



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0166086
(43) 공개일자 2022년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2563/179 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0074968

(22) 출원일자 2021년06월09일
심사청구일자 2021년06월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
김기태

서울특별시 광진구 아차산로 431, 103동 202호(구의동, 강변에스케이뷰)

조윤정

서울특별시 성북구 삼선교로16길 35, 106동 1303호(삼선동3가, 삼선 SK VIEW 아파트)

(74) 대리인

특허법인 무한

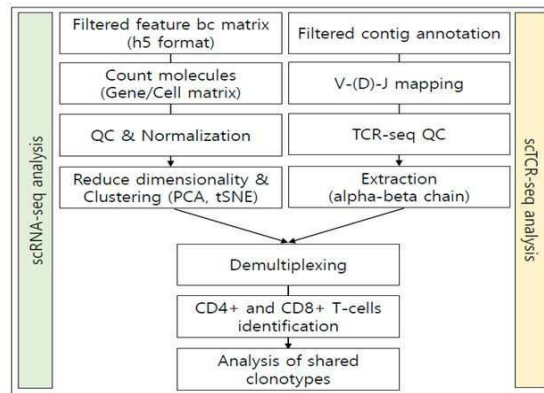
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 정밀의료를 위한 개인 맞춤형 면역 CD4+/CD8+ T-세포간 공유 클로노타입 분석 파이프라인

(57) 요약

본 발명은, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입(clonotype)을 이용한, 암, SARS, MERS, 인플루엔자 감염 및 COVID-19 등을 포함한 질병의 분류 방법 및 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법이 제공된다. 본 발명에 따르면, 기존 분석법으로는 측정할 수 없는 새로운 유전체 특성을 파악하는 것이 가능하며, 다양한 질병에서 기존 분석법이 제시하지 못한 새로운 유전체 바이오 마커를 제시하는 것이 가능하다. 또한, 암 치료제, COVID-19 등 면역 반응과 관계된 다양한 신약 개발에 사용될 수 있다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병 분류 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 질병은 암, SARS, MERS, 인플루엔자 감염 또는 COVID-19 인 것을 특징으로 하는, 질병 분류 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 질병 분류 방법은,

- a) 질병을 갖는 개체들로부터 분리한 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 대상으로 단일세포 RNA 시퀀싱(scRNA sequencing)을 수행하여 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 추출하는 단계;
 - b) 단일세포 T세포 수용체 시퀀싱(scTCR sequencing)을 수행하고, 단일세포 T세포 수용체의 바코드와 상기 단계 a) 에서의 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 비교하여, 서로 일치하는 바코드를 검출한 후, T세포 수용체(TCR) 서열을 추출하는 단계;
 - c) 추출된 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 TCR 서열 중 제3 상보성 결정 부위(CDR3) 서열을 비교하고, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입(clonotype)을 도출하는 단계; 및
 - d) 도출된 공유 클로노타입을 질병에 따라 분류하여 이들 간의 빈도 분포를 측정하는 단계;
- 를 포함하는, 질병 분류 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 단계 d) 이후, 측정된 빈도 분포를 정상 대조군의 것과 비교하는 단계를 추가적으로 포함하는, 질병 분류 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 단계 d) 에서의 빈도를 측정하는 단계는 세포 내 공유 클로노타입의 빈도 분포를 측정하는 것을 특징으로 하는, 질병 분류 방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 단계 c) 이후, 단계 c) 에서 도출된 공유 클로노타입이 만들어내는 아미노산의 분포를 분석하여 공유 클로

노타입의 특성을 파악하는 과정을 시행하는 단계를 포함하는, 질병 분류 방법.

청구항 7

CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 질병은 암, SARS, MERS, 인플루엔자 감염 또는 COVID-19 인 것을 특징으로 하는, 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법은,

- A) 질병 의심 개체로부터 분리한 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 대상으로 단일세포 RNA 시퀀싱(scRNA sequencing)을 수행하여 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 추출하는 단계;
- B) 단일세포 T세포 수용체 시퀀싱(scTCR sequencing)을 수행하고, 단일세포 T세포 수용체의 바코드와 상기 단계 A)에서의 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 비교하여, 서로 일치하는 바코드를 검출한 후, T세포 수용체(TCR) 서열을 추출하는 단계;
- C) 추출된 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 TCR 서열 중 제3 상보성 결정 부위(CDR3) 서열을 비교하고, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입(clonotype)을 도출하는 단계;
- D) 질병 의심 개체의 상기 도출된 공유 클로노타입의 빈도를 측정하는 단계; 및
- E) 상기 측정한 빈도를 정상 대조군의 것과 비교하는 단계;

를 포함하는, 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단일 세포 시퀀싱 기술을 이용한 유전체 데이터 분석 방법에 대한 것이며, 보다 상세하게는 개인 면역 T세포의 특성을 이용한, 질병의 분류 방법 및 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] COVID-19 은 이전에 중증급성호흡기증후군(SARS), 중동호흡기증후군(MERS), 인플루엔자 감염과 마찬가지로 심각한 임상적 결과를 동반한다. 일반적으로 숙주의 면역 반응은 외부 바이러스 항원에 대한 macrophage와 pro-inflammatory cells의 방어 작용을 통해 결정된다고 알려져 있다. 적응형 면역 체계는 바이러스에 감염된 세포를 제거할 수 있는 T세포와 바이러스 특이 항체를 생성하는 B 세포로 구성되어 있다. 특히, T세포는 친염증 반응을 유도하는 케모카인(chemokines)과 다른 사이토카인(cytokines)을 생산하면서 적응성 및 선천성 면역 반응의 시작을 담당하고 있다. 선천성 및 적응성 면역 세포에서 협력적 대응은 바이러스에 대한 신속한 방어로 이어질 수 있는 반면, 실패한 면역 반응은 사이토카인 폭풍(cytokine storm)을 일으키며 환자에게 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 최근의 연구는 COVID-19, SARS, MERS 가 같은 바이러스 그룹에 속함에도 불구하고, 확산 속도와 치료 그리고 사망률의 차이가 있음을 강조하고 있다. 게다가, 이러한 차이는 질병과 관련된 주요 면역주체들

과 근원적인 분자 메커니즘의 차이가 그 원인일 수 있다. 하지만 COVID-19 의 면역 반응에 대한 학계의 지식은 여전히 부족하며, 바이러스의 강한 전염성과 높은 치사율에 반해 확립된 치료법이 부재하다는 점은 매우 중요한 문제를 야기하고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) (1) Nan-ping Weng 외 12, TCR β repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition, J leukoc Biol. 2016 Mar; 99(3): 505-513.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 종래 단일 세포 시퀀싱을 이용한 면역계 연구는 CD4+ T세포와 CD8+ T세포가 가진 개별 클로노타입(clonotype)의 기본적인 분포 차이만을 중심으로 분석이 이루어져 왔다. 그러나, 다양한 일반인/환자군 단일세포 시퀀싱 데이터를 통해 살펴본 바로는 CD4+ T세포와 CD8+ T세포가 각각 고유한 역할을 가지고 있음에도 불구하고, 공유되는 클로노타입이 있다는 현상적인 결과가 있으나, 이에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 본 발명자들은 CD4+ T세포와 CD8+ T세포의 공유 클로노타입이 개인 면역 체계 구성과 외부 항원에 대한 면역반응에 대해 매우 중요한 역할을 할 것이라 생각하여 이에 맞는 분석 방법을 설계하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 본 발명의 목적은 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병의 분류 방법 및/또는 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

- [0009] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병 분류 방법이 제공된다.
- [0013] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입(clonotype)을 이용한 질병의 분류 방법 및 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법은, 기존 분석법으로는 측정할 수 없는 새로운 유전체 특성을 파악하는 것이 가능하며, 다양한 질병에서 기존 분석법이 제시하지 못한 새로운 유전체 바이오 마커를 제시하는 것이 가능하다. 나아가, 최종적으로는 암 치료제, COVID-19 등 면역 반응과 관계된 다양한 신약 개발에 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1 은 본 발명의 일 실시예에 따른 공유 클로노타입 도출 및 분석 파이프라인을 나타낸 도면이다.
- 도 2 는 COVID-19 환자로부터 추출한 BALF 조직의 단일 세포 전사체(single-cell transcriptomes)를 나타낸 도면이다.
- 도 3 은 CD4+ 및 CD8+ T세포에서 공유 클로노타입의 frequency 비교를 나타낸 도면이며, box plot 은 (A) CD4+ T세포 및 (B) CD8+ T세포에서 공유 클로노타입의 비율 분포를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0020] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0021] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0022] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0024] - 질병의 분류 방법
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병 분류 방법이 제공된다.
- [0026] 상기 질병 분류 방법은 특정 질병에 따른 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입의 발현을 도출함으로써, 상기 공유 클로노타입을 통해, 질병을 분류할 수 있다는, 기존에 존재하지 않았던 새로운 관점의 방법을 제시하는 특징이 있다.
- [0027] 구체적으로, 상기 질병 분류 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0028] a) 질병을 갖는 개체들로부터 분리한 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 대상으로 단일세포 RNA 시퀀싱(scRNA sequencing)을 수행하여 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 추출하는 단계;
- [0029] b) 단일세포 T세포 수용체 시퀀싱(scTCR sequencing)을 수행하고, 단일세포 T세포 수용체의 바코드와 상기 단계 a)에서의 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 비교하여, 서로 일치하는 바코드를 검출한 후, T세포 수용체(TCR) 서열을 추출하는 단계;
- [0030] c) 추출된 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 TCR 서열 중 제3 상보성 결정 부위(CDR3) 서열을 비교하고, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입(clonotype)을 도출하는 단계; 및
- [0031] d) 도출된 공유 클로노타입을 질병에 따라 분류하여 이들 간의 빈도 분포를 측정하는 단계.
- [0032] 이 경우, 상기 특정 질병의 예로서는, 면역세포에 대한 싱글셀 시퀀싱 분석방법을 필요로 하는 모든 질병이 해당될 수 있으나, 바람직하게는 암, SARS, MERS, 인플루엔자 감염 또는 COVID-19 등이 해당될 수 있다. 또한, 상기 개체는 상기 나열한 예시한 질병을 갖는 개체이면, 인간을 포함한 포유류와 같은 동물 뿐만 아니라, 인간을 제외한 개체 등도 제한없이 포함될 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 단계 a)에서의 세포 바코드는 개체 내에서 개별 세포를 구분할 수 있는 표지자를 의미하며, 상기

단계 d) 에서의 빈도를 측정하는 단계는 세포 내 공유 클로노타입의 빈도 분포를 측정하는 것일 수 있고, 상기 단계 d) 이후, 측정한 빈도 분포를 정상 대조군의 것과 비교하는 단계를 추가적으로 포함할 수도 있다.

[0034] 또한, 상기 단계 c) 이후, 단계 c) 에서 도출된 공유 클로노타입이 만들어내는 아미노산의 분포를 분석하여 공유 클로노타입의 특성을 파악하는 과정을 시행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0035] 클로노타입은 일종의 시퀀스 일부로서 최종적으로 단백질로 환원되고, 이 때 클로노타입의 종류에 따라 환원되는 단백질(아미노산)들의 조합은 달라지게 되는데, 상기 도출된 공유 클로노타입이 만들어내는 아미노산의 분포를 분석하여 공유 클로노타입의 특성을 파악하는 과정을 시행하는 단계는, 조합 내에서 특정 아미노산이 어느 정도로 우세하게 분포하는지를 비교하는 작업을 수행하고 추가적으로 기준에 보고된 에피토프와 관련된 아미노산 조합과 개별 Shannon's entropy 를 이용하여 유사성을 예측하는 작업에 해당될 수 있다.

[0037] - 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입을 이용한 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법이 제공된다.

[0039] 상기 질병 의심 개체의 질병 정보 제공 방법은 구체적으로, 하기의 단계를 포함할 수 있다:

[0040] A) 질병 의심 개체로부터 분리한 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 대상으로 단일세포 RNA 시퀀싱(scRNA sequencing)을 수행하여 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 추출하는 단계;

[0041] B) 단일세포 T세포 수용체 시퀀싱(scTCR sequencing)을 수행하고, 단일세포 T세포 수용체의 바코드와 상기 단계 A) 에서의 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 세포 바코드를 비교하여, 서로 일치하는 바코드를 검출한 후, T세포 수용체(TCR) 서열을 추출하는 단계;

[0042] C) 추출된 CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 TCR 서열 중 제3 상보성 결정 부위(CDR3) 서열을 비교하고, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입(clonotype)을 도출하는 단계;

[0043] D) 질병 의심 개체의 상기 도출된 공유 클로노타입의 빈도를 측정하는 단계; 및

[0044] E) 상기 측정한 빈도를 정상 대조군의 것과 비교하는 단계.

[0045] 상기 질병 의심 개체의 면역 반응 관련 정보 제공 방법은, 상기 단계 A) 내지 E) 를 포함함으로써, CD4+ 및 CD8+ T세포의 공유 클로노타입의 빈도를 파악하고, 이를 통해, 특정 질병 의심 개체를 정상 대조군과 구분하여, 특정 질병을 갖는 환자를 진단할 수 있다.

[0046] 이 경우, 상기 질병의 구체적인 예로서는, 앞서 기술한 바와 같이, 암, SARS, MERS, 인플루엔자 감염 또는 COVID-19 등에 해당할 수 있다.

[0047] 한편, 상기 공유 클로노타입의 빈도를 파악하는데 있어서, 통계적 유의성 확보를 위해 군별 통계테스트를 시행하여 유의성을 추출할 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 통계 테스트는 아노바 테스트 또는 T-test 를 이용하여 통계적으로 차이 여부 등을 확인할 수 있다.

[0048] 또한, 공유 에피토프 분석을 위해 기준에 보고된 항원 정보를 이용하여 최대 매칭된 에피토프를 도출하는 것 또한 가능하며, 여기서 기준에 보고된 항원정보는 VDJdb 또는 IEDB 데이터 베이스에 공개된 정보를 의미하며, 상기 데이터 베이스에는 CDR3 시퀀스, 아미노산 모티프, 에피토프 서열, 질병 등에 대한 기준에 발견된 항원에 대응하는 에피토프의 정보가 수록되어 있고, 이를 활용하여 도출된 공유 클로노타입과 직접적으로 보고된 에피토프의 유사성이 있는지, 또는 유사성이 가장 큰 에피토프가 존재하는지를 확인하여, 이를 신약 후보 물질 마커 선정에 사용할 수 있다.

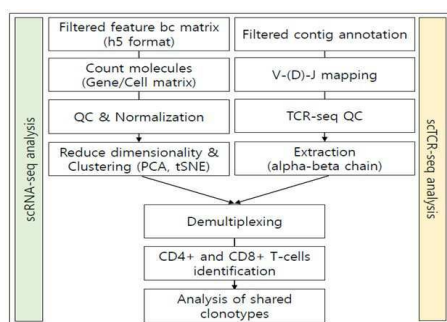
[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] <실시예>

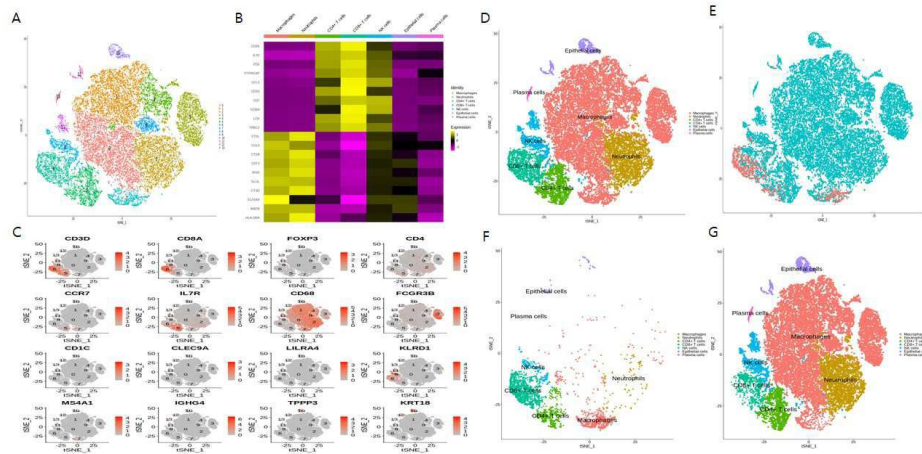
- [0053] 본 실험에서는 단일 세포 시퀀싱을 사용하여 9 명의 COVID-19 환자로부터 추출된 BALF 조직을 통해 개별 세포의 유전체적 특성을 프로파일링하고 천여개의 CD4+ 및 CD8+ T-세포에 집중하여 분석을 진행하였다. 대조군과의 비교를 위해 COVID-19 환자가 아닌 사람의 혈액 및 기관지 표본을 사용하였다.
- [0054] 이를 통해, 세 그룹(대조군, Moderate, Severe) 모두에서 일부 공유 클로노타입 유형을 발견하였으며, 비록 대조군과 COVID-19 환자에서 CD4 과 CD8 T세포의 공유 클로노타입을 가진 세포의 수는 통계적으로 차이가 없으나, 중증(Severe) COVID-19 환자는 대조군이나 경증(Moderate) COVID-19 환자보다 CD8+ T세포에서 공유 클로노타입의 발생 빈도가 높았다(도 3 참조). 특히 중증 COVID-19 환자에서 세포독성 T세포의 공유 클로노타입은 약 8%로 다른 그룹보다 높은 비율로 존재하는 것을 확인하였다. 공유 클로노타입 발생의 높은 비율은 중증 환자에서 미접촉(naive) T세포의 반응성 감소를 초래한다고 볼 수 있으며, 미접촉 T세포의 반응 감소는 사이토카인 폭풍과 같은 과도한 염증 반응에 기여할 수 있다. 이처럼 세포 독성 T세포에서 공유 클로노타입이 많다는 것은 치명적 바이러스에 대응하는 환자의 면역체계를 약화시키는 원인으로 해석될 수 있다.
- [0055] 또한, 공유 클로노타입에 대응하는 에피토프(epitope)도 예측하였으며, 중증 COVID-19 환자의 공유 클로노타입만이 HIV, 인플루엔자-A 및 SARS-CoV-2 를 포함한 중요 바이러스와 연관성이 있는 것으로 예측되었다.
- [0057] 상기 실시예의 결과는, COVID-19 환자의 CD4 와 CD8 T세포 간 공유 클로노타입의 특성에 대한 새로운 관점을 제시하며, 이는 단순히 공유 클로노타입이 우연히 발견된 것이 아니라 특정 질병의 면역 반응과 깊은 관계가 있다는 점을 의미한다. 또한 항바이러스성 면역 메커니즘의 심각한 결과를 설명하는데 도움을 주고 앞으로의 백신개발과 중증 환자 치료에도 사용될 수 있는 있음을 시사한다.
- [0059] 이상과 같이 실시예가 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0060] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1



도면2



도면3

