



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0052299  
(43) 공개일자 2022년04월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6869 (2018.01) C07K 14/74 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)  
C12N 5/0784 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6869 (2018.05)  
C07K 14/70539 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0140533  
(22) 출원일자 2021년10월20일  
심사청구일자 2021년10월20일
- (30) 우선권주장  
1020200136348 2020년10월20일 대한민국(KR)
- (71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
방두희  
서울특별시 서대문구 연세로 50, 과학관 431B
- 하상준  
서울특별시 서대문구 연세로 50, 323동 s301호  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인다나

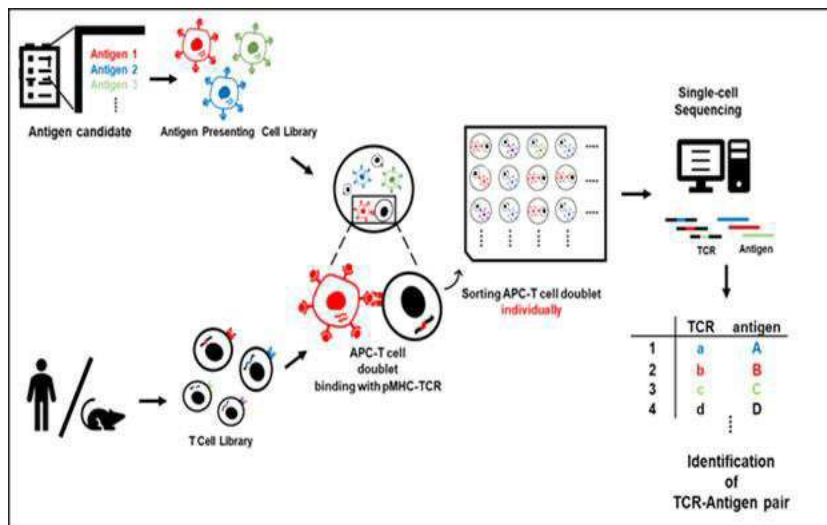
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 단일 세포 분석법을 이용한 TCR-항원의 특이성을 확인하는 방법

(57) 요약

본 발명은 단일 세포 분석법을 이용한 TCR-항원 특이성을 검출하는 방법에 대한 것으로, 항원을 표면에 제시하는 항원 제시 세포 및 TCR을 표면 발현하는 T-세포의 공동 배양을 통해 형성된 항원 제시 세포-T세포 복합체의 단일 세포 유전체 분석을 통하여 TCR-항원을 동시에 시퀀싱 함으로써 식별하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 방법을 이용하는 경우, 기존 TCR-항원 특이성을 검출기술 대비 비용 경제적이며, 고 처리량으로 TCR-항원 쌍 식별이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 15/86** (2013.01)

**C12N 5/0636** (2013.01)

**C12N 5/0639** (2013.01)

**C07K 2319/60** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

(72) 발명자

**이승현**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 과학관 431B

**신동주**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 과학관 431B

**박동진**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 323동 s301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711104629
과제번호	2018M3A9H3024850
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	[통합이지마로]엔지니어드 박테리아 기반 정밀 면역 치료법 개발(1/3단계, 3/3차년
도)	
기 여 율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711109363
과제번호	2018R1A2A1A05079172
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	[통합이지마로]종양 세포의 진화와 치료에 관한 차세대 플랫폼기술 개발(3/4)
기 여 율	5/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711108900
과제번호	2018R1A2A1A05076997
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	[통합이지마로]암-면역 분자네트워크를 활용한 환자별 면역 억제에 대한 분자기전
규명 및 정밀 면역항암치료	플랫폼 개발(3/4)
기 여 율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711105688
과제번호	2019M3A9B6065221
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	[통합이지마로][2세부]단일세포 다중오믹스 기술을 활용한 면역리액툼 유도기전 규
명(1/2단계, 2/3차년도)	
기 여 율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1465033666
과제번호	HR14C0003090021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	혁신형 암패널 개발 및 실용화
기 여 율	20/100
과제수행기관명	서울대학교병원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (1) 임의의 항원을 코딩하는 유전자로 형질도입하여 상기 항원을 표면에 제시하는 항원 제시 세포(Antigen Presenting Cell) 제조 단계;
- (2) T-세포를 준비하는 단계;
- (3) 상기 제조된 APC 및 T-세포를 공동 배양하는 단계;
- (4) 배양 후 APC의 표면에 제시된 항원 및 T-세포의 TCR 간 결합에 의해 형성된 세포 복합체(complex)를 분리하는 단계; 및
- (5) 상기 세포 복합체를 단일 세포 분석(Single-cell sequencing)하여, 상기 세포 복합체로부터 APC가 발현하는 항원 및 T-세포가 발현하는 TCR 서열을 식별하는 단계를 포함하는 항원-TCR 특이성 검출 방법.

#### 청구항 2

- (1) 임의의 항원을 코딩하는 유전자로 형질도입하여 상기 항원을 표면에 제시하는 복수의 항원 제시 세포(Antigen Presenting Cell)를 제조하는 단계;
- (2) 복수의 T-세포를 준비하는 단계;
- (3) 상기 제조된 APC 및 T-세포들을 공동 배양하는 단계;
- (4) 배양 후 APC의 표면에 제시된 항원 및 T-세포의 TCR 간 결합에 의해 형성된 세포 복합체(complex)들을 분리하는 단계; 및
- (5) 상기 세포 복합체들을 동시에 단일 세포 분석(Single-cell sequencing)하여, 상기 상기 복합체로부터 APC가 발현하는 항원 및 T-세포가 발현하는 TCR 서열을 식별하는 단계를 포함하는 다중 항원-TCR 특이성 검출 방법.

#### 청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 항원 제시 세포는 하나의 유전자로 형질도입되어 하나의 유전자를 표면에 제시하는 것인, 항원-TCR 특이성 검출 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제 2항에 있어서,

단계 (1)에서 형질도입되는 유전자는 특정 질환 또는 감염과 관련된 항원을 암호화하는 유전자이고, 단계 (2)에서 준비된 T 세포는 상기 특정 질환 및 감염을 가진 환자로부터 분리된 T 세포인 항원-TCR 특이성 검출 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 항원 제시 세포는 수지상 세포인 항원-TCR 특이성 검출 방법.

## 청구항 6

제1항 또는 제 2항에 있어서,

단계 (1)에서 항원을 암호화하는 유전자는 바이러스 벡터를 이용하여 형질도입 되는 항원-TCR 특이성 검출 방법.

## 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 바이러스는 렌티바이러스인 항원-TCR 특이성 검출 방법.

## 청구항 8

제1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 방법은 항원 제시 세포 및 T 세포를 각각 다른 형광을 나타내는 물질로 표지하는 단계를 추가로 포함하고, 항원 제시 세포 및 T 세포간의 복합체는 상기 다른 형광을 모두 발광하는지 여부로 구별하여 분류되는 것인 항원-TCR 특이성 검출 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 TCR 및 항원의 특이성을 확인하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 면역은 크게 선천 면역과 후천 면역으로 나눌 수 있다. 모든 외부물질을 인지하여 작동되는 선천 면역과 다르게 후천 면역은 특정 병원체를 인지하여 특이적으로 강한 면역 작동을 일으켜 빠르게 병을 치료하며, 장기적인 보호 기능을 제공한다. 이 후천 면역의 중심에는 T세포가 있다. T 세포는 세포 표면의 T-세포 수용체 (T cell Receptor ,TCR)를 가지고 있는데, 이를 이용하여 병원균에서 생성된 물질인 항원을 인식, 병원균의 존재를 감지하여 감염된 세포를 파괴하거나 병원균을 제거하여 몸을 보호한다.

[0003] 항원은 병원균에 감염된 세포의 세포 표면의 구조적 적합성 복합체 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 상에 결합된 펩타이드(peptide) 형태인, peptide-MHC(pMHC)로 제시된다. 즉, T 세포는 TCR을 통하여 감염된 세포의 pMHC를 인식하여 특이적인 항원을 인지하여 면역 반응을 개시한다. 따라서, TCR과 항원의 특이적 상관관계는 후천 면역에서 매우 중요하다.

[0004] 최근, 질병에 특이적인 T 세포들을 투여하여 감염된 세포와 병원균을 제거하는 치료법인 T 세포 면역 치료법이 대두되고 있다. 이는 강력한 면역인 후천면역의 핵심을 이용하는 방법으로서, 약이나 여러 치료요법에도 효과가 없는 환자들에게도 효과가 나타나 큰 기대를 모으고 있다. 따라서, TCR 및 항원에 대한 정보가 있다면 T 세포 치료법을 더욱 다양하게 사용할 수 있다.

[0005] TCR 및 항원의 특이성, 즉 상관관계를 식별하기 위한 다양한 연구가 진행 중에 있다. 구체적으로 제안된 방법으로는 세포와 항원(peptide)을 함께 넣어서 세포 표면의 MHC 상에 항원(peptide)을 올려서 항원 제시 세포 만들고 상기 항원 제시 세포 및 T세포를 공동 배양하여 T 세포의 활성화 여부를 통해 T 세포에 그 항원이 특이적인지 확인하는 방법이 알려져 있다(Nat Med. 2019 25,1488-1499). 그러나 제안된 이 방법은 항원 및 상기 항원에 적합한 MHC를 표면에 제시하는 세포를 각각 제조하여야 하는 점에서 시간 및 비용이 많이 소요되는 단점이 있으며, 한번에 하나의 항원 제시 세포 및 T 세포의 반응 여부만을 확인할 수 있다는 점에서 상당히 비효율적인 단

점이 존재한다.

[0006] 다른 방법으로는, 항원 제시 세포를 사용하지 않고 형광을 붙인 MHC에 항원을 결합시킨 pMHC 형태로 항원을 제시하고, 이를 T-세포와 접촉시킴으로써 형광을 통한 TCR과의 특이성을 확인하는 방법이 제안되었다(*The Journal of Immunology*, 2018, 200.7: 2263-2279). 이 방법 또한 항원 및 MHC를 개별적으로 합성하여 pMHC를 합성하여야 하며, 사용 가능한 형광물질의 종류에 제한이 있고, 많은 MHC를 사용할 경우 단백질 손상 우려가 있기 때문에 반응시킬 수 있는 항원의 수가 제한되는 단점이 있다.

[0007] 따라서, 비용 경제적이며 고 처리량으로 항원-TCR의 특이성을 확인할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) *The Journal of Immunology*, 2018, 200.7: 2263-2279

(비특허문헌 0002) *Nat Med.* 2019 25,1488-1499

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 비용 경제적이며 고 처리량으로 항원-TCR의 특이성으로 식별하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 항원 제시 세포(APC)와 T 세포를 공동 배양하여 TCR-pMHC 친화성을 갖는 특정 T 세포-APC 복합체를 생성시키고, 상기 T 세포-항원 제시 세포 복합체를 유세포 분석을 이용하여 개별적으로 분류하고, 분류된 상기 복합체를 단일 세포 분석함으로써, 복합체에서 특이적으로 결합된 항원 및 TCR 서열을 동시에 확인함으로써, 이 방법을 이용하는 경우, 비용 경제적이고, 고 처리량으로 항원-TCR 특이성 확인이 가능함을 확인하였다.

[0011] 이에 본 발명은

[0012] (1) 임의의 항원을 코딩하는 유전자로 형질도입하여 상기 항원을 표면에 제시하는 항원 제시 세포(Antigen Presenting Cell) 제조 단계;

[0013] (2) T-세포를 준비하는 단계;

[0014] (3) 상기 제조된 APC 및 T-세포를 공동 배양하는 단계;

[0015] (4) 배양 후 APC의 표면에 제시된 항원 및 T-세포의 TCR 간 결합에 의해 형성된 세포 복합체(complex)를 분리하는 단계; 및

[0016] (5) 상기 복합체를 단일 세포 분석(Single-cell sequencing)하여, 상기 복합체로부터 APC가 발현하는 항원 및 T-세포가 발현하는 TCR 서열을 식별하는 단계를 포함하는 항원-TCR 특이성 검출 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은

[0018] (1) 임의의 항원을 코딩하는 유전자로 형질도입하여 상기 항원을 표면에 제시하는 복수의 항원 제시 세포(Antigen Presenting Cell)를 제조하는 단계;

[0019] (2) 복수의 T-세포를 준비하는 단계;

[0020] (3) 상기 제조된 APC 및 T-세포들을 공동 배양하는 단계;

[0021] (4) 배양 후 APC의 표면에 제시된 항원 및 T-세포의 TCR 간 결합에 의해 형성된 세포 복합체(complex)들을 분리하는 단계; 및

[0022] (5) 상기 복합체들을 동시에 단일 세포 분석(Single-cell sequencing)하여, 상기 복합체로부터 APC가 발현하는 항원 및 T-세포가 발현하는 TCR 서열을 식별하는 단계를 포함하는 다중 항원-TCR 특이성 검출 방법을 제공한다

다.

- [0023] 본 발명의 항원 제시 세포(antigen presenting cell: APC)는 단백질 항원을 세포 내에서 처리하여 펩타이드 항원을 생성한 후에 이들을 주조직 적합성 항원 단백질에 결합시켜 세포 표면에 제시하는 세포를 의미한다. 거의 대부분의 세포는 어떤 형태로든 항원 제시 세포로 기능할 수 있지만, 바람직하게는 항원 제시 세포는 T세포에 항원을 제시하는 기능을 하는 세포로, 대식세포, B세포, 및 수지상 세포(dendritic cell, DC)가 포함될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항원 제시 세포로 수지상 세포가 사용되었다. 수지상 세포는 내재 면역 반응(innate immune response)과 적응 면역 반응(adaptive immune response)을 모두 유도할 수 있는 면역계의 가장 핵심적인 전문 항원 제시 세포로서 기억 면역 반응을 활성화할 수 있다. 이러한 이유로 “Nature's adjuvant”로 여겨진다. 특히, 수지상 세포는 다른 항원 제시 세포와 달리, 수외인성 항원을 MHC class II 뿐만 아니라 MHC class I을 통해 교차 제시(cross presentation)할 수 있는 특별한 능력이 있기 때문에 효과적으로 CD4+와 CD8+ T 세포를 동시에 활성화시킬 수 있는 장점이 있다.
- [0025] 본 발명에서 제조되는 상기 항원 제시 세포는 임의의 하나의 항원을 코딩하는 유전자로 형질도입됨으로써, 하나의 항원 제시 세포 표면에는 형질 도입된 상기 하나의 항원만이 제시되는 것을 특징으로 하고, 항원 관련 유전 정보가 세포 내 존재하므로 단일 세포 분석을 통하여 세포 표면에 제시된 항원의 식별이 가능하다.
- [0026] 아울러, 세포 내로 도입된 항원 관련 유전자는 세포 내에서 저절로 전사, 번역되어 펩타이드 형태로 가공되고, 특이적인 MHC에 결합되어 세포 표면에 제시되기 때문에 MHC 및 항원(peptide)을 별도로 합성해야 할 필요가 없고, 알려진 공지된 형질 도입 방법을 이용하여 항원 제시 세포를 간단히 만들 수 있으므로 간단하고 저비용으로 항원 제시 세포 집단을 만들 수 있다.
- [0027] 본 발명의 항원 제시 세포는 1) 박테리아 또는 바이러스 벡터를 이용한 방법, 2) DNA를 리포솜(liposome)에 결합시켜 형질도입하여 효소 분해로부터 DNA를 보호하거나 엔도솜(endosome)으로 흡수하도록 하는 방법 3) DNA에 단백질로 구성된 분자 콘쥬게이트(molecular conjugate)나 합성 리간드를 결합하여 세포로 DNA를 전달 효율을 높이는 방법[예: 아시알로글리코프로테인(Asialoglycoprotein), 트랜스페린(transferrin), 폴리머 IgA(polymeric IgA)], 또는 4) PTD(Protein transduction domain)을 이용한 새로운 DNA 전달 시스템으로 세포로 DNA의 전달 효율을 높임으로서 항원 유전자를 전달하는 방법[예: Mph-1]의 의하여 유전자로 형질 도입될 수 있다.
- [0028] 구체적으로, 본 발명의 항원 제시 세포는 바이러스 벡터에 의해 항원을 암호화하는 유전자가 형질도입될 수 있다. 보다 구체적으로 상기 바이러스 벡터는 Canarypox virus, Newcastle disease virus, vaccinia virus, Sindbis virus, yellow fever virus, human papillomavirus, adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus로부터의 벡터가 사용될 수 있고, 이제 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 도 2와 같이, 렌티바이러스 벡터를 사용하여 원하는 항원을 암호화하는 유전자를 수지상 세포에 형질 도입하였고, 항원의 표면 제시 효율이 가장 우수하였다.
- [0030] 본 발명의 항원 제시 세포에 의해 표면에 발현되는 항원은 특정 질환 또는 바이러스와 관련된 것일 수 있다. 따라서, 다수의 항원이 존재할 수 있으며, 이러한 항원들을 각각 발현하도록 제조된 항원 제시 세포들의 집합을 항원 제시 세포 라이브러리로 지칭할 수 있다.
- [0031] 상기 T-세포를 준비하는 단계는 상기 항원과 관련된 임의의 TCR을 발현하도록 T-세포를 제조하거나, 특정 질환 및 바이러스 감염에 의해서 신체에서 생성된 T-세포를 분리함으로써 얻어질 수 있다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 본 발명자들은 Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) mouse model을 제조함으로써, LCMV가 감염된 마우스에서 생성된 T-세포 집단인 T-세포 라이브러리 및 LCMV와 관련된 항원들을 제시하는 항원 제시 세포 라이브러리를 제조함으로써 본 발명의 방법을 검증하였다.
- [0033] 단계 (3)의 상기 제조된 APC 및 T-세포를 공동 배양하는 단계는 APC의 표면에 제시된 항원 및 T-세포 표면에 발현된 TCR간의 특이성에 따라, APC 및 T-세포 복합체를 형성시키기 위함이다. 여기서 상기 “복합체”는 하나의 항원을 표면에 제시하는 APC에 상기 항원에 특이성을 갖는 TCR을 갖는 하나 또는 복수의 T-세포가 결합된 세포 응집체를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 하나의 APC 및 하나의 T-세포로 이루어진 이합체(doublet), 또는 하나의 APC 및 두 개 이상의 T-세포가 결합된 다중합체(multiplet)가 형성될 수 있다. 이 때, 공동 배양되는 T-세포 및 수지상 세포는 1:0.1 ~5, 바람직하게는 1:0.5~2 비율로 배양될 수 있다. 공동 배양 시간은 30분 내지 4시간일



수 있고, 구체적으로, 1 내지 3시간, 가장 구체적으로, 약 2시간이 이합체 형성물이 가장 우수함을 확인하였다.

[0034] 단계 (3)을 수행하기 전에 준비된 APC 및 T-세포는 상기 세포간의 복합체의 형성 여부를 확인하기 위하여 각각 다른 형광 물질로 표지될 수 있다.

[0035] 단계 (4)에서 이합체를 형성한 APC 및 T-세포는 형광 분석 및 유세포 분석을 통하여 이합체를 형성하지 않은 단일 세포들과 분류되어 구분될 수 있다.

[0036] 분류된 APC 및 T-세포의 복합체, 구체적으로 이합체(들), 또는 다중합체(들)는 동시에 단일 세포 분석을 통하여, 시퀀싱될 수 있다.

[0037] 본 명세서에 사용된 단일 세포 분석은 “1개”의 세포를 분리하여 극미량의 재료로부터 DNA나 RNA를 증폭하고 시퀀싱하여 해당 세포의 유전체적 특징을 분석하는 기술을 의미한다. 해당 분석 방법은 통상적으로 분석 대상 세포가 하나뿐이거나 그에 준하는 극미량의 DNA/RNA만이 존재할 경우 혹은 분석대상 내부 세포 간 이질성(heterogeneity)이 존재하는 경우에 이용될 수 있다.

[0038] 본 발명자들은 단일 세포가 아닌 이종의 세포가 결합된 APC 및 T-세포 이합체를 단일 세포 RNA 시퀀싱한 결과, APC 내 도입된 항원 유전자 서열 뿐만 아니라, T-세포의 TCR 서열을 동시에 검출할 수 있음을 확인하였고, 이를 통해서, APC 및 T-세포 이합체의 단일 세포 분석을 통해서 항원-TCR 특이성을 식별할 수 있음을 최종 확인하였다.

### 발명의 효과

[0039] 본 발명을 이용하는 경우, 항원 펩타이드 및 MHC를 합성하기 위한 비용이 필요하지 않으며 단일 세포 분석(scRNA-seq)를 사용하여 각 세포의 항원 및 TCR을 동시에 식별을 수행할 수 있어, 고 처리량의 항원-TCR 특이성 검출이 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

[0040] 도 1는 본 발명의 항원-TCR 특이성을 식별하는 방법의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 수지상 세포 및 렌티바이러스 벡터를 이용한 항원 제시 세포를 제조하는 방법의 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 렌티바이러스 벡터 이용하여 도입된 항원이 수지상 세포에서 발현되어 세포 표면에 제시됨을 확인한 것이다.

도 4는 형광 표지된 항원 제시 세포 및 T-세포의 공동 배양을 통하여, TCR-항원 특이성에 의한 항원 제시 세포 및 T-세포 복합체의 형성을 나타낸 것이다.

도 5는 항원 제시 세포 및 T-세포의 공동 배양시 최적 배양 조건을 확인한 결과를 나타낸 것이다: (A) 배양 시간, (B) T-세포 : APC 비, 및 (C) T-세포 수.

도 6은 항원 라이브러리의 크기를 결정하기 위해 T 세포의 민감도를 확인한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 항원 제시 세포 라이브러리 및 T-세포 라이브러리를 공동 배양하여 특이적으로 항원 제시 세포-T-세포 복합체를 형성하는지를 형광 분석을 통하여 확인한 결과이다.

도 8은 저빈도 T 세포에서도 복합체를 정확히 검출할 수 있는지 확인하기 위해 모든 T 세포에서 각 T 세포의 비율을 0.1%에서 99.9%로 조정하고 각 웰에 배치하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9 및 10은 마우스 림프구성 맥락 수막염 바이러스(LCMV) 모델에서의 항원-TCR 특이성 검출 방법을 수행한 모식도 및 그 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 다만, 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것이고, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] [실험 방법 및 재료]



- [0043] [1-1] 세포주
- [0044] 인간 배아 신장 HEK293T는 2019년 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 10% 열 불활성화 소 태아혈청(FBS; Gibco, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific, USA)이 보충된 DMEM 배 지에서 배양되었다. DC2.4 마우스 수지상 세포주는 연세대학교 생화학과의 하상준으로부터 기증받았다. DC 2.4 세포주는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI 1640, Gibco, USA)에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이 신로 배양되었다.
- [0045] [2-1] 동물
- [0046] 모든 동물은 System Immunology Laboratory에서 입수했다. 5~6주령 암컷 C57BL/6 마우스를 Orient Bio, Inc. (한국 성남)에서 구입했다. LCMV Gp33-41 에피토프 특이적 TCR 형질전환 P14 마우스는 Dr. Rafi Ahmed(Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA)가 제공했으며 OVA257-264-에피토프 특이적 OT-1 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입했다. 모든 실험에 연령(6~12주)을 사용했다. 모든 마우스는 연세대학교의 특정 병 원체 없는 시설에서 유지되었다. 그리고 실험은 연세대학교 동물연구소(IACUC)의 승인을 받아 진행되었다 (IACUC-A-202008-1124-01).
- [0047] [1-3] LCMV 감염
- [0048] LCMV 감염의 경우, 500  $\mu$ L의 무혈청 RPMI 배지에 LCMV-Armstrong(Arm)의  $2 \times 10^5$  플라크 형성 단위(PFU)를 희석 하고 6주령 C57BL/6J 마우스를 복강내(i.p.) 감염으로 감염시켰다.
- [0049] [1-4] 골수 유래 수지상 세포 제조
- [0050] 골수 유래 수지상 세포(BMDC)는 마우스의 대퇴골과 경골을 모두 세척하여 6주에서 12주령 암컷 C57BL/6 마우스 로부터 골수를 수집했다. 비장을 70  $\mu$ m 세포 여과기(BD Falcon)에 통과시키고 ACK 용해 완충액(Gibco Laboratories)을 사용하여 적혈구를 용해시켰다. 백혈구를 BMDC 완전 배지[RPMI1640 with 10% FBS, 2-mercaptoethanol(Sigma), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 10ng/ml 재조합 마우스 IL-4(JW CreaGene) 및 20 ng/ml 재조합 마우스 GM-CSF(JW CreaGene)]에서  $7.5 \times 10^5$ /웰로 TC 미처리된 6웰 플레이트(BD Falcon)에 플레이팅했다. 배지는 각각 3일, 6일 및 8일에 교체하였다. 8일째 BMDC를 수확하여 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter) 분석하였다. GFP+ 세포만 분류하고 LCMV 감염된 C57BL/6J 마우스의 CD8+ T 세포와 공 동 배양하였다.
- [0051] [1-5] T 세포 준비
- [0052] 마우스에서 비장을 분리하였다. CD8+ T 세포는 MagniSort Mouse CD8 T 세포 농축 키트(Ref. 8804-6822-74, Invitrogen)를 사용하여 비장세포에서 농축되었으며 제조업체에서 제공한 프로토콜을 따랐다. 이들은 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640에서 배양되었다.
- [0053] [1-6] 렌티바이러스 플라스미드 구축
- [0054] 렌티바이러스 플라스미드 pLVX-EF1 $\alpha$ -항원-IRES-GFP는 2단계 클로닝 절차를 통해 생성되었다. 먼저, pLVX-EF1 $\alpha$ -GFP-IRES-Puromycin 백본 플라스미드로부터 pLVX-EF1 $\alpha$ -GFP-IRES-GFP 플라스미드를 생성하였다. 구체적으로, 퓨로마이신 영역이 없는 pLVX-EF1 $\alpha$ -GFP-IRES를 다음 4개의 프라이머(표 1)를 사용하여 2개의 단편으로 PCR 증 폭하였다: Amp\_giv\_foward 프라이머, bb\_gfp\_reverse 프라이머, bb\_gfp \_forward 프라이머, 및 Amp\_giv\_reverse 프라이머. GFP 유전자는 다음 프라이머를 사용하여 증폭되었다: bb\_gfp\_forward 프라이머, 및 bb\_gfp\_reverse 프라이머.

표 1

Oligo Name	Sequence 5' to 3'
Amp_giv_fow primer	TACGCGTCTGGAACAATCAAC (서열번호 1)
Amp_giv_rev primer	CATGGACGAGCTGTACAAGTAAACGCGTCTGGAACAATCAACCTCTGGATTA (서열번호 2)
bb-gfp fwd primer	TTGCCACAACCCACAAGGAGACGACCTCCATGGTGAGCAAGGGCGAG (서열번호 3)
bb-gfp rev primer	AAGGAGACGACCTTC (서열번호 4)

[0058] 단편은 1.5% 아가로스 겔에서 크기를 선택했다. pLVX-EF1 $\alpha$ -GFP-IRES-Puromycin 백본 플라스미드의 세 조각을 Gibson 어셈블리에 의해 pLVX-EF1 $\alpha$ -GFP-IRES-GFP 백본 플라스미드에서 하나로 병합하였다. 전체 시퀀스는 tn5 태그 지정(tagmentation)을 사용하여 NGS에 의해 확인되었다. 둘째, 업스트림 GFP 영역을 EcoR1 및 BamH1 제한 효소 분해에 의해 pLVX-EF1 $\alpha$ -GFP-IRES-GFP 백본 플라스미드로부터 제거하고 절단 단편 크기를 1.5% 아가로스 겔로 확인하였다. blunt-end 항원 인코딩 영역을 생성하기 위해, EcoR1 및 BamH1 제한 부위 인코딩 유전자를 갖는 항원은 T4 DNA 리가제를 사용하여 중첩 올리고의 각 쌍을 어닐링함으로써 생성되었다. 어닐링된 올리고는 제한 효소에 의해 생성된 백본 플라스미드에 직접 클로닝되었다. 항원 삽입은 Sanger 시퀀싱에 의해 확인되었다. 렌티바이러스 벡터 생산을 위해 EndoFree Plasmid Maxi Kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 플라스미드를 제조하였다 (도 2).

#### [0059] [1-7] 렌티바이러스 벡터 생산

[0060] 렌티바이러스 벡터는 제조업체의 지침에 따라 다음 3개의 플라스미드를 사용하여 10번 계대 배양된 293T 신장 세포(ATCC CRL 3216)의 공동 형질감염에 의해 생성되었다: (1) 표적 렌티바이러스 벡터 플라스미드(pLVX-EF1 $\alpha$ -항원-IRES-GFP), (2) 패키징 플라스미드 psPAX2(packaging plasmid psPAX2), 및 (3) 엔벨로프 플라스미드 pMD2.G(envelope plasmid pMD2.G). 공동 형질 감염은 제조사의 지침에 따라 Lipofectamine3000 형질감염 키트(Life Technologies, USA)를 사용하여 수행되었다. 첫 번째 및 두 번째 바이러스 상청액은 각각 형질감염 후 대략 48시간 및 72시간에 수확되었다. 상청액을 800g에서 10분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하고 0.45mm Acrodisc Supor Syringe Filter(PALL, USA)를 통과시켜 여과하였다. 바이러스 역가를 분취액으로 나누고 -80°C에서 동결했다. 한 번의 동결-해동 주기 후에 DC 2.4 세포에서 역가 측정을 수행했다.

#### [0061] [1-8] 렌티바이러스 벡터 적정

[0062] 벡터 적정은 제조업체의 지침에 따라 DC 2.4 세포에서 수행되었다. 렌티바이러스 벡터 적정은 형질도입 72시간 후 형광 활성화된 유세포 분석에 의해 GFP+ 세포의 백분율에 의해 결정되었다. 간략하게, DC 2.4 세포를 형질도입 약 4-5시간 전에 24웰당  $1 \times 10^5$ 개 세포의 밀도로 넣었다(TPP). 약 50% 컨플루언시(confluency)에서 농축 바이러스 및 8 $\mu$ g/ml 폴리브렌(Sigma)의 연속 희석액을 웰에 첨가했다. 플레이트에 균일하게 분포되도록 부드럽게 휘젓고, 800g에서 30분 동안 원심분리하고 세포 인큐베이터에서 밤새 보관했다. 다음날, 바이러스 벡터가 있는 배지를 폴리브렌이 없는 신선한 배지로 교체했다. 72시간 후, 세포를 분석하여 GFP-양성을 결정했다. DC 2.4 세포를 수집하고 1ml의 차가운 인산완충식염수(PBS)로 세척했다. 이들을 150  $\mu$ l의 FACS 완충액에 재현탁하고 BD FACS Aria™ III 세포 분류기로 분석하였다.

#### [0063] [1-9] DC 2.4 세포주 및 BMDC의 렌티바이러스 벡터 형질도입

[0064] DC 2.4 세포주를 제조자의 지시에 따라 형질도입 4-5시간 전에 웰당  $4 \times 10^5$ 개 세포의 밀도로 6웰 조직 배양 플레이트로 옮겼다. 형질도입은 8 $\mu$ g/ml 폴리브렌(Sigma)을 사용하여 MOI 4에서 수행되었다. 플레이트에 균일하게 분포되도록 부드럽게 휘젓고, 800g에서 30분 동안 원심분리하고, 세포 인큐베이터에서 밤새 보관하였다. 다음날, 바이러스 벡터가 있는 배지를 폴리브렌이 없는 신선한 배지로 교체하였다. FACS에 의해 분석된 세포는 72시간 후에 수확되었다. 항원 제시 세포를 사용하기 위해 GFP+ 세포만 수집하였다.

[0065] 효율적인 형질도입을 위해 3일 및 4일에 동일하게 MOI 8에서 2  $\mu$ g/ml 폴리브렌의 존재하에 BMDC를 2회 형질도입하였다. BMDC를 90분 동안 800g에서 렌티바이러스 벡터와 함께 공동 원심분리했다. 8일째에 세포를 수확하고 FACS로 분석하였다. GFP+ 세포만 수집하여 항원 제시 세포에 직접 사용하였다.

#### [0066] [1-10] 공동 배양 분석

[0067] T 세포 및 APC를 전술한 바와 같이 수확하고 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 두 세포 모두 제조업체의 지침에 따라 도 2와 같이 형광 염료로 염색하였다. 세포 계수도 제조업체의 지침에 따라 수행되었다.  $2 \times 10^5$  T 세포 및  $4 \times 10^5$  APC를 96-웰 U-바닥 조직 배양 플레이트의 100  $\mu$ l의 완전 배지에 재현탁하고, 800g에서 5분 동안 공동 원심분리하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 2시간 동안 공동 배양했다. 유세포 분석 및 영상화를 위해 세포를 수확했다.

[0068] [1-11] 현미경으로 이합체의 시각화

[0069] T 세포와 APC 공동 배양 후, 20  $\mu$ l의 세포 혼합물을 웰에서 수득하고 슬라이드로 옮겼다. 현미경 분석은 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Zeiss, LSM880)을 사용하여 수행하였다. Zen blue 에디션 소프트웨어를 사용하여 이미지를 수집하고 처리했다.

[0070] [1-12] 시험관내 IFN- $\gamma$  발현 검정

[0071] 시험관 내 사이토카인 분비 분석을 위해 우리는 LCMV-Arm에 감염된 마우스의 CD8+ T 세포와 LCMV 관련 APC를 1:1 비율로 공동 배양하였다. 그 외에도 대조군으로서 CD8+ T 세포를 APC 없이 25ng/mL Phorbol myristate acetate(PMA) 및 1  $\mu$ M ionomycin(Sigma-Aldrich)으로 자극했다. 이들을 10% FBS를 함유하는 완전한 RPMI 배지에서 Golgi plug/Golgi stop(BD Biosciences)의 존재 하에 세포 인큐베이터에서 5시간 동안 배양하였다. 그 후, 표면 염색을 수행하고, 세포를 제조사의 지시에 따라 세포내 사이토카인을 염색하기 위해 Cytofix/Cytoperm Kit(BD Biosciences) 용액으로 투과화시키고, Cytoflex LX(Beckman Coulter) 및 FlowJo 소프트웨어(Tree Star)로 분석하였다.

[0072] [1-13] 유세포 분석 및 분류

[0073] 세포를 빙냉 분류 완충액(0.2 mM 에틸렌다이아민테트라아세트산, pH 8 및 0.5% 소 혈청 알부민이 보충된 PBS)에 현탁시켰다. T 세포-APC 이합체를 분류하기 위해 샘플을 CTR+GFP+에 대해 게이팅했다. 세포 집단은 BD-FACS Aria Fusion(BD Biosciences) 또는 BD Aria ARIA-II 기기(BD Biosciences)를 사용하여 분류하고 BD FACSDIVA 소프트웨어(BD Biosciences) 및 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0074] 분리된 살아있는 세포는 scRNA-seq용 2  $\mu$ l 용해 용액 및 바코드된 폴리(T) 역전사 프라이머를 포함하는 Semi-skirted 96-well PCR plate(Thermo Fisher Scientific, USA)에 단일 세포로 분류되었다. 분류 직후, 각 플레이트를 회전시켜 세포가 용해 용액에 잠길 수 있도록 하고 완료될 때까지 -80° C에서 보관하였다.

[0075] [1-14] 이합체 라이브러리 제조

[0076] 96웰 플레이트로 분류된 이합체를 용해하여 세포로부터 mRNA를 얻었다. mRNA는 TSO를 사용하여 cDNA로 변환되고 스마트 프라이머로 증폭되었다. 그 후, 바코드-Tn5를 사용하여 상보적 DNA에 태그를 지정하였다.

표 2

Oligo Name	Sequence 5' to 3'
Template Switching Oligo (TSO)	AAGCAGTGGTATCAACAGAGTGAACGTrGrGrG(서열번호 5)
SMART PCR Primer	AAGCAGTGGTATCAACGAGAGT(서열번호 6)

[0079] rG : riboguanosine

[0080] [1-15] 태깅 반응 및 최종 PCR 증폭

[0081] Tn5 단백질을 인코딩하는 pTXB1 벡터는 Rickard Sandberg 그룹에서 얻었고 Tn5 효소는 이전에 설명한 대로 생성되었다. 효율적인 태그 지정 풀 인덱싱을 위해 단일 Illumina 인덱스에서 8개의 샘플을 구별하기 위해 MEDS(Mosaic End Double-Stranded) 올리고에 8개의 정방향 바코드 시퀀스(표 3)를 추가했다.

표 3

number	barcode
1	ACTCGT(서열번호 7)
2	TAGTCC(서열번호 8)
3	CTATGC(서열번호 9)
4	CATACG(서열번호 10)
5	TGACTC(서열번호 11)
6	ATTGCG(서열번호 12)
7	GCAATG(서열번호 13)

8	GTGACT(서열번호 14)
---	-----------------

[0084] 플라스미드 태깅을 위해 MEDS 용액과 2  $\mu$ l의 Tn5 혼합물을 4  $\mu$ l의 5X TAPS-DMF 및 최대 20  $\mu$ l의 DW가 포함된 100ng의 플라스미드에 추가했다. tagmentation 혼합물을 55°C에서 7분 동안 인큐베이션한 다음, 0.2% 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 용액 5  $\mu$ l를 첨가하고, Tn5 불활성화를 위해 실온에서 5분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 태그가 지정된 샘플을 1.2X AMPure XP 비드(Beckman Coulter, USA)로 정제하였다.

[0085] cDNA 태그 지정을 위해 태그 지정 혼합물을 다음과 같은 조성으로 준비하였다: 4  $\mu$ L 5X TAPS-DMF(50mM TAPS-NaOH, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25°C에서 50% v/v DMF(pH 8.5)), 4  $\mu$ L 40% w/ v PEG 8000, 1  $\mu$ L Tn5(1/50 희석), 1ng cDNA, DW 최대 총 부피 20  $\mu$ L. 그 다음 태그가 지정된 샘플을 55°C에서 5분 동안 인큐베이션한 다음 효소 불활성화를 위해 실온에서 5분 동안 불활성화된 5  $\mu$ L 0.2% SDS(최종 0.02%)를 첨가하였다. Tn5 효소 비활성화 후, Tn5 바코드가 다른 8개의 태그가 지정된 샘플 중 10  $\mu$ l를 풀링하고 1X AMPure XP 비드로 정제하였다.

[0086] 정제를 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix(Roche, Switzerland) 25  $\mu$ l 및 각 10  $\mu$ M 정방향 및 역방향 Illumina 인덱스 프라이머 2.5  $\mu$ l에 첨가하고 풀을 다음과 같이 증폭하였다: (i) 72°C 3분, (ii) 98°C 3분 동안, (iii) 30초 동안 98°C, (iv) 30초 동안 60°C, (v) 30초 동안 72°C, 단계 (iii)에서 (v)단계 16 사이클 반복, (vi) 5분 동안 72°C 및 (vii) 보관을 위한 4°C. 증폭된 표적 풀은 0.6부피의 AMPure XP 비드를 사용하여 세척하였다. 라이브러리 품질은 Agilent 4200 TapeStation 고감도(라이브러리 크기 평가), qubit(이중 가닥 DNA 양 평가)로 확인되었다. 샘플은 Illumina NextSeq 500/550 플랫폼으로 시퀀싱하였다.

#### 표 4

Oligo Name	Sequence 5' to 3'
illumina P5 index primer	AATGATACGCGACCACTGATCTACAC [NNNNNNNN]ACACTCTTCCCTACACGACGCT CTTCGATC*T (서열번호 15)
illumina P7 index primer	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [NNNNNNNN]GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T (서열번호 16)

[0089] [NNNNNNNN] : 8bp sample index

#### [실험예 1] T 세포 및 APC의 특이적 결합 식별

[0092] T 세포가 항원을 특이적으로 인식하고 특정 APC를 갖는 이합체를 생성하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다(도 4). 잘 알려진 TCR-항원 쌍(pair)을 검증에 사용하였다. 특정 쌍의 T 세포-APC(OT-1 CD8+ T 세포 및 OVA<sub>257-264</sub> 제시 세포) 및 상기 T 세포와 관련이 없는 항원 Gp<sub>33-41</sub> 제시 세포를 사용하였다. 각 세포 유형은 설명된 대로 다른 형광 염료로 염색되었다. OT-1 CD8+ T 세포를 CTFR로 염색하고, Gp<sub>33-41</sub> 제시 세포를 CTV로 염색하고, OVA<sub>257-264</sub> 제시 세포를 PKH26으로 염색하였다. 3개의 세포를 96개의 웰에 동시에 놓고 공동 배양하여 특정 T 세포-APC 이합체를 형성시켰다. 이어서, T 세포가 특정 항원을 발현하는 APC와 이합체를 형성하는지 여부를 결정하기 위해 공초점 영상화 및 유세포 분석을 수행하였다(도 4). 그 결과, OVA<sub>257-264</sub> 제시 세포와 결합된 여러 OT-1 CD8+ T 세포가 관찰되었지만 Gp<sub>33-41</sub> 제시 세포와 결합된 T 세포는 확인되지 않았다. 예상대로 특이성을 나타내는 이합체만이 형성됨을 확인하였고, 이러한 데이터는 T 세포가 APC를 특이적으로 인식하고 결합한다는 것을 보여주었다.

#### [실험예 2] 방법 최적화

[0095] 보다 효과적으로 T cell-APC 이합체 형성을 위해 위의 세 가지 세포를 사용하기 위한 공동 배양 조건을 최적화하는 실험을 수행하였다. 실험은 3가지 조건으로 수행하였다: 1) 공동 배양 시간(0분, 10분, 1시간, 2시간, 4시간)

간), 2) T 세포:APC 비율(1:0.5, 1:1, 1:2), 및 3) T 세포 밀도( $96\text{웰당 } 2 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $16 \times 10^5$ ). 그 결과, 세포 밀도가 높을수록 이합체 형성 속도는 빨라지지만 특이적 농축은 감소하였다. T cell과 APC의 비율은 다른 조건에 비해 영향을 덜 받았으나 일반적으로 1:2에서 가장 좋은 결과를 보였다. 종합하면, 최적의 결과는 1:2 T 세포: APC 비 및 웰당  $2 \times 10^5$  T 세포를 사용하여 2시간 동안 공동 배양함으로써 달성되었다(도 5).

#### [0097] [실험예 3] T 세포의 항원 민감도 평가

[0098] 항원 라이브러리의 크기를 결정하기 위해 T 세포의 항원에 대한 민감도를 알아보는 실험을 진행하였다. 모든 APC 중 특정 항원을 가진 APC의 비율을 0%, 0.1%, 1%, 10%에서 100%까지 다양화 하여 수행하고 관찰된 결과를 농축으로 표현하였다(도 6). 농축은 T 세포가 비특이적 항원을 가진 세포와 비교하여 특정 항원을 가진 세포와 얼마나 잘 반응하는지 보여준다. 그 결과, 특정 세포의 농축은 빈도에 관계없이 유사한 결과를 보였다. T 세포는 비특이적 APC보다 특정 APC에서 40-70배 더 잘 결합되었다. 이는 APC에 존재하는 특정 항원의 약 0.1%로 존재하더라도 검출 가능한 것으로 나타났다(도 6).

#### [0100] [실험예 4] T-세포 라이브러리 및 APC 라이브러리의 다중 이합체 형성 및 검출 평가

[0101] 2가지 유형의 T 세포와 2가지 유형의 APC를 함께 실험하여 도 7과 같이 라이브러리 대 라이브러리 조합에서도 특이적 이합체 형성 및 검출이 가능한지 알아보았다. OT-1 CD8+ T 세포 및 OVA<sub>257-264</sub> 제시 세포, P14 CD8+ T 세포 및 Gp<sub>33-41</sub> 제시 세포를 특이적 T 세포-APC 쌍으로 사용하였다. OT-1은 CTFR로, P14는 CTV로, OVA<sub>257-264</sub> 제시 세포는 PKH26으로 염색하고 GFP를 발현했다. Gp<sub>33-41</sub> 제시 세포는 염색되지 않지만 GFP 발현으로 구별할 수 있다. 실험은 상기 실험에 1과 동일하게 진행하였다. 공초점 현미경 이미지에서 각 유형의 T 세포는 특정 APC와 결합함을 확인하였다(도 7). 라이브러리 대 라이브러리 조합 상황에도 불구하고 T 세포가 특정 APC와 결합한다는 것이 분명히 확인되었다.

[0102] 또한, 저빈도 T 세포에서도 이합체의 정확한 조합을 감지할 수 있는지 확인하기 위해 모든 T 세포에서 각 T 세포의 비율을 0.1%에서 99.9%로 조정하고 각 웰에 배치하였다. 그 결과, 존재 비가 감소함에 따라 특이성이 증가하는 경향이 있었다(도 8). 각 APC는 특정 T 세포와 반응하여 다른 T 세포에 덜 접근할 수 있도록 하며, 이는 특정 APC와 이합체를 형성하는 속도를 증가시키는 것으로 생각되었다. 실제 유기체에서 우세한 T 세포 클론의 비율이 5% 미만임을 감안할 때 위의 결과는 이전 실험보다 더 유망한 것으로 간주될 수 있다. 위의 실험을 통해 우리 플랫폼이 실제 인간 면역 환경과 유사한 다양한 상황에서도 특정 TCR-APC 쌍을 생성하고 구별하는 데 사용할 수 있음을 검증하였다

#### [0104] [실험예 5] 마우스 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 모델에서의 항원-TCR 특이성 검출

[0105] 위의 실험을 통해 검증된 플랫폼을 실제 질병 모델에 적용하였다. 우리는 잘 연구되고 질병 관련 항원에 비교적 쉽게 접근할 수 있는 마우스 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 모델을 사용하였다. 먼저, LCMV 관련 항원 발현 세포를 구축하였다. 발표된 연구에서 우리는 11개의 고 반응성 LCMV 관련 항원을 선택하고 항원 서열을 얻었다(표 5). 우리는 11개의 서로 다른 항원 서열을 가진 올리고를 설계하고 조립하고 기존 렌티바이러스 벡터 플라스미드에 복제하였다.

표 5

[0106]

#	antigen	Sequence
1	Gp <sub>33-41</sub>	KAVYNFATC(서열번호 17)
2	Gp <sub>34-41</sub>	AVYNFATC(서열번호 18)
3	Gp <sub>118-125</sub>	ISHNFCNL(서열번호 19)
4	Gp <sub>276-286</sub>	SGVENPGGYCL(서열번호 20)
5	Np <sub>205-212</sub>	YTVKYPNL(서열번호 21)
6	Np <sub>238-248</sub>	SGYNFSLGAAV(서열번호 22)



7	Np <sub>396-404</sub>	FQPQNGQFI(서열번호 23)
8	Lp <sub>455-463</sub>	FMKIGAHP(서열번호 24)
9	Lp <sub>689-697</sub>	KFMLNVSYL(서열번호 25)
10	Lp <sub>2062-2069</sub>	RSIDFERV(서열번호 26)
11	OVA <sub>257-264</sub>	SIINFEKL(서열번호 27)

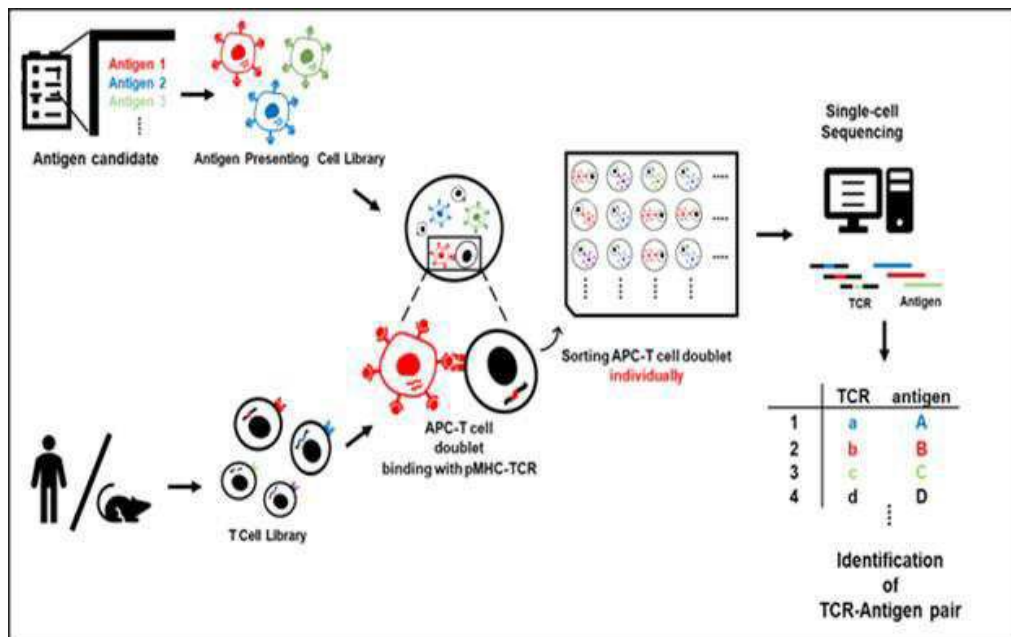
[0108] 또한, 우리는 반응하는 T 세포가 있는 APC와 동일한 개체로부터 얻은 1차 세포 및 세포주 간의 차이를 관찰하기를 원했다. 본 실험에서는 DC 2.4 세포주에 추가하여 마우스에서 얻은 BMDC(Bone-Marrowed Dendritic Cells)를 분화하여 항원 제시 세포의 숙주로 사용하였다 그 다음, DC 2.4 세포주에서 유래한 종인 LCMV에 감염된 C57BL/6 마우스로부터 LCMV 반응 T 세포를 준비하여 개체차가 아닌 항원에 의해서만 반응을 촉발시켰다. LCMV에 대한 T 세포가 충분히 풍부해지면 T 세포를 수확하고, 이중선 형성 실험에 사용하기 위해 CTFR로 염색하였다. APC는 GFP 발현으로 구별할 수 있기 때문에 별도로 염색하지 않았다. 준비된 T 세포와 APC는 이합체 형성을 위한 상술한 실험과 동일하게 공동 배양 실험을 하였다. 형성된 이합체를 분류하고 TCR-항원 서열 쌍을 얻기 위해 scRNA-seq로 분석하였다(도 9A). 그리고 준비된 각 APC가 준비된 T 세포를 사용하여 IFN- $\gamma$  분석에 의해 관련된 LCMV 인지 여부를 확인하였다(도 9B). 그 결과, APC가 LCMV 관련 항원을 발현하고, LCMV를 표적으로 하는 T 세포가 잘 증식하여 APC에 반응하여 활성화됨을 확인하였다(도 9B).

[0109] 마지막으로, LCMV 관련 APC 및 T 세포와 공동 배양 실험을 수행한 결과, DC 2.4 및 BMDC의 LCMV 관련 APC는 모두 대조군(OVA257-264 발현 세포)보다 현저한 이합체 형성 능력을 보였다(도 9C). 이것은 T 세포가 특정 항원에 대한 친화성 때문에 LCMV 관련 APC와 더 잘 결합함을 시사하였다.

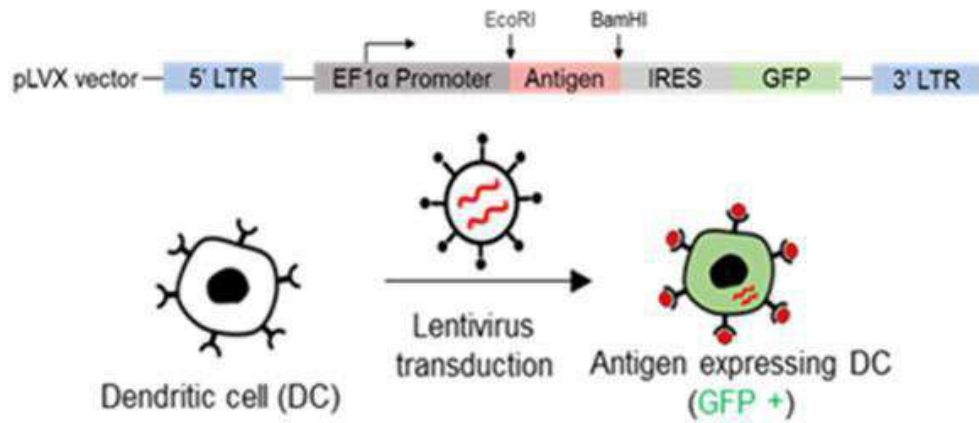
[0110] 그 다음, T 세포-APC 이합체를 96웰 플레이트로 웰당 하나씩 분류하고 smart-seq 3을 사용하여 scRNA-seq로 분석을 수행하였고, 그 결과, 여러 특이적 TCR-항원 쌍을 검출할 수 있었다(도 10).

## 도면

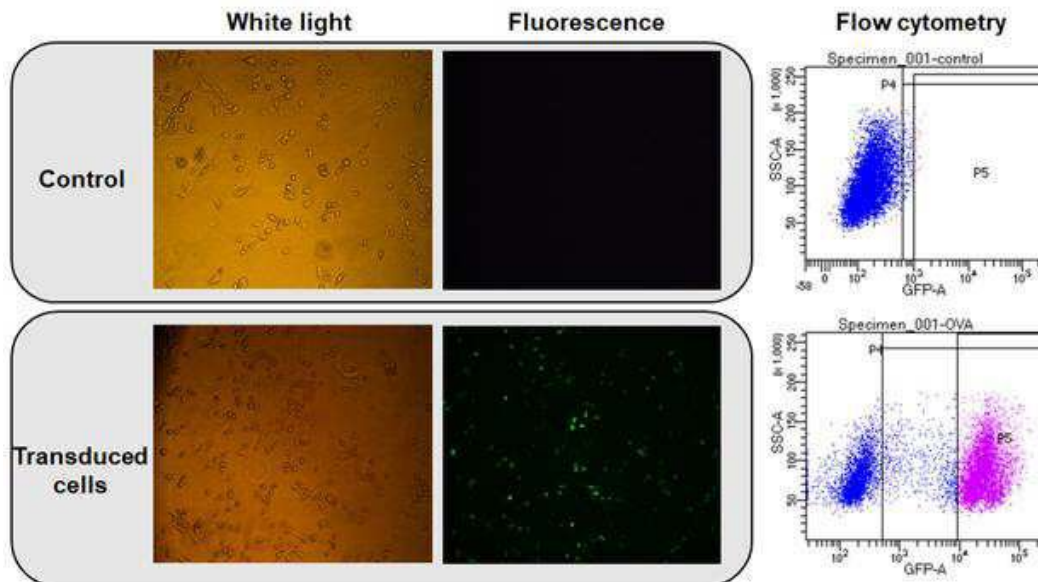
### 도면1



도면2

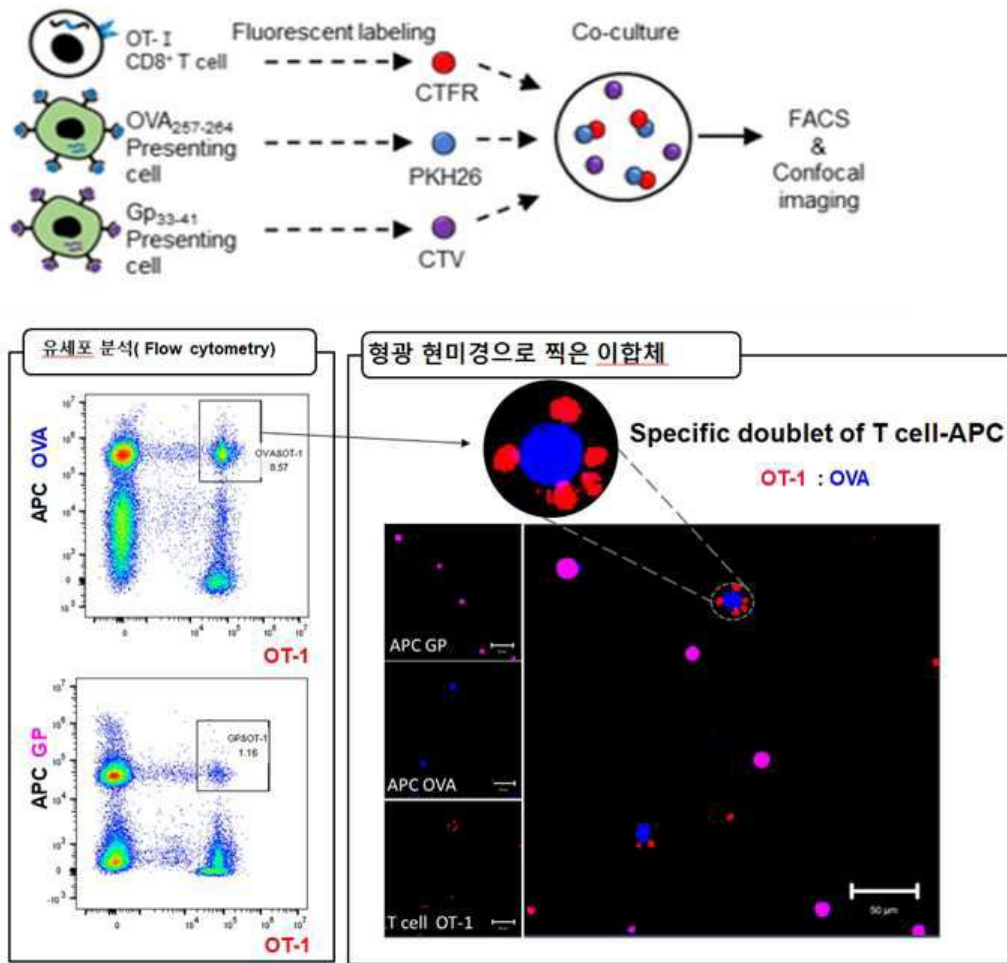


도면3

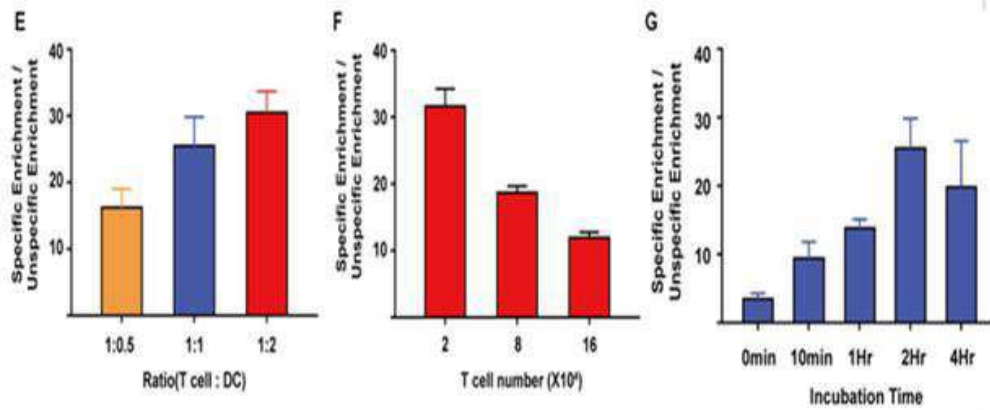




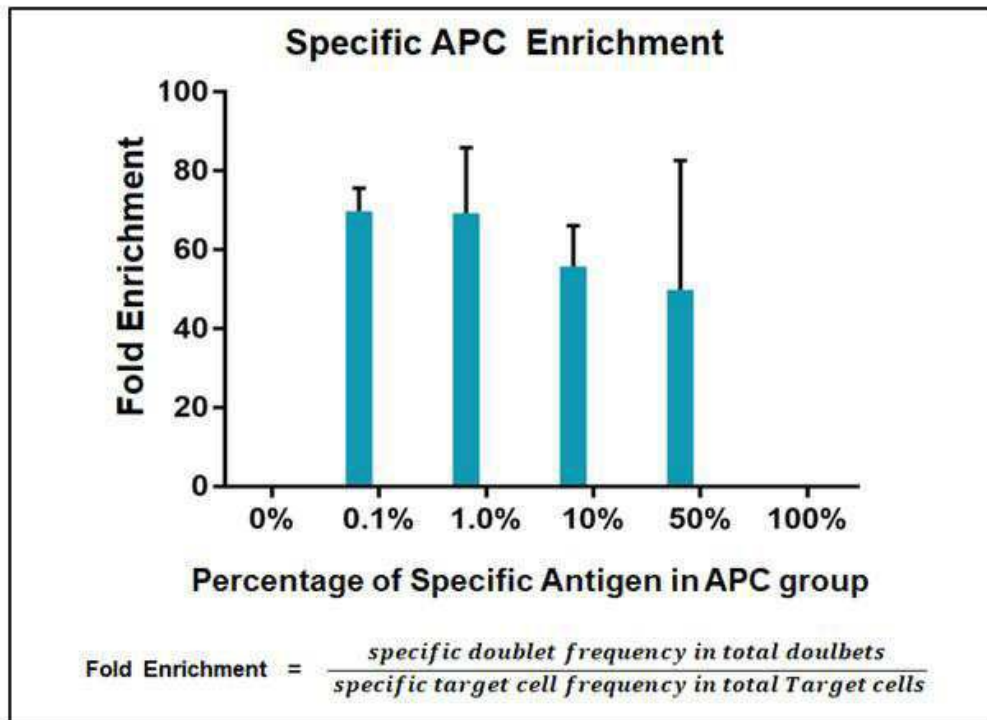
도면4



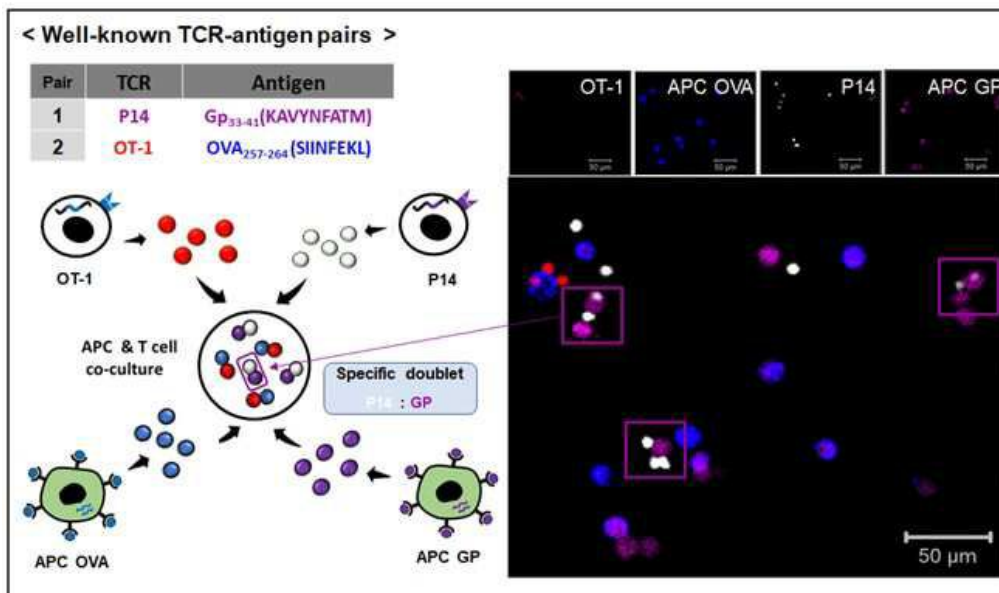
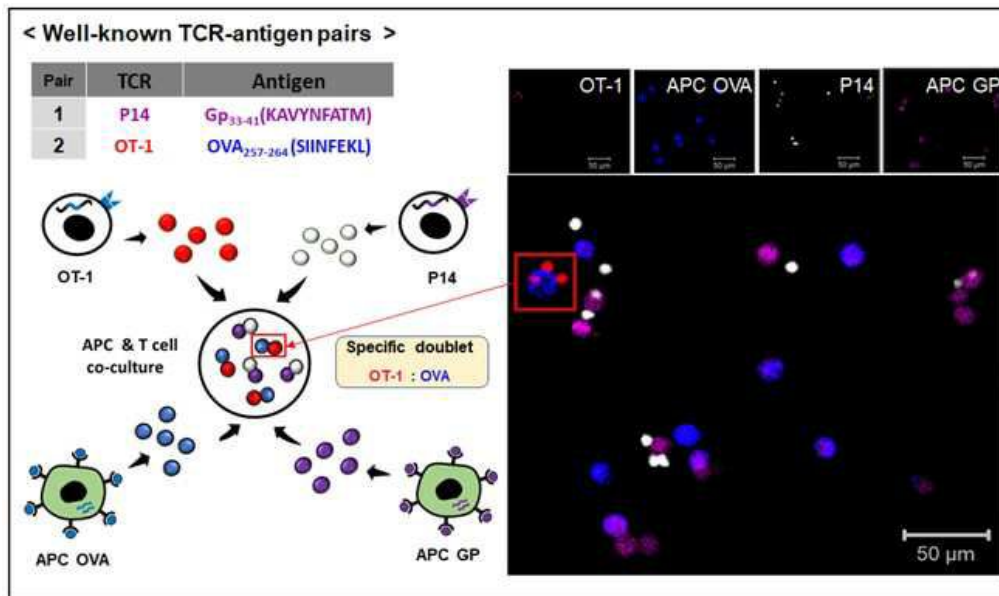
도면5



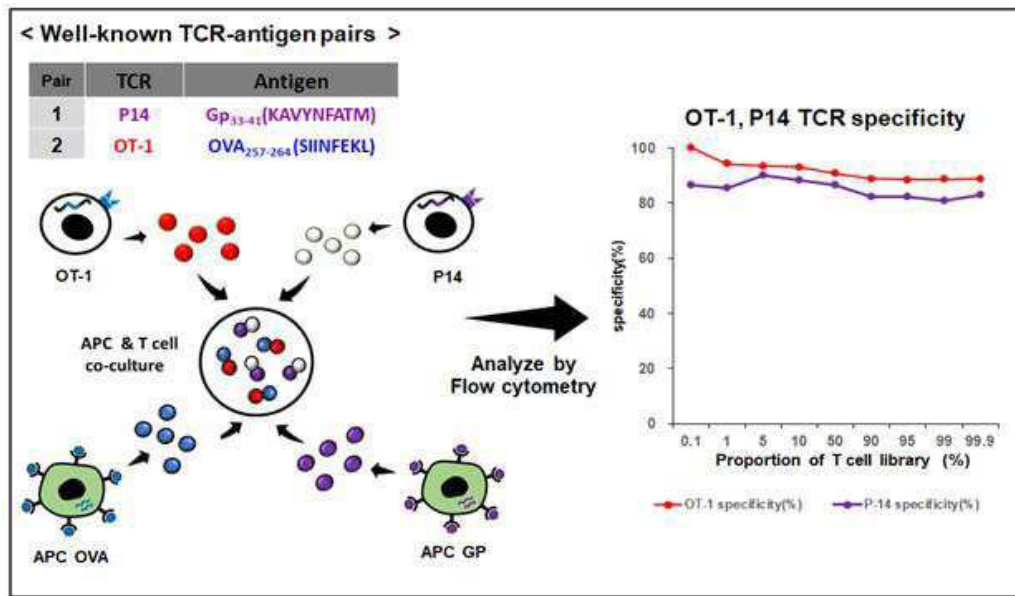
도면6



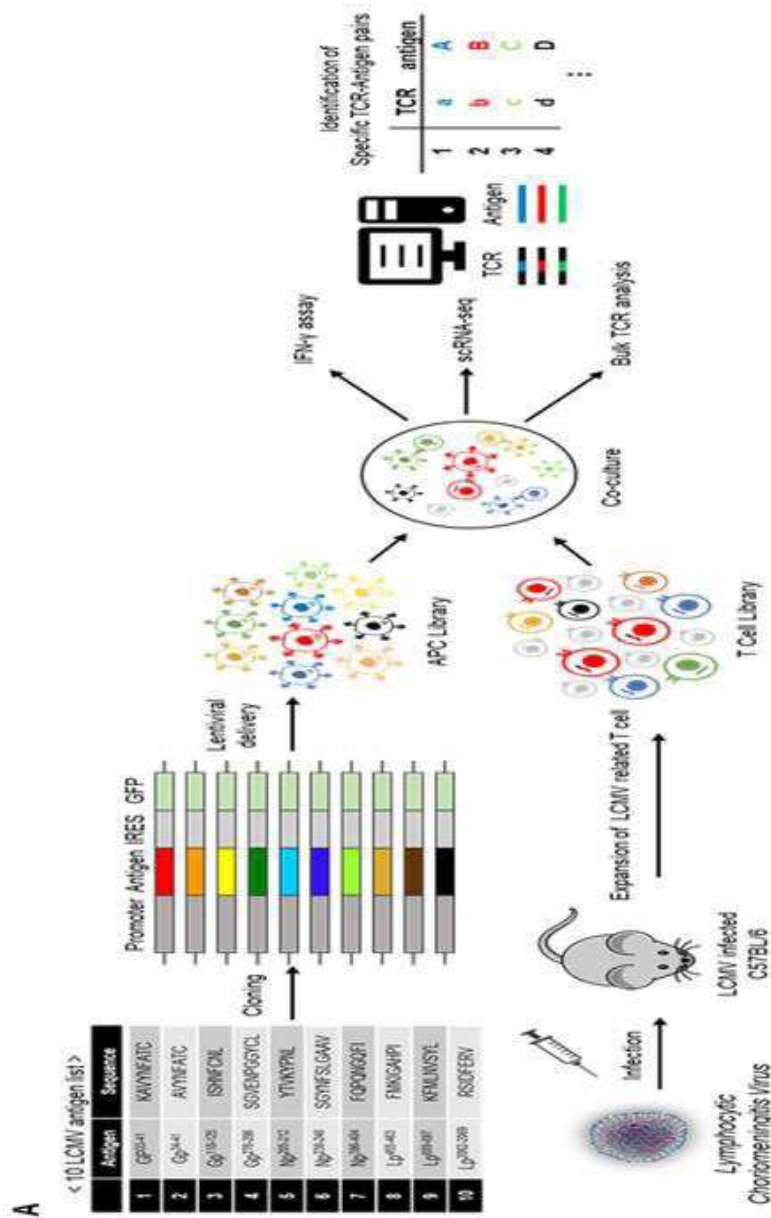
도면7



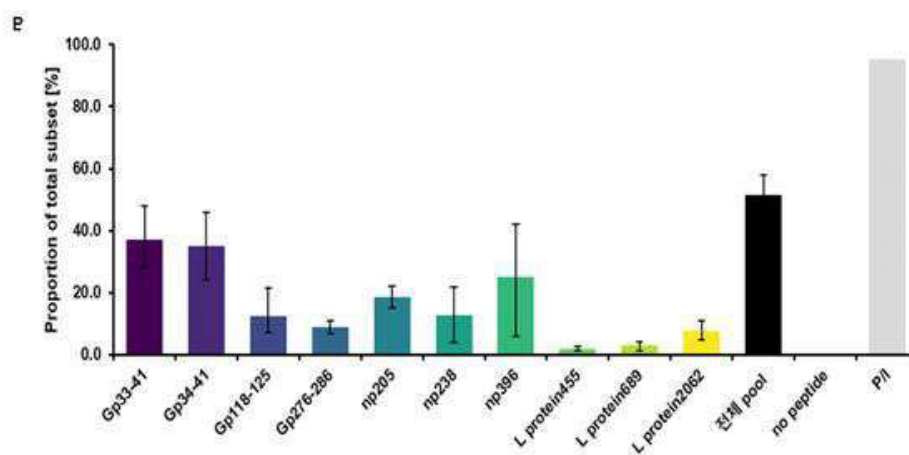
도면8



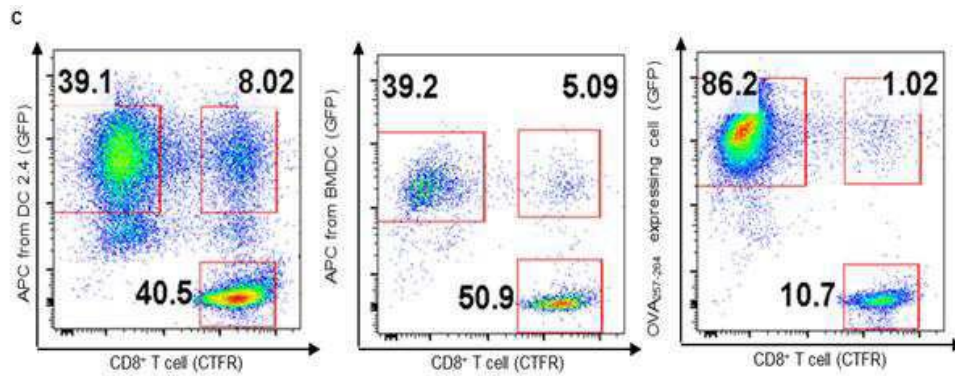
도면9a



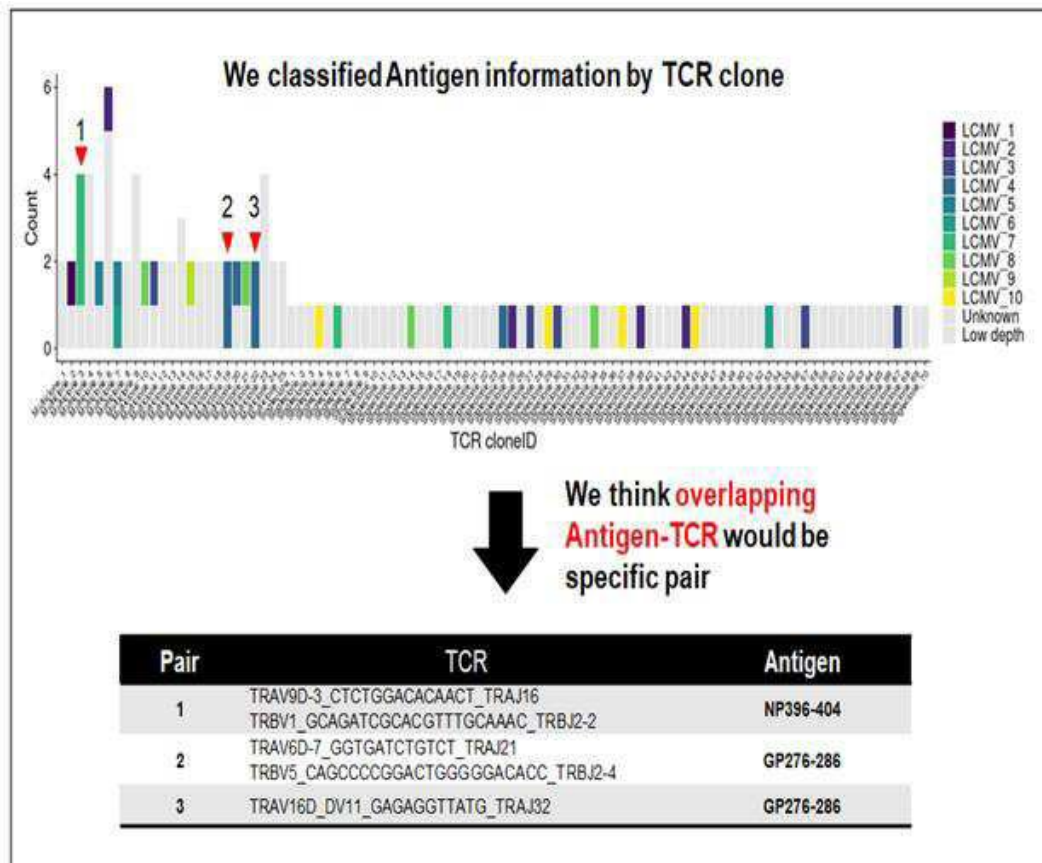
도면9b



도면9c



도면10



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A method for determining the specificity of a TCR-antigen using a single cell analysis
- <130> P21U16C1451
- <150> KR 10-2020-0136348
- <151> 2020-10-20

<160> 27

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amp\_giv\_fow primer

<400> 1

tacgcgtctg gaacaatcaa c 21

<210> 2

<211>

52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amp\_giv\_rev primer

<400> 2

catggacgag ctgtacaagt aaacgcgtct ggaacaatca acctctggat ta 52

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bb-gfp fwd primer

<400> 3

ttgccacaac ccacaaggag acgaccttcc atggtgagca agggcgag 48

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bb-gfp rev primer

<400> 4

aaggagacga ccttcc 16

<210> 5

<211> 30

<212> DNA\_RNA



<213> Artificial Sequence

<220><223> Template Switching Oligo (TSO)

<220><223> 3' terminal three G : riboguanosine(rGrGrG)

<400> 5

aagcagtggg atcaacagag tgaacgtggg 30

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SMART PCR Primer

<400> 6

aagcagtggg atcaacgcag agt 23

<210> 7

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> barcode 1

<400> 7

actcgt 6

<210> 8

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> barcode 2

<400> 8

tagtcc 6

<210> 9

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> barcode 3

<400> 9

ctatgc 6

<210>	10	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	barcode 4	
<400>	10	
catacg		6
<210>	11	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	barcode 5	
<400>	11	
tgactc		6
<210>	12	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	barcode 6	
<400>	12	
attgcg		6
<210>	13	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	barcode 7	
<400>	13	
gcaatg		6
<210>	14	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	barcode 8	
<400>	14	

gtgact	6
<210> 15	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> illumina P5 index primer	
<400> 15	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacacn nnnnnnnaca ctctttccct acacgacgt	60
cttcgatct	70
<210> 16	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> illumina P7 index primer	
<400> 16	
caagcagaag acggcatacg agatnnnnnn nngtgactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 17	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Gp33-41	
<400> 17	
Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys	
1 5	
<210> 18	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Gp34-41	
<400> 18	
Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys	
1 5	

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gp118-125

<400> 19

Ile Ser His Asn Phe Cys Asn Leu

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gp276-286

<400> 20

Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Leu

1 5 10

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Np205-212

<400> 21

Tyr Thr Val Lys Tyr Pro Asn Leu

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Np238-248

<400> 22

Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Gly Ala Ala Val

1 5 10

<210> 23

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Np396-404  
 <400> 23

Phe Gln Pro Gln Asn Gly Gln Phe Ile  
 1 5

<210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Lp455-463  
 <400> 24

Phe Met Lys Ile Gly Ala His Pro Ile  
 1 5

<210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Lp689-697  
 <400> 25

Lys Phe Met Leu Asn Val Ser Tyr Leu

1 5  
 <210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Lp2062-2069  
 <400> 26

Arg Ser Ile Asp Phe Glu Arg Val

1 5  
 <210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OVA257-264

<400> 27

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1

5