양은 상기 표면에서 MR1 발현을 증가시키지만 클론 MC.7.G5에 의한 인식은 감소시킨다. M. smeg 감염의 효과는 훨씬 더 대단하며 MAIT 클론의 효능있는 활성제로서 작용하면서 클론 MC.7.G5의 반응을 실질적으로 감소시킨다. 반복된 M.smeg 및 Ac-6-FP 실험을 도 14F&G에 도시한다.

도 9는 MC.7.G5 TCR에 의한 다클론 T-세포의 형질도입(도 2에 도시됨)이 종양 인식을 부여함을 도시한다. MC.7.G5 TCR 및 환자 T-세포에 의한 추가의 실험을 도 15에 도시한다.

도 10은 클론 MC.7.G5 TCR만이 암세포를 인식함을 도시하는 개략도이다. 인식은 MR1을 필요로 하며 공지된 비-암 MR1 리간드에 의해 억제되고 이는 MR1이 MC.7.G5 TCR에 대한 암-특이성, 또는 암-상향조절된 리간드를 제공함을 암시한다.

도 11은 공지된 MR1 리간드가 MC.7.G5 TCR에 의한 암세포의 인식을 억제함을 도시하는 개략도이다.

도 12는 T 세포 수용체 mRNA 및 단백질의 구조를 도시한다. mRNA 구조(상부)는 각각의 쇠에 대해서 CDR1 및 CDR2가 생식계열에서 암호화됨을 도시한다. CDR3는 T 세포 수용체(TCR)- α 쇠 중 V-J 결합 및 TCR- β 쇠 중 V-D-J 결합에서의 결합 다양성의 산물이다. CDR3는 결과적으로 고가변성이다. CDR 루프에 대해 채용된 색상 코드는 도면 전체를 통해 유지된다. 회색 부분은 TCR의 불변 및 가변 도메인을 나타낸다(고가변성 CDR 루프는 포함하지 않음). 기부 패널은 예상되는 단백질 폴드를 도시한다. TCR은 분자의 막 원위 단부에 상보성-결정 영역(CDR) 루프가 위치하는 유사한 3차 구조를 채용한다. 6개의 CDR 루프가 함께 항원 결합 부위를 형성한다.

도 13. 전장 게놈 CRISPR-Cas9 라이브러리 선별은 MC.7.G5의 후보 표적으로서 MR1을 밝혀낸다. (A) MC.7.G5의 리간드를 밝혀내는데 사용된 접근법의 개요. GeCKO v2 전장 게놈 CRISPR/Cas9 라이브러리 A 및 B를 렌티바이러스

스로서 사용하여 표적 세포주 HEK293T를 형질도입시켰다. MC.7.G5는 HEK293T 인식과 무관한 유전자에 대한 sgRNA를 발현하는 HEK293T를 용해시켰으며, 이에 의해 MC.7.G5에 의한 암세포 용해에 필수적인 유전자에 대한 sgRNA를 농축시켰다. MC.7.G5에 의한 2회 라운드의 선택을 수행하였으며 선택된 라이브러리를 선택되지 않은 HEK293T(MC.7.G5가 아님)와 비교하여 농축된 sgRNA를 밝혀내었다. (B) 선택-후 선택된 HEK293T 라이브러리의 MC.7.G5 인식은 야생형 HEK293T와 비교하여 크게 감소되며, 이는 핵심 유전자가 상기 전장 게놈 CRISPR-Cas9 접근법에 의해 제거되었음을 암시한다. 밤새 활성화 및 TNF ELISA. (C) MR1은 HEK293T의 MC.7.G5 인식을 위한 핵심 유전자 중 하나로서 식별되었다. MAGeCK 분석 및 선택된 HEK293T 세포 중에 농축된 ≥ 2 sgRNA를 갖는 강조된 (색칠된) 유전자. MC.7.G5의 표적으로서 MR1의 확인을 도 14에 도시한다.

도 14. MC.7.G5에 의한 MR1 인식의 확인 및 탐구. (A-D) MR1은 MC.7.G5의 암세포 발현된 표적이다. (A) 흑색종 MM909.23의 인식이 MR1 차단 항체(Ab)의 존재하에서 감소되었다. MHC I 및 II Ab가 음성 대조용으로서 사용되었다. 밤새 활성화 및 TNF ELISA. (B) 암세포주로부터의 MR1 발현의 제거는 MC.7.G5 매개된 인식 및 사멸을 방지하였다. 흑색종 MM909.24 및 폐 선암종 A549를 sgRNA로 형질도입시켜 CRISPR-Cas9를 통해 MR1 유전자를 녹아웃시켰다(-/-). 밤새 활성화 및 TNF ELISA. 6h(MM909.24) 또는 18h(A549) 동안 크로뮴 방출 세포독성 분석. (C) MR1의 과발현(+)은 MC.7.G5에 의한 암세포 사멸을 개선시켰다. 비교적 낮은 MC.7.G5 활성화를 유도하는 것으로 나타난 암세포주 C1R 및 HeLa가 MR1을 안정하게 과발현하도록 렌티바이러스에 의해 형질도입되었다. 흑색종 MM909.24가 양성 대조용으로서 포함되었다. 6h 동안 수행된 크로뮴 방출 세포독성 분석. (D) MR1-/- 세포에서의 MR1의 발현은 MC.7.G5의 활성화를 복원시킨다. A549 야생형, MR1-/- 및 MR1 트랜스유전자(+)를 갖는 MR1-/- 세포를 MC.7.G5와의 밤새 활성화 분석에 사용하였다. TNF ELISA. (E&F) MC.7.G5는 공지된 기전에 의해 MR1을 인식하지 않는다: (E) MC.7.G5 클론, 정규 MAIT 클론(5-OP-RU 결합된 MR1을 인식한다), 및 MHC I 제한된 클론 (MEL5/13, HLA A2 제한된, Melan A 펩티드 ELAGIGILTV)이 하기의 사랑체에 의한 염색에 사용되었다: MR1 '빈'(MR1 리간드의 부재하에서 리폴딩을 가능하게 하는 K43A 돌연변이체), MR1 5-OP-RU 및 MHC I(HLA A2 ELAGIGILTV). MHC I 클론이 무관한 MHC I 사랑체에 대한 양성 대조용으로서 사용되었다. (F) MAIT-활성화 세균 마이코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*)가 로딩된 A549는 A549의 MC.7.G5 인식을 감소시켰다. E로부터의 정규 MAIT 클론이 양성 대조용으로서 사용되었다. A549 MR1-/-는 상기 두 클론 모두에 대한 음성 대조용으로서 사용되었다. 표면 CD107a 및 세포내 TNF에 대한 염색. 클론 단독상의 게이트 셋팅. (G) 공지된 MR1 결합 분자인 외인성 Ac-6-FP는 흑색종 MM909.24의 MC.7.G5 인식을 감소시켰다. 모의 처리된 WT 및 Ac-6-FP MR1-/- 표적이 대조용으로서 사용되었다. 좌측 패널: FlowJo에 의해 분석된 3중 양성을 갖는 세포내 CD107a, TNF 및 IFN γ 에 대한 염색. 2회의 실험을 나타내는, 플롯 기호보다 작은 오차 막대. 우측 패널: Ac-6-FP 처리된 표적 세포상의 MR1 발현.

도 15. MC.7.G5 T-세포 수용체의 전달은 자기유래 흑색종을 사멸시키도록 환자 T-세포를 전용한다. (A) 전이성 흑색종 환자(MM909.11 및 MM909.24) 유래된 T-세포를 MC.7.G5 인식된 자기유래 및 비-자기유래 흑색종의 T-세포 수용체로 형질도입시켰다. 형질도입되지 않은 T-세포를 음성 대조용으로서 사용하였다. 4h의 활성화에 이은 표면 CD107a 및 세포내 TNF 염색. (B) MC.7.G5 TCR이 형질도입된 환자 MM909.11로부터의 T-세포는 자기유래 및 비자기유래 흑색종을 사멸시켰으나, 건강한 세포는 사멸시키지 않았다. 자기유래 흑색종, 환자 MM909.24로부터의 흑색종(야생형 및 MR1 녹아웃(-/-)) 및 건강한 세포주: SMC3(평활근); CIL-1(섬모 상피); 및 Hep2(간세포)에 대한 환자 MM909.11로부터의, 형질도입되지 않은(-) 및 MC.7.G5 TCR 형질도입된(+) T-세포에 대한 크로뮴 방출 세포독성 분석. 6h 및 18h 동안, 5:1의 T-세포 대 표적 세포비에서 수행됨.

도 16. (A) MC.7.G5의 유식 세포측정에 의한 표현형분석. (B) 엑손 2에서 MR1 CRISPR-Cas9 유도된 이중대립유전자 결실을 갖는 흑색종 MM909.24의 MR1 유전자좌의 게놈 서열. (C) 항-MR1 항체(Ab)에 대해 평가된 도 14A-D에 사용된 표적 세포의 MR1 발현. (D) 형질도입된 MC.7.G5 TCR의 존재 및 부재하의, 흑색종 환자 MM909.11 및 MM909.24로부터의 T-세포의 rCD2 염색.

도 17. 48시간의 공-배양후 상이한 기원(핵심)의 다양한 암세포주(x-축)의 MC.7.G5 사멸('장기간 사멸 분석') (A). 이는 MC.7.G5가 각 세포주의 95-99.9%를 사멸할 수 있음을 보이며, 이에 의해 도 4에 도시된 비교적 짧은 기간의 사멸 분석으로부터의 데이터를 보충한다. 5:1의 T-세포 대 표적 세포비에서 배양되었고 사멸 정도는 카운팅 비드 또는 CFSE 표지된 참조 세포를 사용하여 측정되었다. (B) MC.7.G5는 7일 동안 공-배양시 정상 세포를 사멸시키지 않았다. 5:1의 T-세포 대 표적 세포비 및 카운팅 비드가 남아있는 표적 세포의 수를 확립시키는데 사용되었다. SMC3(평활근), Hep2(간세포) 및 MRC5(피부 섬유아세포). 흑색종 MM909.11이 양성 대조용으로서 사용되었다. 1000 카운팅 비드당 표적 세포(건강한 또는 흑색종)의 수 \pm MC.7.G5로서 나타내었다. (C) MC.7.G5는 흑색종 MM909.24를 민감하게 사멸시켰다. 7일간 배양되었고 CFSE 표지된 참조 세포가 사멸 정도를 확립시키는데

사용되었다. 같은 분석에서 정상 세포주 Hep2는 사멸되지 않았다.

도 18은 CIR 세포에서 돌연변이된 K43A('빈') MR1의 과발현이 (A) MR1 항체에 의한 CIR-K43A의 높은 염색에도 불구하고 MC.7.G5의 활성화를 유도하지 않았음을 도시한다. (B) 대조적으로, CIR에서 야생형 MR1의 과발현은 MC.7.G5 활성화를 유도하였다. 이는 MC.7.G5 TCR이 화물이 결합된 MR1을 인식함을 추가로 입증하며 빈 K43A MR1 사랑체에 의한 MC.7.G5의 비-염색을 도시하는 도 14E의 데이터를 보강한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 방법 및 물질

[0054] T-세포 클론 MC.7.G5의 조달 및 특성화.

[0055] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 표준 밀도 구배 분리에 의해 건강한 공여자의 혈액으로부터 정제하고, 이어서 인간 선암종 폐포 기저상피 세포주, A549(배양 조건 및 배경 정보에 대해서 ATCC[®] CCL-185)로 자극하였다. A549에 대한 반응에서 T-세포 증식을 추적하기 위해서, PBMC를 세포 염료 카복시플루오레스세인 숙신이미딜 에스테르(CFSE, 몰레큘러 브로브스, 씨모 피서 사이언티픽(Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific), 미국 매사추세츠주 윌섬 소재)로 표지하였다. PBMC를 PBS에서 광범위하게 세척하고 이어서 암실에서 1 μ M CFSE와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양한 다음 과잉의 소 태아 혈청으로 급냉시켰다. CFSE 표지된 PBMC를 단독으로 배양하거나 또는 24 웰 조직 배양 플레이트에서 A549와, T-세포 초회항원자극 배지 중의 $6-8 \times 10^6$ PBMC 및 $0.1-0.2 \times 10^6$ A549의 밀도로 배양하였다(Theaker et al., 2016). 배양 배지를 매주 3회 교환하고(50 부피%) 세포를 총 2주간 배양하였다. A549에 반응하는 증식의 정도를 평가하기 위해서 세포를 배양물로부터 수확하고 PBS 중에서 세척하고 세포 생육력 염료 Vivid(PBS 중의 1:40 희석, 이어서 50 μ l 중의 염료당 2 μ l)(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))로 표지하고 RT에서 5분간 배양 후에 추가로 20분 동안 빙상에서 항-CD3 항체(Ab)(BW264/56, 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec), 독일 베르기쉬 글라드바하 소재)를 가하였다. 세포를 림프구(전방 대 측면 살포제), 단일(전방 대 측면 살포제), 및 Vivid⁺CD3⁺ 세포상에서 게이팅하고 분석을 위해 이변량 플롯을 CD3 Ab 대 CFSE로서 나타내었다. CFSE⁺ 세포(증식된 T-세포)를 앞서 기재된 바와 같이(Theaker et al., 2012) 제한 희석에 의해 클로닝을 위해 BD FACS Aria(센트럴 바이오테크놀로지 서비스즈(Central Biotechnology Services), 영국 카디프 대학)를 사용하여 분류하였다. 활성화 분석의 수행에 앞서, MC.7.G5를 수확하고, 세척하고 앞서 기재된 바와 같이(Wooldridge et al., 2012) 환원된 혈청 배지에서 24h 동안 배양하였다. 후속적으로, MC.7.G5(96 U 웰 플레이트의 웰당 30,000)를, 표지되지 않고 방치되었거나 또는 10 μ g/ml의 MHC 부류 I(W6/32, 바이오레전드(BioLegend), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 또는 MHC 부류 II(Tu39, 바이오레전드) 항체(Ab)로 1h 동안 표지된 A549(60,000/웰)와 배양하였다. 세척 없이 MC.7.G5를 상기 웰에 100 μ l의 최종 부피로 가하였으며, 이때 클론을 또한 단독으로 또는 10 μ g/ml의 피토헤마글루티닌(PHA)과 배양하였다. 밤새 배양 후에, 상등액을 수확하고 TNF α ELISA(R&D 리써치(Research), 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)에 의해 전개시켰다. MC.7.G5를 CD3(밀테니 바이오텍), CD8(BW135/80, 밀테니 바이오텍), CD4(M-T466, 밀테니 바이오텍), $\gamma \delta$ TCR(11F2, 밀테니 바이오텍) 및 $\alpha \beta$ TCR(BW242/412, 밀테니 바이오텍)의 표면 발현을 위해 Ab로 염색하였다. 염색을 위해, 상기 클론을 배양물로부터 수확하고, PBS로 세척하고, 실온(RT)에서 생육력 착색제 Vivid로 표지한 다음 각각의 Ab로 빙상에서 20분간 별도로 표지하였다. 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson) FACS 칸토(Canto) II상에서 포획을 수행하고 FlowJo 소프트웨어(트리 스타(Tree Star))를 사용하여 데이터를 분석하였다. 세포 크기(림프구 게이트), vivid⁺ 세포 및 이어서 관심 세포 표면 마커에 대한 게이팅을 히스토그램으로서 나타내었다.

[0056] MC.7.G5는 정상 세포에 반응하지 않는다.

[0057] 건강한 세포 및 그의 전용 배양 배지를 사이언셀(Sciencell)(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)로부터 수득하고 물질 및 방법 섹션의 다른 어딘가에 기재된 활성화 및 세포독성 분석에 표적 세포로서 사용하였다. SMC3(인간 결장 평활근), CIL-1(인간 비-착색된 섬모 상피) 및 Hep2(인간 간세포)를 모두 96 U 웰 플레이트의 웰당 60,000 세포로 사용하였다. 추가로, 노화 지연을 위해 hTERT를 발현하는 MRC-5(폐 섬유아세포, ATCC[®] 참조 CCL-171)를 같은 분석에 또한 사용하였다.

[0058] MC.7.G5 TCR α 및 β 채의 서열

[0059] RNA를 RNEasy 마이크로 키트(퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 추출하였다. cDNA를 제조사의 설명에 따라 5'/3'

SMARTer 키트(클론테크(Clontech), 프랑스 파리 소재)를 사용하여 합성하였다. 상기 SMARTer 접근법은 모로니 쥐 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효소, 3' 올리고-dT 프라이머 및 5' 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 공지된 보편적인 앵커 서열이 측면에 인접된 cDNA 주형을 생성시켰다. 이어서 PCR을 단일 프라이머 쌍을 사용하여 셋업하였다. TCR- β 불변 영역-특이성 역방향 프라이머(C β -R1, 5'-GAGACCTCAGGCGGCTGCTC-3', 서열번호 9, 유로핀스 게노믹스(Eurofins Genomics), 독일 에벨스베르크 소재) 및 앵커-특이성 순방향 프라이머(클론테크)를 하기의 PCR 반응에 사용하였다: 2.5 μ l 주형 cDNA, 0.25 μ l 고충실도 퓨전(Phusion) Taq 폴리머라제, 10 μ l 5X 퓨전 완충제, 0.5 μ l DMSO(모두 써모 피셔 사이언티픽으로부터), 1 μ l dNTP(각각 50 mM, 라이프 테크놀로지스), 1 μ l의 각각의 프라이머(10 μ M), 및 50 μ l의 최종 반응 부피를 위한 무-뉴클레아제 수. 후속적으로, 2.5 μ l의 첫 번째 PCR 산물을 취하고, 네스티드 프라이머 쌍(C β -R2, 5'-TGTGTGGCCAGGCACACAGTGTG-3, 서열번호 10, 유로핀스 게노믹스 및 클론테크로부터의 앵커-특이성 프라이머)을 사용하여 상기와 같은 네스티드 PCR을 셋업하였다. 상기 두 PCR 반응을 위한 순환 조건은 하기와 같았다: 94°C 5분, 30주기의 94°C 30s, 63°C 30s, 72°C 90s, 및 최종적으로 72°C 10분. 최종 PCR 산물을 1% 아가로스 겔상에 로딩하고 QIAEX II 겔 추출 키트(키아젠)로 정제하였다. 정제된 산물을 제로 블런트(Zero-Blunt) TOPO내에 클로닝하고 표준 서열분석을 위해 원샷 화학 능력 이콜라이 세포내로 형질전환시켰다(둘 다 라이프 테크놀로지스로부터).

[0060] **클론 MC.7.G5는 광범위한 중앙 표적에 반응한다.**

[0061] 활성화 분석, 및 또한 나트륨 크로메이트(크로뮴⁵¹) 표지된 표적 세포(Ekeruche-Makinde et al., 2012), 또는 유식 세포측정 기반 장기간 사멸 분석을 사용하는 세포독성 분석을 상기와 같이 수행하였다(물질 및 방법 섹션의 다른 어딘가를 참조하시오). 크로뮴 방출 분석을 위해 각각의 세포주를 1x10⁶ 세포당 Cr⁵¹의 30 μ Ci(파킨 엘머, 미국 매사추세츠주 윌섬 소재)로 표지하고 웰(96 U 웰 플레이트)당 2000 표적 세포를 MC.7.G5와 함께 사용하여 목적하는 T-세포 대 표적 세포비를 성취하였다. 밤새 배양후에 상등액을 수확하고, 섬광제와 혼합하고 마이크로베타(Microbeta) 계수기를 사용하여 판독하고 비용을 앞서 기재된 바와 같이 산정하였다(Ekeruche-Makinde et al., 2012). 상기 A549 HEK293T 외에, 사용된 암세포주에 대한 세부사항은 하기와 같다: 세포주 명칭(배경 및 배양 정보에 대해서 ATCC[®] 참조 또는 ECACC 수)/기원 조직 또는 기관: HEK293T(태아 신장, CRL-1573); LnCaP(CRL-1740)/전립선; SiHa(HTB-35) 및 HeLa(CCL-2)/자궁경부; MCF7(HTB-22), MDA-MB-231(CRM-HTB-26) 및 T47D(HTB-133)/유방; TK143(CRL-8303) 및 U2OS(HTB-96)/뼈; HCT-116(CCL-247)/결장; Jurkat(TIB-152), T2(.174 x CEM.T2)(CRL-1992), K562(CCL-243), CIR 발현 HLA-A2(CRL-1193), THP-1(TIB-202), U266(TIB-196) 및 Molts(CRL-1552)/모든 혈액; FM74(ECACC 13012422), SK-Mel-28(HTB-72) 및 FM45(ECACC 13012410)/모든 피부 흑색종. RC177(신장, 신세포 암종), MM909.11, MM909.15 및 MM909.24(모든 피부 흑색종)를 암 면역요법 치료 센터(CCIT, 헤르레프 병원, 덴마크 코펜하겐 소재)에서 치료된 암 환자로 부터 수득하였다.

[0062] **T 세포 클론**

[0063] 멜란(Melan) A(Woodridge et al (2010); Lissina et al (2009))로부터 펩티드 EAAGIGILTV 및 ELAGIGILTV(2번 위치의 불규칙변화성 L)를 인식하는 HLA-A*0201 제한된 클론 MEL5/13 및 정규 MAIT 클론을 앞서 기재된 바와 같이 배양하였다(Tungatt et al (2014)).

[0064] **전장 게놈 CRISPR에 의한 유전자 포획법**

[0065] 전장 게놈 CRISPR/Cas9 라이브러리 접근법을 사용하였다(개요에 대해서 도 5 및 14 및 또한 최근에 문헌[Patel et al., 2017]에 기재되었다). GeCKO v2 하위-라이브러리 A 및 B(애드진(Adgene) 플라스미드, #1000000048, 펑장 박사(Dr. Feng Zhang)에 의해 기탁됨)를 사용하는 전장 게놈 표적화된 HKE293T를 MC.7G.5에 의한 선택에 사용하였다. 간단히, 퓨로마이신으로 선택된 성공적으로 형질도입된 HEK293T(0.4의 MOI)를 MC.7G.5와 1:1의 소정의 비로 2 내지 3주간 96 웰 편평바닥 플레이트에서 공-배양하였다. MC.7G.5에 의한 2회 라운드의 선택에 생존한 HEK293T로부터의 게놈 DNA를, 삽입된 가이드 RNA 및 따라서 제거를 위해 표적화된 유전자를 밝혀내기 위한 차세대 서열분석에 사용하였다.

[0066] **클론 MC.7.G5는 MR1을 통해 표적 특이성을 나타낸다.**

[0067] MHC 차단 Ab에 대한 상기와 같은 동일한 접근법을 사용하여, 항-MR1 항체를 사용하는 활성화 분석을 또한 수행하였다, 도 6 및 도 14(클론 26.5, 바이오레전드). MC.7.G5를 앞서 기재된 바와 같이(Laugel et al, 2016) MR1 유전자의 발현을 제거하도록 CRISPR/Cas9 기술로 표적화한 A549 및 MM909.24 세포와 함께 활성화 분석에 사용하였다. 세포주를 상기와 같은 활성화 및 크로뮴 방출 분석에 사용하였다. 완전길이 코돈 최적화된 MR1 유전자를

렌티바이러스 입자로서 생성시켰으며 하기에 MC.7G.5 TCR에 대해 기재된 바와 유사한 방법(단일 유전자, 및 이 경우에 ratCD2 없이)을 사용하여 표적 세포에 형질도입시켜 MR1 과발현(고) 세포주를 생성시켰다. MR1 발현을 2% FBS가 있는 50 μ l의 PBS 중에서 착색제당 10 μ g/ml의 MR1 Ab(상기와 같은) 및 50,000 세포를 사용하여 평가하였다. MM909.24에서의 MR1 녹아웃을 상기 A549에 대해 기재된 바와 같이 성취하였다(6). 활성화 분석을 세포주: MM909.24 wt, MM909.24 MR1^{-/-}, MM909.24 MR1^{+/+}, pt146 wt(B-림프모구성 세포주), pt146 MR1^{-/-} 및 pt146 MR1^{+/+}로 상기와 같이 수행하였다.

[0068] **클론 MC.7.G5는 사랑체 형태의 MAIT 리간드 MR1-5-OP-RU 또는 MR1-Ac-6-FP에 의해 염색되지 않는다.**

[0069] MC.7.G5를 배양물로부터 수확하고, PBS + 2% FBS에서 세척하고, 이어서 50 nM의 단백질 키나제 억제제(PKI), 다사티니브(Lissina et al., 2009)로 처리하고, 이어서 Ac-6-FP 또는 5-OP-RU로 리폴딩된 MR1과 조립된 PE 접합된 사랑체로 표지하였다, 도 6 및 14. 상기 사랑체 염색된 세포를 앞서 기재된 바와 같이(Tungatt et al., 2015) 접합되지 않은 항-PE Ab로 표지한 다음 Vivid 및 항-CD8 Ab로 표지하였다. MR1-5-OP-RU 반응성 MAIT 클론을 양성 대조용으로서 작용하도록 동일한 방식으로 염색하였다. 세포를 크기에 이어서 Vivid⁺CD8⁺에 대해 게이팅하고 상기와 같은 데이터 획득 및 분석과 함께 사랑체 형광의 히스토그램으로서 나타내었다.

[0070] **Ac-6-FP 및 M.smeg 감염은 세포 표면에서 MR1의 발현 중대에도 불구하고 클론 MC.7.G5에 의한 인식을 감소시킨다.**

[0071] MC.7.G5를 50 μ g/ml(도 8), 및 1, 10 또는 100 μ g/ml(도 14)의 Ac-6FP와 예비-배양된 표적 세포(MM909.24 및 A549)를 사용하는 활성화 분석에 사용하였다. 추가로, M.smeg가 로딩된 A549 세포를 또한 사용하였다. 처리되지 않고 방치된/로딩되지 않은 표적 세포를 음성 대조용으로서 사용하였다, 도 8 및 14. A549를 100:1 M.smeg 대 A549의 MOI로 M.smeg와 무항생제 배지에서 2h 동안 배양한 다음 상기 세포를 배양 플라스크에서 세정하고 이어서 R10에서 2h 동안 배양하였다. MC.7.G5 및 MAIT 클론을 TNF 가공 억제제(TAPI)-0(30 μ M) 및 항-CD107a Ab(H4A3, BD)의 존재하에서 4-5h 동안 배양하고, 이어서 항-TNF Ab(cA2, 밀테니 바이오텍), 항-CD3 Ab, 항-CD8 Ab 및 Vivid로 염색하였다. 상기와 같은 데이터 획득 및 분석과 함께 크기, 단일, vivid⁺CD3⁺ 세포 이어서 CD8⁺ 대 CD107a 또는 TNF α 에 대한 게이팅. 각각의 표적 세포를 또한 2% FBS가 있는 50 μ l의 PBS 중에서 착색제당 50,000 세포를 사용하여 10 μ g/ml의 Ac-6FP 또는 M.smeg와 배양 후 MR1 Ab로 염색하였다.

[0072] **MC.7.G5 TCR에 의한 다클론 T-세포의 형질도입(도 2에 도시됨)은 중앙 인식을 부여한다.**

[0073] 자기-절단 2A 서열에 의해 분리된, 코돈 최적화된 완전길이 TCR쇄를 합성하고(진위즈(Genewiz)) 3세대 렌티바이러스 전달 벡터 pELNS(친절하게도, 미국 펜실베이니아 소재 펜실베이니아 대학의 제임스 릴리 박사에 의해 제공됨)내에 클로닝하였다. 상기 pELNS 벡터는 또 다른 자기-절단 2A 서열에 의해 상기 TCR로부터 분리된 래트 CD2(rCD2) 마커 유전자를 함유한다. 렌티바이러스 입자를 HEK293T 세포의 염화 칼슘 형질감염에 의해 생성시켰다. TCR 전달 벡터를 패키징 및 외막 플라스미드 pMD2.G, pRSV-Rev 및 pMDLg/pRRE로 동시-형질감염시켰다. 렌티바이러스 입자를, 미리 24h 동안 건강한 공여자(도 9) 또는 흑색종 환자(도 15)로부터 자기 분리(밀테니 바이오텍)에 의해 정제시키고 3:1 비드:T-세포 비로 CD3/CD28 비드(다이나비즈(Dynabeads), 라이프 테크놀로지스)로 밤새 활성화시킨 CD8⁺ T-세포와 함께, 5 μ g/ml의 폴리브렌을 사용하여 CD8⁺ T-세포의 형질도입에 앞서 한외원심 분리에 의해 농축시켰다. 상기 바이러스를 흡수한 T-세포를 항-rCD2 PE Ab(OX-34, 바이오레전드)에 의한 농축에 이어서 항-PE 자기 비드(밀테니 바이오텍)에 의해 선택하였다. 형질도입 14d 후에 T-세포를 동종이계 공급기로 확대시켰다. 모든 기능 실험에 대해서, MC.7.G5 TCR 형질도입된 T-세포는 >95% rCD2⁺이었으며 기능 분석에 사용되었다(도 16). 형질도입된 세포를 30 mM의 TAPI-0 CD107a Ab의 존재하에서 4-5h 동안 표적 세포와 배양하고 이어서 TNF α , CD3, CD8 및 또한 Vivid에 대한 Ab로 염색하였다. 크기, 단일, vivid⁺CD3⁺ 세포 및 이어서 CD8⁺ 대 CD107a 또는 TNF α 에 대한 게이팅. 데이터 획득 및 분석은 상기와 같다. 환자로부터의 TCR 형질도입된 T-세포를 또한 상술한 바와 같이 크로뎀 방출 세포독성 시험(도 15)에 사용하였다.

[0074] **유식 세포측정**

[0075] 세포를 고정성 생/사 바이올렛 염료(라이프 테크놀로지스) 및 하기의 표면 항체: 범- $\alpha\beta$ TCR PE(클론 IP26, 바이오레전드), 범- $\gamma\delta$ TCR-FITC(클론 REA591, 밀테니 바이오텍), CD3 PerCP(클론 UCHT1, 바이오레전드), CD4 APC(클론 VIT4, 밀테니 바이오텍), CD8 PE(클론 BW135/80, 밀테니 바이오텍), 래트 CD2 PE(클론 OX-34, 바이오레전드) 및 MR1 PE(클론 26.5, 바이오레전드)로 염색하였다. MR1 PE에 의한 염색을 위해 Fc 블록(밀테니 바이오

텍)을 제조사의 설명에 따라 사용하였다. 사랑체 염색의 경우, MR1 단량체가 제이미 로스존(Jamie Rossjohn)(모내쉬 대학)에 의해 제공되었으며, pMHC 단량체는 사내 생산되었다. 사랑체를 조립하고 앞서 기재된 바와 같이 최적화된 염색에 사용하였다(Tungatt et al(2014)). 데이터를 BD FACS 칸토 II(BD 바이오사이언시즈)상에서 획득하고 FlowJo 소프트웨어(트리스타)로 분석하였다.

[0076] MR1 녹아웃 및 트랜스유전자 발현

MR1 sgRNA 및 CRISPR/Cas9 렌티바이러스를 앞서 기재된 바와 같이 생성시키고 사용하였다(Laugel et al(2016)). MR1 트랜스유전자를, 인간 PGK 프로모터 및 GFP cDNA가 없는 디디엘 트로노(Didier Trono)의 실험실에 의해 개발된 2 세대 pRRL.sin.cppt.pgk-gfp.wpre 렌티벡터 주쇄(에드진 12252번) 내로 클로닝하고, 렌티바이러스 입자를 MR1 sgRNA에 대해 기재된 바와 같이 생성시켰다(Laugel et al(2016)). 표적 세포를 8 μ g/ml 폴리브렌의 존재하에서; 37°C에서 2시간 동안 500xg에서 스피감염시켰다(spinfected)(Shalem et al(2014)). 항-MR1 항체 PE(클론 26.2, 바이오레전드) 양성 세포를 제조사의 설명(밀테니 바이오텍)에 따라 항-PE 자기 비드를 사용하여 자기에 의해 농축시켰다.

[0078] TCR 서열분석 및 형질도입

MC.7.G5 TCR을, SMARTer RACE 키트(클론테크) 및 TCR- α 및 TCR- β 불변 영역에 특이적인 보편적인 순방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 사용하는 2-단계 폴리머라제 체 반응을 사용하여 사내에서 서열분석하였다. 이어서 상기 TCR을 코돈 최적화(진위즈)로 합성하였으며, 이때 완전길이 TCR 체는 자기-절단 2A 서열에 의해 분리되었다(Ryan et al 1991). 상기 TCR을 제2의 2A 자기-절단 서열에 의해 상기 TCR로부터 분리된 rCD2를 함유하는 3 세대 pELNS 렌티바이러스 벡터(친절하게도 펜실베이니아 대학의 제임스 킬리 박사에 의해 제공됨)내에 클로닝시켰다. 렌티바이러스 입자를 HEK293T 세포의 염화 칼슘 형질감염에 의해 생성시키고 환원원심분리에 의해 농축시켰다. 치료후 PBMC를 TIL 환자 MM909.11 및 MM909.24로부터 수득하였으며 CD8 및 CD4 T 세포를 자기 농축(밀테니 바이오텍)에 의해 정제시켰다. T 세포를 후속적으로 3:1 비드 대 T 세포비로 CD3/CD28 비드(다이나비즈; 라이프 테크놀로지스)와의 배양에 의해 활성화시켰다. 이어서 T-세포를 5 μ g/ml 폴리브렌(산타 크루즈 바이오 테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology))의 존재하에서 MC.7.G5 TCR로 형질도입시켰다. 상기 바이러스를 흡수한 T 세포를 제조사의 설명(밀테니 바이오텍)에 따라, 항-rCD2 항체 및 항-PE 자기 비드로 자기에 의해 농축시켰다. 형질도입 14일 후에 T 세포를 앞서 기재된 바와 같이(Tungatt et al(2014)) 확대시켰다. 모든 기능 실험에 대해서, 형질도입된 T 세포는 >85% rCD2+이었다(도 16D).

[0080] 전장 게놈 GeCKOv.2 선별

GeCKOv.2 라이브러리용 렌티바이러스 입자(친절하게 켄 장에 의해 제공된 플라스미드(Sanjana et al (2014))(에드진 플라스미드 #1000000048)). 상기 GeCKOv.2 라이브러리는 19,050개의 단백질-암호화 유전자를 표적화하는 123,411개의 단일 가이드 (sg)RNA(유전자당 6개의 sgRNA) 및 1,864개의 미세RNA(미세RNA당 4개의 sgRNA)로 이루어지며 표적 세포주 HEK293T를 형질도입시키기 위한 렌티바이러스로서 사용되었다. 4x10⁷ HEK-293T 세포를 0.4의 MOI로 형질도입시켜 각 하위라이브러리의 100X 커버리지를 제공하였다. 상기 렌티바이러스를 흡수한 세포는 퓨로마이신하에서 선택되었다. 14일 후에, 상기 라이브러리의 절반을 대조용으로서 동결시켰다. MC.7.G5를 나머지 형질도입된 HEK-293T 세포에, 20 IU IL-2 배지 중의 0.25:1의 T-세포 대 HEK293T 비로 가하였다. 14일 후에, MC.7.G5를 다시 0.5:1 비로 가하였다. 7일 후에 상기 HEK293T 세포를 서열분석에 사용하였다. 3x10⁷의 HEK-293T 세포(선택되지 않은 대조용 및 MC.7.G5로 선택된)로부터 게놈 DNA를 분리하였다(GenElute 포유동물 게놈 DNA 미니프랩 키트, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)). 분리된 게놈 DNA(50 μ l 반응당 2.5 μ g) 전체를, 상기 라이브러리의 전체 표출을 확실히 포획하기 위해 후속 PCR에 사용하였다. 상기 2단계 PCR을 HPLC 정제된 프라이머 및 NEBNext 고충실도 PCR 마스터믹스(뉴잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs))를 사용하여 이전에 기재된 바와 같이(Shalem et al(2014)) 수행하였다. <300 bp PCR 산물을 후속적으로 아가로스 겔로부터 분리하고, 80 주기의 판독 1(sgRNA의 서열을 측정하기 위해) 및 8 주기의 판독 2(샘플-특이성 바코드를 식별하기 위해)로, HiSeq 장치(일루미나(Illumina))상에서 서열분석하였다. 농축된 가이드의 분석을 MAGeCK 분석(Li et al(2014))을 사용하여 수행하였다.

[0082] 장기간 사멸 분석

유동-기반 사멸 분석을 위해 5000 내지 10,000개의 암 또는 정상 세포주를 96U 웰 플레이트에 놓고, MC.7.G5 클론을 가하여 표적 세포(실험 웰)당 5개의 T-세포를 제공하였다. 상기 세포를 20 IU의 IL-2 및 25 ng/ml의 IL-15가 보충된 200 μ l의 표적 세포 배지에서 공-배양하였다. 표적 세포(대조용 웰), MC.7.G5 및 CSFE CIR을 또한 단

독으로 배양하여 분석을 보조하였다. 상기 세포를 48시간 동안 배양하였다. 감도 분석을 위해 MC.7.G5의 수를 표적 세포에 대해 적정하고 7일 동안 배양하였다. 물질 및 방법 섹션의 다른 어딘가에 기재된 세포주 외에, 난소암 세포주 A2780(ECACC 93112519)을 또한 사용하였다. 수확에 앞서, 0.1×10^6 CFSE 표지된($0.1 \mu\text{M}$) CIR 세포를 각 웰에 가하여 실험 및 대조용 웰에 남아있는 표적 세포의 수를 확립시켰다. 상기 세포를 2 mM EDTA가 보충된 냉장 D-PBS로 3회 세척하고, 이어서 상기 분석 플레이트에서 고정성 생/사 바이올렛 염료(라이프 테크놀로지스), 이어서 CD3 PerCP(클론 UCHT1, 바이오레전드) 및/또는 항-TRBV25.1 APC TCR(TRBV11 아텐(Arden) 명명법: 카탈로그 A66905, 벡크만 쿨터(Beckman Coulter)) Ab로 염색하여 죽은 세포 및 T-세포가 게이팅-아웃되게 하였으며, 이는 분석에 실행가능한 표적 세포를 남겼다. 사멸 백분율을 하기 식을 사용하여 산정하였다:

$$\text{사멸\%} = 100 - ((\text{실험 표적 세포 사건} \div \text{실험 비드 또는 CFSE CIR 사건}) \div (\text{대조용 표적 세포 사건} \div \text{대조용 비드 또는 CFSE CIR 사건}) \times 100)$$

CIR 세포 발현 빈(K43A) MR1에 의한 활성화 분석

CIR 세포를 야생형 MR1에 관하여 K43A 돌연변이(R. Reantragoon et al)를 갖는 MR1으로 형질도입시켰다. 활성화 분석 및 유식 세포측정을 물질 및 방법 섹션의 다른 어딘가에 기재된 바와 같이 수행하였다.

결과

클론 특성화

1. T-세포 클론 MC.7.G5는 A549 세포를 인식한다(도 1A). $10 \mu\text{g/ml}$ 의 차단 MHC-I 및 MHC-II 항체의 첨가는 인식을 차단하지 않았다(도 1B).

2. 항체 염색 및 유식 세포측정은 클론 MC.7.G5가 $\alpha \beta$ TCR을 발현하고 CD8+임을 입증하였다(도 1C 및 도 16A에서 반복됨).

3. 중요하게 T-세포 클론 MC.7G.5는 정상(비-암) 세포주에 반응하지 않는다(도 2 및 도 17B&C). 상기 MC.7.G5 TCR이 1차 CD8 T-세포에서 발현시 상기는 정상 세포의 사멸을 매개하지 않았다(도 15B). 상기 MC.7.G5 클론은 자신 또는 신선한 말초 혈액 단핵세포에 반응하지 않았다(도시 안 됨). 상기 MC.7G.5 T-세포 클론은 명백한 손상 없이 정상적인 건강한 공여자로부터 단리되었다. 본 발명자들은 T-세포 클론 MC.7G.5가 종양-특이성이라는 결론을 내린다.

4. MC.7.G5 T-세포 클론은 도 3에 도시된 서열의 TRAV38.2/DV8 TRAJ31 및 TRBV25.1 TRBJ2.3으로부터 제조된 TCR을 발현한다. MR1-제한된 클론 MC.7.G5는 MAIT가 아니며 MAIT TCR α 쇄를 발현하지 않는다.

5. MC.7.G5 T-세포 클론은 광범위한 암 세포주에 반응하여 MIP1 β (도 4A) 및 TNF α (도 4A)를 만든다. MC.7.G5는 또한 매우 낮은 효과기 대 표적 비(도 4B 및 17C)에서조차 다수의 암세포에 대해 대단히 세포독성이다(도 4B 및 17A). MC.7G.5는 시험된 모든 유형의 암: 혈액, 뼈, 흑색종(피부), 결장, 신장, 폐, 자궁경부, 유방, 난소 및 전립선을 인식하였다. 더욱이, 이러한 세포독성은 유효하고 민감하였다: 장기간(48시간) 사멸 분석으로부터의 데이터는 낮은 T-세포 대 표적세포 비(도 17C)에서 암세포주의 >95% 사멸을 나타내었다(도 17A).

6. MC.7.G5 암 표적의 전장 게놈 CRISPR/Cas9 라이브러리는 클론 MC.7.G5에 의한 용해에 내성인 표적 세포주를 생성시킴으로써 MR1을 MC.7.G5의 리간드로서 밝혀내었다. 이러한 내성 세포주 중의 가이드 RNA의 서열분석은 상기가 주로 대사 및 면역계에 관련된 유전자를 표적화함을 보였다. MR1 및 $\beta 2$ 미세글로불린에 대한 가이드 RNA는 MC.7.G5에 의한 용해에 내성인 세포 집단에 매우 농축되었다. 이들 유전자는 MAIT 세포 활성화에 대한 그들의 연관성으로 인해 즉각적으로 본 발명자들의 주목을 끌었다(MR1은 폴딩을 위해 $\beta 2$ 미세글로불린을 필요로 한다).

7. 항-MR1 항체에 의한 차단은 A549 세포주의 인식을 제거하였다(도 6A 및 도 14에서 반복됨).

6. 암 세포주 A549(클론 c9) 및 MM909.24(클론 c4)는, MR1이 이들 세포주로부터 녹아낼 때 인식되지 않았다(도 6B&C 및 14). 렌티바이러스 형질도입을 통한 MM909.24에서의 MR1의 과발현은 인식을 약간 증대시킨다(도 6D 및 14).

8. LCL 계통 pt146은 T-세포 클론 MC.7.G5에 의해 인식되지 않는다. MC.7.G5는 또한 상기가 MR1-발현 렌티바이러스로 형질도입되고 세포 표면에서 일부 MR1 발현을 나타낼 때조차 pt146 세포를 인식하지 못한다. LCL 계통 pt146은 MC.7.G5 T-세포 리간드를 발현하지 않는다. 이는 MC.7.G5가 MR1 자체에 반응하지 않고 오히려 상기 MR1

결합 홈내 특유의 압 특이성 리간드를 인식함을 암시한다(도 6).

[0098] 9. 클론 MC.7.G5는 Ac-6-FP 또는 5-OP-RU 로딩된 MR1 사랑체로 염색되지 않는다(도 7 및 도 14E에서 반복됨). MAIT T-세포 클론은 병행 분석에서 MR1-5-OP-RU 사랑체로 염색된다. 본 발명자들은 MC.7.G5가 MAIT 리간드에 결합하지 않는다는 결론을 내린다. 이러한 발견은 MC.7.G5가 정규 MAIT 불변성 TRAV1-2 α 쇄를 발현하지 않음과 일치한다. 이는 '빈'(K43A) MR1 사랑체(이는 MC.7.G5를 염색하지 않았다)를 사용하여 입증되었다. 상기 MR1의 K43A 돌연변이는 결합된 화물의 부재하에서 MR1의 리폴딩을 허용한다, 도 14. 유사하게, 빈(K43A) MR1의 발현은 C1R상에서 MR1의 양호한 세포 표면 발현에도 불구하고 MC.7.G5에 의한 인식을 도출하지 않는다(MR1 Ab 염색 우측 패널) 도 18. 이는 MR1에 결합된 압-발현된 리간드가 MC.7.G5 활성화에 중요함을 추가로 입증한다.

[0099] 10. 12시간 동안 10, 50 또는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MR1 리간드 Ac-6-FP(<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4pj5>)의 부가는 MM909.24 세포의 표면에서 MR1 발현을 실질적으로 증대시키지만(도 8 및 14G) 클론 MC.7.G5에 의한 상기 세포의 인식은 낮춘다(도 8 및 14G). 이러한 발견은 클론 MC.7.G5가 MM909.24 세포 표면상의 Ac-6-FP와 상이한 MR1-결합된 리간드를 인식할 것임을 강하게 암시한다. 유사한 발견이 A549 세포에서 관찰되었다. A549 세포와 Ac-6-FP와의 배양은 상기 표면상의 MR1 발현을 증가시키는 반면 인식은 감소시켰다. 마이코박테리움 스메그마티스(M.smeg)에의 A549 세포의 노출은 또한 MR1 발현을 증대시켰다. 이는 M.smeg가 MR1 리간드를 생성시킴이 공지되어 있기 때문에 예상된다. 이들 리간드는 MAIT 세포에 의해 인식될 수 있다. M.smeg 감염된 A549 세포는 병행 실험에서 MAIT 클론에 양호한 리간드였다(도 8 및 14F). M.smeg에의 A549 세포의 노출은 클론 MC.7.G5에 의한 인식을 실질적으로 감소시켰다. 본 발명자들은 클론 MC.7.G5가, 오직 암세포상에만 존재하는 MR1 결합 홈 중의 리간드를 통해 암세포를 인식한다는 결론을 내린다.

[0100] 11. MC.7.G5의 다클론 T-세포내로의 형질도입은 상기가 종양 표적을 인식하게 한다(도 9). 실제로, 상기 MC.7.G5 TCR로 형질도입된 전이성 흑색종 환자 MM909.11으로부터의 CD8 T-세포는 자기유래 및 비-자기유래 흑색종을 사멸시켰지만, 정상 세포는 사멸시키지 않았다(도 15). 본 발명자들은 클론 MC.7.G5에 의한 종양 인식이 MR1 분자에 의해 제공된 리간드를 통해 도 3에 도시된 MC.7.G5 T-세포 수용체를 통해 발생한다는 결론을 내린다.

[0101] 6개의 상이한 단일 가이드(sg)RNA를 갖는 인간 게놈 중 모든 단백질-암호화 유전자를 표적화하는 GeCK0v.2 라이브러리를 사용하는 게놈-와이드 CRISPR/Cas9 접근법을 사용하여 MC.7.G5에 의한 표적 세포의 인식에 필수적인 유전자를 식별하였다(도 13A). MC.7.G5에 의한 2회 라운드의 선택에 이어서, 생존하는 형질도입된 HEK293T 세포는 감소된 MC.7.G5 자극 능력을 나타내었으며, 이는 그의 인식에 관련된 핵심 유전자가 제거되었음을 암시한다(도 13B). 용해 내성 HEK293T 세포에서 CRISPR sgRNA의 서열분석은 단지 6개의 유전자만이 하나 초과와 농축된 sgRNA: β 2M(5개의 sgRNAs), MR1(2개의 sgRNAs), 조절 인자 X(RFX, 5개의 sgRNAs), RFX 관련 안키린 함유 단백질(RFXANK, 5개의 sgRNAs), RFX 관련 단백질(RFXAP, 3개의 sgRNAs), 및 전사 6의 신호 전달제 및 활성제(STAT6, 2개의 sgRNAs)에 의해 표적화됨을 보였다(도 13C). RFX, RFXANK 및 RFXAP는 β 2M, MHC I 및 MHC II 프로 모터의 전사활성화를 담당하는 단백질 복합체의 필수 성분들이다. β 2M 및 MR1이 연합하여 MAIT 및 다른 MR1-제한된 T-세포를 활성화하는 것으로 공지된 비-다형태성의 안정한 항원-제공 분자를 형성한다는 사실과 함께, 이들 데이터는 상기 MC.7.G5 T-세포가 불변성 MR1 분자를 통해 암 표적을 인식함을 강하게 암시하였다. 상응하게, MR1 항체(그러나 MHC I 또는 MHC II 항체는 아님)는 MC.7.G5에 의한 표적 세포 인식을 차단하였다(도 14A). A549 및 흑색종 MM909.24로부터의 MR1의 CRISPR 매개된 녹아웃(도 16B에 도시된 결실 돌연변이)은 MC.7.G5-매개된 인식 및 용해로부터 보호되었다(도 14B). 흑색종 MM909.24는 항-MR1 항체로 염색되지 않았으며 이는 표적 인식에 매우 최소 수준의 MR1이 요구됨을 암시하였다(도 16C). MR1의 과발현은 불충분하게 인식된 표적, HeLa 및 C1R의 강한 인식을 생성시켰으며, 흑색종 MM909.24의 인식을 약간 증대시켰다(도 14C). MR1의 CRISPR/Cas9 MR1-녹아웃 A549 세포내로의 재도입은 MC.7.G5에 의한 인식을 복원시켰으며(도 14D), 이는 암세포 인식이 MR1-의존성이라는 추가적인 신뢰를 심어주었다.

[0102] MR1은 MAIT 세포에 세포 표면의 리보플라빈 합성 중간체를 제공하는 것으로 공지되어 있으며 결합된 화물 없이는 상기 세포 표면에서 발현되지 않는 것으로 여겨진다. MC.7.G5는 결합된 리간드 없이 MR1 리폴딩을 허용하는 K43A 돌연변이를 함유하는 MR1으로 구성된 사랑체로 염색되지 않았다. 암세포의 MR1-의존적인 인식은 MC.7.G5가 악성 세포에서 특이적으로 발현되거나 상향조절된 MR1-결합된 대사산물을 인식할 수도 있음을 암시하였다. 상기 가설과 일치하여, MC.7.G5는 MR1 제공 미생물 유래된 T 세포 활성제 5-OP-RU와 조립된 사랑체로 염색되지 않았다. 더욱 또한, 표적 세포의 인식은, MR1의 표면 발현의 증가에도 불구하고(도 14G), MAIT 활성화 세균 마이코박테리움 스메그마티스(M.smeg)(도 14F) 또는 MR1 리간드 아세틸-6-포르밀프테린(Ac-6-FP)(22,23)(도 14G)가

로딩될 때 감소되었다. 이러한 결과는 MC.7G.5가 공지된 이전에 의해 MR1 자체도, MR1도 인식하지 않으며, 오히려 암세포에 특이적이거나 또는 암세포에 결합된 화물이 있는 MR1을 인식함을 가리킨다.

- [0103] MC.7.G5의 TCR 서열분석은 TRBV25.1 TRBJ2.3 β -쇄와 짝을 이룬 TRAV38.2/DV8 TRAJ31 α -쇄로 구성된 신규의 TCR을 밝혀내었다. 암세포상의 MR1을 표적화하는 치료학적 가능성을 탐구하기 위해서 본 발명자들은 T-세포를 IV기 흑색종 환자로부터 정제하고 상기를 MC.7.G5 TCR로 렌티바이러스에 의해 형질도입시켰으며, 이는 자기유래 및 비-자기유래 흑색종의 인식 및 사멸을 생성시켰지만(도 15), 건강한 세포는 그렇게 하지 않았다(도 15B). 상기 사멸은 상기 MC.7.G5 TCR 형질도입된 세포가 MR1 녹아웃 흑색종을 용해하지 않았기 때문에 MR1에 특이적이었다(도 15B). 본 발명자들은 상기 MC.7.G5 TCR이 환자 T-세포를 특정한 HLA의 요구 없이 환자의 암세포를 사멸시키는 데 전용할 수 있다는 결론을 내린다. MR1은 그의 비-다형태성의, 편재하여 발현되는 성질로 인해 암 면역요법에 매력적인 표적이다. MR1 사량체 및 리간드 발견에 있어서 최근의 진보는 상기 분야에서 진전된 지식을 갖지만, 발견해야 할 것은 훨씬 더 많다. 여기에서 본 발명자들은 다양한 조직 유형으로부터의 다수의 암세포주에 반응하는 T-세포 클론에 의한 암세포 인식을 입증하였다.
- [0104] 장기간 사멸 분석(도 17)은 상이한 기원의 일련의 암세포주의 MC.7.G5 사멸을 도시한다. 실제로, MC.7.G5는 각 세포주의 95 내지 99.5%를 사멸할 수 있었다. 더욱이, MC.7.G5는 건강한 세포를 사멸시키지 않았다.
- [0105] CIR 세포에서 돌연변이된 K43A('빈') MR1의 과발현은 MR1 항체에 의한 CIR-K43A의 고도의 염색에도 불구하고(도 18B) MC.7.G5의 활성화를 유도하지 않았다(도 18A). 대조적으로, CIR에서 야생형 MR1의 과발현은 MC.7.G5 활성화를 유도하였다. 이는 상기 MC.7.G5 TCR이 결합된 화물을 갖는 MR1을 인식함을 입증한다.
- [0106] 현행 MR1 항체는 검출 가능한 mRNA 발현에도 불구하고, 암세포상에서 MR1의 낮은 표면 발현을 검출할 수 없다. 실제로, MC.7.G5에 의한 암세포 인식에 요구되는 MR1 표면 발현의 수준은 종종 항체에 의한 염색에 요구되는 한계 미만이었으며, 이는 상기 MC.7.G5가 pMHC를 인식하는 T-세포와 유사한, 낮은 사본수의 MR1 리간드에 반응할 수도 있음을 암시한다. 본 발명자들의 결과는 또한 통상적이지 않은 T-세포 리간드에 대한 발견 플랫폼으로서 게놈-와이드 CRISPR/Cas9 선별의 막대한 힘을 입증한다. 실제로, 본 발명자들은 또한 상기 기법을 사용하여 γ δ TCR에 의한 암세포 인식에 요구되는 절대적인 세포 표면 발현된 분자를 발견하였으며, 본 발명자들은 여기에서 적용된 방법론이 신규 리간드를 드러냄으로써 상기 통상적이지 않은 T-세포 분야를 급속하게 혁신시킬 것임을 예상한다.
- [0107] 요약하면, 전장 게놈 CRISPR 선별을 사용하여 MC.7.G5의 암 발현된 리간드를 밝혀내었다. MR1 확인 실험은 A549 세포에 의한 MC.7.G5의 활성화가 MR1 항체에 의해 차단될 수 있고 상기 클론이 본 발명자들의 실험실에 의해 생성된 MR1 녹아웃 A549 세포(Lauge et al 2012) 또는 흑색종 표적 MM9909.24의 CRISPR/Cas9-매개 MR1 녹아웃에 반응하지 않음을 보였다. MC.7.G5는 대부분의 암세포주에 반응하였으나 1차(비-종양) 세포에는 반응하지 않았다. MC.7.G5에 의한 표적 암세포의 인식은 MR1의 발현을 요구하였다. MR1의 유일한 다형성은 MR1-제한된 TCR이 집단 중 임의의 개체로부터의 세포에 반응하도록 침묵한다(Parra-Cuadrado et al 2000). 이는 단일 생성물을 모든 환자에 사용할 수 있었으므로(Guo et al 2015) MR1을 입양 세포 요법 접근법에 특히 매력적인 후보로 만든다.
- [0108] 결론
- [0109] 상기 MC.7.G5 TCR은 T-세포가 광범위한 종양을 인식할 수 있게 한다. 인식은 집단 불변성 분자 MR1을 통해 일어난다. MR1은 통상적으로 그의 결합 홈 중 리간드의 부재하에서 세포 표면상에서 발현되지 않는다(Chua et al. 2011). MR1에 결합하는 리간드의 발현은 상기 분자를 세포 표면으로 수송하여 상기 리간드를 제공할 수 있게 한다(도 10). 공지된 MR1 리간드의 부가는 MC.7.G5 T-세포 클론에 의한 종양 인식을 감소시키며 이는 상기 MC.7.G5가 MR1의 상황에서 암세포 특이성 리간드를 인식함을 암시한다(도 11)(즉, 다른 리간드들이 MR1에의 결합에 대해 암 리간드와 경쟁한다). MR1에 관해 공지된 것을 고려하면, 상기 리간드는 종양형성에 의해 상향조절되는 대사 경로의 중간체인 것처럼 보인다. 진행중인 실험은 상기 리간드의 성질을 측정하는 것을 목적으로 한다.
- [0110] 본 발명은 T-세포 클론 MC.7.G5에서 식별된 TCR에 중점을 둔다. 상기 TCR은 보존된 MHC 관련된(MR) 1 단백질을 통해 광범위한 암세포를 인식한다. 상기 TCR은 비-종양 세포는 인식하지 않는다. 종양 세포주로부터의 MR1의 CRISPR/Cas9 녹아웃 또는 항-MR1 항체에 의한 차단은 TCR 인식을 제거한다. 공지된 MR1-결합 리간드와의 배양은 TCR 인식을 감소시키며 이는 상기 T-세포 수용체(TCR) 리간드가, MR1 결합 홈 중의 TCR에 있거나 또는 상기에 제공되는 암-특이성 대사산물임을 암시한다. 상기 MC.7.G5 TCR은 다양한 상이한 암 면역요법 전략에 사용될 수

있다. 광범위한 중앙 인식 및 인식의 인간 백혈구 항원(HLA)-독립성은 상기 TCR을 사용하는 범-암, 범-집단 면역요법에 대한 흥분되는 가능성을 드러낸다.

[0111]

참고문헌

Chua WJ, Kim S, Myers N, Huang S, Yu L, Fremont DH, et al. (2011) Endogenous MHC-related protein 1 is transiently expressed on the plasma membrane in a conformation that activates mucosal-associated invariant T cells. *Journal of Immunology*, 186, 4744-50.

Ekeruche-Makinde, J., M. Clement, D.K. Cole, E.S.J. Edwards, K. Ladell, J.J. Miles, K.K. Matthews, A. Fuller, K.A. Lloyd, F. Madura, G.M. Dolton, J. Pentier, A. Lissina, E. Gostick, T.K. Baxter, B.M. Baker, P.J. Rizkallah, D.A Price, L. Wooldridge and A.K. Sewell (2012). T cell receptor optimized skewing of the repertoire can enhance antigen targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 37269-81.

Guo T, Chamoto K, Hirano N. (2015) Adoptive T Cell Therapy Targeting CD1 and MR1. *Frontiers in immunology*. 6:247.

Laugel B, Lloyd A, Meermeier EW, Crowther MD, Connor TR, Dolton G, et al. (2016) Engineering of Isogenic Cells Deficient for MR1 with a CRISPR/Cas9 Lentiviral System: Tools To Study Microbial Antigen Processing and Presentation to Human MR1-Restricted T Cells. *Journal of Immunology*, 197, 971-82.

Li W., H. Xu, T. Xiao, L. Cong, M. I. Love, F. Zhang, R. A. Irizarry, J. S. Liu, M. Brown, X. S. Liu, (2014) MAGECK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biology*. 15, 554.

Lissina A., K. Ladell, A. Skowera, M. Clement, E. Edwards, R. Seggwiss, H. van den Berg, E. Gostick, K. Gallagher, E. Jones, J.J. Melenhorst, A.J. Godkin, M. Peakman, D.A. Price, A.K. Sewell and L. Wooldridge (2009) Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. *Journal of Immunological Methods*, 340, 11-24.

Parra-Cuadrado JF, Navarro P, Mirones I, Setien F, Oteo M, Martinez-Naves E. A study on the polymorphism of human MHC class I-related MR1 gene and identification of an MR1-like pseudogene. *Tissue Antigens*. 2000;56(2):170-2.

Patel, S.J. et al 2012 Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature*, 584, 537-542.

R. Reantragoon, A. J. Corbett, I. G. Sakala, N. a Gherardin, J. B. Furness, Z. Chen, S. B. G. Eckle, A. P. Uldrich, R. W. Birkinshaw, O. Patel, L. Kostenko, B. Meehan, K. Kedzierska, L. Liu, D. P. Fairlie, T. H. Hansen, D. I. Godfrey, J. Rossjohn, J. McCluskey, L. Kjer-Nielsen, Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *The Journal of experimental medicine*. 210, 2305-2320 (2013).

Ryan M.D., A. M. Q. King, G. P. Thomas, (1991) Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *Journal of General Virology*. 72, 2727-2732.

[0112]

Sanjana N.E., O. Shalem, F. Zhang, (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*. 11, 783–784.

Shalem, N. E. Sanjana, E. Hartenian, X. Shi, D. A. Scott, T. S. Mikkelsen, D. Heckl, B. L. Ebert, D. E. Root, J. G. Doench, F. Zhang, (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 343, 84–87.

Theaker, S.M., C. Rius, A. Greenshields-Watson, A. Lloyd, A. Trimby, A. Fuller, J.J. Miles, D.K. Cole, M. Peakman and A.K. Sewell G Dolton (2016) T-cell libraries allow simple parallel generation of multiple peptide-specific human T-cell clones. *Journal of Immunological Methods* 430, 43-50

Tungatt, K., V. Bianchi, M.D. Crowther, W. E. Powell, A. J. Schauenburg, A. Trimby, M. Donia, A. Skowera, J. J. Miles, C. J. Holland, D. K. Cole, A. J. Godkin, M. Peakman, P. T. Straten, I. M. Svane, A.K. Sewell and G. Dolton (2015) Antibody stabilization of peptide-MHC multimers reveals functional T-cells bearing extremely low affinity TCRs. *Journal of Immunology* 194, 463-74.

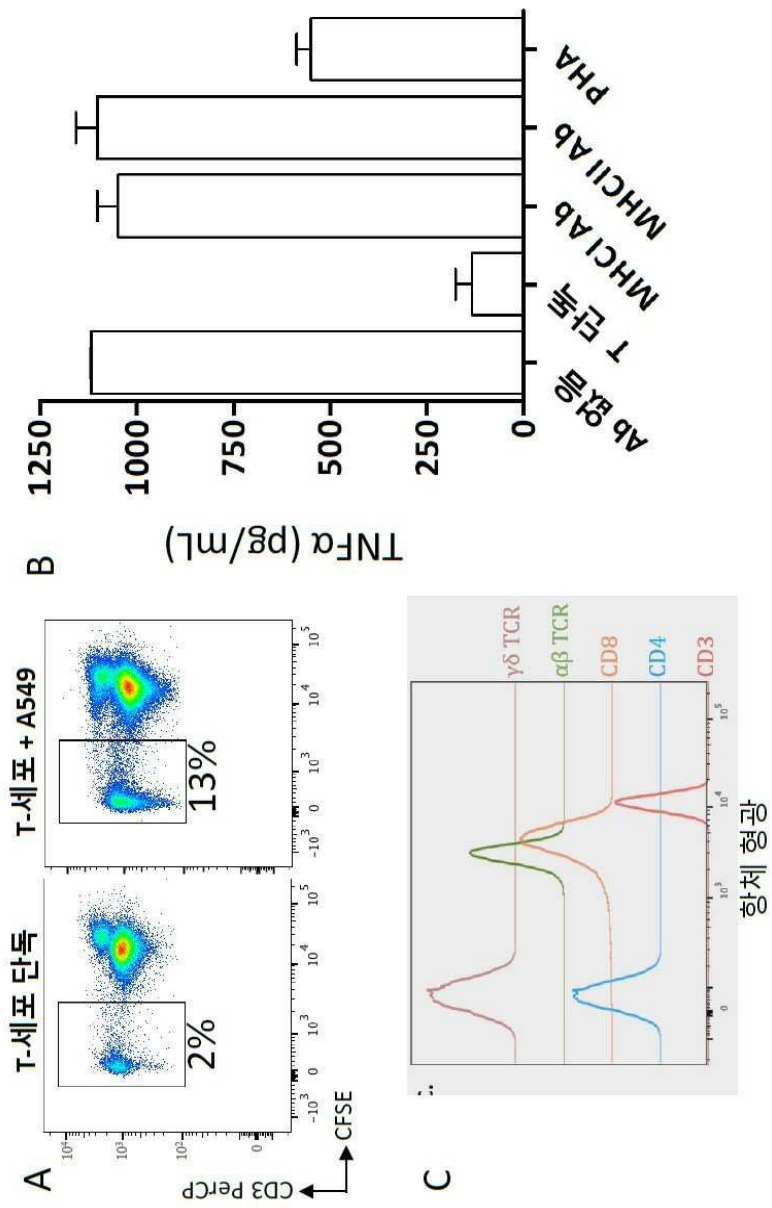
Wooldridge L., M. Clement, A. Lissina, E. S. J. Edwards, K. Ladell, J. Ekeruche, R. E. Hewitt, B. Laugel, E. Gostick, D. K. Cole, R. Debets, C. Berrevoets, J. J. Miles, S. R. Burrows, D. A. Price, A. K. Sewell (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs. *The Journal of Immunology*. 184, 3357–3366.

Wooldridge L., J. Ekeruche-Makinde, H.A. van den Berg, A. Skowera, J.J. Miles, M.P. Tan, G. Dolton, M. Clement, S. Llewellyn-Lacey, D.A. Price, M. Peakman and A.K. Sewell (2012) A single autoimmune T-cell receptor recognises over a million different peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 1168-77.

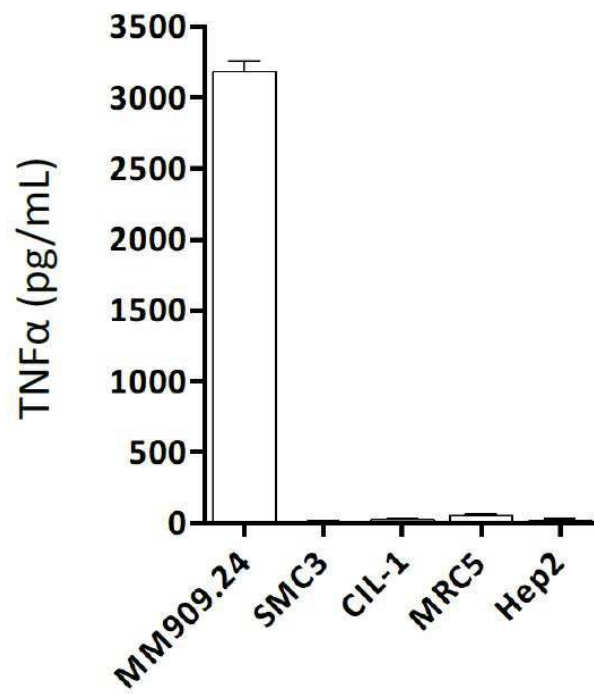
[0113]

도면

도면1



도면2



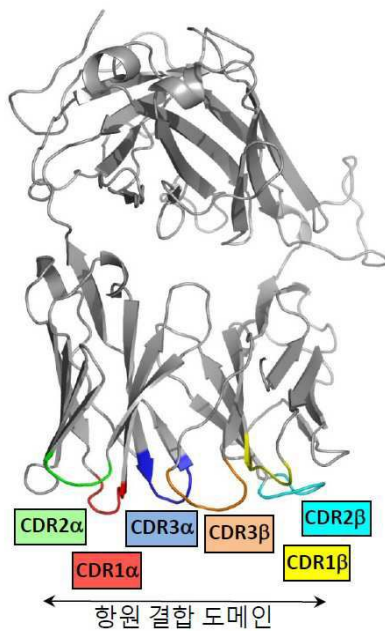
도면3

MC.7.G5 TCR 알파쇄 TRAV38.2/DV8 TRAJ31 (CDR 은 굵은 글씨로 밑줄침)

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCITYD **TSESDYY** LFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQ
NATEN RFSVNFQKAASFSLKISDSQLGDAAMYF **CAYRSAVNARLMF** GDGTQLVVK
 PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMD
 FKSNSAFAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

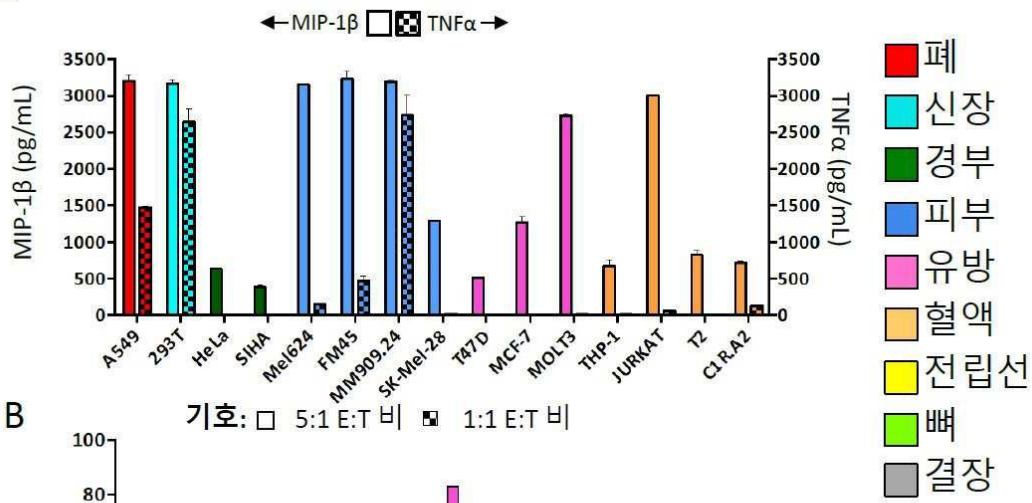
MC.7.G5 TCR 베타쇄 TRBV25.1 TRBJ2.3 (CDR 은 굵은 글씨로 밑줄침)

EADIYQTPRYLVIGTGKKITLECSQT **MGHDK** MYWYQQDPGMELHLIHY **SYGVNS** TE
 KGDLSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYL **CASSEARGLAFTDTQYF** GPGTRLT
 VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSG
 VCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD
 RAKPVTQIVSAEAWGRAD

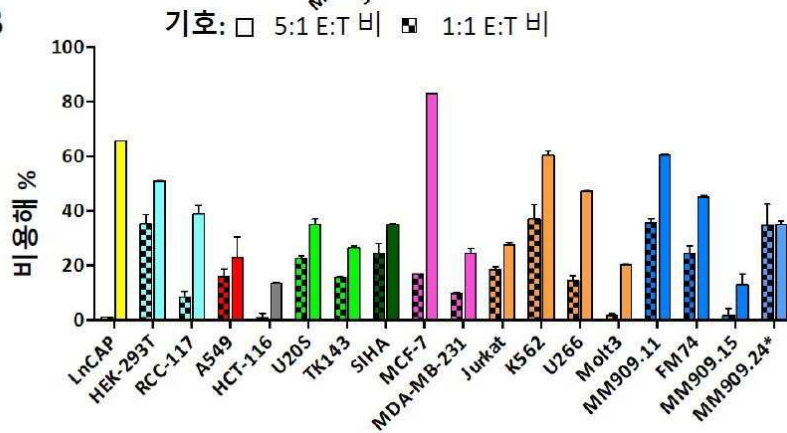


도면4

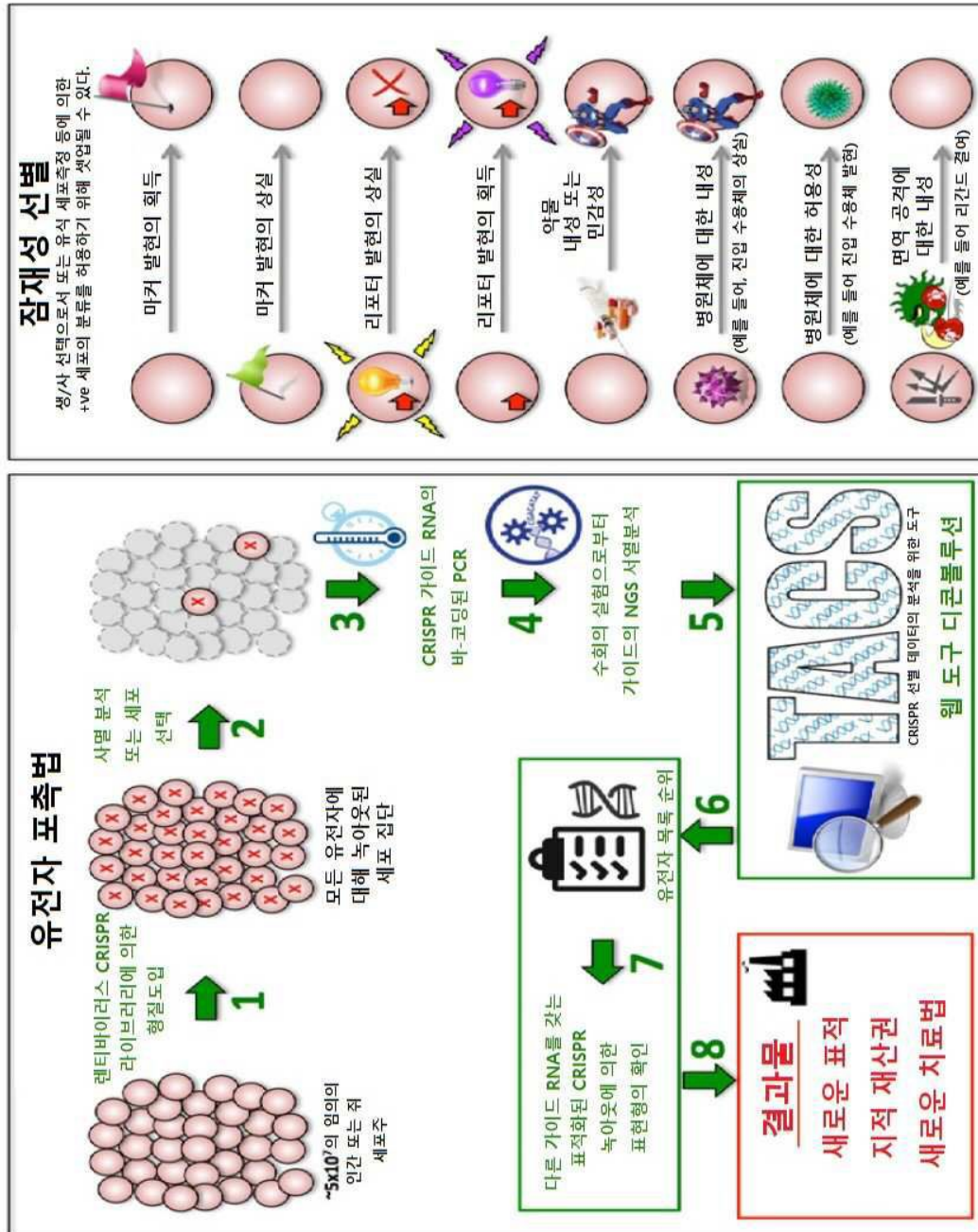
A



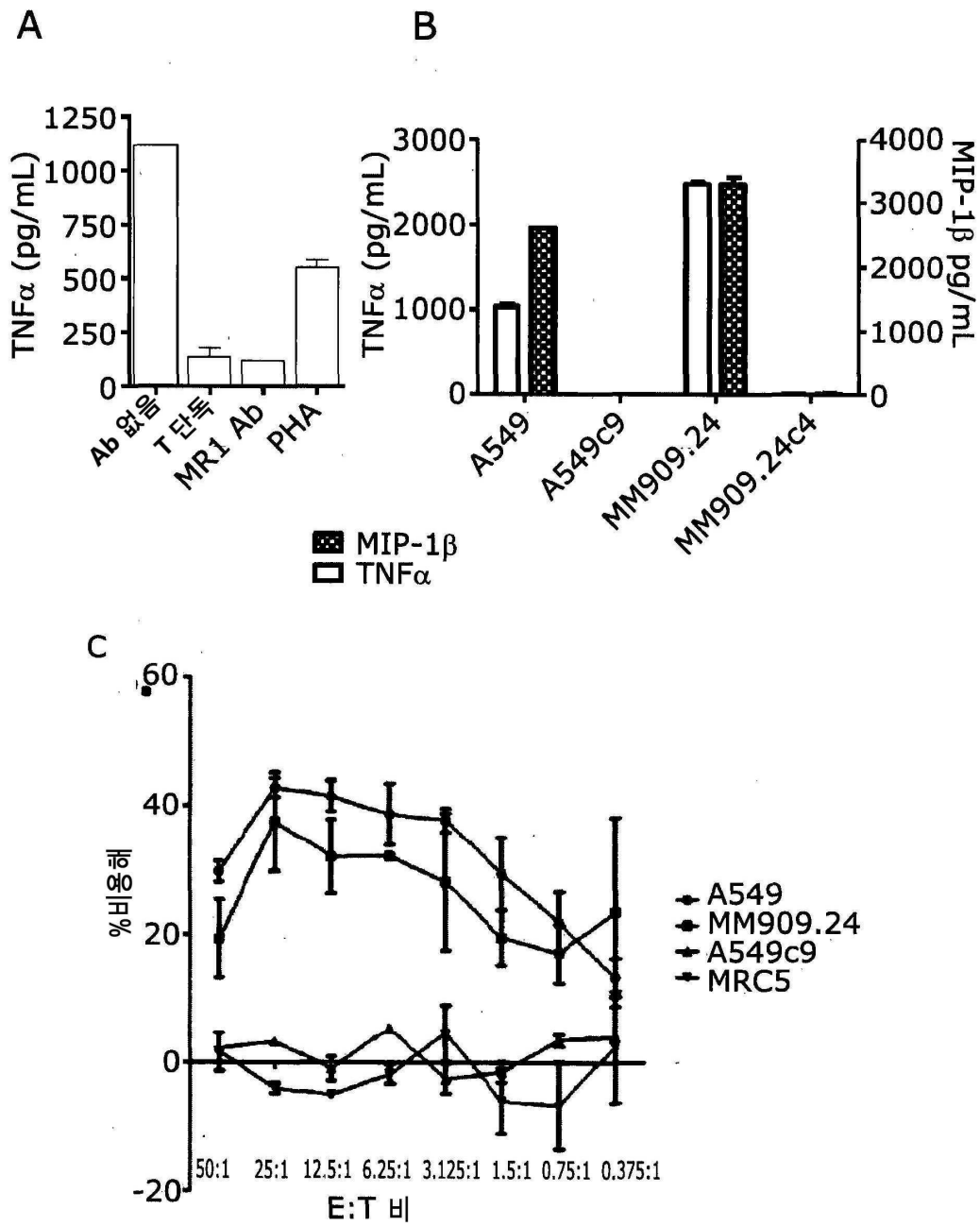
B



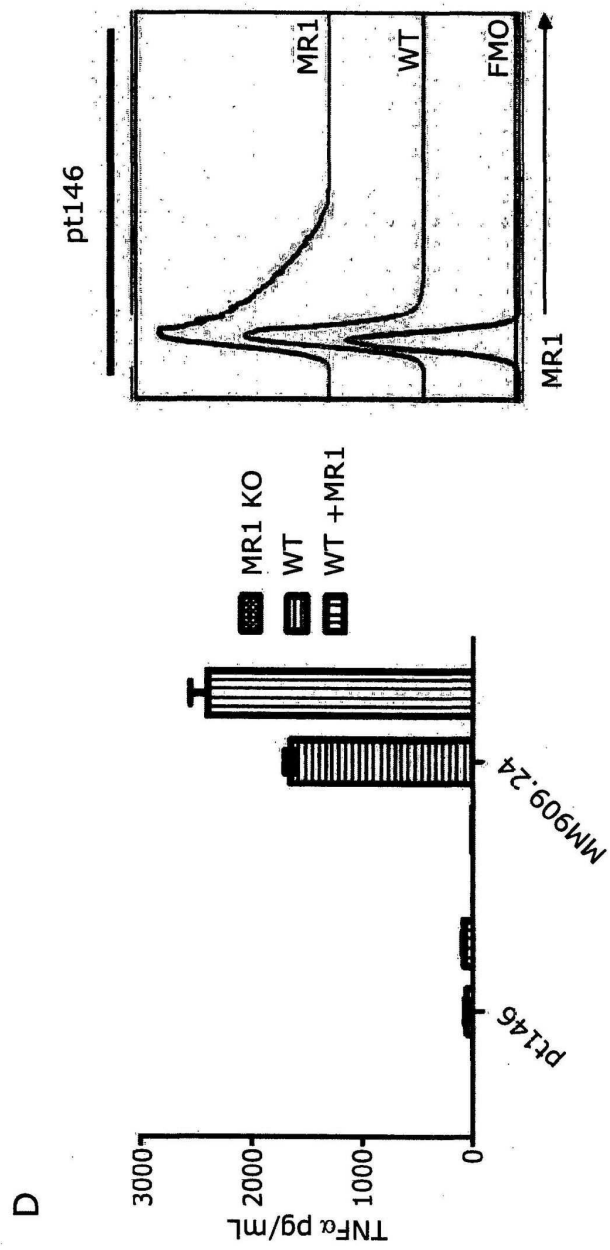
도면5



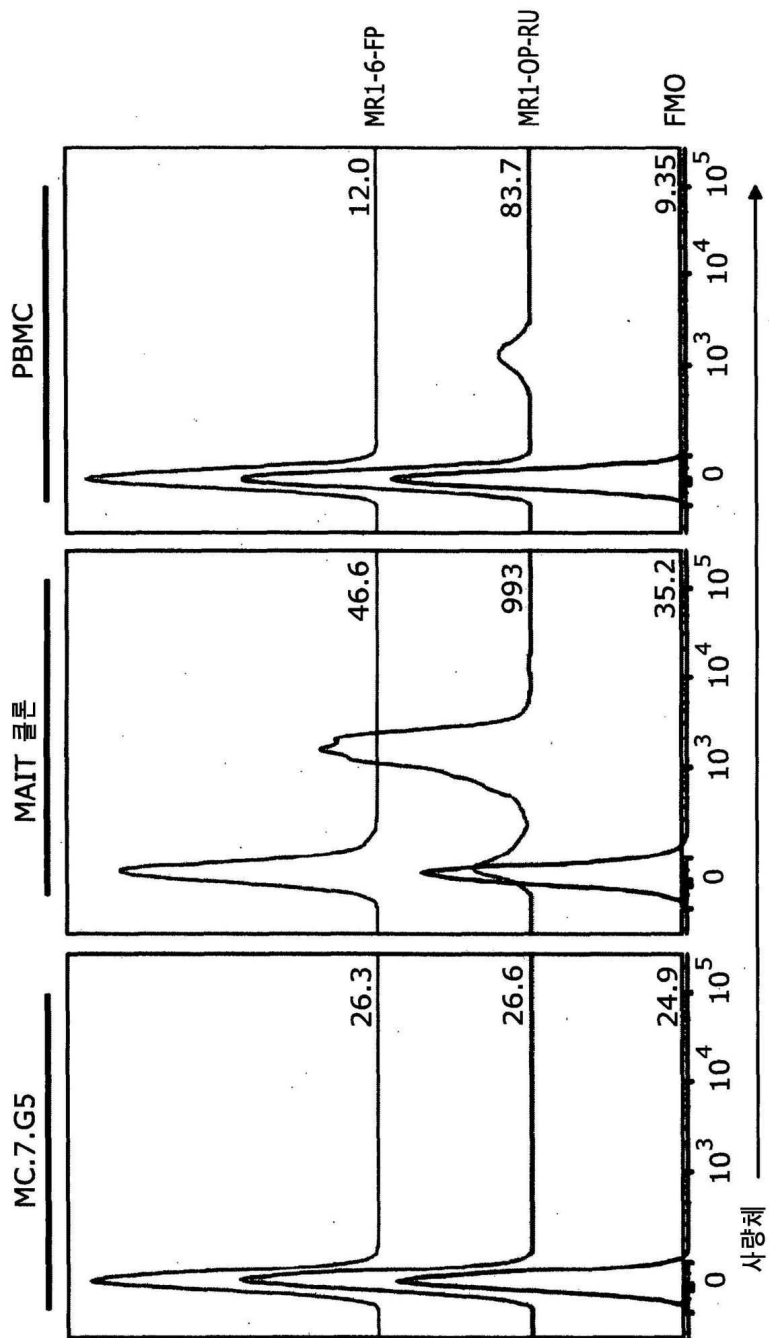
도면6ac



도면6d

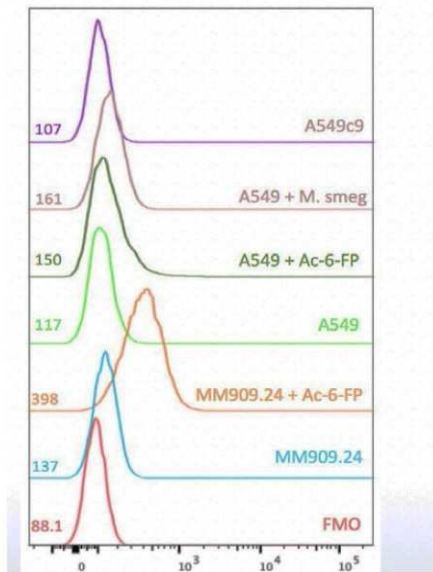


도면7

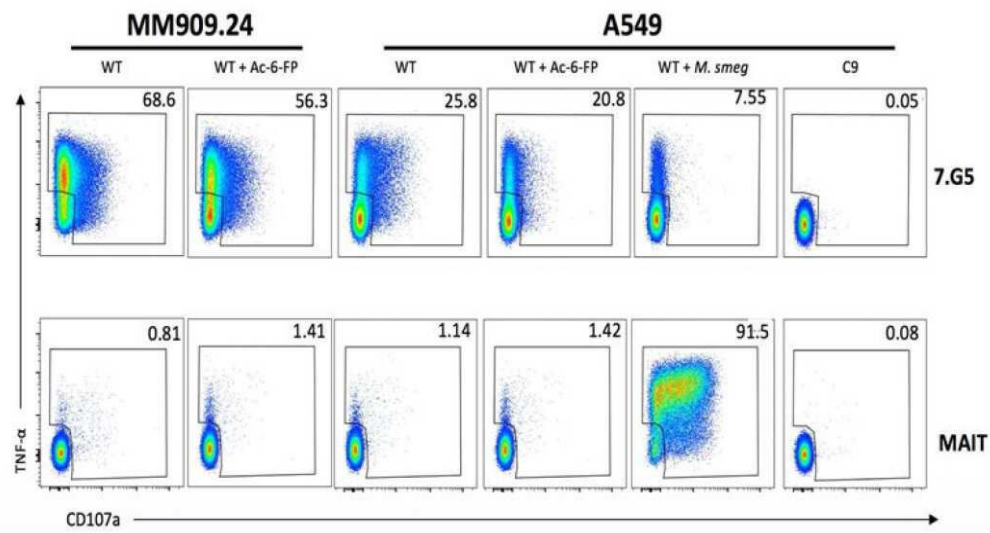


도면8

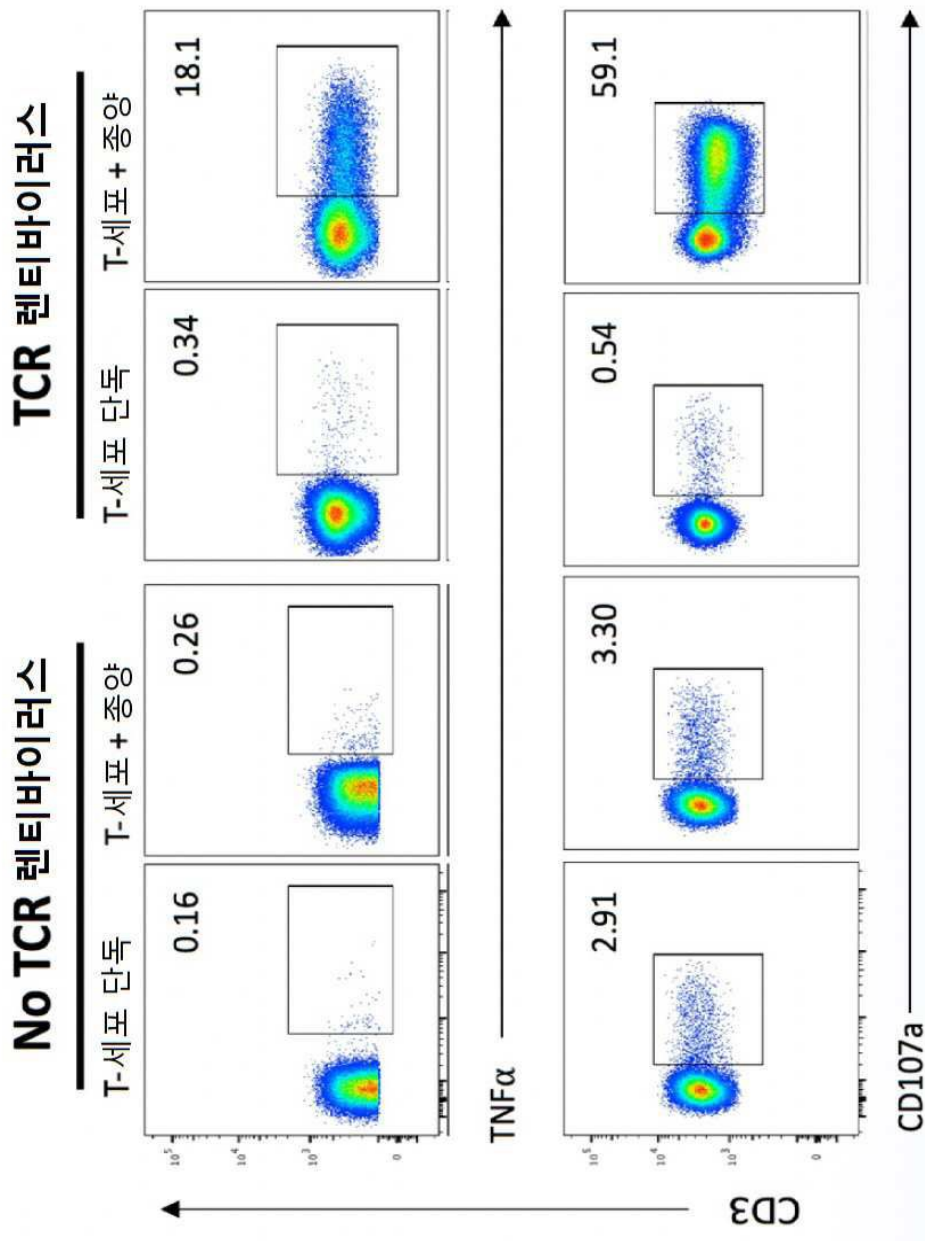
A



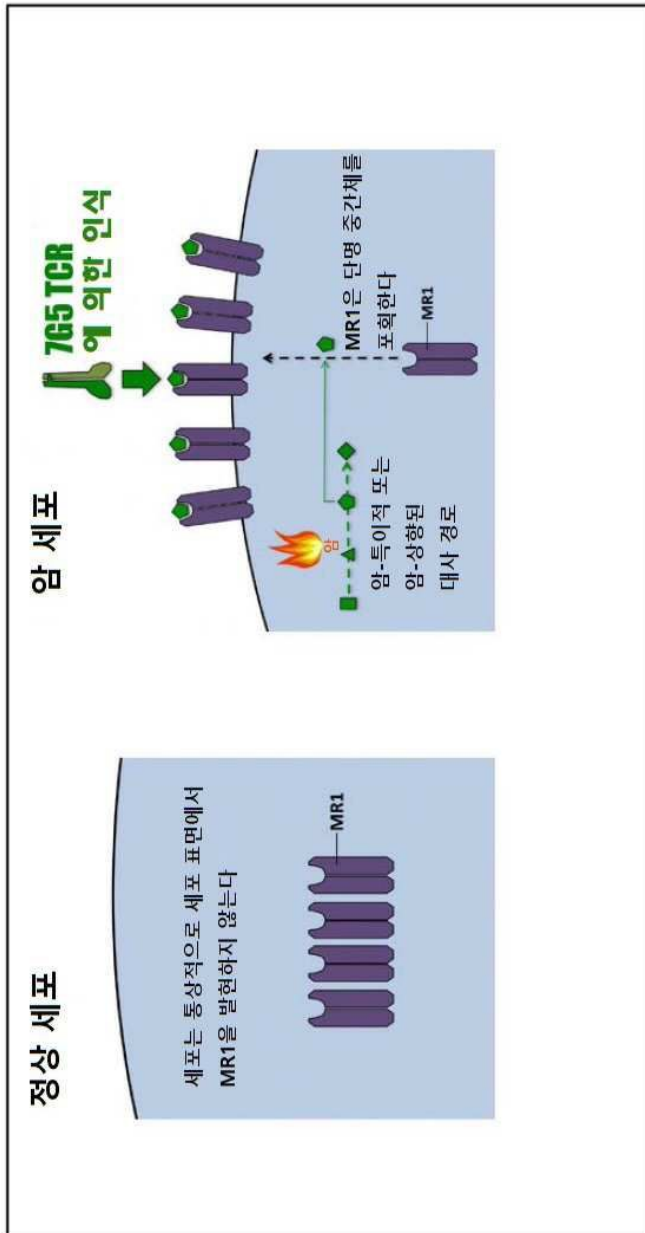
B



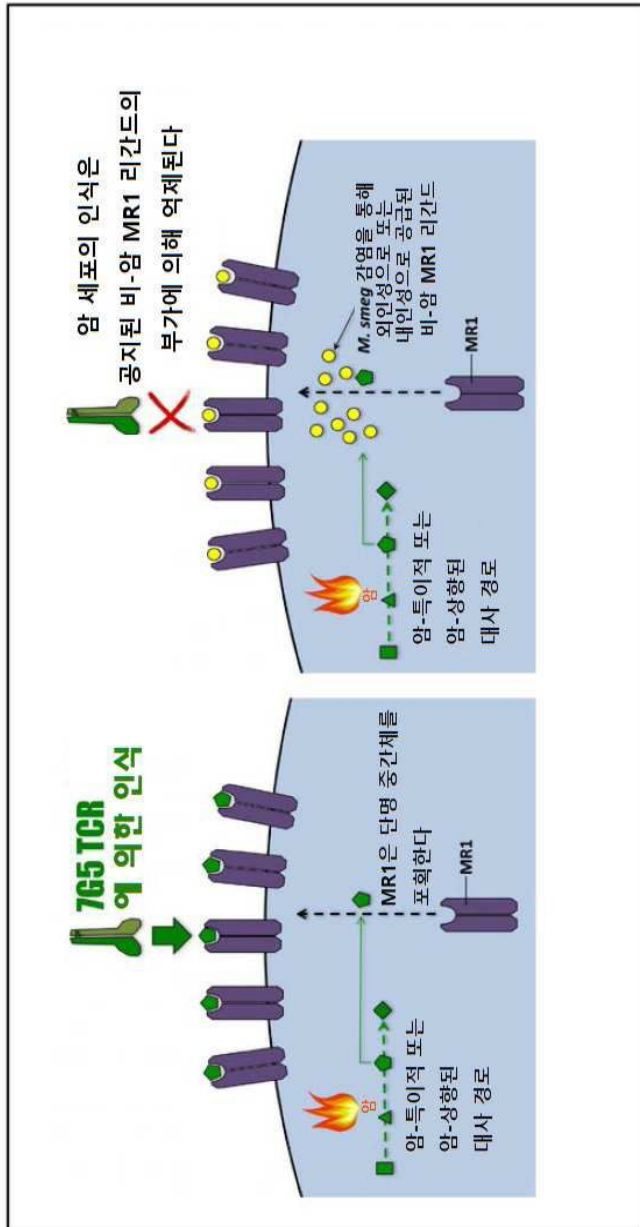
도면9



도면10

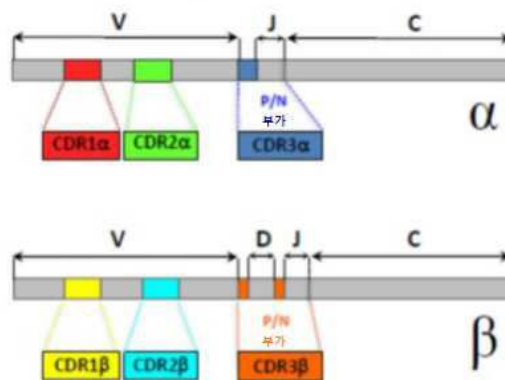


도면11

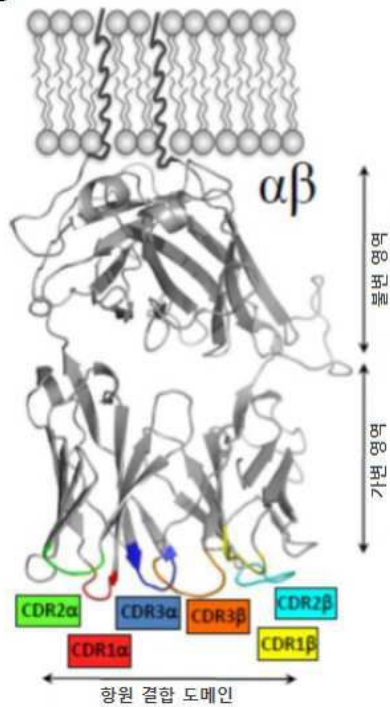


도면 12

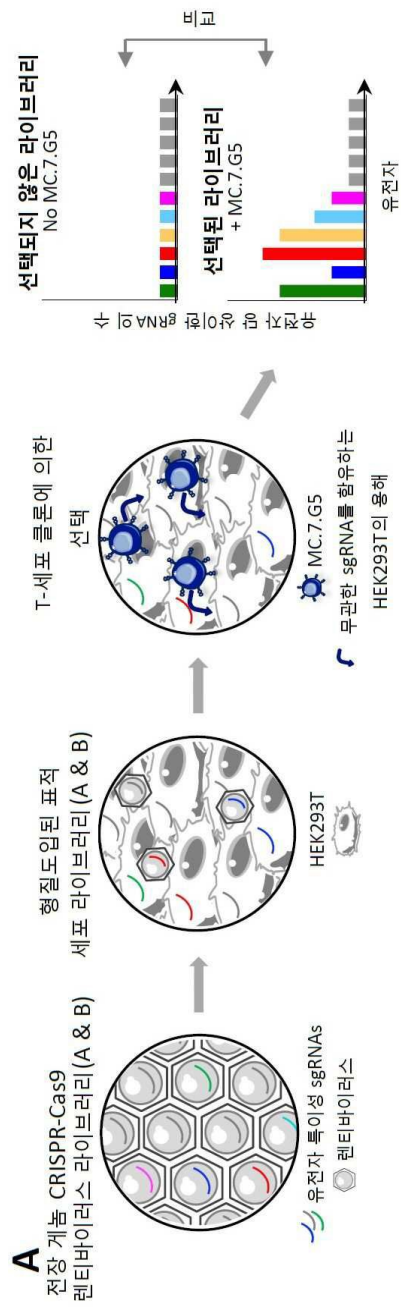
A TCR 유전자 구조



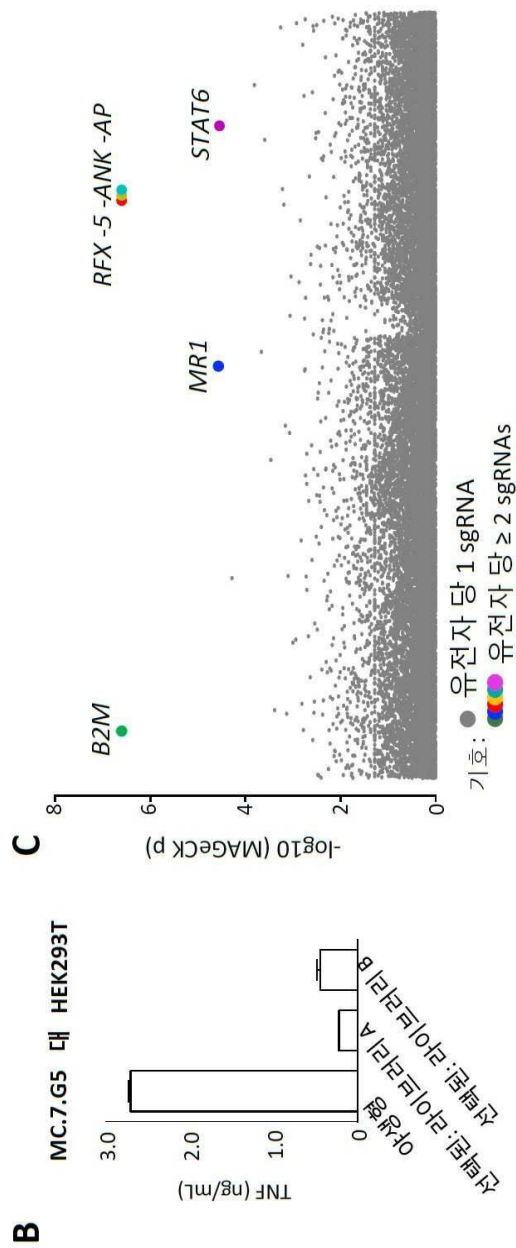
B



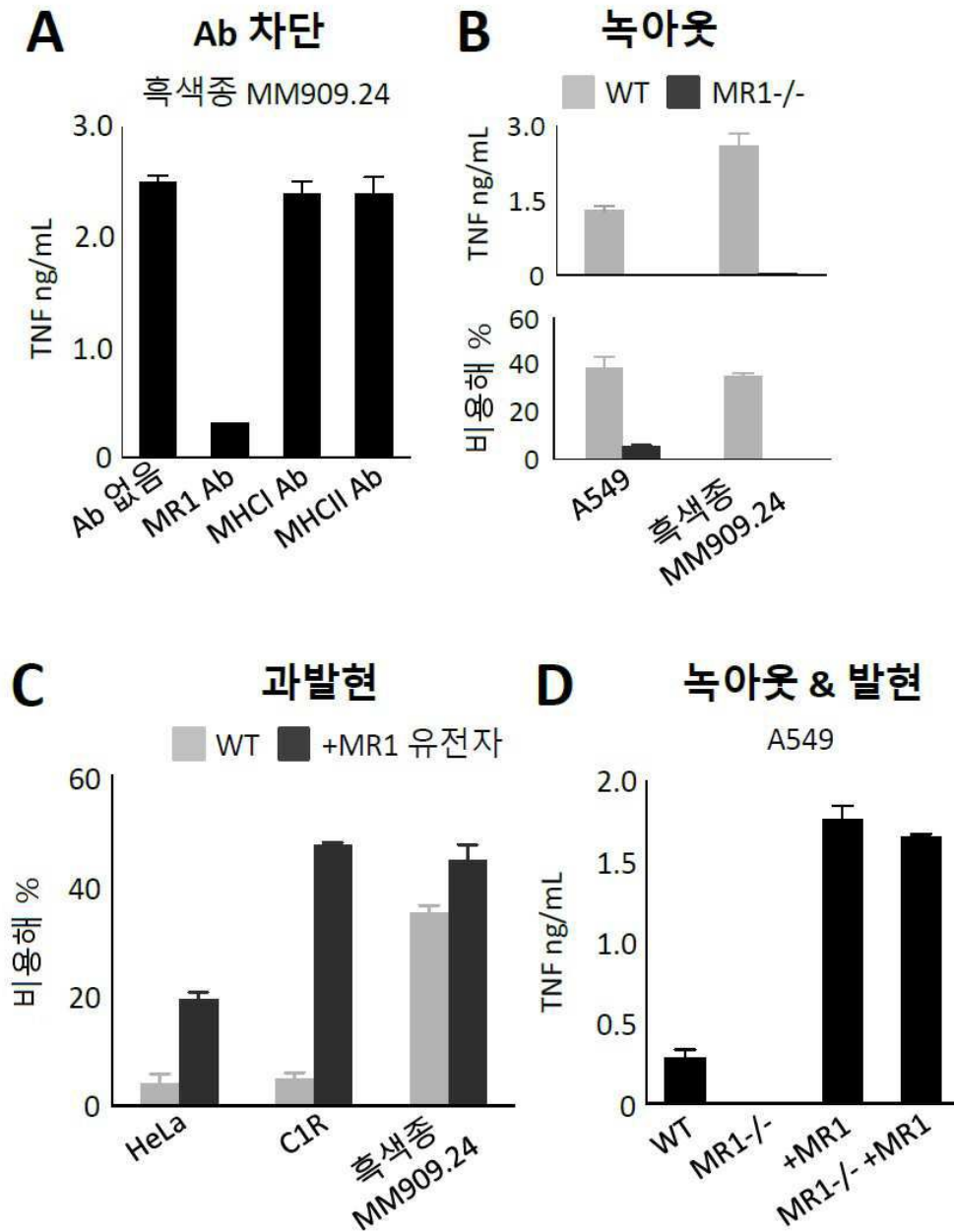
도면13a



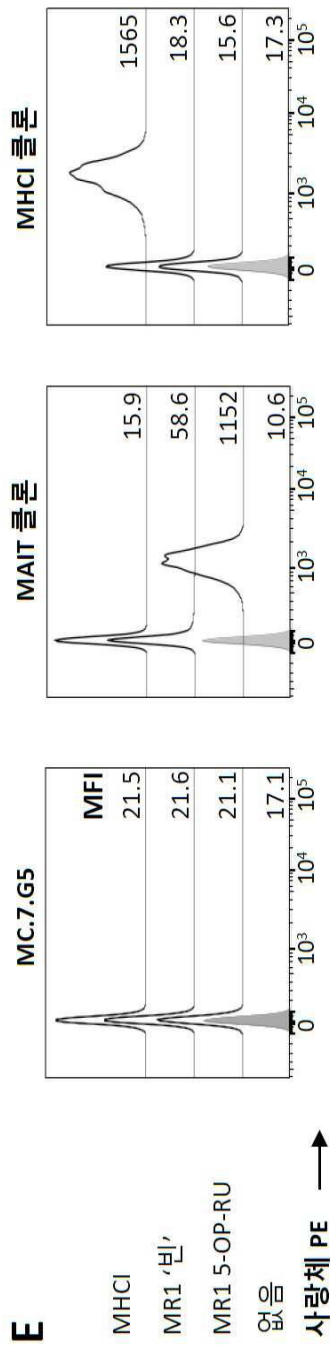
도면13bc



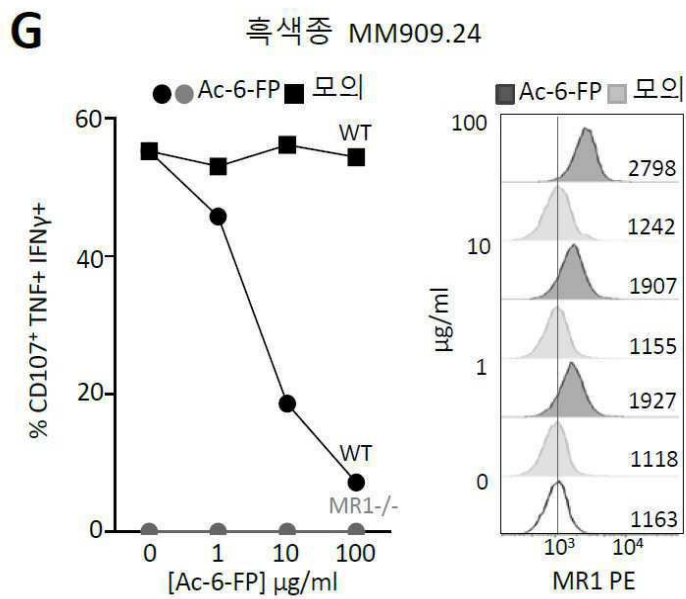
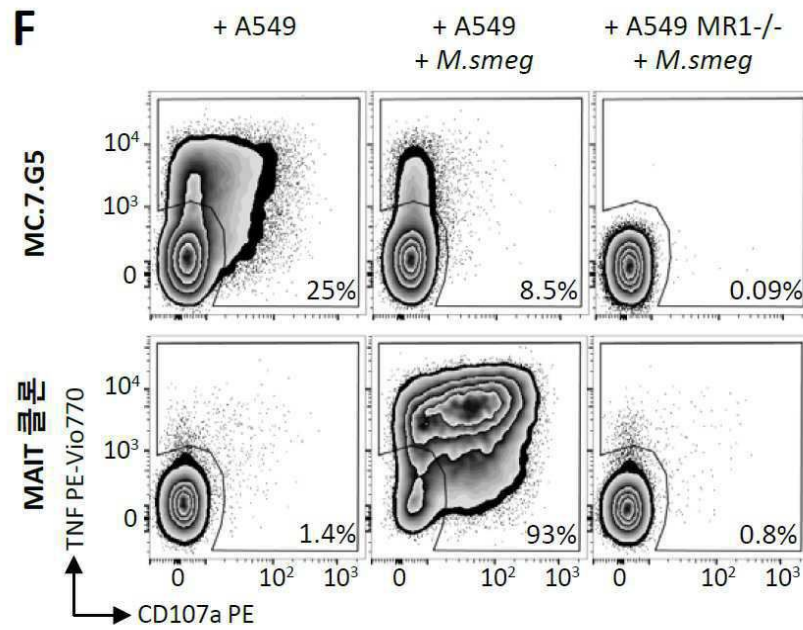
도면14ad



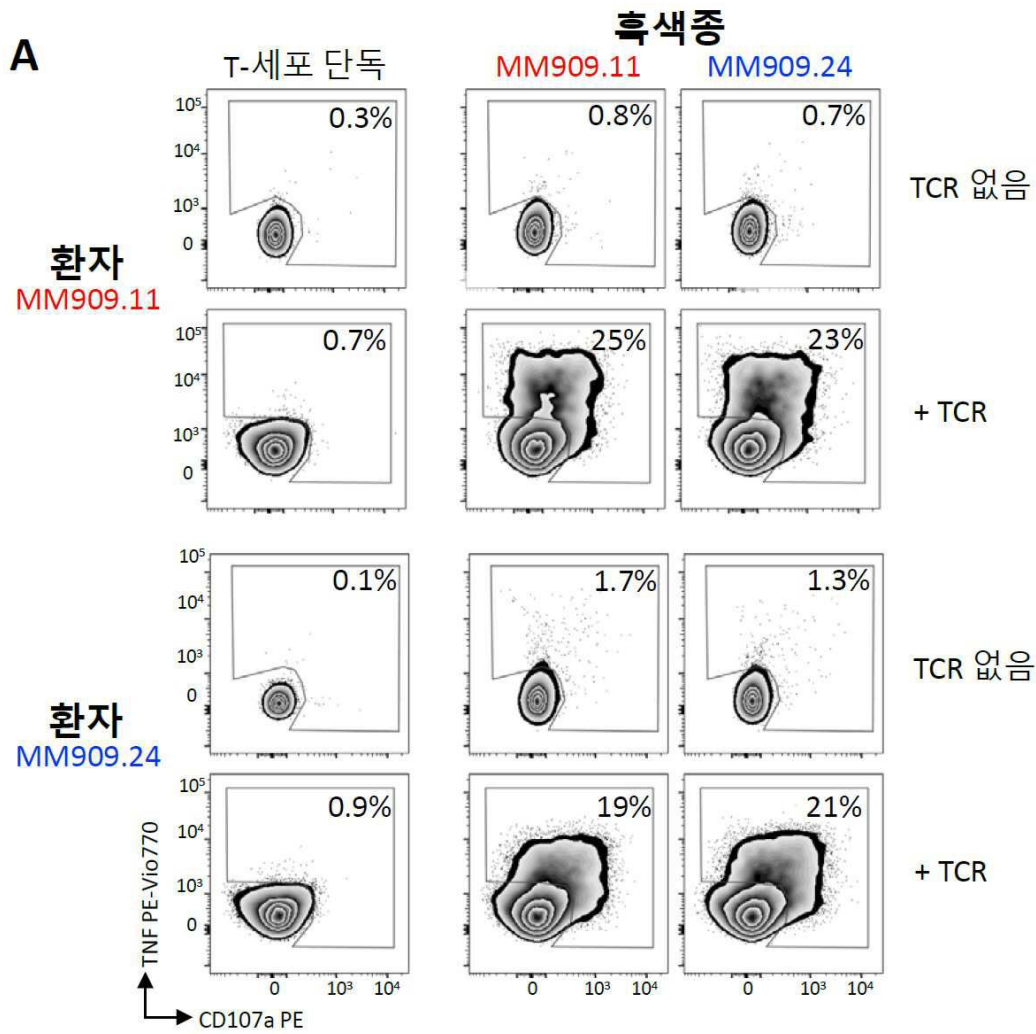
도면14e



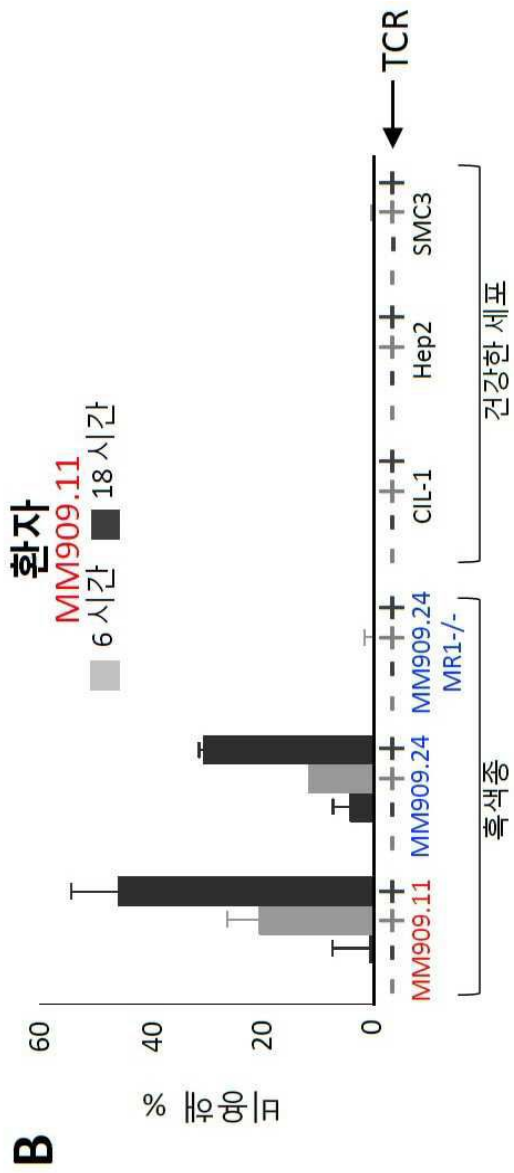
도면14fg



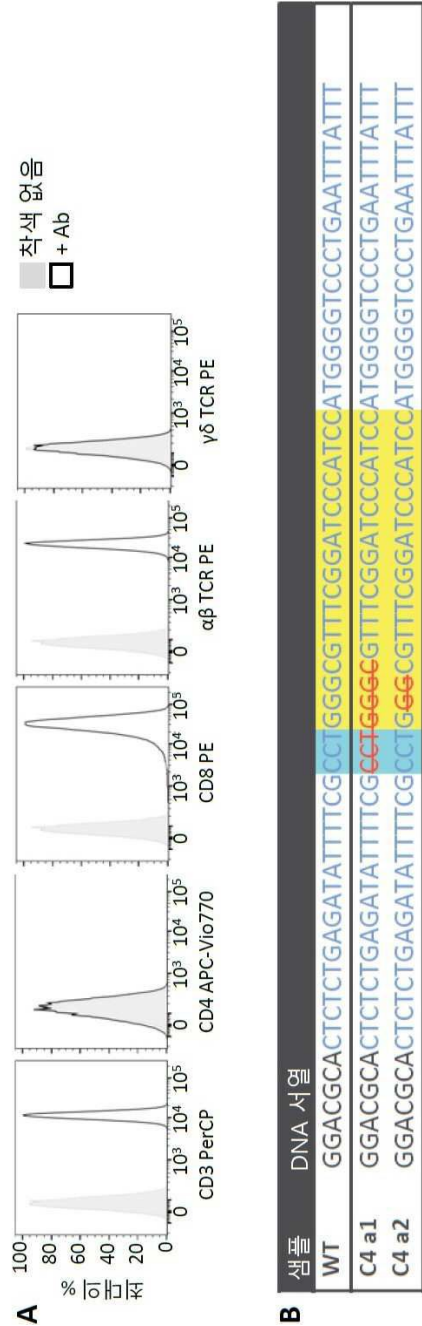
도면15a



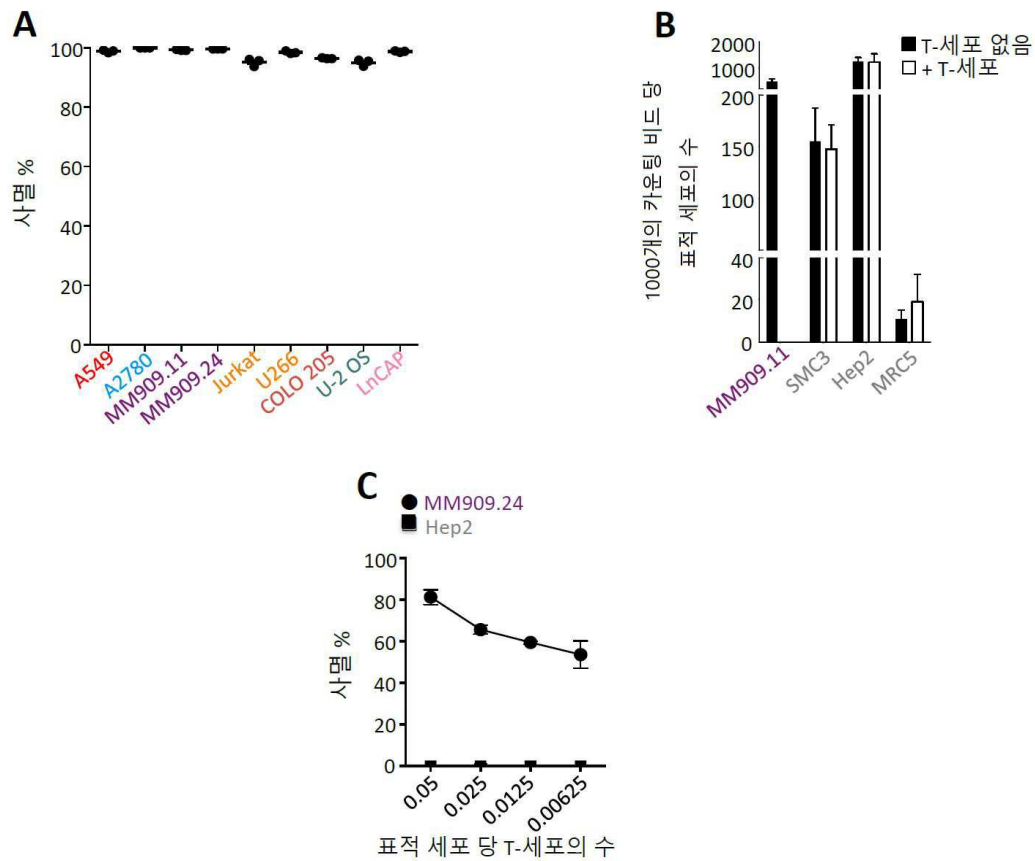
도면15b



도면16ab



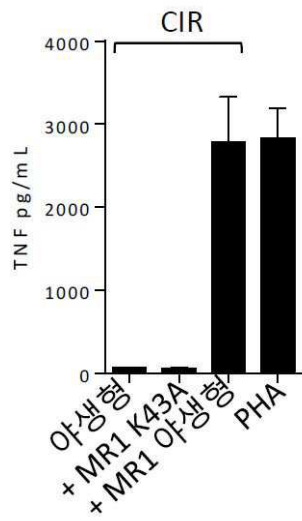
도면17



기호: 암 세포 주 조직/기관 기원: 폐 난소 피부 혈액 결장 뼈 전립선 건강한 세포주

도면18

A



B

