



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0131253
(43) 공개일자 2022년09월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7026190
- (22) 출원일자(국제) 2020년07월23일
심사청구일자 2022년07월27일
- (85) 번역문제출일자 2022년07월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2020/103687
- (87) 국제공개번호 WO 2021/135178
국제공개일자 2021년07월08일
- (30) 우선권주장
201911389706.0 2019년12월30일 중국(CN)

- (71) 출원인
차이나 이뮤노테크 (베이징) 바이오테크놀로지 컴퍼니 리미티드
중국 베이징 102206, 창핑 디스트릭트, 메디칼 로드 넘버 9, 빌딩 1, 5티에이치 플로어
- (72) 발명자
루이, 웨이
중국 베이징 102206, 창핑 디스트릭트, 메디칼 로드 넘버 9, 빌딩 1, 5티에이치 플로어
우, 춘안
중국 베이징 102206, 창핑 디스트릭트, 메디칼 로드 넘버 9, 빌딩 1, 5티에이치 플로어
리우, 팡
중국 베이징 102206, 창핑 디스트릭트, 메디칼 로드 넘버 9, 빌딩 1, 5티에이치 플로어
- (74) 대리인
안소영

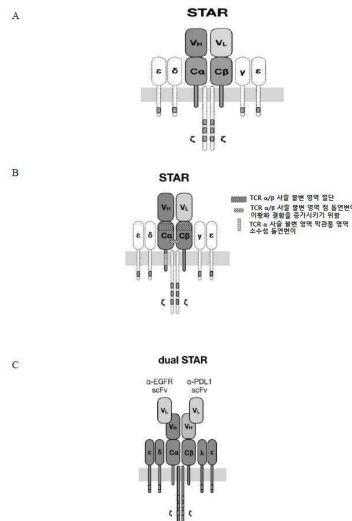
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 **향상된 T-세포 수용체 STAR 및 이의 적용**

(57) 요약

본 발명은 생물의학 분야에 관한 것으로, 특히 향상된 T-세포 수용체 STAR 및 그의 적용에 관한 것이다. 구체적으로, 개선된 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(Synthetic T-cell receptor and Antigen Receptor, STAR), STAR를 함유하는 T 세포 및 그의 용도가 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/0005 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2863 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 16/303 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

α 사슬 및 β 사슬을 포함하는 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(synthetic T-cell receptor and antigen receptor, STAR)로서; α 사슬은 제1 항원-결합 영역 및 제1 불변 영역(constant region)을 포함하고, β 사슬은 제2 항원 결합 영역 및 제2 불변 영역을 포함하며,

여기서 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 변이체로서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 i) N-말단 변형; ii) 시스테인 치환; 및/또는 iii) 소수성 아미노산 치환을 포함하고; 및/또는

여기서 제2 불변 영역은 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역의 변이체로서, 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역과 비교하여 i) N-말단 변형; 및/또는 ii) 시스테인 치환을 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 불변 영역이 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역, 비-인간 영장류의 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역 또는 설치류 예컨대 마우스의 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고; 바람직하게는, 제1 불변 영역이 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되는 것인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 불변 영역이 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 N 말단에서 18개 아미노산 내의 변형을 포함하는 것인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 불변 영역이 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고; 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, N 말단으로부터 X개의 연속 아미노산은 결실에 의해 변형되고, 및/또는 N 말단의 위치 (X+1)에서부터 위치 18까지의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되며, 여기서 X는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 불변 영역이 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고; 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, N 말단의 위치 1-4의 아미노산은 결실되고, N 말단의 위치 5에서부터 위치 18까지의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고; 아미노산의 번호는 서열번호 2를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역이 위치 48에서 시스테인 치환을 포함하고; 아미노산의 번호는 서열번호 2를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역에서, 위치 48의 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되고; 아미노산의 번호는 서열번호 2를 참조하는, 합성 T-

세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역이 막관통 영역 내에 소수성 아미노산 치환을 포함하고; 막관통 영역은, 예를 들어, 위치 111에서부터 위치 119까지의 아미노산 서열을 포함하고; 아미노산의 번호는 서열번호 2를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역이 위치 112, 위치 114 및/또는 위치 115에서 소수성 아미노산 치환을 포함하고; 아미노산의 번호는 서열번호 2를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역에서, 위치 112의 세린이 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌이 이소류신으로 치환되고, 및/또는 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되고; 아미노산의 번호는 서열번호 2를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 불변 영역이 서열번호 8로 나타난 막관통 영역을 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 불변 영역이 서열번호 6-7, 서열번호 9-13 및 서열번호 34-36으로 나타난 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 불변 영역이 인간 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역, 비-인간 영장류의 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역 및 설치류 예컨대 마우스의 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고; 바람직하게는, 제1 불변 영역이 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되는 것인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 불변 영역이 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역과 비교하여 N 말단에서 25개 아미노산 내의 변형을 포함하는 것인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 불변 영역이 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고; 천연 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역과 비교하여, N-말단으로부터 X개의 연속 아미노산은 결실에 의해 변형되고, 및/또는 N 말단의 위치 (X+1)에서부터 위치 25까지의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되며, 여기서 X는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 불변 영역이 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고; 천연 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역과 비교하여, N 말단의 위치 1-6의 아미노산은 결실되고, N 말단의 위치 7에서부터 위치 25까지의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고; 아미노산의 번호는 서열번호 15를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수

용체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역과 비교하여, 제2 불변 영역에서, 위치 56의 세린이 시스테인으로 돌연변이되고; 아미노산의 번호는 서열번호 15를 참조하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 불변 영역이 서열번호 19-21로 나타낸 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

- i) 제1 불변 영역은 서열번호 34로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 37로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고;
- ii) 제1 불변 영역은 서열번호 7로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 20으로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고;
- iii) 제1 불변 영역은 서열번호 9로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 15로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고;
- iv) 제1 불변 영역은 서열번호 11로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 21로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고;
- v) 제1 불변 영역은 서열번호 12로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 37로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고;
- vi) 제1 불변 영역은 서열번호 10으로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 20으로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고; 또는
- vii) 제1 불변 영역은 서열번호 13으로 나타낸 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 21로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는,

합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역이 독립적으로 또는 조합하여 표적 항원에 특이적으로 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 21

제20항에 있어서, 표적 항원이 질병-관련 항원, 바람직하게는 암-관련 항원, 예를 들어, CD16, CD64, CD78, CD96, CLL1, CD116, CD117, CD71, CD45, CD71, CD123, CD138, ErbB2(HER2/neu), 암-배아 항원(carcino-embryonic antigen, CEA), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), EGFR 변이체 III(EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, 디시알로강글리오시드(disialoganglioside) GD2, 관 상피 뮤신(ductal epithelial mucin), gp36, TAG-72, 글리코스핑고지질, 신경교종-관련 항원, β -인간 융모막 성선 자극 호르몬, α 페토탄백질(α fetoprotein, AFP), 렉틴 반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2(AS), 장(intestinal) 카르복실에스테라제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타제(prostase), 프로스타제 특이적 항원(prostase specific antigen, PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, Prostein, PSMA, 생존 및 텔로머라제, 전립선암 종양 항원-1(PCTA-1), MAGE, ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린 B2, CD22, 인슐린-유사 성장 인자(IGF1)-I, IGF-II, IGFI 수용체, 메조텔린, 종양-특이적 펩티드 에피토프를 제시하는 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, 종양 기질 항원, 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 A(EDA) 및 엑스트라 도메인 B(EDB), tenascin-C A1 도메인(TnC A1), 섬유아세포 관련 단백질(fap), CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, Foxp3, B7-1(CD80), B7-2(CD86), GM-CSF, 사이토카인

수용체, 내피 인자, 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자, BCMA(CD269, TNFRSF17), TNFRSF17(UNIPROT Q02223), SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25), GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1), FKBP11(UNIPROT Q9NYL4), KAMP3, ITGA8(UNIPROT P53708) 및 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)의 암-관련 항원으로부터 선택되는 것인, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역(variable region)을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고; 또는 제1 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 항원-결합 영역은 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하며; 또는 제1 항원-결합 영역은 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 STAR는 EGFR에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역은 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하며; 또는 제1 항원-결합 영역은 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 STAR는 CD19에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역은 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하며; 또는 제1 항원-결합 영역은 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 STAR는 CD20에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역은 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하며; 또는 제1 항원-결합 영역은 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 STAR는 CD22에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역은 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하며; 또는 제1 항원-결합 영역은 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 STAR는 GPC3에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하고; 또는 제1 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하며, 따라서 STAR는 CD19에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역은 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하며; 또는 제1 항원-결합 영역은 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 STAR는 CD19에 특이적으로 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원-결합 영역이 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일-쇄 항체(예컨대 scFv) 또는 단일-도메인 항체(예컨대 낙타 항체)를 포함하고, 및/또는 제2 항원-결합 영역이 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일-쇄 항체(예컨대 scFv) 또는 단일-도메인 항체(예컨대 낙타 항체)를 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 25

제24항에 있어서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역이 동일한 표적 항원에 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 26

제24항에 있어서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역이 동일한 표적 항원의 상이한 영역(예컨대 상이한 에피토프)에 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 27

제24항에 있어서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역이 상이한 표적 항원에 결합하고, 예를 들어, 2개의 항원-결합 영역이 각각 CD19 및 CD20, 또는 각각 CD19 및 CD22, 또는 각각 CD38 및 BCMA, 또는 각각 PDL1 및 EGFR에 결합할 수 있는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 28

α 사슬 및 β 사슬을 포함하는 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(STAR)로서; α 사슬은 제1 항원-결합 영역 및 제1 불변 영역을 포함하고, β 사슬은 제2 항원-결합 영역 및 제2 불변 영역을 포함하며,

여기서 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역, 또는 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 정의된 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 변이체이고; 여기서 제2 불변 영역은 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역, 또는 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 정의된 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역의 변이체이며; 및

여기서 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역은 상이한 표적 항원 또는 동일한 표적 항원의 상이한 영역에 특이적으로 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 29

제29항에 있어서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역이 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일-쇄 항체(예컨대 scFv) 또는 단일-도메인 항체(예컨대 낙타 항체)를 포함하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 30

제29항에 있어서,

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 EGFR에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 CD20에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 CD22에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열 및

서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 GPC3에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하고; 또는

제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일-쇄 항체가 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 따라서 제1 항원-결합 영역 또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 2개의 항원-결합 영역이 각각 CD19 및 CD20, 또는 각각 CD19 및 CD22, 또는 각각 CD38 및 BCMA, 또는 각각 PDL1 및 EGFR에 결합하는, 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(STAR)의 α 사슬 및/또는 β 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 33

제32항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 동일한 리딩 프레임(reading frame)에 i) α 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, ii) β 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 및 iii) i)와 ii) 사이에 자가-절단(self-cleaving) 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 34

제33항에 있어서, 자가-절단 펩티드가 2A 폴리펩티드, 예를 들어, P2A 폴리펩티드인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 35

조절 서열에 작동가능하게 연결된, 제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 36

제35항에 있어서, 발현 벡터가 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터인, 발현 벡터.

청구항 37

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(STAR)를 T 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는, 치료적 T 세포를 제조하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 제35항 또는 제36항에 따른 발현 벡터를 T 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(STAR)를 포함하거나, 또는 제37항 또는 제38항에 따른 방법에 의해 수득되는, 치료적 T 세포.

청구항 40

제39항에 따른 치료적 T 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 41

대상체(subject)에서 질병, 예를 들어, 암의 치료를 위한 약제를 제조하기 위한 제39항에 따른 치료적 T 세포 또는 제40항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

청구항 42

제41항에 있어서, 암이 폐암, 난소암, 결장암, 직장암, 흑색종, 신장암, 방광암, 유방암, 간암, 림프종, 혈액암, 두경부암, 신경교종양, 위암, 비인두암, 인후암, 자궁경부암, 자궁체종양 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 본 발명의 방법 또는 약제학적 조성물로 치료할 수 있는 다른 암의 예는 골암, 췌장암, 피부암, 전립선암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 항문암, 고환암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 질암, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병 포함), 소아 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신우암, 중추신경계(CNS) 종양, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피 암종, 편평 세포 암종, T 세포 림프종, 및 석면-유도 암을 비롯한 환경적으로 유도된 암, 및 암의 조합을 포함하는, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물의학 분야에 관한 것으로, 특히 향상된 T-세포 수용체 STAR 및 그의 적용에 관한 것이다. 구체적으로, 개선된 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(Synthetic T-cell receptor and Antigen Receptor, STAR), STAR를 함유하는 T 세포 및 그의 용도가 개시된다.

배경 기술

[0002] 인체에서 면역 세포에 의한 종양 세포의 제거는 수지상 세포가 종양 세포의 돌연변이 유전자를 인식하여 돌연변이 정보를 T 세포에 디스플레이하는 방식으로 실현된다. 그러면 T 세포는 돌연변이를 가지고 있는 종양 세포를 찾아 사멸시킨다. 때때로, 종양 세포는 돌연변이된 펩티드 단편을 디스플레이할 수 있는 MHC 분자를 하향 조절하여 T 세포에 의한 사멸을 피하고 제어할 수 없는 암으로 점차적으로 발전한다.

[0003] 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T) 요법은 최근 몇 년 동안 좋은 효능을 가진 항암 면역 요법이다. 천연 T 세포가 종양 세포를 인식하는 방식과 달리, CAR-T 세포는 종양 세포 인식을 위해 MHC 분자에 의존하지 않는다. CAR 분자는 항체에서 유래한 항원 인식 구조 도메인으로 표적 항원을 인식하는 역할을 하는 세포의 영역(extracellular region), 막관통 영역(transmembrane region), 및 T-세포 수용체에서 유래하고 자극을 받으면 T 세포 활성화 신호를 전달하는 역할을 하는 신호전달 분자 및 공동자극(costimulatory) 신호전달 분자인 세포 내 영역(intracellular region)을 포함하는 3개의 주요 부분으로 구성된다. 작동 원리는 다음과 같다: CAR 분자가 해당 항원에 결합하면, CAR 분자가 응집하여 국소 인산화 수준을 높이고, 다운스트림 신호를 활성화하고, 최종적으로 T 세포의 이펙터 기능을 시작하여 표적 종양 세포를 사멸시킨다.

[0004] CD19-단백질-표적화 키메라 항원 수용체 T 세포(CD19-CAR-T) 요법은 미국에서 재발성 불응성(refractory) B 세포 림프종의 치료를 위한 두 가지 임상 적용에 대해 승인되었다. 그러나, CAR-T 요법은 고형 종양의 치료에 어려움을 겪었다. T 세포 요법이 고형 종양의 치료에서 좋은 효능을 얻지 못하게 하는 여러 요인이 있는데, 중요한 이유 중 하나는 CAR-T 세포의 기능이 종양 미세환경에서 억제되고, T 세포가 고갈 및 세포사멸사(아포토시스)의 경향이 있기 때문이다. 최근 연구는 T 세포의 장애가 키메라 항원 수용체의 신호전달 경로 특성과 관련이 있을 수 있음을 시사한다.

[0005] T-세포 수용체(TCR) 복합 분자는 다중 사슬을 포함하며, TCR α 사슬과 TCR β 사슬은 MHC-폴리펩티드 분자를 인식하는 역할을 하고, 나머지 6개의 CD3 서브유닛은 TCR α/β 사슬에 결합하여 신호 전달의 기능을 한다. 천연 TCR 복합체는 총 10개의 ITAM 신호 서열을 포함하고 있으며, CAR보다 강한 신호의 전달이 이론적으로 가능하다. 이전 연구에 따르면 TCR 신호의 전달은 CAR 신호의 전달보다 느리지만, TCR 신호는 더 지속적이다. 따라서, 천연 TCR 신호 전달 기능을 이용하여, T 세포 기능 장애를 완화하고 더 나은 항-고형 종양 효과를 발휘할 수 있는 새로운 수용체를 구축할 수 있을 것이다.

[0006] TCR의 세포의 영역은 항체의 Fab 도메인과 매우 유사하므로, TCR 가변 영역(variable region) 서열을 항체 가변 영역 서열로 치환하여 합성 TCR 및 항원 수용체(STAR)를 얻을 수 있으며, 이는 항체의 특이성과 천연 TCR의 우수한 신호 전달 기능을 모두 가지고 있고, 완전한 T 세포 활성화를 매개할 수 있다.

[0007] 그러나, 천연 TCR으로부터 유래된 STAR는 여전히 열악한 막 안정성, 낮은 α/β 사슬 페어링 능력, 내인성 TCR과의 미스매치(mismatch), T 세포로의 도입의 어려움 등을 겪고 있다. 따라서, 개선된 STAR에 대한 현장의 요구가 여전히 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 STAR의 구조를 나타낸다. A, STAR의 프로토타입의 구조도(structure diagram); B, 개선된 STAR의 구조도; 및 C, 서로 다른 표적 항원을 표적화하는 이중-STAR의 구조도.

도 2는 인간 및 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 및 β 사슬의 불변 영역(constant region)의 서열 정렬 결과를 나타낸다.

도 3은 인간 및 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단의 18개 아미노산의 서열 정렬 결과를 나타낸다. UserSeq1은 인간 서열이고, UserSeq2는 마우스 서열이다.

도 4는 인간 및 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단의 25개 아미노산의 서열 정렬 결과를 나타낸다. UserSeq1은 인간 서열이고, UserSeq2는 마우스 서열이다.

도 5는 다양한 변형을 조합하는 불변 영역 돌연변이를 나타낸다.

도 6은 EGFR을 표적으로 하는 Cetux STAR의 다양한 돌연변이체의 기능을 보여준다.

도 7은 GPC3을 표적으로 하는 GC33 STAR의 다양한 돌연변이체의 기능을 보여준다.

도 8은 CD19를 표적으로 하는 334 STAR의 통합 돌연변이체의 기능을 보여준다.

도 9는 CD19/CD20을 표적으로 하는 FMC63-2C6 STAR의 통합 돌연변이체의 기능을 보여준다.

도 10은 CD19/CD22를 표적으로 하는 FMC63-M791 STAR의 통합 돌연변이체의 기능을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] **발명의 요약**

[0010] 달리 명시되거나 정의되지 않는 한, 사용되는 모든 용어는 해당 기술 분야에서 통상적인 의미를 가지며, 이는 당업자에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Lewin, "Genes VIII"; 및 Roitt et al. "Immunology"(8판)과 같은 표준 매뉴얼 뿐만 아니라 여기에 인용된 일반적인 선행 기술을 또한 참조한다. 또한, 달리 명시되지 않는 한, 구체적으로 기재되지 않은 모든 방법, 단계, 기술 및 작업은 그 자체로 공지된 방식으로 수행될 수 있고, 수행되어 왔으며, 방식은 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 또한, 예를 들어 표준 매뉴얼, 상기 일반적인 선행 기술 및 거기에 인용된 다른 참고 문헌을 참조한다.

[0011] 본원에 사용된 "및/또는"이라는 용어는 그 용어에 의해 연결된 항목의 모든 조합을 포괄하며, 각각의 조합이 본원에 개별적으로 나열되는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, "A 및/또는 B"는 "A", "A 및 B" 및 "B"를 포괄한다. 예를 들어, "A, B 및/또는 C"는 "A", "B", "C", "A 및 B", "A 및 C", "B 및 C" 및 "A 및 B 및 C"를 포괄한다.

[0012] "포함하다(comprise)"라는 용어가 단백질 또는 핵산의 서열을 기재하기 위해 본원에서 사용될 때, 단백질 또는 핵산은 서열로 구성될 수 있거나, 단백질 또는 핵산의 한쪽 또는 양쪽 말단이 추가의 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 가질 수 있지만, 본 발명에 기술된 활성은 여전히 존재한다. 또한, 폴리펩티드의 N-말단에서 개시 코돈(initiation codon)에 의해 암호화된 메티오닌이 특정 실제 상황(예를 들어, 특정 발현 시스템에서 발현되는 경우) 하에서 유지될 것이지만, 폴리펩티드의 기능은 실질적으로 영향을 받지 않는다는 것이 당업자에게 명백하다. 따라서, 특정 폴리펩티드 아미노산 서열이 본 발명의 명세서 및 특허청구범위에 기재되어 있는 경우, N-말단의 개시코돈에 의해 암호화되는 메티오닌이 포함되지 않을 수 있지만, 메티오닌을 포함하는 서열이 이와 관련하여 또한 커버되며, 따라서, 암호화 뉴클레오타이드 서열은 개시 코돈을 또한 포함할 수 있고; 그 반대도 마

참가지다.

- [0013] 일 측면에서, 본 발명은 α 사슬 및 β 사슬을 포함하는 합성 T-세포 수용체 및 항원 수용체(STAR)를 제공하며, 여기서 α 사슬은 제1 항원-결합 영역 및 제1 불변 영역을 포함하고, β 사슬은 제2 항원-결합 영역 및 제2 불변 영역을 포함하며,
- [0014] 여기서 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 변이체로서, 천연 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 i) N-말단 변형; ii) 시스테인 치환; 및/또는 iii) 소수성 아미노산 치환을 포함하고; 및/또는
- [0015] 여기서 제2 불변 영역은 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역의 변이체로서, 천연 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역과 비교하여 i) N-말단 변형; 및 ii) 시스테인 치환을 포함한다.
- [0016] 일부 구현예에서, 항원-결합 영역은 불변 영역의 N-말단에 융합된다.
- [0017] 일부 구현예에서, α 및 β 사슬은 T 세포에서 발현시 기능적 TCR 복합체를 형성할 수 있다. 예를 들어, α 및 β 사슬은 T 세포에서 발현된 후 세포의 내인성 CD3 분자(CD3 ϵ δ , CD3 γ ϵ , CD3 ζ ζ)에 결합하여 8-서브유닛 TCR 복합체를 형성할 수 있으며, TCR 복합체는 세포 표면에 디스플레이되어 표적 항원에 결합하면 T 세포를 활성화시킨다. 기능적 TCR 복합체는 표적 항원에 특이적 결합을 하면 T 세포를 활성화할 수 있다.
- [0018] 본원에 사용된 "N-말단 변형"은 언급된 아미노산 서열(폴리펩티드 또는 단백질)의 N-말단이 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 부가를 포함하는 것을 의미하고, 용어는 또한 언급된 아미노산 서열(폴리펩티드 또는 단백질)의 N-말단으로부터 하나 이상의 연속 아미노산의 결실을 포함할 수 있다.
- [0019] 본원에 사용된 "시스테인 치환" 또는 "소수성 아미노산 치환"은 언급된 아미노산 서열(폴리펩티드 또는 단백질)의 원래 아미노산이 시스테인 또는 소수성 아미노산으로 치환되는 것을 의미하며, 여기서 소수성 아미노산 치환은 친수성 아미노산이 소수성 아미노산으로 치환된 것일 수도 있고, 소수성이 낮은 아미노산이 소수성이 높은 아미노산으로 치환된 것일 수도 있다.
- [0020] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역, 비-인간 영장류 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역, 설치류, 예를 들어 마우스, T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래된다. 예시적인 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래된다.
- [0021] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여 N 말단에서 18개 아미노산 내의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열(DIQNPEPAVYQLKDPRSQ)이 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실된다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-N.DLT에 상응)
- [0022] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여 N 말단에서 변형을 포함하며, 여기서 N-말단의 위치 15-18에 있는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 결실되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 15-18에 있는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 15-18에 있는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 1-14에 있는 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-N.Rec-4에 상응)
- [0023] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단으로부터 X개의 연속 아미노산이 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 및/또는 N-말단의 위치 (X+1) 내지 18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되며, 여기서 X는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18이다.
- [0024] 예를 들어, 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래

되고, N-말단의 위치 1-14의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 34에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-N.Rec-1에 상응)

[0025] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-8의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 9-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 35에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-N.Rec-2에 상응)

[0026] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-12의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 13-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 36에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-N.Rec-3에 상응)

[0027] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여 위치 48에서 시스테인 치환을 포함하고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역의 위치 48에 있는 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 시스테인 치환을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열(인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래됨)을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 시스테인 치환을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열(마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래됨)을 포함한다. (TCRaC-Cys에 상응)

[0028] 본원에 사용된 "아미노산 번호는 서열번호 x를 참조한다"(서열번호 x는 본원에 기재된 특정 서열임)는 기재된 특정 아미노산의 위치 번호가 서열번호 x 상의 상응하는 아미노산의 위치 번호임을 의미한다. 상이한 서열에서 아미노산의 대응성은 당업계에 널리 공지된 서열 정렬 방법에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 아미노산의 대응성은 EMBL-EBI의 온라인 정렬 툴(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>)에 의해 결정될 수 있으며, 여기서 두 개의 서열은 기본 파라미터를 사용하는 Needleman-Wunsch 알고리즘을 사용하여 정렬될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단으로부터 위치 46에 있는 아미노산이 서열 정렬에서 서열번호 x의 위치 48에 있는 아미노산과 정렬되면, 상기 폴리펩티드의 아미노산은 또한 본원에서 "폴리펩티드의 위치 48의 알라닌이고, 아미노산 위치는 서열번호 x를 참조한다"로 기재될 수 있다.

[0029] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여 막관통 영역 내에 소수성 아미노산 치환을 포함하고, 예를 들어, 막관통 영역은 위치 111-119의 아미노산 서열을 포함하고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여 위치 112, 114 및/또는 115에서 소수성 아미노산 치환을 포함하고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역의 위치 112의 세린이 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌이 이소류신으로 치환되고, 및/또는 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되며; 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 제1 불변 영역의 위치 112의 세린이 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌이 이소류신으로 치환되고, 및/또는 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되며; 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 구현예에서, 소수성 아미노산 치환을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 8에 기재된 막관통 영역(마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래됨)을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 소수성 아미노산 치환을 포함하는 제1 불변 영역은 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열(마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래됨)을 포함한다. (TCRaC-TM9에 상응)

[0030] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-4의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 48의 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-Cys-N.Rec-1에 상응)

[0031] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치

1-4의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 112의 세린이 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌이 이소류신으로 치환되며, 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-TM9-N.Rec-1에 상응)

[0032] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 위치 48의 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되고, 위치 112의 세린이 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌이 이소류신으로 치환되고, 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-Cys-TM9에 상응)

[0033] 일부 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-4의 아미노산이 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산이 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 48의 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되고, 위치 112의 세린이 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌이 이소류신으로 치환되고, 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1에 상응)

[0034] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역, 비-인간 영장류 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역 및 설치류, 예를 들어, 마우스, T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래된다. 예시적인 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역은 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역은 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래된다.

[0035] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 N 말단에서 25개 아미노산 내의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열(DLRNVTTPKVSFLFEPKAEIANKQK)이 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실된다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRbC-N.DLT에 상응)

[0036] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 N 말단에서 변형을 포함하고, 여기서 N-말단의 위치 17 및 21-25에 있는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 결실되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 17 및 21-25에 있는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 17 및 21-25에 있는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 1-16의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRbC-N.Rec-4에 상응)

[0037] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단으로부터 X개의 연속 아미노산이 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 및/또는 N-말단의 위치 (X+1) 내지 25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되며, 여기서 X는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25이다.

[0038] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-6의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 7-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 37에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRbC-N.Rec-1에 상응)

- [0039] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-12의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 13-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 38에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRbC-N.Rec-2에 상응)
- [0040] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-18의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 19-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, N-말단 변형을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 39에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRbC-N.Rec-3에 상응)
- [0041] 일부 구현예에서, 천연 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여, 제2 불변 영역은 위치 56에서 시스테인 치환을 포함하고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 구현예에서, 천연 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여, 제2 불변 영역의 위치 56의 세린이 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 시스테인 치환을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열(인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래됨)을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 시스테인 치환을 포함하는 제2 불변 영역은 서열번호 20에 기재된 아미노산 서열(마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래됨)을 포함한다. (TCRbC-Cys에 상응)
- [0042] 일부 구현예에서, 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-6의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 7-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 56의 세린은 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제2 불변 영역은 서열번호 21에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. (TCRbC-Cys-N.Rec-1에 상응)
- [0043] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-4의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-6의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 7-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 34에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 37에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0044] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 위치 48의 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여, 위치 56의 세린이 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 20에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 위치 112의 세린은 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌은 이소류신으로 치환되고, 위치 115의 글리신은 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및 제2 불변 영역은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역이다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0046] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, N-말단의 위치 1-4의 아미노산이 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산이 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 48의 트레오닌은 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β -사슬 불변 영역으로부터 유래하고, N-말단의 위치 1-6의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β -사슬 불변 영역과 비교하여 결실되고, 여기서 N-말단의 위치 7-25의 아미노산은 천연 인간

T-세포 수용체 β -사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 56의 세린은 시스테인으로 돌연변이되고, 위치 56의 시스테인은 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 21에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0047] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-4의 아미노산은 천연 마우스 T 세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단 위치 5-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 112의 세린은 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌은 이소류신으로 치환되고, 위치 115의 글리신이 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-6의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 7-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 37에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0048] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여, 위치 48의 트레오닌은 시스테인으로 돌연변이되고, 위치 112의 세린은 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌은 이소류신으로 치환되고, 위치 115의 글리신은 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, 위치 56의 세린은 천연 마우스 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역과 비교하여 시스테인으로 돌연변이되며, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다. 일부 특정 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 20에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0049] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-4의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 5-18의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 48의 트레오닌은 시스테인으로 돌연변이되고, 위치 112의 세린은 류신으로 치환되고, 위치 114의 메티오닌은 이소류신으로 치환되고, 위치 115의 글리신은 발린으로 치환되고, 아미노산 번호는 서열번호 2를 참조하며; 및

[0050] 제2 불변 영역은 마우스 T-세포 수용체 β -사슬 불변 영역으로부터 유래되고, N-말단의 위치 1-6의 아미노산은 천연 마우스 T-세포 수용체 β -사슬 불변 영역과 비교하여 결실되며, 여기서 N-말단의 위치 7-25의 아미노산은 천연 인간 T-세포 수용체 β -사슬 불변 영역의 상응하는 아미노산으로 치환되고, 위치 56의 세린은 시스테인으로 돌연변이되고, 위치 56의 시스테인은 시스테인으로 돌연변이되고, 아미노산 번호는 서열번호 15를 참조한다.

[0051] 일부 바람직한 구현예에서, 제1 불변 영역은 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 불변 영역은 서열번호 21에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0052] 본원에 사용된 "항원-결합 영역"은 단독으로 또는 다른 항원-결합 영역과 조합하여 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 것을 의미한다.

[0053] 본원에 기재된 "항원" 또는 "표적 항원"은 항체에 의해 인식 및 결합될 수 있는 임의의 항원, 바람직하게는 질병-관련 항원, 보다 바람직하게는 암-관련 항원일 수 있다. 예시적인 암-관련 항원은 CD16, CD64, CD78, CD96, CLL1, CD116, CD117, CD71, CD45, CD71, CD123, CD138, ErbB2(HER2/neu), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), EGFR 변이체 III(EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, 디시알릴글리코시드 GD2, 관 상피 뮤신(ductal epithelial mucin), gp36, TAG-72, 글리코스핑고지질, 신경교종-관련 항원, β -인간 옴모막 성선 자극 호르몬, α -페토글로불린(AFP), 렉틴-반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2(AS), 장(intestinal) 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타제(prostase), 프로스타제 특이적 항원(prostatase specific antigen, PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, Prostein, PSMA, 생존 및 텔로머라제, 전립선암 종양 항원-1(PCTA-1), MAGE, ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린 B2, CD22, 인슐린 성장 인자(IGF1)-I, IGF-II, IGF1 수용체, 메조텔린, 종양-특이적 펩티드 에피토프를 제시하는 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, 종양 기질 항원, 피브로넥틴 엑스트라 도메인 A(EDA) 및 엑스트라 도메인 B(EDB), tenascin-C A1 도메인

인(TnC A1), 섬유아세포-관련 단백질(fap), CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, Foxp3, B7-1(CD80), B7-2(CD86), GM-CSF, 사이토카인 수용체, 내피 인자, BCMA(CD269, TNFRSF17), TNFRSF17(UNIPROT Q02223), SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25), GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1), FKBP11(UNIPROT Q9NYL4), KAMP3, ITGA8(UNIPROT P53708) 및 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0054] 항원-결합 영역은 임의의 상업적으로 입수가 가능한 항체, 예컨대 FMC63, 리톡시맙, 알렘투주맙, 에프라투주맙, 트라스투주맙, 비바투주맙, 세톡시맙, 라베투주맙, 팔리비주맙, 세비루맙, 투비루맙, 바실릭시맙, 다클리주맙, 인플릭시맙, 오말리주맙, 에파투주맙, 켈릭시맙, 시플리주맙, 나탈리주맙, 클레놀릭시맙, 켈투모맙, 에드레콜로맙, 칸투주맙 등을 포함하는 하나 이상의 공지된 항체로부터 유래될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 항원-결합 영역은 기탁 번호 CGMCC 제17095호(CGMCC No. 17095)를 갖는 하이브리도마 세포 334에 의해 생산된 모노클로날 항체 334이다(2019년 1월 21일, 북경 100101, 조양구 베이첸서로, 야드 1, 3호(No. 3, Yard 1, Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing)에 있는 중국과학원 미생물학 연구소, 중국 일반 미생물보존센터(China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences)에 기탁됨).
- [0055] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 항체의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 항체의 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0056] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 대안적으로, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 STAR는 EGFR에 특이적으로 결합한다.
- [0057] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 대안적으로, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 STAR는 CD19에 특이적으로 결합한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 대안적으로, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 STAR는 CD20에 특이적으로 결합한다.
- [0059] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 대안적으로, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 STAR는 CD22에 특이적으로 결합한다.
- [0060] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 대안적으로, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 STAR는 GPC3에 특이적으로 결합한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하고; 또는 제1 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하며, 이에 의해 STAR는 CD19에 특이적으로 결합한다.
- [0062] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역

은 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 또는 대안적으로, 제1 항원-결합 영역은 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 STAR는 CD19에 특이적으로 결합한다.

- [0063] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체(예컨대 scFv) 또는 단일 도메인 항체(예컨대 낙타 항체)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체(예컨대 scFv) 또는 단일 도메인 항체(예컨대 낙타 항체)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 표적 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 표적 항원의 상이한 영역(예컨대 상이한 에피토프)에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역은 상이한 표적 항원에 결합한다. 예를 들어, 일부 예시적인 구현예에서, 2개의 항원-결합 영역은 각각 CD19 및 CD20, 또는 각각 CD19 및 CD22, 또는 각각 CD38 및 BCMA, 또는 각각 PDL1 및 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0064] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 EGFR에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합//결합한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD20에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0067] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD22에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0068] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 GPC3에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0070] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0071] 또 다른 측면에서, 본 발명은 α 사슬 및 β 사슬을 포함하는 합성 T-세포 수용체 항원 수용체(STAR)를 제공하고, α 사슬은 제1 항원-결합 영역 및 제1 불변 영역을 포함하고, β 사슬은 제2 항원-결합 영역 및 제2 불변 영역을 포함하며,
- [0072] 여기서 제1 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역 또는 본원에 개시된 천연 T-세포 수용체 α 사슬 불변 영역의 변이체이고, 여기서 제2 불변 영역은 천연 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역 또는 본원에 개시된 천연 T-세포 수용체 β 사슬 불변 영역의 변이체이며, 및
- [0073] 여기서 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역은 상이한 표적 항원 또는 동일한 표적 항원의 상이한 영역에 특이적으로 결합한다.
- [0074] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체(예컨대 scFv) 또는 단일 도메인 항체(예컨대 낙타 항체)를 포함/포함한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 22에 기

재된 아미노산 서열 및 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 EGFR에 특이적으로 결합/결합한다.

- [0076] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 44에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 45에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0077] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 46에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 47에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD20에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0078] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 48에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 49에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD22에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0079] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 GPC3에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0080] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 29에 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 30에 기재된 중쇄 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31에 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 32에 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 33에 기재된 경쇄 CDR3을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0081] 일부 구현예에서, 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역에 포함된 단일쇄 항체는 서열번호 26에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호 27에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 이에 의해 제1 항원-결합 영역 및/또는 제2 항원-결합 영역은 CD19에 특이적으로 결합/결합한다.
- [0082] 일부 예시적인 구현예에서, 2개의 항원-결합 영역은 각각 CD19 및 CD20, 또는 각각 CD19 및 CD22, 또는 각각 CD38 및 BCMA, 또는 각각 PDL1 및 EGFR에 결합할 수 있다.
- [0083] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 합성 T-세포 수용체 항원 수용체(STAR)의 α 사슬 및/또는 β 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0084] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나의 리딩 프레임에 i) α 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, ii) β 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 및 iii) i)와 ii) 사이에 위치한 자가-절단(self-cleaving) 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. α 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 β 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치할 수 있다.
- [0085] 본원에서 사용된 "자가-절단 펩티드"는 세포 내에서 자가-절단을 달성할 수 있는 펩티드를 의미한다. 예를 들어, 자가-절단 펩티드는 세포 내에서 프로테아제에 의해 인식되고 특이적으로 절단될 수 있도록 프로테아제 인식 부위를 포함할 수 있다.
- [0086] 대안적으로, 자가-절단 펩티드는 2A 폴리펩티드일 수 있다. 2A 폴리펩티드는 번역 중에 자가-절단이 일어나는 바이러스의 짧은 펩티드의 부류이다. 2A 폴리펩티드를 사용하여 동일한 리딩 프레임에서 발현되는 두 개의 서로 다른 표적 단백질을 연결하는 경우, 두 개의 표적 단백질은 거의 1:1의 비율로 생성된다. 일반적으로 사용되는 2A 폴리펩티드는 돼지 테코바이러스-1(tecovirus-1)으로부터의 P2A, 테세아 시그나 바이러스(Thosea asigna virus)로부터의 T2A, 말 비염 A 바이러스로부터의 E2A 및 구제역 바이러스로부터의 F2A일 수 있다. 그 중, P2A의 절단 효율이 가장 높기 때문에 P2A가 선호된다. 이들 2A 폴리펩티드의 다양한 기능적 변이체도 당업계에 공지되어 있으며, 이러한 변이체도 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0087] 또 다른 측면에서, 본 발명은 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0088] 본 발명의 "발현 벡터"는 선형 핵산 절편, 원형 플라스미드 및 바이러스 벡터일 수 있거나, 또는 번역될 수 있는 RNA(예컨대 mRNA)일 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터이다.

- [0089] "조절 서열" 및 "조절 요소"는 암호화 서열의 상류(5' 비-암호화 서열), 중간, 또는 하류(3' 비-암호화 서열)에 위치한 뉴클레오티드 서열을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용되며, 이는 연관된 암호화 서열의 전사, RNA 프로세싱 또는 안정성, 또는 번역에 영향을 미친다. 발현 조절 요소는 관심 뉴클레오티드 서열의 전사, RNA 프로세싱 또는 안정성, 또는 번역을 제어할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 조절 서열은 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론, 인핸서 및 폴리아데닐화 인식 서열을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 뉴클레오티드 서열의 전사가 전사 조절 요소에 의해 제어 및 조절 되도록 조절 요소(예를 들어, 프로모터 서열, 전사 종결 서열 등, 그러나 이에 제한되지 않음)가 핵산 서열(예를 들어, 암호화 서열 또는 오픈 리딩 프레임)에 연결되는 것을 의미한다. 조절 요소 영역을 핵산 분자에 작동가능하게 연결하는 기술은 당업계에 공지되어 있다.
- [0091] 또 다른 측면에서, 본 발명은 T 세포에서 본 발명의 합성 T-세포 수용체 항원 수용체(STAR)를 발현시키는 단계를 포함하는, 치료적 T 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 발현 벡터를 T 세포에 도입하는 단계를 포함한다.
- [0092] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 합성 T-세포 수용체 항원 수용체(STAR)를 포함하거나, 본 발명의 방법에 의해 수득되는 치료적 T 세포를 제공한다.
- [0093] 본 발명의 T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 조직, 복수, 흉막 삼출물, 비장 조직 및 종양을 비롯한 다수의 비제한적 공급원으로부터 다양한 비제한적 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 건강한 공여자로부터 또는 암으로 진단된 환자로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 상이한 표현형 특징을 나타내는 세포의 혼합 집단의 일부일 수 있다. 예를 들어, T 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리한 다음 특정 항체로 활성화 및 확장을 수행하여 수득할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 측면의 일부 구현예에서, T 세포는 대상체(subject)의 자가(autologous) 세포로부터 유래된다. 본원에 사용된 "자가"는 대상체를 치료하는 데 사용되는 세포, 세포주 또는 세포 집단이 대상체로부터 유래됨을 지칭한다. 일부 구현예에서, T 세포는 이종 세포, 예를 들어 대상체의 인간 백혈구 항원(HLA)과 양립가능한 공여자로부터 유래된다. 표준 방안(scheme)을 사용하여 기증자로부터의 세포를 비-동종반응성(non-alloreactive) 세포로 전환하고 필요에 따라 세포를 복제하여 한 명 이상의 환자에게 투여할 수 있는 세포를 생성할 수 있다.
- [0095] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 치료적 T 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0096] 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 양립가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제, 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예컨대 주사 또는 주입)에 적합하다.
- [0097] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암과 같은 질병의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 치료적 T 세포 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0098] 본원에 사용된 "대상체"는 본 발명의 세포, 방법 또는 약제학적 조성물에 의해 치료될 수 있는 질병, 예컨대 암을 앓거나 앓기 쉬운 유기체를 지칭한다. 비제한적인 예에는 인간, 소, 래트, 마우스, 개, 원숭이, 염소, 양, 사슴 및 기타 비포유동물이 포함된다. 바람직한 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0099] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 치료적 T 세포 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암과 같은 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0100] 본원에 사용된 "치료학적 유효량" 또는 "치료학적 유효 용량" 또는 "유효량"은 대상체에 투여한 후 치료 효과를 생성하기에 적어도 충분한 물질, 화합물, 원료 또는 세포의 양을 지칭한다. 따라서, 이는 질병이나 상태의 증상을 예방, 치료, 개선, 정지 또는 부분적으로 정지시키는 데 필요한 양이다. 예를 들어, 본 발명의 세포 또는 약제학적 조성물의 "유효량"은 바람직하게는 질병의 증상의 중증도의 감소, 질병의 무증상 단계의 빈도 및 기간의 증가, 또는 질병으로 인한 손상 또는 장애의 예방을 초래한다. 예를 들어, 종양의 치료를 위해, 본 발명의 세포 또는 약제학적 조성물의 "유효량"은 바람직하게는 치료를 받지 않은 대상체에 비해 종양 세포 성장 또는 종양 성장을 적어도 약 10%, 바람직하게는 적어도 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%, 보다 바람직하게는 적어도 약 50%, 보다 바람직하게는 적어도 약 60%, 보다 바람직하게는 적어도 약 70%, 보다 바람직하게는 적어도 약 80% 억제한다. 종양 성장을 억제하는 능력은 인간 종양에 대한 치료 효과를 예측하는 데 사용할 수 있는 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 대안적으로, 이는 또한 당업자에게 잘 알려

진 검정에 의해 시험관내에서 결정될 수 있는 종양 세포 성장을 억제하는 능력을 조사함으로써 평가될 수 있다.

[0101] 본 발명의 약제학적 조성물에서 세포의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정의 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 세포의 양을 얻기 위해 다양할 수 있다. 선택되는 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 기간, 사용된 특정 조성물과 조합하여 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에 널리 공지된 유사 인자를 비롯한 다양한 약동학적 인자에 따라 달라질 것이다.

[0102] 본 발명에 따른 치료적 T 세포 또는 약제학적 조성물 또는 약제의 투여는 주사, 주입, 임플란트 또는 이식을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 세포 또는 조성물의 투여는 정맥내, 림프내, 피내, 종양내, 골수내, 근육내 또는 복강내 투여에 의해 이루어질 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 세포 또는 조성물은 바람직하게는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0103] 본 발명의 다양한 측면의 구현예에서, 암은 폐암, 난소암, 결장암, 직장암, 흑색종, 신장암, 방광암, 유방암, 간암, 림프종, 혈액암, 두경부암, 신경교종양, 위암, 비인두암, 인후암, 자궁경부암, 자궁체종양 및 골육종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 방법 또는 약제학적 조성물로 치료할 수 있는 다른 암의 예는 골암, 췌장암, 피부암, 전립선암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 항문암, 고환암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 질암, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병 포함), 소아 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신우암, 중추신경계(CNS) 종양, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피 암종, 편평 세포 암종, T 세포 림프종, 및 석면-유도 암을 비롯한 환경적으로 유도된 암, 및 암의 조합을 포함한다.

[0104] 실시예

[0105] 실시예 1. STAR 및 이의 돌연변이체의 불변 영역 도메인의 설계

[0106] 1.1 STAR의 프로토타입의 설계

[0107] B 세포에 의해 생성된 분비 항체(Ab) 또는 B 세포 수용체(BCR)는 유전자 구조, 단백질 구조 및 공간적 형태에서 T-세포 수용체(TCR)와 큰 유사성을 공유한다. 항체와 TCR은 모두 가변 영역과 불변 영역으로 구성되어 있는데, 가변 영역은 항원 인식과 결합에 관여하고, 불변 영역 도메인은 구조적 상호작용과 신호전달에 관여한다. TCR α 및 β 사슬(또는 TCR γ 및 δ 사슬)의 가변 영역을 항체의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄(VL) 가변 영역으로 치환함으로써, 합성 T-세포 수용체 및 항체 수용체(STAR)라고 하는 합성 키메라 분자를 작제할 수 있으며, 그 구조를 도 1에 나타내었다.

[0108] STAR 분자는 2개의 사슬을 가지며, 제1 사슬은 항원 인식 서열(예를 들어, 항체의 중쇄 가변 영역 VH)을 T-세포 수용체 α 사슬(TCR α)의 불변 영역(C α , 인간 TCRAc-WT, 서열번호 1)에 융합함으로써 얻어지고, 제2 사슬은 항원 인식 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 가변 영역 VL)을 T-세포 수용체 β 사슬(TCR β)의 불변 영역(O β , 인간 TCRbC-WT, 서열번호 14)에 융합함으로써 얻어진다. 작제물 내의 항원 인식 도메인(예컨대 VH, VL 또는 scFv) 및 불변 영역 도메인(TCR α , β , γ 및 δ 불변 영역)은 배열되고 조합되어 구성(configuration)은 다르지만 기능은 유사한 복수의 작제물을 형성할 수 있다.

[0109] STAR 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬이 T 세포에서 발현된 후, STAR 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬은 소포체(endoplasmic reticulum)에서 세포의 내인성 CD3 ϵ δ , CD3 γ ϵ 및 CD3 ζ ζ 사슬과 결합하여 8-서브유닛 복합체를 형성할 수 있으며, 복합체는 복합체 모드로 세포막의 표면에 디스플레이된다. 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)은 TCR 분자에서 신호전달 효과를 가지는 서열 모티프로, 보존된 서열은 YxxL/V이다. CD3 ϵ , δ , γ 및 ϵ 사슬의 세포내 영역은 하나의 ITAM 서열을 포함하고, CD3 ζ 사슬의 세포내 영역은 3개의 ITAM 서열을 포함하므로 완전한 STAR 복합체는 총 10개의 ITAM 서열을 포함한다. STAR의 항원 인식 서열이 특정 항원과 결합되면, 세포내 ITAM 서열이 점차 인산화되어, 하향 신호경로가 활성화되고, NF- κ B, NFAT, AP-1과 같은 전사인자가 활성화되어, T 세포가 활성화되도록 트리거되고, 이펙터 기능이 생성된다.

[0110] 1.2 마우스 유래 STAR의 설계

- [0111] STAR의 프로토타입의 설계는 인간 기원의 TCR α/β 사슬(또는 TCR γ 및 δ 사슬)의 불변 영역 서열을 사용한다. 인간, 영장류 및 마우스 TCR α/β 사슬(마우스 TCR α -WT, 서열번호 2 및 마우스 TCR β -WT(서열번호 15)) (또는 TCR γ 및 δ 사슬)의 불변 영역 서열은 기능 보수성 면에서 높고, 주요 아미노산 서열이 동일하므로, 서로 대체할 수 있다.
- [0112] 일단 T 세포로 형질도입되면, STAR 분자는 불변 영역을 통해 T 세포의 내인성 TCR과 미스페어링(mis-pair)을 이룰 것이다. 이 미스페어링 문제는 한편으로는 STAR 분자가 적절하게 짝을 이루는 효율성을 감소시키고 그 기능을 손상시키며, 다른 한편으로는 미지의 특이성을 생성하는 미스페어링의 가능성을 증가시키고 안전 위험을 증가시킨다. 이 문제를 해결하기 위해, STAR 분자의 불변 영역을 마우스 서열로 치환하여 인간 T 세포로 전달된 후의 STAR 분자의 기능을 향상시켰다. 인간과 마우스 서열의 정렬을 도 2에 나타내었다.
- [0113] 1.3 STAR의 불변 영역의 N-말단에서 변형의 설계
- [0114] STAR 분자의 설계를 추가로 최적화하기 위해, STAR 분자의 특정 서열을 변형하였으며, 한 가지 변형 방안(scheme)은 STAR 분자의 불변 영역의 N-말단을 결실시킨 것이다. TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단의 18개 아미노산을 결실시켰고(마우스 서열은 DIQNPEPAVYQLKDPRSQ, 서열번호 3)(생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCR α -N.DLT, 서열번호 4); 및 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단의 25개 아미노산을 결실시켰다(마우스 서열은 DLNRNTPPKVSLFEPKAEIANKQK, 서열번호 16)(생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCR β -N.DLT, 서열번호 17). 이 두 영역은 불변 영역의 N-말단에 위치하며, Ig-유사 C1 유형 도메인에 속하지 않으며, 이들은 분자 내 이황화 결합 형성에 관여하지 않지만, 주로 힌지 역할을 하며, 이는 STAR의 기능에 영향을 미치고, 이에 대해서는 다른 결실 방안이 설계된다. 본 발명에 따르면, 불변 영역의 특정 서열을 더 나은 효과를 얻기 위해 재배열하였다. 재배열은 부분 서열을 결실시키는 한편 부분 서열에 인간화 돌연변이를 만드는 것을 의미한다. 이러한 영역 변형은 다음과 같은 장점이 있다; 첫째, 힌지 영역의 기능적 최적화는 STAR와 내인성 TCR의 미스페어링을 감소시킬 수 있다; 둘째, 최적화된 STAR 분자 크기는 천연 TCR의 크기와 더 유사하며, 이는 공동-자극 분자의 결합, 면역학적 시냅스의 형성 및 안정화, 그리고 T 세포의 후속 이펙터 기능을 촉진한다.
- [0115] 인간화 돌연변이의 중요성은 STAR 분자에서 비인간 서열을 최소화하는 동시에 STAR-T 세포가 임상 적용에서 수용체에 의해 거부될 가능성을 최대한 우회하도록 STAR 분자의 기능을 보장하는 것이다. 구체적인 재배열 방안은 아래와 같다.
- [0116] TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단의 18개 아미노산(마우스 서열은 DIQNPEPAVYQLKDPRSQ임)의 재배열을 위한 방안:
- [0117] 도 3은 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단에 있는 18개 아미노산과 인간 서열의 정렬을 나타내며, UserSeq1은 인간 서열이고, UserSeq2는 마우스 서열이다. 아미노산 특성 분석을 통해, 마우스 유래 서열과 인간 유래 서열 모두 E6D, K13R, R16K 및 Q18S 부위에서 동일한 성질의 아미노산 치환에 속하며, P15S 부위에서 극성 아미노산으로 치환되는 비극성 아미노산에 속하므로 그 부위 근처의 단백질 특성이 보존되지 않고, 기능에 영향을 주지 않고 변형이 가능하다는 것이 밝혀졌다. 결론적으로, 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-14의 아미노산 서열은 유지하였고 인간화하였으며, 위치 15-18의 아미노산은 결실시켜 마우스 TCR α -N.Rec-4, 서열번호 5를 생성하였다.
- [0118] 또한, 이 영역의 힌지 효과를 설명하기 위해, 모든 절단이 효과에 영향을 미칠 수 있으며, 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-4의 아미노산을 결실시키고, 위치 5-18의 아미노산을 인간화하고, 변형을 마우스 TCR α -N.Rec-1로 명명하였으며, 생성된 불변 영역 서열은 서열번호 34이다; 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-8의 아미노산을 결실시키고, 위치 9-18의 아미노산을 인간화하고, 변형을 마우스 TCR α -N.Rec-2라고 명명하였으며, 생성된 불변 영역 서열은 서열번호 35이고; 및 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-12의 아미노산을 결실시키고, 위치 13-18의 아미노산을 인간화하고, 생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCR α -N.Rec-3, 서열번호 36이었다. 대조군으로서, 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 N-말단의 위치 1-18의 아미노산의 무작위 재배열을 또한 수행하였으며, 생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCR α -N.rRec, 서열번호 40이다.
- [0119] TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단의 25개 아미노산(마우스 서열은 DLNRNTPPKVSLFEPKAEIANKQK임)의 재배열을 위한 방안:
- [0120] 도 4는 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단에 있는 25개 아미노산과 인간 서열의 정렬을 나타내며, UserSeq1은 인간 서열이고, UserSeq2는 마우스 서열이다. 아미노산 특성 분석을 통해, 마우스 유래 서열 및 인간 유래 서열은 단지 R3K 및 L12V 부위에서 동일한 성질의 아미노산 치환에 속하고, 모두 T6F, K8E, D11A,

K17E, A21S, N22H 및 K23T 부위에서 아미노산 성질이 다른 치환에 속하여 그 부위에 가까운 단백질의 성질이 보존되지 않고, 기능에 영향을 주지 않고 변형이 가능하다는 것이 밝혀졌다. 결론적으로, 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-16의 아미노산 서열은 보존하였고 인간화하였으며, 위치 17 및 21-25의 아미노산은 결실시켰고, 생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCRβC-N.Rec-4(서열번호 18)이다.

[0121] 또한, 이 영역의 힌지 효과를 설명하기 위해, 모든 절단이 효과에 영향을 미칠 수 있으며, 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-6의 아미노산을 결실시키고, 위치 13-25의 아미노산을 인간화하였으며, 생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCRβC-N.Rec-1, 서열번호 37이고; 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-12의 아미노산을 또한 결실시키고, 위치 13-25의 아미노산을 인간화하였으며, 생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCRβC-N.Rec-2, 서열번호 38이고; 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-18의 아미노산을 또한 결실시키고, 위치 19-25의 아미노산을 인간화하였으며, 생성된 불변 영역 서열은 마우스 TCRβC-N.Rec-3, 서열번호 39이다. 대조군으로서, 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 N-말단에서 위치 1-25의 아미노산의 무작위 재배열을 또한 수행하여 마우스 TCRβC-N.rRec, 서열번호 41의 불변 영역 서열을 생성하였다.

[0122] 1.4 STAR의 불변 영역의 C-말단의 변형의 설계

[0123] 본 발명에서는, 마우스 TCR α 사슬 불변 영역의 C-말단에 있는 15개의 아미노산을 결실시켰고, 불변 영역 서열은 마우스 TCRAc-C.DLT(서열번호 42)이다.

[0124] 본 발명에서는, 마우스 TCR β 사슬 불변 영역의 C-말단에 있는 15개의 아미노산을 결실시켰고, 불변 영역 서열은 마우스 TCRβC-C.DLT(서열번호 43)이다.

[0125] 1.5 분자간 이황화 결합을 도입하기 위한 STAR의 시스테인 점 돌연변이의 설계

[0126] STAR 분자의 설계를 추가로 최적화하기 위해, STAR 분자에서 특정 서열을 변형하였으며, 한 가지 변형 방안은 STAR 분자에 시스테인 점 돌연변이를 수행하여 분자간 이황화 결합을 도입하여 STAR 분자의 두 사슬 사이의 페어링을 향상시키고 내인성 TCR과의 미스페어링을 줄이는 것이었다. 구체적인 방안은 아래와 같다.

[0127] TCR α 사슬 불변 영역에서, 위치 48의 트레오닌 T를 시스테인 C로 돌연변이시켰고(생성된 불변 영역 서열은 인간 TCRAc-Cys, 서열번호 6 및 마우스 TCRAc-Cys, 서열번호 7임), TCR β 사슬 불변 영역에서, 위치 56의 세린 S를 시스테인 C로 돌연변이시켰다(생성된 불변 영역 서열은 인간 TCRβC-Cys, 서열번호 19 및 마우스 TCRβC-Cys, 서열번호 20임). 새로 추가된 2개의 시스테인은 STAR의 두 사슬 사이에 이황화 결합을 형성할 것이고, STAR의 두 사슬과 내인성 TCR 사슬 사이의 미스페어링이 감소되고, STAR 분자는 더 안정적인 복합체를 형성하는 데 도움을 받았으며, 그 다음 더 나은 기능을 얻었다.

[0128] 1.6 STAR의 막관통 영역에서 소수성 아미노산 치환의 설계

[0129] STAR 분자의 설계를 추가로 최적화하기 위해, 본 발명은 STAR 분자의 특정 서열을 변형한다. 한 가지 변형 방안은 STAR 분자의 막관통 영역에서 소수성 아미노산 치환을 수행하여 STAR 분자의 안정성을 증가시키고 더 오래 지속되는 기능을 하도록 돕는 것이다. 구체적인 방안은 하기에 기재된 바와 같다.

[0130] TCR α 사슬 불변 영역의 막관통 영역의 111 내지 119 아미노산 영역에서 3개의 아미노산 부위를 돌연변이시켰고, 위치 112의 세린 S를 류신 L로 변경하였고, 위치 114의 메티오닌 M을 이소류신 I로 변경하였으며, 위치 115의 글리신 G를 피리미딘 V로 변경하였다. 이 영역의 전체 아미노산 서열은 L SVMGLRIL에서 LLVIVLRIL로 변경되었으며, 이 변형을 마우스 TCRAc-TM9라고 명명하고, 생성된 불변 영역 서열은 서열번호 9이다. 이 설계는 막관통 영역의 소수성을 증가시키고 TCR 막관통 영역이 운반하는 양전하로 인한 불안정성을 상쇄하여, STAR 분자가 세포막에 보다 안정적으로 존재하여 더 나은 기능을 얻을 수 있다.

[0131] 1.7 N-말단 변형, 시스테인 변형 및 막관통 영역 변형의 조합

[0132] 본 발명자들은 전술한 N-말단 변형, 시스테인 변형 및 막관통 영역 변형을 조합하여, 마우스 TCRAc-Cys-N.Rec-1(서열번호 11), 마우스 TCRAc-TM9-N.Rec-1(서열번호 12), 마우스 TCRAc-Cys-TM9(서열번호 10), 마우스 TCRAc-Cys-TM9-N.Rec-1(서열번호 13), 및 마우스 TCRβC-Cys-N.Rec-1(서열번호 21)을 설계하였다.

[0133] 1.8 STAR의 가변 및 불변 영역의 교환 배열 및 조합

[0134] STAR 분자는 가변 영역 도메인과 불변 영역 도메인의 두 부분으로 나눌 수 있다. 가변 영역 도메인은 항원 인식 능력을 갖는 아미노산 서열로 구성되며, 일반적으로 다음과 같은 클래스의 분자로 이루어진다: 항체 경쇄 가변 영역, 항체 중쇄 가변 영역, 단일-쇄 항체(scFv), 리간드-수용체 결합 영역, 나노바디 등. 불변 영역 도메인은

TCR 불변 영역 또는 CD3 서브유닛과 통합할 수 있는 능력이 있는 관련 서열로 구성되며, 전형적으로 TCR α , β , γ 및 δ 사슬의 불변 영역을 포함한다.

[0135] STAR 작제물의 항원 인식 도메인 및 불변 영역 도메인은 배열되고 조합되어 구성은 다르지만 유사한 기능을 갖는 다양한 작제물을 형성할 수 있다. 몇 가지 가능한 배열과 조합을 아래 표에 나타내었다.

일련 번호	STAR- α 사슬		STAR- β 사슬	
	항원 인식 영역	불변 영역	항원 인식 영역	불변 영역
1	VH	C α	VL	C β
2	VL	C α	VH	C β
3	VH	C γ	VL	C δ
4	VL	C γ	VH	C δ
5	ScFv1	C α	ScFv2	C β
6	ScFv2	C α	ScFv1	C β
7	ScFv1	C γ	ScFv1	C δ
8	ScFv2	C γ	ScFv2	C δ
9	Ligand1	C α	Ligand2	C β
10	Ligand2	C α	Ligand1	C β
11	Ligand1	C γ	Ligand2	C δ
12	Ligand2	C γ	Ligand1	C δ
13	VH	C α	scFv1	C β
14	VL	C α	scFv1	C β
15	scFv1	C α	Ligand1	C β
16	VH	C α	Ligand1	C β
17	VL	C α	Ligand1	C β

[0136]

[0137] **실시예 2. STAR의 항원 인식 도메인의 설계**

[0138] 1) 표적 선택

[0139] STAR 표적 선택은 주로 유전자 발현의 은행에 의해 달성되며, 일반적으로 적합한 STAR 표적의 발현 수준은 일반적으로 정상 세포에 비해 질병 또는 관련 세포에서 높은 발현 또는 특이적 발현을 갖는다. 적합한 표적이 결정된 후, 표적을 인식하기 위한 항원 인식 도메인은 일반적으로 항체, SCFV, VHH 또는 항원 대응 수용체 등이다. 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), 알파카 단일 체 항체(VHH), 및 항체의 수용체 및 리간드는 마우스, 알파카의 면역화, 시퀀싱 또는 공개된 서열에 의해 획득할 수 있다. 획득된 마우스 유래 또는 알파카 서열은 일반적으로 인간 세포에서의 발현 및 기능에 보다 유리하도록 인간화 및 코돈 최적화를 거칠 필요가 있다. 적합한 서열을 획득한 후, 획득된 서열을 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터에 연결하고, 벡터 작제가 맞는지 여부를 시퀀싱 방법을 통해 검증한 후, 바이러스 패키징 및 감염을 통해 벡터를 체세포에서 발현시키고, 태그 단백질 RFP, GFP, MYC, HIS 등을 사용하여 STAR 단백질 발현, 막 로딩, 항원 결합 등을 검증한다. 유용한 표적은 GPC3, EGFR VIII, CD22, CD20, MSLN, GD2, LIRB4, ROR1, Claudin 18.2, CD7, CD47 및 CD24를 포함하지만 이에 국한되지 않는다.

[0140] 2) 표적 세포주 및 도구(tool) 세포주의 표

[0141] 본 발명에서는, STAR의 기능을 설명하기 위해 복수의 표적 세포주를 사용하였으며, 표적 세포는 유전 공학 수단을 통해 루시퍼라제 유전자를 획득하여 시험관 내 기능 검증이 용이하도록 하였다. 루시퍼라제는 세포 기능 연구를 위한 일반적인 물질로, 시스템에 루시퍼라제 기질을 첨가하여 효소 활성을 판단하며, 루시퍼라제 활성은 표적 유전자의 발현, 결합력, 세포수 등과 밀접한 관련이 있다. 본 발명에서는, 루시퍼라제를 안정적으로 발현

하기 위한 표적 세포주를 확립하고, 표적 세포의 양을 루시퍼라제의 양으로 나타내어 기능성 세포의 사멸(killing) 기능을 나타내었다. 특정 세포는 다음과 같다.

세포주의 명칭	표적 스팟	해당하는 암/질병 또는 기능
A431	EGFR	피부암
A549	EGFR	폐암
B16/htEGFR	EGFR	흑색종
HepG2	GPC3	간암
HUH7	GPC3	간암
RAJI	CD19	림프종/백혈병
RAJI-CD19KO	CD19-	림프종/백혈병
RAJI-CD20KO	CD20-	림프종
RAJI-CD22KO	CD22-	림프종
Jurkat		기능 검사
Jurkat Clone 5 (JC5)		기능 검사/바이러스 역가 검사

[0142]

[0143]

3) 항원 인식 도메인(항체, scFv, Fab, VHH 등)의 선택

[0144]

항원 인식 도메인은 항원을 인식하는 항체, 항체의 단일 쇠 가변 영역, 가변 영역, 나노바디, 항원 인식 수용체 등으로부터 유래될 수 있다. STAR의 설계에서, 바이러스는 T 세포 형질전환의 주요 경로이며 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 패키징은 패키징의 크기와 관련이 있으므로, 더 작은 항체 인식 단위가 선호되며, 예를 들어, 항체 단일 쇠 가변 영역 및 나노바디가 크기 면에서 더 나은 선택이다. 동일한 항원을 겨냥하여, 기존의 항체는 선행 기술로서 항체 인식 도메인을 광범위하게 스크리닝하는 방법 중 하나이며, 한편, 과지 라이브러리에 의한 완전-인간화 항체 라이브러리 구축, 친화성 최적화, 마우스 하이브리도마 스크리닝, 알파가 모노클로날 항체 스크리닝, 인간화 등의 기술을 통해 항원을 인식하는 새로운 항체를 수득하였다. 또한, 항원을 인식할 수 있는 특정 분자로서 항원의 수용체는 항원 인식 도메인의 주요 선택 중 하나이다.

[0145]

실시예 3. STAR 및 이의 돌연변이체의 플라스미드 작제

[0146]

1) 플라스미드 공급원

[0147]

렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 단백질 발현 벡터, 과지미드, 렌티바이러스 패키징 플라스미드, 레트로바이러스 패키징 플라스미드 등을 포함하여 본 발명에 사용된 벡터는 모두 상업적 회사로부터 구입하거나 상업적 회사에 의해 합성되며, 벡터의 전장 서열을 수득하고, 명확한 효소 절단 부위가 알려져 있다.

[0148]

2) 단편 공급원

[0149]

본 발명에 채용된 유전자 절편(segment)은 시그널 펩티드, 항체 결합 영역, 힌지 영역, TCR 불변 영역, 태그 단백질 등을 포함하며 모두 상업적 회사에 의해 합성된 것이다. 프라이머 합성 PCR 방식으로 하나 이상의 표적 단편을 연결하여 상응하는 기능적 서열을 얻었다.

[0150]

3) 플라스미드 작제 및 시퀀싱 방법

[0151]

상기 방법에 사용된 렌티바이러스 벡터는 pHAGE-EF1a-GFP이고, pHAGR-EF1A-WPRE-AMP 벡터는 제한 엔도뉴클레아제 Not I/Cla I을 통해 수득하였고, 단편 유전자는 합성 및 PCR 방법을 통해 수득하였고, 완전한 벡터는 Gibson/NEBuilder 및 기타 재조합효소(recombinase)의 작용 하에 상동 재조합 방법을 통해 수득하였다. 레트로바이러스 벡터 RVKM-CMV-GFP는 제한효소 Xho I/BamH I에 의해 벡터 단편을 수득하였고, 한편 합성 및 PCR 방법에 의해 삽입 단편 유전자를 수득하였고, 상동 재조합 방법에 의해 벡터와 단편을 접합시켰다. 원핵 발현 벡터는 pET-28a 벡터였고, 사용된 제한 엔도뉴클레아제 부위는 XhoI 및 NcoI였으며, 진핵 발현 벡터는 PVRC8400이었고, 사용된 제한 엔도뉴클레아제 부위는 XhoI 및 XbaI였으며, 프라이머는 인간 항원 유전자에 따라 설계하였고, 제한 엔도뉴클레아제 소화 부위를 프라이머의 두 말단에 첨가하고, 항원 세포의 세그먼트 및 C 세그먼트의 절단된 his-tag를 표적 세포 웰 유전자로부터 증폭시켜 후속 정제에 사용하였다. 스티키(sticky) 말단 PCR을 이용하

여 효소 분해 산물의 스티키 말단의 센스 가닥과 안티센스 가닥에 따라 프라이머를 각각 디자인하고, 프라이머를 각각 PCR에 적용하여 벡터와 윈-스텝 재조합 연결을 수행하고, 효소 분해 후, 5 μL의 연결 생성물을 형질전환을 위한 연결 후 50 μL의 DH5α 컴피턴트 세포에 첨가하고, 37°C 인큐베이터에서 역전시키고, 12-16시간 동안 배양하였다.

[0152] 4) 플라스미드 추출 방법

[0153] 플라스미드 추출을 위해 알칼리 용해법을 사용하였으며, 플라스미드 추출 후, 260 nm 광흡수를 통해 플라스미드 농도를 검출하였다. 1차 시퀀싱 결과가 정확한 플라스미드를 형질전환하여 단클라인(monocline)으로 선별하여 추출해야 하며, 효소 분해를 통해 플라스미드가 맞는지 여부를 확인하였다.

[0154] 플라스미드 pHAGE-EF1A-IRES-RFP를 상기 방법으로 수득하였다; 불변 영역은 다양한 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 및 pHAGE-EF1A-GC33-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 플라스미드로 TCRa/bC-WT(TCRaC-WT 및 TCRbC-WT 포함), TCRa/bC-N.DLT(TCRaC-N.DLT 및 TCRbC-N.DLT 포함), TCRa/bC-C.DLT(TCRaC-C.DLT 및 TCRbC-CDLT 포함), TCRa/bC-N.Rec-1(TCRaC-N.Rec-1 및 TCRbC-N.Rec-1 포함), TCRa/bC-N.Rec-2(TCRaC-N.Rec-2 및 TCRbC-N.Rec-2 포함), TCRa/bC-N.Rec-3(TCRaC-N.Rec-3 및 TCRbC-N.Rec-3 포함), TCRa/bC-N.Rec-4(TCRaC-N.Rec-4 및 TCRbC-N.Rec-4 포함), TCRa/bC-N.rRec(TCRaC-N.rRec 및 TCRbC-N.rRec 포함), TCRa/bC-Cys(TCRaC-Cys 및 TCRbC-Cys 포함), TCRa/bC-TM9(TCRaC-TM9 및 TCRbC-WT 포함), TCRa/bC-Cys-N.Rec-1(TCRaC-Cys-N.Rec-1 및 TCRbC-Cys-N.Rec-1 포함), TCRa/bC-TM9-N.Rec-1(TCRaC-TM9-N.Rec-1 및 TCRbC-N.Rec-1 포함), TCRa/bC-Cys-TM9(TCRaC-Cys-TM9 및 TCRbC-Cys 포함), TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1(TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1 및 TCRbC-Cys-N.Rec-1 포함)이고; 그리고 상이한 표적의 경우, TCR 불변 영역은 모두 pHAGE-EF1A-334-VL-TCRbC-P2A-VH-TCRaC-IRES-RFP, pHAGE-EF1A-2C6-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-FMC63-VL-(G4S)3-VH-TCRaC-IRES-RFP, pHAGE-EF1A-M971-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-334-VL-(G4S)3-VH-TCRaC-IRES-RFP 및 기타 플라스미드이다.

[0155] 실시예 4. 도구 플라스미드 및 세포주의 구축

[0156] 1) 플라스미드 pHAGE-루시페라제-GFP의 작제

[0157] 렌티바이러스 벡터로서 pHAGE는 표적 유전자를 표적 세포 계놈에 안정적으로 삽입할 수 있으며, 안정적인 세포주를 구축하는 중요한 방법이다. 루시페라제는 촉매 활성을 갖는 효소로 기질을 촉매하여 화학적 자기발광을 발생시킬 수 있으며, 표적 세포의 수는 표적 세포가 루시페라제를 안정적으로 발현하고 기질을 첨가한 후에 표시될 수 있으므로, 표적 세포에 대한 기능 세포의 영향이 반영된다. PHAGE-EF1A 벡터는 제한 효소 Not I/Cla I 제한 효소 절단 부위를 가지고 있으며, 두 효소를 사용하여 벡터를 절단하였고, 루시페라제 및 GFP 서열은 NCBI로부터 입수하였고, 단편은 상업적인 회사인 루이바이오테크(Ruibiotech)에서 합성하였고, 루시페라제 유전자와 GFP 유전자를 Overlap PCR 방법을 사용하여 결합한 후 상동 재조합 방법을 이용하여 루시페라제-GFP 단편을 pHAGE 벡터에 연결하고, EF1A와 WPRE에 각각 정방향 및 역방향 프라이머를 설계하고, 시퀀싱을 수행하여 벡터 작제가 성공적인지 여부를 결정하였다.

[0158] 2) 루시페라제-함유 표적 세포주의 구축(세포주 표)

[0159] 루시페라제와 GFP를 이용하여 렌티바이러스 벡터를 성공적으로 작제한 후, Lentix-293T로 렌티바이러스를 패키징하고, PEG8000 농축법으로 렌티바이러스 용액을 농축하고, 구배 회석 방법을 사용하여 바이러스 역가를 결정한다. 다음, 표적 세포를 하기 표의 세포주를 포함하지만 이에 국한되지 않는 세포주에 감염시켰다.

명칭	표적	해당하는 암/질병 또는 기능
A431	EGFR	피부암
A549	EGFR	폐암
B16/htEGFR	EGFR	흑색종
HepG2	GPC3	간암
HUH7	GPC3	간암
RAJI	CD19	림프종/백혈병
RAJI-CD19KO	CD19-	림프종/백혈병
RAJI-CD20KO	CD20-	림프종
RAJI-CD22KO	CD22-	림프종

[0160]

[0161]

감염 72시간 후 형광 현미경을 통해 GFP 양성 세포의 존재 여부를 관찰한 후, 흐름 분류기(플로우 소터, flow sorter)를 통해 GFP 양성 세포를 선별하고, 모노클론을 선별하여, 라이브러리를 구축하여 보관하였다. 한편, 루시퍼라제 기질과 표적 세포를 동시-인큐베이션하여, 루시퍼라제의 발현 및 발현량을 검출하였다.

[0162]

3) TCR α /b-녹아웃 Jurkat 세포주의 구축

[0163]

TCR의 구조 및 서열 특성에 기초하여, α 사슬과 β 사슬의 불변 영역에 가이드 서열을 설계하고 TCR α - β -Jurkat 세포주를 구축하였다. TCR의 α 사슬 및 β 사슬의 불변 영역 엑손 서열은 각각 NCBI에서 얻었고, α 사슬 및 β 사슬의 불변 영역의 엑손 1 서열은 tools.genome-engineering.org 웹사이트에 제출하여 가이드 서열을 설계하고, 그 결과에 따라 올리고 서열을 합성하였다. 그런 다음 sgRNA-LentiCRISPR 렌티바이러스 벡터를 작제하고, CRISPR 렌티바이러스 벡터를 BsmBI 제한 효소로 분해하고, 필터 서열을 제거하고, 결합된 말단을 노출시키고, 자가 결합을 줄이기 위해 플라즈미드를 37°C에서 1시간 동안 알칼리성 포스파타제로 처리하였다. 효소 분해를 거친 시스템을 아가로스 겔 전기영동을 하여 겔을 회수하고, 표적 단편의 플라즈미드 골격은 약 11500 bp였으며, 한편 -2000 bp 위치에 컷 필터 밴드가 존재하였다; 합성된 가이드 서열의 올리고 단일 사슬을 시험관 내에서 T4 리가제와 T4 PNK를 사용하여 처리하고, 이중 사슬로 어닐링하고, 결합을 위해 말단에 포스페이트기를 첨가하고; 어닐링된 이중-사슬 가이드 서열을 물로 200배 희석하여 BsmBI 효소 분해를 거친 LentiCRISPR과 연결하여 Stb13 대장균(*Escherichia coli*)으로 형질전환시키고, 바이러스 코팅 감염을 위해 플라즈미드를 추출하였다. α 사슬의 가이드 서열은 LentiCRISPR-puro에 연결하였고, β 사슬의 가이드 서열은 LentiCRISPR-BSD에 연결하였다. sgRNA-LentiCRISPR 렌티바이러스의 패키징 및 농축은 HEK-293T를 미리 10 cm 디쉬에 스프레딩하고, 세포가 80%-90%까지 성장했을 때 형질감염 시스템을 준비하고, 형질감염 시스템을 HEK-293T에 첨가하고, 배양을 위해 세포를 다시 37°C 인큐베이터에 넣고, 시간을 0시간으로 기록하고; 형질감염 후 12시간 후, 신선한 10% FBS-DMEM으로 변경하고; 형질감염 48시간 및 72시간 후 바이러스 수집하고; 바이러스-함유 배양 배지를 원심분리 및 여과하고, 균일하게 혼합되도록 PEG8000을 첨가하고, 4°C에서 12시간 이상 정치하고, 3500 rpm에서 30분 동안 원심분리하고; 상청액을 버리고, 적절한 부피의 배양 배지로 재현탁 침전을 수행하고; 및 -80 냉동보존을 수행하거나, 또는 직접 사용을 수행하는 단계를 포함한다. Jurkat T 세포 감염, 약물 사멸 스크리닝 및 모노클로날 세포주 식별은 다음의 단계로 구성되었다: Jurkat T 세포를 12-웰 또는 24-웰 플레이트에 접종하였고; 세포 밀도가 너무 커지지 않도록 하였고; 적절한 부피의 α 사슬과 β 사슬의 sgRNA-LentiCRISPR 바이러스를 동시에 첨가하였고, 폴리브렌(1:1000의 총 부피에 따라 첨가)을 첨가하여 균일하게 혼합하였고; 1000 rpm에서 원심분리 감염을 수행하였고, 32°C 원심분리를 90분 동안 수행하였고, 세포를 꺼내 37°C 인큐베이터에 넣고, 시간을 0시간으로 기록하였다; 용액을 10-12시간 후에 변경하였고; 48시간 후, 퓨로마이신과 블라스티시딘(Blasticidin)을 적절한 최종 농도로 첨가하였고, 약물 사멸 48시간 후에, 감염되지 않은 대조군의 모든 세포가 사멸하였다. 살아남은 세포를 빨아내고, 원심분리 후 완전 배양 배지로 배양하여 TCR α - β -Jurkat 세포 라이브러리를 수득하였고; TCR α - β -Jurkat 세포 라이브러리의 단세포를 flow type Aria를 사용하여 96-웰 플레이트에 분류하였고, 2주간 배양하였고, 성장한 단일 세포를 흡입하였고, 확대 배양을 수행하였다; TCR α 사슬과 TCR β 사슬의 항체를 이용하여 모노클로날 세포주를 각각 동정하고, 두 사슬이 결손된 세포주를 증폭하여 내인성 TCR이 녹아웃된 Jurkat T 세포주를 수득하였다.

[0164] **실시예 5. T 세포를 형질도입하기 위한 바이러스 시스템의 확립**

[0165] 1) 렌티바이러스 시스템 및 패키징 방법(세대별)

[0166] Lentix-293T 세포를 10 cm 배양 접시에 5×10^5 /mL로 접종하고, 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 배양한 후, 세포 밀도가 약 80%에 도달했을 때(현미경으로 관찰) 형질감염시켰다. 3개의 플라스미드를 PMD2. G: PSPAX: 전달 플라스미드 = 1: 2: 3의 비율로 500 uL의 무혈청 DMEM과 잘 혼합하였다. 54 uL의 PEI-max를 500 uL의 무혈청 DMEM과 잘 혼합하고 실온에서 5분 동안 정치하였다(PEI-Max 대 플라스미드의 부피-대-질량 비율은 3:1이었다). PEI-max 혼합 용액을 플라스미드 혼합 용액에 천천히 첨가하여 균일하게 혼합되도록 약간 불어 휘젓고, 실온에서 15분간 정치하였다. 최종 혼합 용액을 배양 배지에 천천히 첨가하여 충분히 균일하게 혼합한 후, 혼합 용액을 다시 인큐베이터에 넣어 12-16시간 연속 배양하고 6% FBS DMEM 배양 배지에 옮겨 연속적으로 배양하고, 48시간 및 72시간 바이러스 용액을 수집하였다.

[0167] 2) 바이러스 역가 측정 방법

[0168] Jurkat-C5 세포를 평평한 바닥 96-웰 플레이트에 5×10^5 /mL로 접종하고, 10% FBS 및 0.2 uL의 1000×폴리브렌을 함유하는 100 uL의 1640 배양 배지를 각 웰에 첨가하였다. 바이러스 희석시에는, 1640 완전 배양 배지를 이용하여 10배 희석을 수행하였으며, 바이러스가 바이러스 원액(stock solution)인 경우, 첫 번째 웰의 바이러스 양은 100 uL이었고, 바이러스가 농축액인 경우에는, 첫 번째 웰의 바이러스 양은 1 uL이었다; 희석된 세포를 바이러스 웰에 100 uL/웰로 첨가하여 혼합하고, 32°C, 1500 rpm에서 90분간 원심분리를 수행하고, 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양하였다. 96-웰 평평한 바닥 플레이트의 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트로 흡입시키고 4°C, 1800 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 1× PBS 200 uL을 첨가한 후, 4°C에서 1800 rpm으로 5분간 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 4% 조직고정액 200 uL를 첨가하고, 어두운 곳에서 보존을 수행하고, 유세포분석기(flow cytometer)에 로딩하였다. 감염 효율을 유세포 분석기를 이용하여 측정하였으며, 역가 계산 시 감염률이 2%-30%인 웰을 선별하였으며, 계산식은 역가(TU/mL) = $1.5 \times 10^4 \times$ 양성 비율/바이러스 부피(uL)×1000으로 하였다.

[0169] 하기 플라스미드의 바이러스 pHAGE-EF1A-IRES-RFP를 상기 방법으로 패키징하였다; 불변 영역은 다양한 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 및 pHAGE-EF1A-GC33-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 플라스미드로 TCRa/bC-WT(TCRaC-WT 및 TCRbC-WT 포함), TCRa/bC-N.DLT(TCRaC-N.DLT 및 TCRbC-N.DLT 포함), TCRa/bC-C.DLT(TCRaC-C.DLT 및 TCRbC-CDLT 포함), TCRa/bC-N.Rec-1(TCRaC-N.Rec-1 및 TCRbC-N.Rec-1 포함), TCRa/bC-N.Rec-2(TCRaC-N.Rec-2 및 TCRbC-N.Rec-2 포함), TCRa/bC-N.Rec-3(TCRaC-N.Rec-3 및 TCRbC-N.Rec-3 포함), TCRa/bC-N.Rec-4(TCRaC-N.Rec-4 및 TCRbC-N.Rec-4 포함), TCRa/bC-N.rRec(TCRaC-N.rRec 및 TCRbC-N.rRec 포함), TCRa/bC-Cys(TCRaC-Cys 및 TCRbC-Cys 포함), TCRa/bC-TM9(TCRaC-TM9 및 TCRbC-WT 포함), TCRa/bC-Cys-N.Rec-1(TCRaC-Cys-N.Rec-1 및 TCRbC-Cys-N.Rec-1 포함), TCRa/bC-TM9-N.Rec-1(TCRaC-TM9-N.Rec-1 및 TCRbC-N.Rec-1 포함), TCRa/bC-Cys-TM9(TCRaC-Cys-TM9 및 TCRbC-Cys 포함) 및 TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1(TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1 및 TCRbC-Cys-N.Rec-1 포함)이었고; 그리고 상이한 표적의 경우, TCR 불변 영역은 모두 pHAGE-EF1A-334-VL-TCRbC-P2A-VH-TCRaC-IRES-RFP, pHAGE-EF1A-2C6-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-FMC63-VL-(G4S)3-VH-TCRaC-IRES-RFP 및 TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1의 pHAGE-EF1A-M971-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-334-VL-(G4S)3-VH-TCRaC-IRES-RFP, pHAGE-EF1A-334-VL-TCRbC-P2A 및 기타 플라스미드였다.

[0170] **실시예 6. T 세포 배양의 확립 및 감염 방법**

[0171] 1) Jurkat T 세포주의 배양 방법

[0172] Jurkat T 세포주를 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였다. 배양 밀도는 3×10^5 /ml 이었으며 최대 3×10^6 /ml를 넘지 않도록 하였으며, 1-2일마다 계대배양하고, 세포를 계수하고, 필요한 양의 세포를 취하고, 배양 배지를 보충하여 밀도를 조절하고, 세포를 CO₂ 배양 상자에 넣어 배양하였다.

[0173] 2) Jurkat T 세포주의 감염 방법

[0174] 이 방법은 세포를 계수하고, 원심분리 및 액체 교환을 위해 1×10^6 /ml의 세포를 취하고, 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배양 배지 1 ml를 사용하여 재현탁하고, 24-웰 플레이트에 첨가하고, 적당량의 바이러스액을 첨가하

고, 1500 rpm에서 90분 동안 원심분리하고, CO₂ 인큐베이터에서 배양하는 단계를 포함한다. 감염 12시간 후, 액체를 10% FBS가 포함된 신선한 RPMI 1640 배양 배지로 완전히 교체하였고, 72시간 후에 양성물을 검출하였다.

[0175] 3) 인간 1차 T 세포의 배양 방법

[0176] Ficoil 분리 방법으로 1차 T 세포를 수득하고 10% FBS와 100 IU/ml IL-2가 포함된 X-VIVO 배지에서 배양한 후, CD3와 RetroNectin r-피브로넥틴(최종 농도 5 ug/ml)로 미리-코팅된 플레이트에 1×10^6 /ml의 초기 배양 밀도로 첨가하였다. 후기 배양 밀도는 5×10^5 /ml이었고 최대 3×10^6 /ml를 넘지 않도록 하였고, 1-2일마다 계대배양을 수행하였다.

[0177] 4) 인간 1차 T 세포의 감염 방법

[0178] 1차 T 세포를 48시간 배양한 후, 바이러스액을 첨가하여 MOI가 20이 되도록 하고, 1500 rpm에서 90분간 원심분리한 후, 세포를 CO₂ 인큐베이터에 넣어 배양하였다. 감염 24시간 후, 10% FBS와 100 IU/ml IL-2를 함유하는 X-VIVO 배양 배지를 보충하고, 웰 전달(well transferring)을 수행하고, 72시간 후 태그 단백질 또는 항체를 통해 감염 효율을 확인하였다.

[0179] 5) 감염 효율 검출 방법

[0180] 감염 72시간 후에 세포를 균일하게 불어서 계수하고, 5×10^5 /ml를 취하여 원심분리하고, 상청액을 버리고, 염색 용액은 PBS + 2% FBS + 2 mM EDTA이었으며, 인큐베이션을 위해 해당 항체를 첨가하고, 인큐베이션을 30분 동안 수행한 다음, PBS를 첨가하여 2회 세척하고, 검출을 위해 로딩을 수행하였다.

[0181] **실시예 7. T 세포에서 STAR 및 이의 돌연변이체의 발현 검출 방법**

[0182] 유전자 형질전환에 의한 T 세포 형질전환 과정에서, 표적 유전자의 발현, 막 로딩 및 세포 표면의 분포는 T 세포의 기능에 영향을 미치므로, 형광 단백질을 통해 바이러스 감염 효율을 검출하였고, myc 항체를 STAR의 N-말단에 연결하여 유동 항체를 통해 STAR의 막 로딩 효율을 검출하였다. STAR의 구조는 TCR에서 유래하기 때문에, STAR가 내인성 TCR과 미스페어링하였는지 여부는 온전한 STAR의 발현 풍부도에 영향을 미치며, RFP 양성 비율과 STAR myc 양성 비율을 비교하여 미스페어링 효율을 평가하였다.

[0183] 1) STAR 막 로딩 효율 검출

[0184] 작제된 pHAGE-EF1A-myc-STAR-IRES-RFP 플라스미드를 Lentix-293T에 의해 바이러스 패키징하고, 바이러스 농도 및 역가 검출을 수행한 다음, Jurkat C5 및 1차 T 세포를 감염시키고, 감염 72시간 후, 감염된 세포를 수집하여 FITC-항-myc 항체와 APC-항-mTCR-β 항체로 염색하고, 유세포 분석기(BD Fortessa)를 사용하여 유동 RFP/FITC/APC 형광 채널을 검출하였다. FITC 또는 APC가 명백한 양성 세포 집단을 갖는다면 STAR 막 로딩 발현이 수행될 수 있고, FITC와 APC가 모두 발현되지 않으면 STAR가 막 로딩을 실현하지 못한다는 것을 나타내었다.

[0185] 2) STAR가 내인성 TCR과 미스페어링될 확률 평가

[0186] 작제된 pHAGE-EF1A-myc-STAR-IRES-RFP 플라스미드를 Lentix-293T에 의해 바이러스 패키징하고, 바이러스 농도 및 역가 검출을 수행한 다음, Jurkat 및 1차 T 세포를 감염시키고, 감염된 세포를 감염 72시간 후에 수집하여, FITC-항-myc 항체와 APC-항-mTCR-β 항체를 이용하여 염색을 수행하고, 유세포 분석기(BD Fortessa f4)를 사용하여 유동 RFP/FITC/APC 형광 채널을 검출하였다. RFP 양성률과 FITC 또는 APC 양성률 간의 차이를 검출하였다.

[0187] **실시예 8. T 세포에서 STAR 및 이의 돌연변이체의 시험관내 수준의 기능적 검출 방법**

[0188] 1) T 세포와 표적 세포의 시험관 내 공동-배양 방법

[0189] T 세포는 T 세포주 Jurkat C5를 포함하고, Jurkat 및 1차 세포주는 현탁 세포이며, 표적 세포는 상이한 항원 및 세포주에 따라 현탁 세포 및 부착 세포로 나눌 수 있으며, RAJI 등과 같은 현탁 표적 세포를 T 세포와 공동-인큐베이션하였고, RAJI와 같은 현탁 표적 세포와 T 세포를 공동-배양하였다면, 해당 개수의 세포를 동시에 취하고, 세포를 원심 배양을 위해 표적 세포 배양 배지와 균일하게 혼합하였고; 세포가 부착성 표적 세포인 경우, 표적 세포는 하루 전에 미리 접종되어야 하고, 그 다음 특정 수의 T 세포가 첨가되며, 여기서 상기 방법은 다음의 특정 단계를 포함한다: 패키징 및 정제된 STAR 바이러스를 사용하여 T 세포주 또는 1차 T 세포를 감염시키고, 공동-배양하기 1일 전에 감염 효율에 대한 유동형 검출을 수행하고, 일반적으로 10:1, 5:1 및 1:1의 비율을 사용하여 표적 세포에 대한 기능성 세포의 비율을 결정하고, 감염 효율에 따른 총 T 세포 수를 계산

하였으며, 이때 표적 세포의 사용량은 일반적으로 4E5/웰(24-웰 플레이트)이었다.

[0190] 2) 표적 항원에 의한 T 세포의 자극 방법

[0191] 적용 대상은 일반적으로 세포 표면 단백질이고, 항원은 T 세포의 기능을 검출하기 위해 T 세포의 활성화에 직접 사용될 수 있으며, 전형적으로 300 마이크로리터의 5 µg/ml 항원(1*코팅 완충액 희석, 24-웰 플레이트를 예로 들면)을 사용하여 웰 플레이트를 밤새 코팅한 다음, 항원을 버리고, 1E6/웰의 양성 T 세포를 첨가하고, T 세포의 기능을 검출하기 위해 6, 12 및 24시간의 원심 활성화 후 T 세포를 수집하였다.

[0192] 3) T 세포의 분비 사이토카인 분석: ELISA

[0193] T 세포는 T 세포가 표적 세포를 죽이거나 T 세포 자체의 증식을 촉진하는 것을 돕기 위해 활성화 과정에서 많은 수의 사이토카인(일반적인 예로는 TNF-α, IFN-γ 및 IL-2 포함)을 방출할 수 있다. 표적 세포 또는 항원에 의해 자극시킨 후, T 세포를 수집 및 원심분리하고, 상청액을 취하였다. TNF-α, IFN-γ 및 IL-2 ELISA 키트는 각각 인간 IL-2 코팅되지 않은 ELISA, 인간 TNF-α 코팅되지 않은 ELISA 및 인간 IFN-γ 코팅되지 않은 ELISA(제품 번호 88-7025, 88-7346, 88-7316 포함)를 사용하였다. 구체적인 단계는 다음과 같다: 10X 코팅 완충액을 ddH2O로 1X로 희석하고, 코팅 항체(250X)를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음, 혼합물을 96-웰 플레이트(ELISA를 위해 특별히)에 웰 당 100 µl로 첨가하였다. 4°C에서 밤새 정치하기 위해 방부 필름으로 밀봉한 후, 96-웰 플레이트를 1X PBST(세척 완충액이라고도 함, 0.05% Tween 20을 1X PBS에 첨가)로 각 회에 웰 당 260 µl로 3회 세척하고; 5X ELISA/ELISPOT 희석제를 ddH2O로 1X로 희석하고; 생성물을 웰 당 200 µl로 96-웰 플레이트에 첨가하고; 96-웰 플레이트를 실온에서 1시간 동안 정치하기 위해 그대로 두었다. 96-웰 플레이트를 PBST로 1회 세척하고 희석하여 표준 곡선(각각 2-250, 4-500 및 4-500 범위)을 획득하고; 샘플을 1X 희석제로 20-50배로 희석하였다. 샘플 및 표준 곡선을 웰 당 100 µl 및 2개의 다중 기공(multiple pore)으로 첨가하고; 상온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 96-웰 플레이트를 PBST로 3회 세척하고; 1X 희석제로 희석한 검출 항체를 첨가하여 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 96-웰 플레이트를 PBST로 3회 세척하고; 그런 다음 1X 희석제로 희석한 HRP를 첨가하여 30분 동안 인큐베이션한 후, 96-웰 플레이트를 6회 세척하고; TMB를 첨가하여 현상 시간이 15분을 초과하지 않게 현상하고; 2N H₂SO₄를 첨가하여 현상을 종료하고; 450 nm에서 광흡수를 수행하여 광흡수를 검출하였다.

[0194] 4) T 세포의 사멸 기능 검증: 루시퍼라제 검출

[0195] 24시간 동안 공동-배양한 후, 세포 현탁액을 균일하게 약간 불어서, 각 웰로부터 150 µL의 세포 현탁액을 취하여 흰색 96-웰 플레이트에 첨가하고; 각 웰로부터 2개의 다중 기공을 선택하고; 루시퍼라제 기질(프로메가)을 첨가하였다. 10분 동안 공동-인큐베이션을 위해 진동(저속에서)을 수행하고; 그런 다음 다중모드 판독기를 사용하여 100으로 고정된 게인(gain)으로 화학발광 값을 검출하였다. 세포 사멸 계산: 사멸 효율 = 100% - (이펙터 세포 - 표적화 세포 웰 값/대조군 세포 - 표적화 세포 웰 값).

[0196] 실시예 9. 동물 종양 모델 수준에서 T 세포에서 STAR 수용체 및 이의 돌연변이체의 기능을 검출하는 방법

[0197] 1) 실험 동물 모델

[0198] 이 실험은 NSG 면역결핍 마우스를 모델로 사용하였다. 마우스는 유전자형이 NOD-Prkdc^{em26}I12rg^{em26}/Nju이고, T 세포, B 세포 및 NK 세포가 결핍되어 있으며; 마우스의 대식세포와 수지상 세포도 결함을 가지고 있다. NSG 마우스는 가장 완전한 면역결핍증이 있는 마우스 계통에 속하며 이식 종양 및 T 세포에 대한 거부 반응 없이 T 세포 치료에 대한 전임상 연구에 널리 적용된다. 이 실험에서는, 6-8주령 암컷 NSG 마우스를 사용하였고; 각 배치의 실험에서 마우스 간의 체중 차이는 2 g 이내로 제어되었다. 마우스는 특정 병원균이 없는(specific pathogen free, SPF) 청정 등급 장벽에 있는 개별적으로 환기되는 케이지에서 급식하였으며 병원체 오염을 방지하기 위해 정상 식이와 약산성 pH의 식수를 먹였다.

[0199] 2) 종양 모델의 확립

[0200] 본 발명은 STAR-T 세포의 기능을 검증하기 위해 다양한 종양 모델을 사용했고 STAR-T 세포의 효과의 보편성이 검증되었다. 혈액학적 종양 모델 구축에서, 이 실험은 이종이식을 위해 인간 Burkitt 림프종 세포주의 Raji 세포를 사용하였다. Raji 세포는 켈티바이러스 백터를 통해 루시퍼라제 유전자를 발현시키기 위한 세포주로, 루시페린의 화학발광 및 생체 이미징(living imaging) 모드에서 마우스에서 Raji 종양의 발달 및 변화를 실시간으로 모니터링한다. 모델에서, 다양한 용량(일반적으로 약 1-3×10⁶ 세포)의 Raji-루시퍼라제 세포를 꼬리 정맥 재주

입을 통해 6-8주령 암컷 NSG 마우스에 접종하였다. 3일 후, 마우스에 루시페린 칼륨염 용액을 복강내 주사하고, 생체내 종양 세포의 형광 신호를 생체 이미징 모드에서 검출하였다. Raji 세포는 마우스에서 빠르게 성장하여 혈액을 통해 몸 전체에 분포되어, 특정 장기를 감염시킬 가능성을 가지고, 고형 종양을 형성하고, 마우스의 체중 감소 등의 증상을 유발한다; 치료적 처리를 하지 않는 경우, Raji 종양 부담은 약 30-40일 후에 마우스의 죽음을 초래할 것이다.

[0201] 고형 종양 이종이식 모델의 구축에서, 이 실험은 인간 표피양(epidermoid) 암종 A431 세포주, 인간 비소세포 폐암 A549 세포주, 인간 간암 Huh-7 및 HepG2, 인간 신경교종 U87 및 U251 세포주 및 인간 유방암 MDA-MB-231 세포주를 포함한 다양한 종양 유형을 선택하였다. 이들 세포는 렌티바이러스 벡터를 통해 루시페라제 유전자를 발현하고, 루시페린의 화학발광 및 생체 이미징 모드에서 마우스의 종양 발달 및 변화를 실시간으로 모니터링한다. 모델에서, 서로 다른 용량(악성도 및 종양의 다른 특성에 따라 2×10^5 내지 3×10^6 의 범위)의 세포를 마트리겔과 혼합한 후, 혼합물을 마우스에 피하 주사를 통해 피하 접종하였다. 3일 후, 마우스에 루시페린 칼륨염 용액을 복강내 주사하였고, 생체 내 종양 세포의 형광 신호를 생체 이미징 모드에서 검출할 수 있었다. 피하 접종된 고형 종양은 일반적으로 침습성이 없고, 전이가 어렵고, 피하로 제자리에서 조밀한 종양 덩어리를 형성하는 것이 일반적이다. 각 종양 덩어리의 길이, 너비 및 높이를 버니어 캘리퍼스(vernier caliper)로 측정하였고, 각 종양의 크기를 통해 종양 진행을 추가로 모니터링할 수 있었다. 치료적 처리를 하지 않는 경우, 이들 고형 종양 세포에 의해 형성되는 종양 덩어리는 약 20-40일 후에 동물복지윤리 기준의 규격에 도달하게 되는데, 즉, 각 종양 덩어리의 최대 크기가 15 mm를 초과할 때, 각 종양 덩어리의 크기가 1500 mm³를 초과하면, 피하 종양 영역에 궤양이 형성되었거나, 또는 종양이 마우스의 활동 및 섭식에 크게 영향을 미치게 되었고, 동물을 안락사시켜야 한다.

[0202] 3) 동물 실험을 위한 조작 방법

[0203] 마우스를 실험 동물로 조작하는 방법은 포획, 고정, 넘버링, 마취, 제모, 투여, 채혈, 처형 및 절개를 포함하며, 여기서 본 실험에서, 사용되는 넘버링 방법은 발가락 자르기, 귀 마킹 및 털색 마킹 방법을 포함한다. 이 실험에서, 사용된 마취 방법은 이소플루란의 흡입 마취 및 아베르틴 또는 펜토바르비탈의 주사 마취를 포함한다. 제모 방법은 다음을 포함한다: 마우스의 국소 부위를 가위 또는 면도기로 제모하였다. 투여 방법은 복강내 주사, 꼬리 정맥 주사, 피하 주사, 안와후 정맥 신경총 주사(postorbital venous plexus injection), 두개내 주사 등을 포함한다. 채혈 방법은 안와 채혈, 안구 추출을 통한 채혈, 꼬리 정맥 채혈 등을 포함한다. 처형 방법은 목을 뽑는 처형, 이산화탄소를 이용한 처형 등을 포함한다. 모든 작업은 실험 동물 연구 및 사용 계획(동물 프로토콜)의 승인 후 수행되었다.

[0204] 4) 종양 성장의 모니터링 수단

[0205] 이 실험은 주로 두 가지 수단을 통해 종양 성장을 검출한다. 첫 번째는 생체 내 형광 이미징 방법이다: 루시페라제 유전자를 가진 종양 세포를 동물에 주입하여 집락화하였다. 마우스에 루시페린 칼륨염 용액을 복강내 주사하였고, 효소의 작용하에 기질이 특정 파장의 빛을 방출하였고, 생체내 종양 세포의 형광 신호를 생체이미징 기기에 민감한 CCD 장비로 검출하였다. 또한, 전문 소프트웨어를 사용하여 형광 신호를 정량적으로 분석하고 열화상을 그려, 종양 성장을 직관적이고 정량적으로 반영할 수 있다. 두 번째 방법은 피하 종양의 크기를 측정하는 방법이며; 각 종양의 길이, 너비 및 높이를 버니어 캘리퍼스로 측정하고, 각 부피 값을 특정 계산 공식을 통해 풀어내었다. 일반적인 계산 공식은 다음을 포함한다: 부피=길이×너비×높이; 부피=3×길이×너비×높이 등.

[0206] 5) 동물에서 T 세포의 생존력 및 증식의 검출 방법

[0207] 체내에서 T 세포의 생존력 및 증식 상태는 T 세포의 최종 항-종양 효과와 직접적으로 연결된다. 동물에서 T 세포의 생존력 및 증식 상태를 검출하기 위해, 본 실험에서는, 마우스로부터 정기적으로 혈액을 채취하고, 말초 혈액에서 STAR-T 세포의 비율, 세포 상태 및 세포 분류를 분석하였다. 구체적인 작업은 다음과 같다: 대략 1주일에 한 번, 마우스를 이소플루란으로 마취하고 약 100 μl의 양으로 안와 채혈을 실시하였다. 혈액 샘플에 대해 항응고, 혈장 수집, 적혈구 용해 등의 작업을 수행한 후, 나머지 세포를 유동 염색하여 CD4 대 CD8의 비율 및 CCR7, CD45RA, PD-1, LAG-3, TIM-3 등의 분자를 검출하여 T 세포 서브세트에 대한 분석 및 세포 상태에 대한 분석을 수행하였다. 한편, 유세포 분석기와 디지털 PCR로 계수하는 방법을 통해, 각 마우스의 말초 혈액 내 STAR-T 세포의 절대량 값을 구하였다. 또한, 실험의 종료 시에, 마우스를 해부할 수 있었고, 마우스의 다른 면역 기관에 있는 T 세포의 비율을 검출하였다.

- [0208] 6) 동물에서 T 세포의 안전성 평가 방법
- [0209] STAR-T 세포의 세포독성과 안전성을 평가하기 위해, 세포가 실험 동물에게 부작용을 일으켰는지 여부를 검출할 수 있다. 마우스의 행동 상태를 관찰하고, 마우스에 대한 병리학적 분석을 수행하고, 분석 및 기타 모드를 위해 마우스의 중요한 장기를 슬라이스함으로써, 재주입된 T 세포가 유의한 세포독성을 가졌는지 여부를 평가할 수 있었다. 한편, 마우스의 비-종양 조직에 대한 T 세포 침윤 분석을 통해, T 세포가 비종양 조직에 대해 표적-외사멸 효과가 있었는지 여부를 추가로 판단할 수 있었다. 또한, 각 마우스의 혈액에서 사이토카인(예컨대 IL-2, IFN- γ , TNF α 또는 IL-6)의 수준을 검출함으로써, T 세포가 전신성(systemic) 사이토카인 폭풍을 유발하는지 여부를 판단할 수 있었다.
- [0210] 7) T 세포의 종양 침윤능의 평가 방법
- [0211] 종양에 침투하는 T 세포의 능력은 고형 종양에 도전하는 핵심 능력이다. T 세포의 침투 능력을 검출하기 위해, 먼저 종양 조직을 분리, 분해 및 분쇄하여 단일 세포를 얻을 수 있었고, 종양 조직에서 T 세포의 비율을 유동 염색을 통해 검출할 수 있었다. 한편, 종양 세포, 종양 기질 세포 및 면역 세포는 밀도 구배 원심분리 방법(예컨대 Percoll 구배 및 Ficoll 구배)을 통해 종양 현탁액으로부터 추가로 분리하여, 정제된 종양 침윤 T 세포를 수득할 수 있으며; 정제된 종양 침윤 T 세포의 특성(케모카인 수용체 발현 및 T 세포 소진 정도 포함)을 시퀀싱 등의 방법을 사용하여 상세하게 분석하였다.
- [0212] **실시예 10. 항-EGFR STAR 수용체의 작제 및 불변 영역 변형의 확인**
- [0213] 10.1. 항-EGFR STAR 수용체의 작제
- [0214] (1) EGFR을 표적으로 하는 항체의 서열 결정
- [0215] 항체 중쇄 가변 영역(항-EGFR Cetux-VH, 서열번호 22) 및 항체 경쇄 가변 영역(항-EGFR Cetux-VL, 서열번호 23)은 세특시맵(Cetuximab)(줄여서 Cetux)을 선택하였다. 코돈을 최적화하여 서열을 합성하였다.
- [0216] (2) EGFR을 표적으로 하는 STAR의 설계
- [0217] STAR는 2개의 폴리펩티드 사슬을 함유하였고; 항-EGFR Cetux-VL을 마우스 TCRbC-WT 사슬에 융합하여 제1 폴리펩티드 절편을 형성하고; 항-EGFR Cetux-VH를 마우스 TCRAc-WT 사슬에 융합하여 제2 폴리펩티드 절편을 형성하였다. 두 사슬 모두 GM-CSF 신호 펩티드를 사용하였다. STAR의 유전자 서열을 푸린(Furin)-SGSG-p2A 프로테아제 절단 부위에서 폴리펩티드 절편을 통해 연결하였고; 두 개의 폴리펩티드 사슬이 함께 전사, 번역 및 단백질로 발현될 것이다; 그런 다음, 단백질을 푸린 및 p2A에 해당하는 프로테아제에 의해 절단하여 두 개의 독립적인 단백질 사슬을 형성하였다. 두 개의 단백질 사슬과 T 세포의 내인성 CD3 서브유닛(ϵ , δ , γ , ζ)이 복합체를 형성하였고; GM-CSF 신호 펩티드의 가이드 하에, 복합체가 세포막 상으로 전달되고 제시되었다(도 1에 나타낸 바와 같음).
- [0218] (3) 유전자 단편의 클로닝 및 어셈블리
- [0219] 유전자 합성 및 클로닝의 모드를 통해, "항-EGFR Cetux-VL", "마우스 TCRbC-WT", "항-EGFR Cetux-VH" 및 "마우스 TCRAc-WT"의 4개 단편을 수득하였다. 각 프라이머 쌍은 앞의 염기 및 다음 염기와 상동인 25 bp 염기를 가졌다; 4개의 단편을 깃슨 어셈블리(Gibson Assembly) 방법을 통해 추가로 재조합한 다음 렌티바이러스 벡터 pHAGE에 연결하고; 따라서 STAR를 수득하였다.
- [0220] (4) 벡터 형질전환 및 시퀀싱
- [0221] 깃슨 어셈블리의 생성물을 DH5 α 균주에 형질전환시키고 암피실린이 포함된 LB 플레이트에서 밤새 성장시켰다. 시퀀싱을 위해 모노클로날 박테리아를 선택하였고, 시퀀싱 프라이머는 pHAGE 벡터에서 프라이머 seq-pHAGE-F 및 seq-pHAGE-R을 선택하였다.
- [0222] (5) 플라스미드 추출
- [0223] 정확하게 시퀀싱된 박테리아를 LB 액체 배지에 접종하여 밤새 배양하였다. 엔도톡신 제거 기능이 있는 키트를 사용하여 플라스미드를 추출하였다. Nanodrop으로 플라스미드의 농도를 측정된 결과, 플라스미드의 최종 농도는 약 1000 ng/ μ l였으며, A260/A280 값은 1.8 이상이였다. 따라서, 마우스 TCRA/bC-WT의 불변 영역을 갖고 EGFR을 표적으로 하는 STAR 플라스미드 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRAc-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP를 수득하였다.
- [0224] 유사하게, TCRA/bC-N.DLT(TCRAc-N.DLT 및 TCRbC-N.DLT 포함), TCRA/bC-C.DLT(TCRAc-C.DLT 및 TCRbC-CDLT

포함), TCRA/bC-N.Rec-1(TCRAc-N.Rec-1 및 TCRbC-N.Rec-1 포함), TCRA/bC-N.Rec-2(TCRAc-N.Rec-2 및 TCRbC-N.Rec-2 포함), TCRA/bC-N.Rec-3(TCRAc-N.Rec-3 및 TCRbC-N.Rec-3 포함), TCRA/bC-N.Rec-4(TCRAc-N.Rec-4 및 TCRbC-N.Rec-4 포함), TCRA/bC-N.rRec(TCRAc-N.rRec 및 TCRbC-N.rRec 포함), TCRA/bC-Cys(TCRAc-Cys 및 TCRbC-Cys 포함), TCRA/bC-TM9(TCRAc-TM9 및 TCRbC-WT 포함), TCRA/bC-Cys-N.Rec-1(TCRAc-Cys-N.Rec-1 및 TCRbC-Cys-N.Rec-1 포함), TCRA/bC-TM9-N.Rec-1(TCRAc-TM9-N.Rec-1 및 TCRbC-N.Rec-1 포함), TCRA/bC-Cys-TM9(TCRAc-Cys-TM9 및 TCRbC-Cys 포함), TCRA/bC-Cys-TM9-N.Rec-1(TCRAc-Cys-TM9-N.Rec-1 및 TCRbC-Cys-N.Rec-1 포함)인 불변 영역을 갖는 다양한 플라스미드 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRAc-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP를 작제하였다.

[0225] 상기 플라스미드를 바이러스에 패키징하고, 세포를 바이러스로 감염시키고, STAR의 막 형성 효율을 검출하였다. 결과를 도 6에 나타내었다.

[0226] 10.2. 항-EGFR STAR 수용체의 불변 영역에 대한 N-말단 변형 및 재배열된 돌연변이체의 기능

[0227] 1) STAR의 불변 영역의 N 말단에 있는 특정 서열을 결실시켜 STAR가 기능을 상실하도록 하였다.

[0228] phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 TCRA/bC-N.DLT STAR 및 마우스 TCRA/bC-WT STAR 벡터를 깃슨 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 마우스 TCRA/bC-N.DLT STAR의 바이러스 패키징 효율이 마우스 TCRA/bC-WT STAR의 바이러스 패키징 효율보다 우수함을 보여준다. Jurkat C5 및 1차 T 세포를 동일한 MOI(감염다중도, multiplicity of infection)에 적용하였고, 감염 효율에 큰 차이가 없는 것으로 밝혀졌다. 1차 T 세포의 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-N.DLT의 막을 형성할 수 없다. 표적 세포 A431, B16-tEGFR 및 A549와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-N.DLT는 사멸 능력이 없고 EGFR 항원에 의해 자극된 후 사이토카인 IL-2, TNF α 및 IFN γ를 분비하지 않았다.

[0229] 2) STAR의 불변 영역의 C 말단의 재배열은 STAR가 기능을 상실하도록 만들었다.

[0230] phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 TCRA/bC-C.DLT STAR 벡터를 깃슨 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. Jurkat C5 및 1차 T 세포를 감염시켰고; 1차 T 세포에서 웨스턴 블로팅, RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-C.DLT는 단백질 발현을 갖지만 막 형성에는 적용될 수 없었다; 이것은 마우스 TCRA/bC-C.DLT로부터 삭제된 서열이 STAR 기능의 핵심이며 STAR의 재배열은 무작위가 아니라는 것을 명시하는 것이다.

[0231] 3) STAR의 불변 영역의 N-말단의 재배열이 중요한 역할을 하였다.

[0232] phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-1 STAR, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-2 STAR, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-3 STAR, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-4 STAR 및 마우스 TCRA/bC-WT STAR 벡터를 깃슨 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 바이러스 역가에 명백한 차이가 없음을 보여준다. Jurkat C5 및 일차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포의 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-WT STAR와 비교하여, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-1은 내인성 TCR과의 미스매칭(mismatching) 측면에서 미스매칭 비율이 더 낮았다. 표적 세포 A431, B16-tEGFR 및

A549와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-1은 마우스 TCRA/bC-WT STAR보다 더 강력한 표적 세포 사멸 능력을 가진다. 서열 분석은 마우스 TCRA/bC-N.Rec-1이 마우스 TCRA/bC-WT STAR보다 서열 인자원에서 더 높다는 것을 보여준다. 면역원성 예측 분석은 마우스 TCRA/bC-N.Rec가 마우스 TCRA/bC-WT STAR보다 면역원성이 더 낮다는 것을 보여준다. 한편, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-2 STAR, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-3 STAR 및 마우스 TCRA/bC-N.Rec-4 STAR의 결실은 STAR가 기능을 상실하게 만들었다.

[0233] 4) STAR의 불변 영역의 N 말단의 재배열은 서열 특이성을 가지며, 다른 재배열 모드는 유효하지 않다.

[0234] phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-1 STAR 및 마우스 TCRA/bC-N.rRec STAR 벡터를 깃슨 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 바이러스 역가에 명백한 차이가 없음을 보여준다. Jurkat C5와 1차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포의 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-N.Rec-1과 비교하여, 마우스 TCRA/bC-N.rRec는 미스매칭 비율이 크게 증가하였다. 표적 세포 A431, B16-tEGFR 및 A549와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-N.rRec의 사멸 기능은 거의 상실되었고 마우스 TCRA/bC-N.Rec STAR의 기능보다 훨씬 열악하였다.

[0235] 10.3. 항-EGFR STAR 수용체의 시스템인 점 돌연변이의 돌연변이체의 기능

[0236] STAR 수용체의 시스템인 점 돌연변이로, 추가적인 이황화 결합이 추가되어 매칭을 강화하고 복합체를 안정화시키는 효과를 발휘할 수 있다. phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 TCRA/bC-Cys STAR 및 마우스 TCRA/bC-WT STAR 벡터를 깃슨 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 바이러스 역가에 명백한 차이가 없음을 보여준다. Jurkat C5 및 일차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포의 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-WT와 비교하여, 마우스 TCRA/bC-Cys는 내인성 TCR과의 미스매칭 측면에서 미스매칭 비율이 현저히 낮았다. 표적 세포 A431, B16-tEGFR 및 A549와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-Cys는 마우스 TCRA/bC-WT보다 더 강력한 표적 세포 사멸 능력을 가진다. 마우스 TCRA/bC-Cys는 EGFR 항원에 의해 자극된 후 사이토카인 IL-2, TNF α 및 IFN γ의 분비 수준이 더 높았다.

[0237] 10.4. 항-EGFR STAR 수용체의 막관통 영역의 특정 부위에서 소수성 아미노산 치환을 수행하는 것의 기능

[0238] 특정 부위에서 STAR 수용체의 막관통 영역 상의 소수성 아미노산 치환이 핵심적인 역할을 한다. STAR 수용체의 시스템인 점 돌연변이로, 추가적인 이황화 결합이 추가되어 매칭을 강화하고 복합체를 안정화시키는 효과를 발휘할 수 있다. phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 TCRA/bC-TM9 STAR 및 마우스 TCRA/bC-WT STAR 벡터를 깃슨 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 바이러스 역가에 명백한 차이가 없음을 보여준다. Jurkat C5 및 일차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포의 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-WT와 비교하여, 마우스 TCRA/bC-TM9는 내인성 TCR과의 미스매칭 측면에서 미스매칭 비율이 현저히 낮았다. 표적 세포 A431, B16-tEGFR 및 A549와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 TCRA/bC-TM9는 마우스 TCRA/bC-WT보다 더 강력한 표적 세포 사멸 능력을 가진다. 마우스 TCRA/bC-Cys는 EGFR 항원에 의해 자극된 후 사이토카인 IL-2, TNF α 및 IFN γ

의 분비 수준이 더 높았다.

[0239]

10.5. 항-EGFR STAR의 포괄적 돌연변이체의 기능

[0240]

불변 영역의 변형 전략(N-말단 변형, Cys 치환 및 막관통 영역 소수성 변형)의 삼중 조합, 한 쌍 조합 및 단일 변형의 효과를 비교하기 위해, phge-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 하기 표에 있는 모든 STAR 벡터를 깊은 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. Jurkat C5와 1차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, T 세포를 동일한 MOI로 감염시킨 후, 감염 효율(즉, RFP 양성률)에 큰 차이가 없었다. RFP 및 EGFR-his-APC 항체 염색으로부터 발견된 바, 한 쌍의 돌연변이 조합의 미스매칭 비율은 단일 돌연변이 전략의 미스매칭 비율보다 현저히 낮았다. 동일한 RFP 양성 세포의 경우, 한 쌍 돌연변이의 STAR-T 세포의 표적 세포 A431, B16-htEGFR 및 A549에 대한 사멸 능력은 단일 돌연변이 전략의 사멸 능력보다 유의하게 더 높았고; 사이토카인 IL-2, TNF α 및 IFN γ의 분비 수준은 더 높다. 그러나, 3가지 돌연변이 전략을 동시에 함께 조합하는 경우, 가장 낮은 미스매칭 비율, 동시에 표적 세포에 대한 더 강한 사멸 능력 및 더 높은 사이토카인 분비 수준을 나타낸다. 전체 결과를 도 6에 나타내었다.

[0241]

[0242]

실시예 11. 항-GPC3 STAR 수용체의 불변 영역에 대한 N-말단 변형 및 재배열된 돌연변이체의 기능

[0243]

구현예 1의 돌연변이 전략에 기초하여, 본 발명은 불변 영역에 대한 서열 절단, 재배열 및 C-말단 재배열과 같은 최적화 솔루션을 수행하였다. GPC3의 경우, 항체 서열은 GPC3을 목표로 하는 모노클로날 항체 GC33을 선택하고; 항체 중쇄 가변 영역(항-GPC3 GC33-VH, 서열번호 25) 및 항체 경쇄 가변 영역(항-GPC3 GC33-VL, 서열번호 24)은 phage-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하였다; 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.DLT STAR, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-C.DLT STAR, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1 STAR, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-2 STAR, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-3 STAR, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-4 STAR, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 등의 벡터를 깊은 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다. 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과를 도 7에 나타내었다.

[0244]

1) STAR의 불변 영역의 N 말단에서 특정 서열의 절단은 STAR가 기능을 상실하게 만들었다.

[0245]

결과는 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.DLT STAR 및 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR를 보여준다. Jurkat C5 및 일차 T 세포를 동일한 MOI에 적용하였으며, 감염 효율에는 큰 차이가 없음을 발견하였다. 1

차 T 세포의 RFP 및 GPC3-FITC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.DLT의 막을 형성할 수 없다. 표적 세포인 Huh-7 및 HepG2 세포와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.DLT는 사멸 능력을 가지고 있지 않다.

[0246] 2) STAR의 불변 영역의 C 말단의 재배열은 STAR가 기능을 상실하게 만들었다.

[0247] Jurkat C5 및 1차 T 세포를 감염시켰다; 1차 T 세포에서 웨스턴 블로팅, RFP 및 GPC3-FITC 염색에서 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-C.DLT는 막 형성에는 적용될 수 없었고; 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-C.DLT로부터 결실된 서열이 STAR의 기능에 대한 핵심이고 STAR의 재배열이 무작위가 아니라는 것이 언급되었다. 표적 세포 Huh-7 및 HepG2 세포와의 공동-배양에서 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-C.DLT는 사멸 기능을 가지고 있지 않다.

[0248] 3) STAR의 불변 영역의 N-말단의 재배열이 중요한 역할을 하였다.

[0249] Jurkat C5와 1차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포에서 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT STAR와 비교하여, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1은 내인성 TCR과의 미스매칭 측면에서 미스매칭 비율이 더 낮았다. 표적 세포 Huh-7 및 HepG2 세포와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1은 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT STAR 보다 더 강력한 표적 세포 사멸 능력을 가진다. 서열 분석은 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1이 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT STAR보다 서열 인간 기원에서 더 높다는 것을 보여준다. 면역원성 예측 분석은 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec가 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT STAR보다 면역원성이 낮았다는 것을 보여준다. 한편, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-2 STAR, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-3 STAR 및 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-4 STAR의 결실은 STAR가 기능을 상실하게 만들었다.

[0250] 4) STAR의 불변 영역의 N 말단의 재배열은 서열 특이성을 가지며, 다른 재배열 모드는 유효하지 않다.

[0251] 1차 T 세포의 RFP 및 EGFR-his-APC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1과 비교하여, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.rRec의 경우, GC33 scFv는 막 형성에는 적용될 수 없었다. 표적 세포 Huh-7 및 HepG2 세포와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.rRec의 사멸 기능이 상실되었고 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-N.Rec STAR의 기능보다 훨씬 열악하였다.

[0252] **실시예 12. 항-GPC3 STAR 수용체의 시스템인 점 돌연변이의 돌연변이체의 기능**

[0253] STAR 수용체의 시스템인 점 돌연변이로, 추가적인 이황화 결합이 추가되어 매칭을 강화하고 복합체를 안정화시키는 효과를 발휘할 수 있다. phage-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-Cys STAR 및 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT STAR 벡터를 깊은 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 µL의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4°에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 바이러스 역가에 명백한 차이가 없음을 보여준다. Jurkat C5와 1차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포의 RFP 및 GPC3-FITC 염색으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT와 비교하여, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-Cys는 내인성 TCR과의 미스매칭 측면에서 미스매칭 비율이 현저히 낮았다. 표적 세포 Huh-7 및 HepG2 세포와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-Cys는 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT보다 더 강력한 표적 세포 사멸 능력을 가진다.

[0254] **실시예 13. 항-GPC3 STAR 수용체의 막관통 영역의 특정 부위에서 소수성 아미노산 치환을 수행하는 것의 기능**

[0255] 특정 부위에서 STAR 수용체의 막관통 영역 상의 소수성 아미노산 치환이 핵심적인 역할을 한다. STAR 수용체의 시스템인 점 돌연변이로, 추가적인 이황화 결합이 추가되어 매칭을 강화하고 복합체를 안정화시키는 효과를 발휘할 수 있다. phage-EF1A-IRES-RFP 벡터를 이용하여, 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-TM9 STAR 및 마우스 GC33-VH TCRA-GC33-VL TCRbC-WT STAR 벡터를 깊은 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 µg의 플라스

미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 μ L의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. 결과는 바이러스 역가에 명백한 차이가 없음을 보여준다. Jurkat C5와 1차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, 감염 효율에는 큰 차이가 없었다. 1차 T 세포의 RFP 및 GPC3-FITC 단백질 염색으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT와 비교하여, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-TM9는 내인성 TCR과의 미스매칭 측면에서 미스매칭 비율이 현저히 낮았다. 표적 세포 Huh-7 및 HepG2 세포와의 공동-배양으로부터 발견된 바, 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-TM9는 마우스 GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT보다 더 강력한 표적 세포 사멸 능력을 가진다.

[0256] **실시예 14. 항-GPC3 STAR의 포괄적 돌연변이체의 기능**

[0257] 변형 전략의 삼중 조합, 한 쌍 조합 및 단일 돌연변이의 효과를 비교하기 위해, phage-EF1A-IRES-RFP 벡터를 사용하여, 하기 표에 있는 모든 STAR 벡터를 깊은 어셈블리를 통해 재조합하고 작제하였다; 바이러스를 Lentix-293T 세포를 사용하여 패키징하였고, 패키징 플라스미드는 pSPAX 및 PMD2.G였으며, 여기서 트랜스퍼 플라스미드 대 pSPAX 대 PMD2.G의 패키징 비율은 3:2:1이었으며; 각각의 10 cm 배양 접시에는 총 18 μ g의 플라스미드가 존재하였고, 각 배양 접시의 플라스미드 대 PEI-MAX의 비율은 1:3이었고, 즉 54 μ L의 PEI를 사용하였다; 형질감염 12시간 후에 배양 배지를 교체하고, 48시간 및 72시간에 바이러스 용액을 수확하였다; 20000 rpm 및 4° 에서 2시간 동안 원심분리한 후, 무혈청 배지를 재현탁에 사용하였고; 바이러스를 100배 농축하였으며; 바이러스 역가를 검출하였다. Jurkat C5와 1차 T 세포의 감염으로부터 발견된 바, T 세포를 동일한 MOI로 감염시킨 후, 감염 효율(즉, RFP 양성률)에 큰 차이가 없었다. RFP 및 GPC3-FITC 단백질 염색으로부터 발견된 바, 한 쌍의 돌연변이 조합의 막 형성 효율은 단일 돌연변이 전략의 막 형성 효율보다 유의하게 높았다. 동일한 RFP 양성 세포의 경우, 한 쌍 돌연변이의 STAR-T 세포의 표적 세포 Huh-7 및 HepG2 세포에 대한 사멸 능력은 단일 돌연변이 전략의 사멸 능력보다 유의하게 더 높았다; 그러나, 3가지 돌연변이 전략을 동시에 함께 조합하는 경우, 가장 낮은 미스매칭 비율, 동시에 표적 세포에 대한 더 강한 사멸 능력 및 더 높은 사이토카인 분비 수준을 나타낸다. 구체적인 결과를 도 7에 나타내었다.

[0258] GPC3 GC33 STAR 돌연변이체를 목표로 한 전략을 비교하였다:

비교 대상 1	비교 대상 2	결과
Cys-N.Rec-1	Cys 및 N.Rec-1	돌연변이 전략의 한 쌍의 조합은 단일 돌연변이보다 더 나은 효과를 가진다.
Cys-TM9	Cys 및 TM9	
N.Rec-1-TM9	N.Rec-1 및 TM9	
Cys-N.Rec-1-TM9	N.Rec-1, Cys, TM9, Cys-N.Rec-1, Cys-TM9 및 N.Rec-1-TM9	돌연변이 전략의 삼중 조합은 한 쌍의 조합 및 단일 돌연변이보다 더 나은 효과를 가진다.

[0259] **실시예 15. 334-scFv에 기초한 항-CD19 STAR의 포괄적 돌연변이체의 기능**

[0261] 본 발명자는 CGMCC 제17095호(CGMC No. 17095)의 보존 번호를 갖는 하이브리도마 세포에 의해 생산된 CD19를 표적으로 하는 신규한 모노클로날 항체 334를 획득한다(2019년 1월 21일, 북경 100101, 조양구 베이첸서로, 야드 1, 3호(No. 3, Yard 1, Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing)에 있는 중국과학원 미생물학 연구소, 중국 일반 미생물보존센터(China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences)에 보존됨). 항체는 항-CD19 334 VL(서열번호 27) 및 항-CD19 334 VH(서열번호 26)를 함유하고, 여기서 항-CD19 334 VH는 서열번호 28로 나타난 중쇄 CDR1, 서열번호 29로 나타난 중쇄 CDR2 및 서열번호 30으로 나타난 중쇄 CDR3을 함유하고; 항-CD19 334 VL은 서열번호 31로 나타난 경쇄 CDR1, 서열번호 32로 나타난 경쇄 CDR2 및 서열번호 33으로 나타난 경쇄 CDR3을 함유한다.

[0262] 1) 항체 334에 의한 CD19의 특이적 인식

[0263] 표적 항원 CD19 및 비표적 항원 CD20에 대한 항체 334의 인식 능력을 ELISA 방법을 사용하여 확인하였다; 항체

334를 발현하는 플라즈미드를 형질감염 시약 PEI를 사용하여 293T 세포로 형질전환시켰다; 72시간 후, 세포 상청액을 수집하고, ELISA 방법을 이용하여 항원-항체 특이적 결합 능력을 검출하였다. 실험 결과는 항체 334는 표적 항원 CD19에 유의하게 특이적으로 결합하였으며 비표적 항원 CD20에는 결합 능력이 없음을 보여주었다.

[0264] CD19-334 항체가 인간 세포에 의해 발현된 항원 CD19를 특이적으로 인식할 수 있는지 확인하기 위해, WB 테스트를 사용하여 인간화 CD19 항체에 대한 CD19-334 항체의 인식 능력을 검출하였다.

[0265] 2) CD19 양성 단백질 샘플의 제조:

[0266] 인간 림프종 세포주에서 Raji 세포(CD19 항체에 대한 높은 양성 발현)를 통상적으로 배양하였고; 90% 세포를 용합한 후에, 6 cm 접시의 현탁액 세포를 취하여 원심분리하고, 세포 침전물을 1.5 mL 원심분리 튜브에 수집하였다. 200 μ L의 총 단백질 추출 용해 시약(RIPA)을 첨가하여 완전히 휘젓고 균일한 혼합을 한 다음, 얼음 위에서 15분 동안 용해를 수행하였다. 원심분리 튜브를 4°C로 미리 냉각시킨 저온 냉장 원심분리기에 넣고 4°C, 12000 rpm에서 15분간 원심분리하여, 상청액을 수집하였다. 5x 로딩 완충액을 첨가하여 100°C에서 5분 동안 단백질 변성을 하였다. 샘플을 20분간 얼음 위에서 미리 냉각시킨 후 원심분리하고 그런 다음 WB 전기영동을 실시하였다 (CD19 음성 대조군 그룹의 세포로서 인간 직장암 세포주 M62 사용).

[0267] (2) WB 전기영동: 4% 스페이서 겔을 준비하고, 분리 겔은 10% SDS-PAGE 런닝 겔을 사용하였다. 40 μ L의 추출된 CD19 양성 단백질 샘플과 40 μ L의 추출된 CD19 음성 단백질 샘플을 각 웰에 첨가하였다. 전기영동을 80 V에서 20분 동안 수행하였고; 그런 다음 전압을 120 V로 조정하고 40-60분 동안 전기영동을 수행하였다.

[0268] (3) 막 전달: 반건식 전달 시스템을 사용하여 표적 단백질을 0.45 μ m PVDF 막으로 전달하였다. 막 전달 조건은 15 V 및 1시간이었다.

[0269] (4) 차폐(Closure): 전달 후 PVDF 막을 5% 탈지분유에 넣어 차폐하고 실온에서 1시간 동안 진탕기로 진탕하였다.

[0270] (5) 1차 항체 인큐베이션: PVDF 막에 남아있는 분유를 PBST로 깨끗이 세척하고, 여과지를 사용하여 잔류 완충액을 빨아들여 건조시킨 후, PVDF 막을 CD19 항체 하이브리도마 상청액(5-8 mL)을 함유하는 1차 항체 인큐베이션 상자에 넣었다. 인큐베이션을 4°C에서 밤새 수행하였다.

[0271] (6) PBST 행굼: 5분 \times 3.

[0272] (7) 2차 항체 인큐베이션: PVDF를 HRP로 표시된 항-마우스(1:20000) 모노클로날 항체에 넣었다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션을 수행하였다.

[0273] (8) PBST 행굼: 5분 \times 3.

[0274] (9) 겔 이미지로 현상 및 포토그래핑을 수행하였다.

[0275] 실험 결과는 항체 334가 인간 림프종 세포주의 Raji 세포에서 CD19 단백질(95 kD의 표적 밴드 크기를 가짐)을 인식할 수 있음을 보여준다.

[0276] 3) 항체 334의 Kd 값의 검출

[0277] 인간 림프종 세포주에서 Raji 세포(CD19 항체에 대한 높은 양성 발현)를 통상적으로 배양하였고; 90% 세포를 용합한 후에, 6 cm 접시의 현탁액 세포를 취하여 원심분리하고, 세포 침전물을 1.5 mL 원심분리 튜브에 수집하고; 세포 침전물을 PBS로 재현탁시키고, 세포 밀도를 5×10^6 세포/mL로 조정하였다.

[0278] 웰 당 5×10^6 Raji 세포를 96-웰 플레이트에 첨가하고; 항체 334를 375 nM, 187.5 nM, 30 nM, 3 nM, 0.3 nM, 0.03 nM, 0.003 nM 및 0 nM으로 희석 및 정제하여 96-웰 플레이트의 Raji 세포에 첨가하고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다; 그런 다음, 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 수행하고 상청액을 버렸다; PBS를 첨가하여 세포를 1회 세척한 후, 염소-항 마우스 AlexaFluor 555 형광 2차 항체를 첨가하여 Raji 세포를 30분 동안 인큐베이션하였다. 4°C에서 30분간 인큐베이션하고, 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 수행하고, 상청액은 버렸다; PBS를 첨가하여 세포를 1회 세척한 후, 200 μ L의 PBS를 첨가하여 세포를 재현탁시키고; CD19-334 항체의 다양한 농도에서 Raji 세포의 형광 강도를 유세포 분석기를 사용하여 검출하고; GraphPad 소프트웨어를 사용하여 계산을 수행하여 CD19-334 항체의 Kd 값을 얻었다.

[0279] 검출 결과는 다양한 농도에서 Raji 세포의 형광 강도에 맞는(fitted) 결합 곡선을 보여주며; GraphPad 소프트웨어

어에 의해 계산된 CD19-334 항체의 Kd 값은 1.528 ± 0.25 nM이었다.

[0280] 4) 334-scFv에 기초한 항-CD19 STAR의 포괄적 돌연변이체

[0281] myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-334-항-CD19 STAR 구조를 pHAGE-IRES-RFP 벡터에 기초하여 작제하였다. 사용된 항체 결합 서열은 항-CD19 334 VL(서열번호 27) 및 항-CD19 334 VH(서열번호 26)이며, 여기서 항-CD19 334 VH는 서열번호 28로 나타낸 중쇄 CDR1, 서열번호 29로 나타낸 중쇄 CDR2 및 서열번호 30으로 나타낸 중쇄 CDR3을 함유하며; 항-CD19 334 VL은 서열번호 31로 나타낸 경쇄 CDR1, 서열번호 32로 나타낸 경쇄 CDR2 및 서열번호 33으로 나타낸 경쇄 CDR3을 함유한다. 바이러스를 2세대 패키징 플라스미드를 이용하여 패키징한 후, Jurkat C5 세포를 감염시켰다. 유세포 분석 결과로부터 발견된 바, STAR는 정상적인 막 형성에 적용될 수 있으며 표적 세포인 Raji 및 항체 CD19 단백질에 결합하여 CD69 및 CD25와 같은 활성화된 분자의 발현을 촉진할 수 있다. 1차 T 세포를 바이러스로 감염시킨 후, 표적 세포인 Raji, Jeko-1 등과 T 세포의 공동-배양은 분명히 T 세포가 IL-2, TNF- α 및 IFN γ 를 분비하도록 자극하여 T 세포가 표적 세포를 죽이도록 유도할 수 있다; 한편, T 세포는 면역 억제 분자 PD1, TIM3, LAG3 등을 추가로 발현하며, 이는 T 세포가 활성화되고 사멸 기능을 발휘한다고 추가로 명시하는 것이다. Raji 세포를 가지는 NSG 마우스에서 림프종 모델을 확립하였고; 항-CD19 STAR T 세포를 사용하여 종양 보유 마우스에 작용하였다; 그러자 대조군과 비교하여, 항-CD19 STAR T 세포는 분명히 종양에 대한 사멸 효과를 가질 수 있었다. 결과를 도 8에 나타내었다.

[0282] 실시예 16. CD19-CD20에 대한 FMC63-2C6 STAR의 포괄적 돌연변이체의 기능

[0283] STAR의 구조에서, C α 및 C β 는 scFv의 VH 및 VL에 연결될 수 있고 다른 scFv에 추가로 연결될 수 있으며; 따라서, 이중 표적 또는 단일 표적에서 이중 인식 부위의 측면에서 가능하다. myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-항-CD19/CD20 STAR 구조를 pHAGE-IRES-RFP 벡터를 기초로 하여 작제하였으며, 여기서 표적은 CD19에 대해서 FMC63 모노클로날 항체(FMC63 VH 서열번호 44, FMC63 VL 서열번호 45)를 그리고 CD20에 대해서 2C6 모노클로날 항체(2C6 VH 서열번호 46, 2C6 VL 서열번호 47)를 선택하였다. myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-FMC63-2C6 구조를 작제하였고; 바이러스를 2세대 패키징 플라스미드를 이용하여 패키징한 후, Jurkat C5 세포를 감염시켰다. 유세포 분석 결과로부터 발견된 바, STAR는 정상적인 막 형성에 적용될 수 있다. 1차 T 세포를 바이러스로 감염시킨 후, 표적 세포인 Raji, Raji-CD19KO 및 Raji-CD20KO와 T 세포의 공동-배양은 분명히 T 세포가 IL-2, TNF- α 및 IFN γ 를 분비하도록 자극하여 T 세포가 표적 세포를 죽이도록 유도할 수 있으며, 이는 FMC63-2C6 STAR가 두 표적 모두에 대해 우수한 사멸 능력을 가지고 있으며, 두 표적 중 하나의 손실로 인한 종양 재발을 임상적으로 피할 수 있다는 것을 명시하는 것이다. 90% Raji + 5% Raji-CD19KO + 5% Raji-CD20KO 세포를 가지는 NSG 마우스에서 종양 보유 모델을 확립하였고; FMC63-2C6 STAR 세포를 사용하여 종양 보유 마우스에 작용하도록 한 후, 대조군 그룹과 비교하여, FMC63-2C6 STAR 세포는 분명히 종양을 완전히 제거할 수 있었으며, 이는 FMC63-2C6 STAR 세포가 두 표적 모두에 대해 사멸 효과가 있음을 추가로 증명하는 것이다. 결과를 도 9에 나타내었다.

[0284] 실시예 17. CD19-CD22에 대한 334-M971 STAR의 포괄적 돌연변이체의 기능

[0285] STAR의 구조에서, C α 및 C β 는 scFv의 VH 및 VL에 연결될 수 있고 다른 scFv에 추가로 연결될 수 있으며; 따라서, 이중 표적 또는 단일 표적에서 이중 인식 부위의 측면에서 가능하다. myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-항-CD19/CD22 STAR 구조를 pHAGE-IRES-RFP 벡터를 기초로 하여 작제하였으며, 여기서 표적은 CD19에 대해서 334 모노클로날 항체(334 VH 서열번호 26, 334 VL 서열번호 27)를 그리고 CD22에 대해서 M971 모노클로날 항체(M971 VH 서열번호 48, M971 VL 서열번호 49)를 선택하였다. myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-334-M971 구조를 작제하였고; 바이러스를 2세대 패키징 플라스미드를 이용하여 패키징한 후, Jurkat C5 세포를 감염시켰다. 유세포 분석 결과로부터 발견된 바, STAR는 정상적인 막 형성에 적용될 수 있다. 1차 T 세포를 바이러스로 감염시킨 후, 표적 세포인 Raji, Raji-CD19KO 및 Raji-CD20KO와 T 세포의 공동-배양은 분명히 T 세포가 IL-2, TNF- α 및 IFN γ 를 분비하도록 자극하여 T 세포가 표적 세포를 죽이도록 유도할 수 있으며, 이는 334-M971 STAR가 두 표적 모두에 대해 우수한 사멸 능력을 가지고 있으며, 두 표적 중 하나의 손실로 인한 종양 재발을 임상적으로 피할 수 있다는 것을 명시하는 것이다. 90% Raji + 5% Raji-CD19KO + 5% Raji-CD20KO 세포를 가지는 NSG 마우스에서 종양 보유 모델을 확립하였고; 334-M971 STAR 세포를 사용하여 종양 보유 마우스에 작용하도록 한 후, 대조군 그룹과 비교하여, FMC63-2C6 STAR 세포는 분명히 종양을 완전히 제거할 수 있었으며, 이는 FMC63-2C6 STAR 세포가 두 표적 모두에 대해 사멸 효과가 있음을 추가로 증명하는 것이다. 결과를 도 10에 나타내었다.

[0286] 서열 목록

[0287] 서열번호 1 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(인간 TCR α -WT)

- [0288] DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK
SFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0289] 서열번호 2 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(마우스 TCraC-WT)
- [0290] DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFET
DMNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0291] 서열번호 3 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 N 말단에서 결실된 서열
- [0292] DIQNPEPAVYQLKDRSQ
- [0293] 서열번호 4 N-말단 변형을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(마우스 TCraC-N.DLT)
- [0294] DSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNLVIGFRILL
LKVAGFNLLMTLRLWSS
- [0295] 서열번호 5 N-말단 변형을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(마우스 TCraC-N.Rec-4)
- [0296] DIQNPDPAVYQLRDDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
NFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0297] 서열번호 6 시스테인 치환을 포함하는 인간 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(인간 TCraC-Cys)
- [0298] DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK
SFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0299] 서열번호 7 시스테인 치환을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(마우스 TCraC-Cys)
- [0300] DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFET
DMNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0301] 서열번호 8 소수성 아미노산 치환을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역의 막관통 영역
- [0302] LLVIVLRIL
- [0303] 서열번호 9 소수성 아미노산 치환을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 α 사슬 불변 영역(마우스 TCraC-TM9)
- [0304] DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFET
DMNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0305] 서열번호 10 마우스 TCraC-Cys-M9
- [0306] DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFET
DMNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0307] 서열번호 11 마우스 TCraC-Cys-N.Rec-1
- [0308] PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
NFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0309] 서열번호 12 마우스 TCraC-Cys-N.Rec-1
- [0310] PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
NFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0311] 서열번호 13 마우스 TCraC-Cys-TM9-N.Rec-1
- [0312] PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
NFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0313] 서열번호 14 인간 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(인간 TCrbC-WT)
- [0314] DLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFQWQPRNHFRQVQFYGL
SENDEWTQDRAKPVTVQVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF

- [0315] 서열번호 15 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(마우스 TCR β C-WT)
- [0316] DLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS~~WWV~~NGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQNI~~SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMV~~KRKNS~~
- [0317] 서열번호 16 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역의 N 말단에서 결실된 서열
- [0318] DLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQK
- [0319] 서열번호 17 N-말단 결실을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(마우스 TCR β C-N.DLT)
- [0320] ATLVCLARGFFPDHVELS~~WWV~~NGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQNI~~SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMV~~KRKNS~~
- [0321] 서열번호 18 N-말단 변형을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(마우스 TCR β C-N.-Rec-4)
- [0322] DLKNVFPPEVAVFEPSEAEIATLVCLARGFFPDHVELS~~WWV~~NGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQNI~~SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMV~~KRKNS~~
- [0323] 서열번호 19 시스테인 치환을 포함하는 인간 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(인간 TCR β C-Cys)
- [0324] DLKNVFPPEVAVFEPSEAEI~~SHTQ~~KATLVCLATGFFPDHVELS~~WWV~~NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP~~RNH~~FR~~CQV~~QFYGLSENDEW~~TQ~~DRAKPV~~TQI~~VSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV~~SALV~~LMMAMV~~KRKDF~~
- [0325] 서열번호 20 시스테인 치환을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(마우스 TCR β C-Cys)
- [0326] DLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS~~WWV~~NGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQNI~~SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMV~~KRKNS~~
- [0327] 서열번호 21 N-말단 변형 및 시스테인 치환을 포함하는 마우스 T-세포 수용체의 β 사슬 불변 영역(마우스 TCR β C-Cys-N.Rec-1)
- [0328] PPEVAVFEPSEAEI~~SHTQ~~KATLVCLARGFFPDHVELS~~WWV~~NGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQNI~~SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMV~~KRKNS~~
- [0329] 서열번호 22 항-EGFR Cetux-VH
- [0330] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRRQSPGKGLEWLVGIVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSKVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGGTLVTVSAASTKG
- [0331] 서열번호 23 항-EGFR Cetux-VL
- [0332] DILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNWPPTTFGAGTKLELKRTVA
- [0333] 서열번호 24 항-GPC3 GC33 VL
- [0334] DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKR
- [0335] 서열번호 25 항-GPC3 GC33 VH
- [0336] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYEMHWVRRQAPGQGLEWMGALDPKGTAYSQKFKGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGGTLVTVSS
- [0337] 서열번호 26 항-CD19 334 VH
- [0338] QVQLQSGAELVRPGASVKLSCKALGFIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGAFHPGSGGSAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTFEDSAVYHCTRQLGPDWGQGT~~LV~~TVSS
- [0339] 서열번호 27 항-CD19 334 VL
- [0340] DVVMTQTPLTSLV~~TIG~~QPASISCKSSQSLLES~~DK~~TYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV~~PDR~~FTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLVGVYYCWGGTQFPWTFGGGTKLEIK

- [0341] 서열번호 28 항-CD19 334 중쇄 CDR1
- [0342] GFIFTDYE
- [0343] 서열번호 29 항-CD19 334 중쇄 CDR2
- [0344] FHPGSGGS
- [0345] 서열번호 30 항-CD19 334 중쇄 CDR3
- [0346] TRQLGPD
- [0347] 서열번호 31 항-CD19 334 경쇄 CDR1
- [0348] QSLESDGKTY
- [0349] 서열번호 32 항-CD19 334 경쇄 CDR2
- [0350] LVS
- [0351] 서열번호 33 항-CD19 334 경쇄 CDR3
- [0352] WQGTQFPWT
- [0353] 서열번호 34 TCRaC-N.Rec-1
- [0354] PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTEKSFETDMNLFQNLNLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0355] 서열번호 35 TCRaC-N.Rec-2
- [0356] VYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTEKSFETDMNLFQNLNLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0357] 서열번호 36 TCRaC-N.Rec-3
- [0358] RDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTEKSFETDMNLFQNLNLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0359] 서열번호 37 TCRbC-N.Rec-1
- [0360] PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS
- [0361] 서열번호 38 TCRbC-N.Rec-2
- [0362] FEPSEAEISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS
- [0363] 서열번호 39 TCRbC-N.Rec-3
- [0364] EISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS
- [0365] 서열번호 40 N 말단에서 18개 아미노산의 무작위 재배열을 갖는 마우스 TCRaC-N.rRec
- [0366] NQSVDPDEQLIPYRKAQPDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTEKSFETDMNLFQNLNLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0367] 서열번호 41 N 말단에서 25개 아미노산의 무작위 재배열을 갖는 마우스 TCRbC-N.rRec
- [0368] PEKREKSVAPAVKKLNLITFQDSPNATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVMMAMVKRKNS
- [0369] 서열번호 42 마우스 TCR의 α 사슬 불변 영역의 C 말단에서 15개 아미노산이 결실된 마우스 TCRaC-C.DLT
- [0370] DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTEKSFET

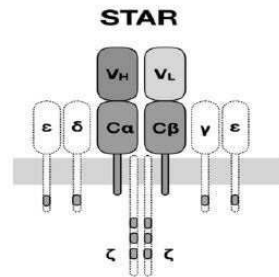
DMNLNFQNLSVMGLRILLK

- [0371] 서열번호 43 마우스 TCR의 β 사슬 불변 영역의 C 말단에서 15개 아미노산이 결실된 마우스 TCR β C-C.DLT
- [0372] DLRNVTTPKVSLEFESKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQVQFHGLSEED
KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
- [0373] 서열번호 44 항-CD19 FMC63 VH
- [0374] AVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFGDYTMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIQYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCTKDNQY
GSGSTYGLGVWQGTLVTVSS
- [0375] 서열번호 45 항-CD19 FMC63 VL
- [0376] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGT
KVEIK
- [0377] 서열번호 46 항-CD20 2C6 VH
- [0378] AVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFGDYTMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIQYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCTKDNQY
GSGSTYGLGVWQGTLVTVSS
- [0379] 서열번호 47 항-CD20 2C6 VL
- [0380] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGT
KVEIK
- [0381] 서열번호 48 항-CD22 M971 VH
- [0382] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAANNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKQWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE
VTGDLEDAFDIWGGGTMVTVSS
- [0383] 서열번호 49 항-CD22 M971 VL
- [0384] DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQTIWSYLNWYQRPQKAPNLLIYAASLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQAEDFATYYCQQSYVIPQTFGGGT
KLEIK

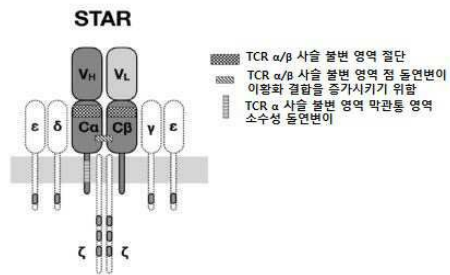
도면

도면1

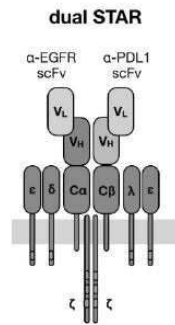
A



B



C



도면2

TCRα 불변 영역

141개 잔기 중복에서 63.8% 동일성 ; 점수 : 458.0; 갭 빈도: 2.8%

```

인간                1 DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKQVLDMRSMDFKSN
마우스             1 DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKQVLDMKAMDSKSN
                    *****  * * * * *
                    S-S
인간                61 SAVAWSNKSDFA+CANAFNNSIIPEDTFFPSPESP+CDV+KLVEKSFETDTNLNLFONLSVIGF
마우스             61 GAIAWSNQTSTFCQ+DI+FKET+----NATYPSSDVPC+DATL+TEKSFETDMNLFONLLVIVL
                    * * * * *          * * * * *
                    lg domain              Connecting peptide
인간                121 RILL+LKVAGFNLLMLT+LRLWSS
마우스             117 RILL+LKVAGFNLLMLT+LRLWSS
                    *****
                    Transmembrane domain
  
```

TCRβ 불변 영역

175개 잔기 중복에서 79.4% 동일성 ; 점수 : 720.0; 갭 빈도: 2.3%

```

인간                1 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV+CLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQ
마우스             1 DLRNVT+PKVSLFEPKAEIAN+KQKATLV+CLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQ
                    * * * * *
                    Cysteine modification
인간                61 PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP+RNHFR+QVQ+FYGLSENDEWTQDRAKPV+TQIV
마우스             61 AYKE+----SNYSYCLSSRLRVSATFWHNP+RNHFR+QVQ+FHGLSEEDKWPEGSPKPV+TQNI
                    **          * * * * *          * * * * *
                    Connecting peptide
인간                121 SAEAWGRAD+CF+T+SV+S+Y+Q+Q+GVLSATILYEILLGKATLYAVLV+SALVLMAMV+KRKD
마우스             117 SAEAWGRAD+CGI+T+S+Y+Q+Q+GVLSATILYEILLGKATLYAVLV+STLVVMAMV+KRKN
                    *****
                    Transmembrane domain
  
```

도면3

```

UserSeq1          1 DIQNPDPAVYQLRDSKSS|
UserSeq2          1 DIQNPEPAVYQLKDPRSQ|
                   *****  * * * * *
  
```

도면4

```

UserSeq1          1 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK.
UserSeq2          1 DLRNVT+PKVSLFEPKAEIAN+KQK.
                   * * * * *  * * * * *
  
```

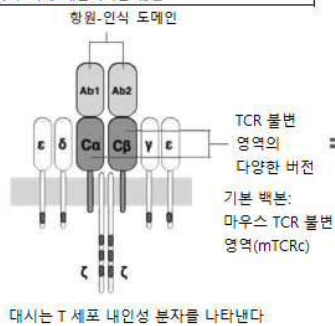
도면5

A

돌연변이의 명칭	TCR α 사슬 불변 영역의 변형	TCR β 사슬 불변 영역의 변형
N.Rec-1	N 말단의 4 aa 절단됨, 인간화됨	N 말단의 6 aa 절단됨, 인간화됨
N.Rec-2	N 말단의 8 aa 절단됨, 인간화됨	N 말단의 12 aa 절단됨, 인간화됨
N.Rec-3	N 말단의 12 aa 절단됨, 인간화됨	N 말단의 18 aa 절단됨, 인간화됨
N.Rec-4	N 말단의 aa 1-14 인간화됨, aa 15-18 결실됨	aa 1-16 인간화됨, aa 7, 21-26 결 실됨
N.DLT	N 말단의 18 aa 절단됨	N 말단의 25 aa 절단됨
C.DLT	C 말단의 15 aa 절단됨	C 말단의 15 aa 절단됨
N.rRec	N 말단의 18 aa 무작위로 재배열 됨	N 말단의 25 aa 무작위로 재배열 됨
TM9	α 사슬 막관통 영역의 aa 111-119	-
Cys	α 사슬의 위치 48의 트레오닌이 시스테인으로 돌연변이되었음	β 사슬의 위치 56의 세린이 시스 테인으로 돌연변이되었음

B

항체 중쇄 가변 영역 VH, 경쇄 가변 영역 VL, 단일쇄 항체 scFv(VH-링커-VL), 항체로부터의 Fab 영역, 라마 단일쇄 항체로부터의 VHH, 천연 수용체 또는 리간드의 세포외 도메인, 항체 이외의 고친화성 분자 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음

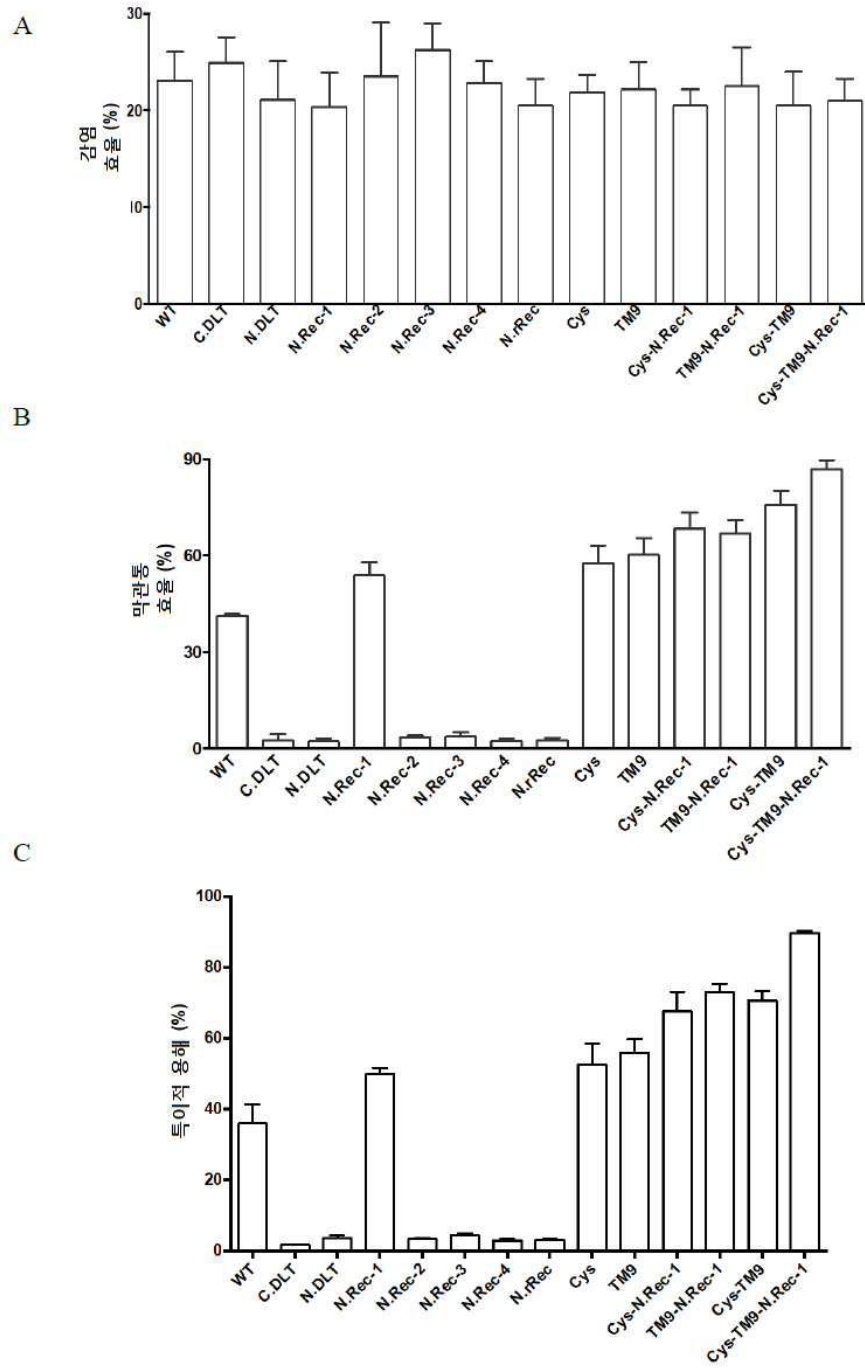


no	mutation	C.DLT	N.DLT	N.Rec-1	N.Rec-2	N.Rec-3	N.Rec-4	N.rRec	Cys	TM9
1	WT									
2	C.DLT	+								
3	N.DLT		+							
4	N.Rec-1			+						
5	N.Rec-2				+					
6	N.Rec-3					+				
7	N.Rec-4						+			
8	N.rRec							+		
9	Cys								+	
10	TM9									+
11	Cys-N.Rec-1			+					+	
12	TM9-N.Rec-1			+						+
13	Cys-TM9								+	+
14	Cys-TM9-N.Rec-1			+					+	+

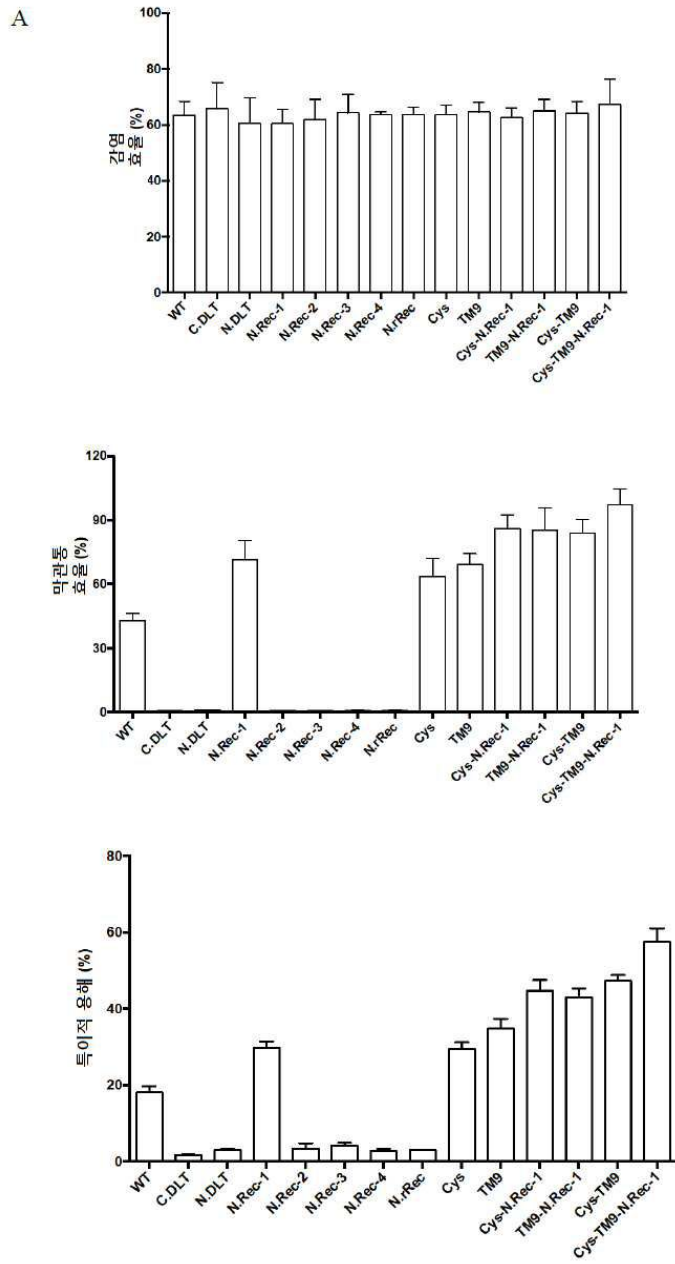
TCR α/β의 다양한 돌연변이체, 각각 13개

TCR α 및 TCR β 사슬의 추가 조합

도면6

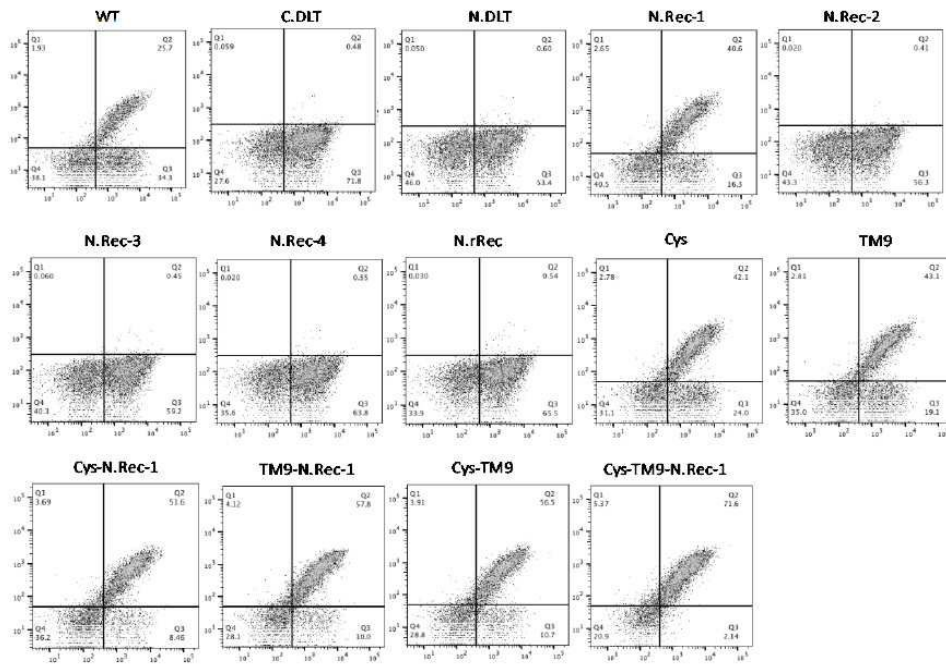


도면7a

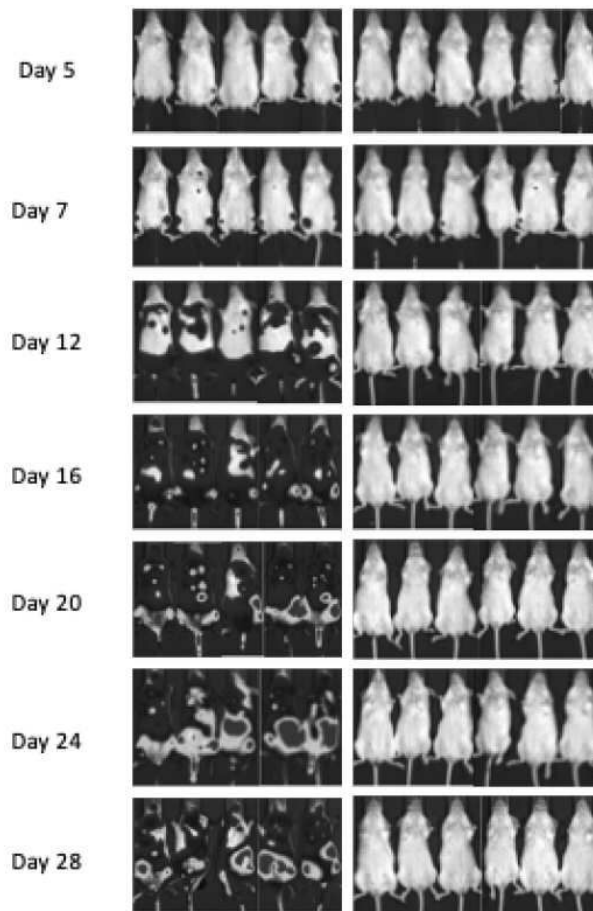
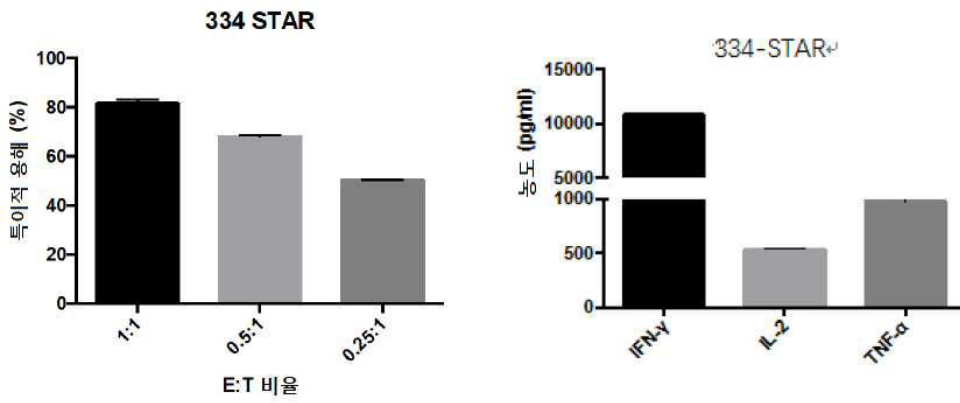


도면7b

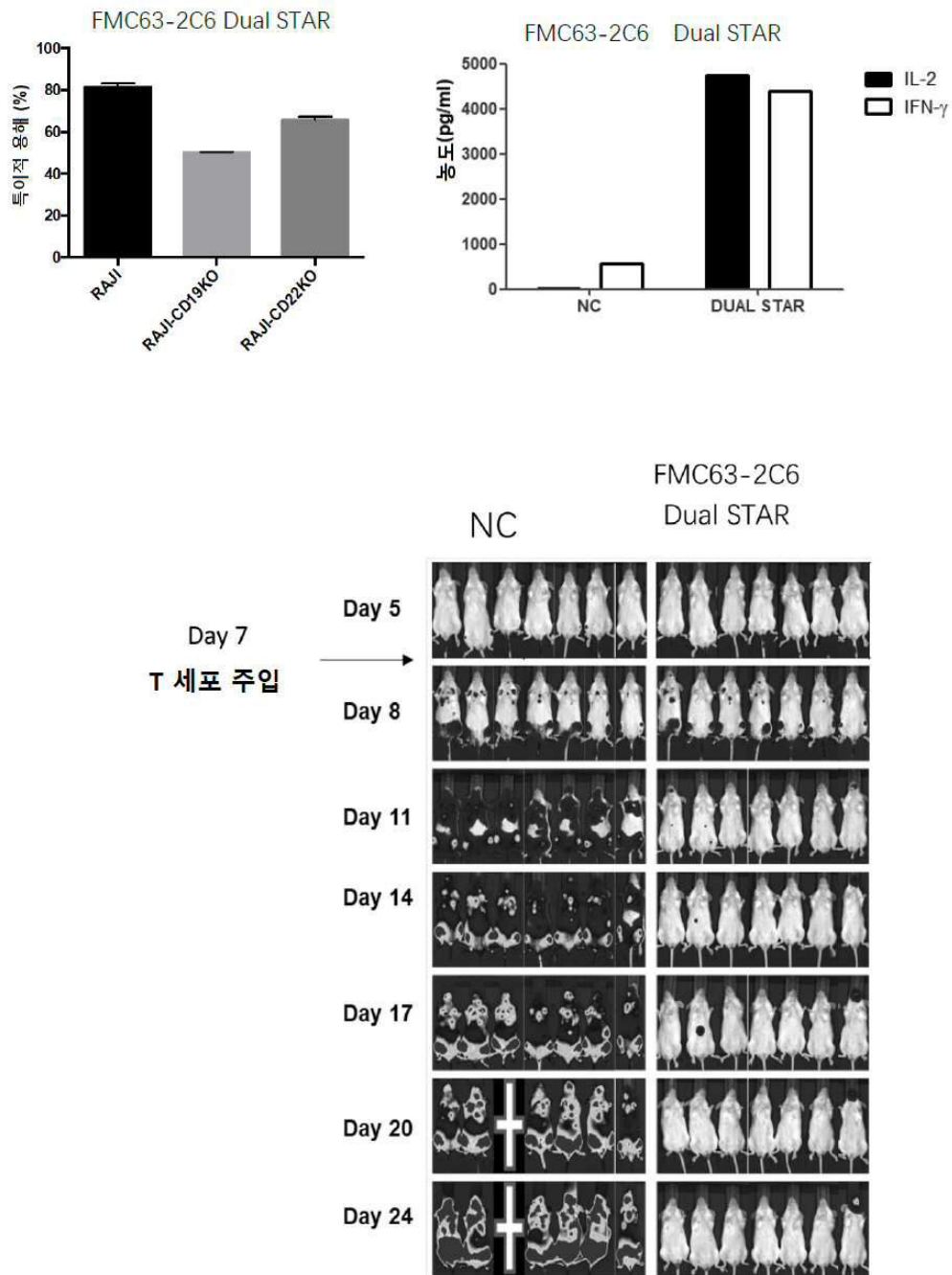
D



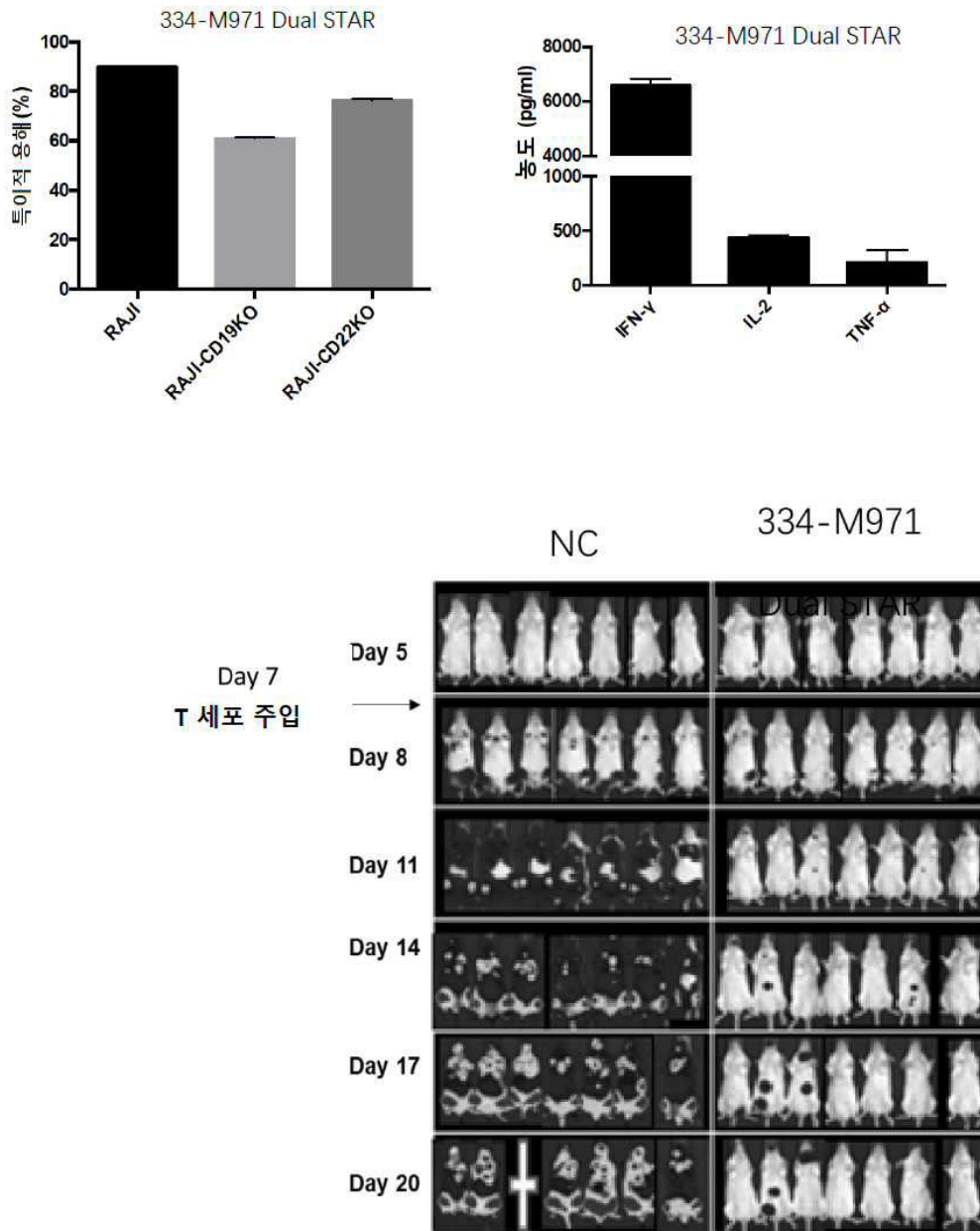
도면8



도면9



도면10



서열목록

Sequence listing

<110> CHINA IMMUNOTECH (BEIJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

<120> Enhanced T-cell receptor STAR and application thereof

<130> P2020TC1203

<150> 201911389706.0

<151> 2019-12-30

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys

1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr

20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr

35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala

50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser

65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp

85 90 95

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

100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

130 135 140

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp 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> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence deleted from N terminal in constant region of 慣 chain of mouse T-cell receptor

<400> 3

Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg

1 5 10 15

Ser Gln

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 慣 chain of mouse T-cell receptor containing N-terminal modification (Mouse TCRaC-N.DLT)

<400> 4

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val

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

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

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 慣 chain of mouse T-cell receptor containing N-terminal modification
 (Mouse TCraC-N.Rec-4)

<400> 5

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

Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln
 50 55 60
 Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe
 85 90 95

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

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

Arg Leu Trp Ser Ser
 130

<210> 6

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 慣 chain of human T-cell receptor containing cysteine substitution (Human TCRaC-Cys)

<400> 6

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

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110

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

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

130 135 140
 <210> 7
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Constant region of 慣 chain of mouse T-cell receptor containing cysteine substitution (Mouse TCRaC-Cys)
 <400> 7
 Asp 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 Cys
 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> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Transmembrane region of constant region of 慣 chain of mouse T-cell receptor containing hydrophobic amino acid substitution

<400> 8

Leu Leu Val Ile Val Leu Arg Ile Leu

1 5

<210> 9

<211

> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 慣 chain of mouse T-cell receptor containing a hydrophobic amino acid substitution (Mouse TCRaC-TM9)

<400> 9

Asp 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 Leu

100 105 110

Val Ile Val 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> 10

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TCRaC-Cys- M9

<400> 10

Asp 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 Cys

 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 Leu

 100 105 110

Val Ile Val 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> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TCRaC-Cys-N.Rec-1

<400> 11

Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Ser

1 5 10 15

Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys

 20 25 30

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

 35 40 45

Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln

50 55 60

Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu

100 105 110

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu

115 120 125

Arg Leu Trp Ser Ser

130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TCRaC-Cys-N.Rec-1

<400> 12

Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Ser

1 5 10 15

Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys

20 25 30

Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met

35 40 45

Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln

50 55 60

Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Leu Val Ile Val Leu

100 105 110
 Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu

115 120 125

Arg Leu Trp Ser Ser

130

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1

<400> 13

Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Ser

1 5 10 15

Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln

50 55 60

Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Leu Val Ile Val Leu

100 105 110

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu

115 120 125

Arg Leu Trp Ser Ser

130

<210> 14

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser

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

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

130 135 140
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 165 170 175

<210> 15

<211> 172

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

1 5 10 15
 Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala

20 25 30
 Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 35 40 45
 Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu
 50 55 60
 Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr
 65 70 75 80

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

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

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence deleted from N terminal in constant region of 棺 chain of mouse T-cell receptor

<400> 16

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

Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys
 20 25

<210> 17

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 梢 chain of mouse T-cell receptor containing N-terminal deletion (Mouse TCRbC-N.DLT)

<400> 17

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

1 5 10 15

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr

20 25 30

Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser

35 40 45

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe

50 55 60

Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro

65 70 75 80

Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp

85 90 95

Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg

130 135 140

Lys Asn Ser

145

<210> 18

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 梢 chain of mouse T-cell receptor containing N-terminal modification (Mouse TCRbC-N.-Rec-4)

<400> 18

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser

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

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

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
 130 135 140
 Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met
 145 150 155 160
 Val Lys Arg Lys Asn Ser
 165

<210> 19

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 棺 chain of human T-cell receptor containing cysteine substitution (Human TCRbC-Cys)

<400> 19

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 1 5 10 15
 Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 20 25 30

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

Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 50 55 60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 65 70 75 80

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

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 100 105 110

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 115 120 125

Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
 130 135 140

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

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 165 170 175

<210> 20

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant region of 棺 chain of mouse T-cell receptor containing cysteine substitution (Mouse TCRbC-Cys)

<400> 20

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

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

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

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

```

      50                55                60

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

Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr
      130               135               140
Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr
145               150               155               160
Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
      165               170

<210> 21
<211> 166
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Constant region of 榧 chain of mouse T-cell receptor containing N-terminal modification
and cysteine substitution (Mouse TCRbC-Cys-N.Rec-1)

<400> 21
Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His
1                5                10                15
Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp
      20                25                30
His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly
      35                40                45
Val Cys Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys
      50                55                60

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg
  
```


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

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
 130 135 140
 Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met
 145 150 155 160
 Val Lys Arg Lys Asn Ser
 165

<210> 22

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-EGFR Cetux-VH

<400> 22

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly

115 120

<210> 23

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-EGFR Cetux-VL

<400> 23

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser

65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110
 <210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-GPC3 GC33 VL

<400> 24

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-GPC3 GC33 VH

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 VH

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Phe Ile Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Phe His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr His Cys

85 90 95

Thr Arg Gln Leu Gly Pro Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 VL

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser

 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

 85 90 95

Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 heavy chain CDR1

<400> 28

Gly Phe Ile Phe Thr Asp Tyr Glu

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 heavy chain CDR2

<400> 29

Phe His Pro Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 heavy chain CDR3

<400> 30

Thr Arg Gln Leu Gly Pro Asp

1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 light chain CDR1

<400> 31

Gln Ser Leu Leu Glu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 light chain CDR2

<400> 32

Leu Val Ser

1

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 334 light chain CDR3

<400> 33

Trp Gln Gly Thr Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 34

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRaC-N.Rec-1

<400> 34

Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Ser

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

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

<210

> 35

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRaC-N.Rec-2

<400> 35

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

Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr

50 55 60

Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp

65 70 75 80

Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met

85 90 95

Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu

100 105 110

Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser

115 120 125

Ser

<210> 36

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRaC-N.Rec-3

<400> 36

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

100 105 110
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 115 120 125
 <210> 37
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TCRbC-N.Rec-1
 <400> 37
 Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His
 1 5 10 15
 Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp
 20 25 30

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

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

 Val Lys Arg Lys Asn Ser
 165
 <210> 38

<211> 160

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRbC-N.Rec-2

<400> 38

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

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

Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
 115 120 125
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 130 135 140
 Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
 145 150 155 160

<210> 39

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRbC-N.Rec-3

<400> 39

Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly

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

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

130 135 140
Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser

145 150

<210> 40

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse TCraC-N.rRec with random rearrangement of 18 amino acids at N terminal

<400> 40

Asn Gln Ser Val Asp Pro Asp Glu Gln Leu Ile Pro Tyr Arg Lys Ala

1 5 10 15

Gln Pro 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> 41

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse TCRbC-N.rRec with random rearrangement of 25 amino acids at N terminal

<400> 41

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

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

115 120 125
 Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr
 130 135 140
 Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr
 145 150 155 160
 Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
 165 170

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse TCRaC-C.DLT with deletion of 15 amino acids at C terminal in constant region of 慣 chain of mouse TCR

<400> 42

Asp 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 Lys
 115 120

<210> 43

<211> 157

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse TCRbC-C.DLT with deletion of 15 amino acids at C terminal in constant region of 椗 chain of mouse TCR

<400> 43

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His

 85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155

<210> 44

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 FMC63 VH

<400> 44

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 FMC63 VL

<400> 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

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

<210> 46

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD20 2C6 VH

<400> 46

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

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

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD20 2C6 VL

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD22 M971 VH

<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

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

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

85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD22 M971 VL

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105