



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0010849
(43) 공개일자 2022년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0089464
(22) 출원일자 2020년07월20일
심사청구일자 2020년07월20일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
강원도 춘천시 삭주로 77
김봉준
강원도 춘천시 교동길 50
윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8
(74) 대리인
특허법인본

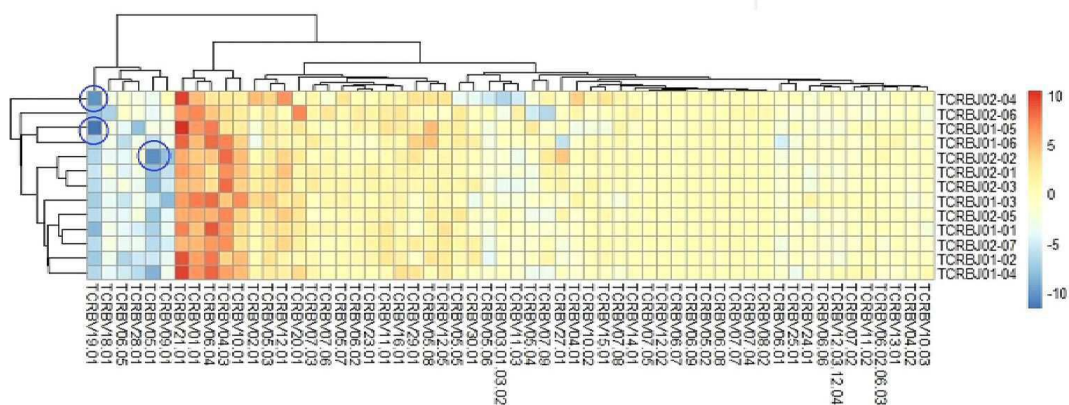
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **중증 지주막하출혈 진단용 조성물**

(57) 요약

T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β)의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성을 모니터링 할 수 있는 제제를 포함하는 중증 지주막하출혈 진단용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/191 (2013.01)

C12Q 2537/143 (2013.01)

G01N 2800/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R-20190315-004075
과제번호	R-20190315-004075
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	정보통신산업진흥원
연구사업명	민간지능정보서비스 확산
연구과제명	AI와 유전체를 활용한 지능형 뇌졸중 판독 시스템과 휴대용 경동맥 초음파 기기 세
트 개	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2019.05.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 상보성 결정 영역 CDR3의 레퍼토리를 모니터링할 수 있는 제제를 포함하는 중증 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 상보성 결정 영역 CDR3의 길이가 증가하면, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단하는, 중증 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 상보성 결정 영역 CDR3의 길이는 15개 내지 78개의 아미노산 범위이고, 중증 지주막하출혈이 발병한 경우 45개에서 피크인, 중증 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성을 분석하여 중증 지주막하출혈의 발병을 판단하는, 중증 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성이 (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04)에서 가장 많이 감소한 경우, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단하는 중증 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 6

제5항의 조성물을 포함하는, 중증 지주막하출혈 진단용 키트.

청구항 7

T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성이 (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04)에서 가장 많이 감소한 경우, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단하는, 중증 지주막하출혈 진단용 바이오 마커.

청구항 8

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β 의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성을 모니터링하는 단계를 포함하고, 상기 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성이 (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04)에서 가장 많이 감소한 경우, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단하는, 중증 지주막하출혈의 진단을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 상보성 결정 영역 CDR3의 레퍼토리를 모니터링하는 중증 지주막하출혈 진단 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] T 세포는 표면 발현에 따라 T 세포 수용체 (TCR) α 및 β 사슬과 TCR γ 및 δ 사슬의 두 그룹으로 분류된다. 말초 혈액에서 대략 90% ~ 95% 인 대부분의 T 세포는 α 및 β 사슬을 암호화한다. 모든 사슬은 가변 (variable, V) 영역, 일관된 (consistent, C) 영역, 세포질 및 막 횡단도메인으로 구성된다. TCR α 및 β 사슬의 V 영역은 3 개의 상보성 결정 영역 (CDR), CDR1, CDR2 및 CDR3을 갖는다. 그 중 CDR3은 가장 가변적인 영역이며, TCR의 항원 결합 특이성과 관련이 있다. 한편, CDR3은 Variable (V), Diversity (D) 및 Joining (J) 유전자 세그먼트의 무작위 체세포 재조합에 의해 고유한 TCR을 나타낸다. 지난 몇 년 동안 면역 질환 또는 암 면역 요법과 같은 다양한 질병에서 면역 T 세포 시그니처를 식별하기 위한 TCR 시퀀싱이 수행되었다. 질병, TCR 시퀀싱은 심혈관 면역 미세 환경 및 질병 병인을 모니터링 하는데도 가능했다. 한편, 적응성 면역 반응은 병원체에 대한 T 세포 표면상의 다양한 수용체에 의해 작용된다. 따라서, T 세포 수용체 (TCR) 레퍼토리의 식별은 숙주의 면역 반응을 모니터링하는데 사용될 수 있다. TCR 레퍼토리의 특성화는 일반적으로 면역 요법을 받은 암 또는자가 면역 질환 환자에서 숙주 적응 면역 반응을 위해 수행되어왔다(PLoS Comput Biol. 2019;15:e1006874). 신경아 교종의 α - 및 β - 사슬의 서열화된 TCR은 비-신 생물 조직보다 종양과 관련된 보다 다양한 VJ- 독립 레퍼토리를 보여 주었다. 또한, 글루코 코르티코이드로 치료 한 전신성 홍 반성 루푸스 (SLE) 환자에서 TCR 레퍼토리와 증상 완화 사이의 연관성에 관한 연구도 있으며, 이러한 연구에서는 TCR 보완 결정 영역 (CDR) 3의 모니터링이 SLE의 예후와 관련되어 치료 효능의 거울을 제안했다(Medicine (Baltimore). 2017;96:e9022). T 세포는 또한 죽상 동맥 경화증에 적극적으로 관여한다. 포크 헤드 박스의 후성 유전적 억제가 조절 T 세포의 감소와 관련되어 죽상 동맥 경화증의 위험을 증가시킨다고 보고했다(Atherosclerosis. 2013;228:346-352). 또한, T 세포는 플라크 파괴의 개시에 관여한다.

[0003] 한편, 가장 심각한 출혈성 뇌졸중 중 하나인 지주막하 출혈 (SAH)은 여전히 높은 사망률 (20 % 이상) 신경계 장애이다. 그러나, SAH 이후에 적응성 면역 반응은 잘 연구되지 않았다.

[0004] 이에 본 발명자들은 T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 상보성 결정 영역 CDR3의 레퍼토리 모니터링을 통해, SAH 환자에서 중증도 (severity)에 T 세포 면역학의 더 나은 이해를 제공할 수 있음은 발견하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-20020089453호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 지주막하출혈(subarachnoid hemorrhage, SAH)에서의 적응 면역 반응에 대한 것으로, T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 상보성 결정 영역 CDR3의 레퍼토리 모니터링을 통해, SAH 환자에서 중

증도 (severity)에 T 세포 면역학의 더 나은 이해를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따르면, T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 상보성 결정 영역 CDR3의 레퍼토리를 모니터링 하는 지주막하출혈 진단용 바이오 마커가 제공된다.

[0010] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "지주막하 출혈(subarachnoid hemorrhage, SAH)"은 뇌의 지주막 아래 공간에 뇌출혈이 일어나는 질환을 의미하는 것으로서, 뇌동맥류 파열과 같은 심각한 원인이 있을 수 있고, 이 외에도 뇌혈관의 기형이나 외상 등에 의해서 지주막하 공간에 출혈이 발생하는 모든 경우를 의미하는 것일 수 있다. 본원에서, 상기 "지주막하 출혈"은 "SAH"와 혼용되어 명명될 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 상보성 결정 영역 CDR3의 길이가 증가하면, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단할 수 있다.

[0012] 또한, 상기 상보성 결정 영역 CDR3의 길이는 15개 내지 78개의 아미노산 범위이고, 중증 지주막하출혈이 발병한 경우 45개에서 피크일 수 있다.

[0013] 한편, 상기 T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β -chain)의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성을 분석하여 중증 지주막하출혈의 발병을 판단할 수 있다.

[0014] 이때, 상기 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성이 (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04)에서 가장 많이 감소한 경우, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단할 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, T 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β)의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성을 모니터링 할 수 있는 제제를 포함하는 중증 지주막하출혈 진단용 조성물이 제공된다.

[0016] 이때, 상기 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성이 (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04)에서 가장 많이 감소한 경우, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단할 수 있다.

[0017] 아울러, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 조성물을 포함하는 중증 지주막하출혈 진단용 키트가 제공된다.

[0018] 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 세포 수용체 베타 사슬(T cell receptor β)의 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 클론성을 모니터링하는 단계를 포함하는 중증 지주막하출혈 진단을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

[0019] 이때, 상기 TCRB V-J쌍의 유전자 조각 (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04)에서 가장 많이 감소한 경우, 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 중증 지주막하출혈 진단용 바이오 마커에 따라 TCRB CDR3 레퍼토리를 모니터링하면 적응성 면역 반응을 더 잘 이해할 수 있고 치료 목표에 사용될 수 있는 이점이 있다.

[0021] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자가 명확하게 이해될 수 있을 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 경증 및 중증의 지주막하 출혈(SAH) 중증도에 따른 TCRB 클론성 (A) 및 CDR3 길이(B) 레퍼토리를 나타낸 것이다.

도 2는 입원 일과 추적 관찰 사이에 각 환자에서 TCRB CDR3 서열을 정량화한 것이다.

도 3은 지주막하 출혈 환자에서 TCRBV 유전자(A)와 TCRBJ 유전자(B)의 독특한 clonotypes의 분포와 변화를 나타낸 것이다.

도 4는 경증 환자와 중증환자의 SAH 심각도에 따른 평균 TCRB V-J 유전자 이용률 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0024] 본 명세서에 있어서, T 세포는 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) -TCR 복합체를 통해 항원을 인식하는 것으로, TCR 레퍼토리는 주로 α 및 β 체인의 다양성에 의존한다. 체인의 CDR의 초 가변 영역(hypervariable regions) 중에서 CDR3은 다양성으로 인해 고 처리량 면역 시퀀싱을 목표로 하고 있다.
- [0025] 본 발명자들은 SAH 환자에서 T 세포의 적응 면역을 이해하기 위해 TCRB CDR3 레퍼토리의 구성과 변형을 탐구했다. TCRB CDR3 레퍼토리는 질병 중증도에 따라 역동적인 성질을 나타냈다. 중증 SAH 환자는 아미노산의 CDR3 길이가 길뿐만 아니라 경증의 SAH 환자보다 현저하게 감소된 클론성 및 증가된 다양성을 나타냈다. 또한, 질병 중증도는 TCR 재배 열에 영향을 줄 수 있는 아미노산의 TCRB 및 CDR3 길이의 VJ 유전자 사용량의 차이를 나타냈다. 따라서, 지연된 뇌허혈 또는 SAH- 연관 패렴과 같은 임상적 합병증의 발생에서 개별 클론형에 대한 응용도 가능할 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명자들은 혈관 절개술을 통해 혈관 내 코일 색전술을 받은 SAH 환자 만 포함시켰으며, 두개 절개술과 클리핑이 없는 환자는 배제하였다. 조직 손상에 대한 숙주 면역 반응은 전신 염증 및 항 염증 반응에 영향을 줄 수 있으며, 일부 연구에 따르면, 증가된 T- 헬퍼 2 세포를 보고하여 신체 손상 후 세포 매개 면역이 손상될 수 있다고 보고하였다. 코일 색전술과 비교하여 클리핑은 수술 부위 감염에 대한 우려를 제기할 수 있다. 본 발명자들은 코일 색전술 을받은 SAH 환자에서 TCRB 레퍼토리를 시퀀싱하고 분석하여 치료 방법에 의한 편향을 감소시켰다. 따라서 두개 절제술과 클리핑을 받은 환자는 SAH에 따라 다른 TCRB CDR3 레퍼토리를 가질 수 있을 것이다.
- [0027] 아울러, 본 발명에 있어서, TCRB는 SAH에 따라 역동적인 성질을 보여주었으며, 중증 SAH 환자는 클론성 감소 및 다양성, CDR3 길이 증가를 나타냈다. TCRB CDR3 레퍼토리를 모니터링하면 적응성 면역 반응을 더 잘 이해할 수 있고 치료 목표에 응용될 수 있을 것이다.
- [0028] 이하, 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 실시예 1 : 연구 코호트 수집
- [0030] 본원을 수행하기 위한 코호트(cohort)는 2016년 3월부터 219년 8월까지 지역 의료센터 뇌졸중 데이터 베이스에서 파생되었다. 이 데이터 베이스는 1) 18세 이상의 성인, 2) 동맥류, 3)코일 색전술을 받은 환자 및 4) IV 미만의 초기 헌트 및 헤스 등급 및 5) 외상성 또는 감염이 아닌 자발적인 SAH를 선택하였다.
- [0031] 본 발명자들은 SAH 다음에 TCR β -chain (TCRB) CDR3 레퍼토리의 구성과 변형을 비교하는 것을 목표로 했다. 또한 SAH 심각도 및 양호 등급에 따라 TCRB 레퍼토리를 비교했다. 중증의 SAH는 Hunt and Hess grader IV로 정의되었다. 임상 및 방사선 정보와 같은 의료 기록을 검토하였다. SAH 후 6 개월에 변형된 랭킨 스케일 (mRS) 점수를 사용하여 임상 결과를 평가하였다. 이 조사는 참여 병원의 기관 검토위원회 (2016-3, 2017-9 및 2018-6)에 의해 승인되었으며 환자 또는 그들의 친척으로부터 동의를 받았다.
- [0032] 실시예 2 : DNA 추출 및 고처리량 시퀀싱
- [0033] 말초 혈액 샘플은 입원시 및 그 후 7 일에 제조되었다. 게놈 DNA를 QIAamp DNA 혈액 미디 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)에 의해 전혈로부터 추출하고, DropSense96에 의해 정량화하고, 버퍼에서 표준으로의 라이브러

리 제조를 위해 회석시켰다. 이어서, 면역 SEQ 분석 (Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA)을 사용하여 샘플 데이터를 생성하였다. 편향-제어된 멀티 플렉스 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여 체세포 재배열된 유전자와 CDR3 영역을 증폭시켰다. 보다 구체적으로, 제 1 PCR은 정방향 및 역방향 증폭 프라이머를 사용하여 모든 V 및 J 유전자 세그먼트에 대해 수행되고 초 가변 CDR3을 증폭하였다. 그런 다음 독점 바코드 서열과 Illumina 어댑터 서열 (<https://support.illumina.com>)을 두 번째 PCR에 의해 추가로 수행하였다. 제조업체의 지침과 이전 보고서에 따라 Illumina 기기에서 CDR3 라이브러리를 서열 분석하였다.

[0034] 실시예 3 : TCRβ 사슬 CDR3 레퍼토리의 분석

[0035] 원시 Illumina 서열 관독을 역 다중화 한 후, 어댑터 및 프라이머 서열의 제거, 기술적 오류의 식별 및 그의 정정, 프라이머 이량체, 생식선 및 기타 오염물 서열의 제거와 같은 단계로 추가 처리 하였다. 그런 다음 상대 주파수 비율과 수정된 가장 가까운 이웃 알고리즘을 사용하여 밀접하게 관련된 시퀀스를 병합하도록 데이터를 필터링하고 클러스터링 하였다. V, D 및 J 유전자는 IMGT 데이터베이스 (www.imgt.org)에 따른 주석에 기초하여 정의되었다. 생물학적 CDR3 유전자와 서열을 정규화하고 정량화 하였다. 면역 SEQ 분석기 툴셋을 데이터 분석에 사용하였다. 비교 결과는 Mann-Whitney U 테스트를 사용한 중앙값 (25-75 번째 백분위 수)으로 설명되었다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 정의되었다. 통계는 SPSS V.19 (미국 일리노이 주 SPSS)를 사용하여 수행되었다.

[0036] 실험예 1 : 코호트 군의 임상학적 특징 확인

[0037] 6명의 SAH 환자로부터의 TCRB CDR3 레퍼토리를 분석하고, 입원 및 추적 관찰의 2 개의 상이한 기간에 비교하였다. 3 명의 환자는 경증의 SAH를, 다른 환자는 중증의SAH가 나타났다. 평균 연령은 55.5 세 (41-77 세)였다. 여성 환자의 수는 4 명 (66.7 %)이고, 대부분의 동맥류 (n = 5, 83.3 %)가 전방 순환에 위치했다. 두 명의 환자는 심각한 지연성 뇌허혈을 경험하였고 화학적 혈관 성형술 후 회복이 잘되었다. 6 명의 환자 중 5 명은 심각한 장애없이 잘 회복되었다. 하기 표 1은 등록된 환자의 임상 특성을 나타낸 것으로, 중증 SAH 환자는 헌트 앤 헤스 등급 IV를 나타내는 환자로 정의된다.

표 1

[0038]

Pt No.	Age	Sex	Hunt and Hess grade	Fisher grade	Aneurysm site	DCI	6-month mRS
1	61	F	II	2	MCA	No	0
2	50	F	II	3	MCA	Yes	0
3	77	F	III	3	A-com	No	3
4	47	M	IV	4	PICA	No	0
5	57	M	IV	4	A-com	No	1
6	41	F	IV	3	MCA	Yes	0

[0039] * A-com : 전교통동맥(anterior communicating arter)DCI: 지연성 허혈(delayed cerebral ischem)

[0040] MCA: 중대뇌동맥(middle cerebral artery)

[0041] PICA:후방하대소뇌동맥(posterior inferior cerebellar artery)

[0042] 실험예 2 : 서열, 클론성 및 CDR3 길이

[0043] 모든 환자에서, TCRB CDR3 레퍼토리의 총 서열 및 고유 서열, 클론성 및 빈도가 측정되었다. 도 1(A)는 경증 및 중증의 지주막하 출혈 (SAH) 중증도에 따른 TCRB 클론성을 나타낸 것으로 Shannon 지수를 사용한 불량 등급의 [0.025 (0.011-0.038)] SAH는 등급이 높은 SAH [0.095 (0.079-0.101); p=0.026] 보다 유의하게 낮았다. 또한, 0.05 % ≤ <0.005 %의 관독 빈도가 클론 확장을 지배하지만, 입원과 추적 관찰 사이의 변화는 명확한 연관성을 보이지 않았으며, 하기 표 2는 지주막하 출혈 환자에서 입원 후 (Adm) 및 추적 관찰 (F/U)의 두 가지 다른 시간에 클론 형 풍부도의 분포 및 비교한 것이고, 표 3은 TCRB CDR3 레퍼토리는 총 서열, 고유 서열 및 클론성에 관한 것이다.

표 2

[0044]

Read frequency (%)	No.1		No.2		No.3		No.4		No.5		No.6	
	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U
≥5	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0.5 ≤ - < 5	8	9	14	3	10	6	0	2	5	3	8	1
0.05 ≤ - < 0.5	65	45	56	217	1071	284	44	278	259	94	1372	265
0.005 ≤ - < 0.05	3995	4748	10787	2256	0	2000	3744	2557	1965	4646	0	3005

표 3

[0045]

Pt	N.A. ¹			Frame Sequences (A.A.) ²			
No.	Group	Total	Unique	Total	Unique	Clonality	Max frequency (%)
1	Adm	6762	5721	4961	4069	0.094	5.74
	F/U	8187	6858	5919	4803	0.096	6.44
2	Adm	23275	19296	13403	10858	0.150	4.74
	F/U	3431	2826	3023	2476	0.013	0.61
3	Adm	5213	4222	4698	3788	0.007	0.35
	F/U	4171	3334	3565	2837	0.015	0.48
4	Adm	1797	1509	1318	1082	0.073	5.56
	F/U	4019	3360	2816	2291	0.102	9.16
5	Adm	3743	2901	2808	2229	0.044	2.99
	F/U	8032	6244	5981	4743	0.039	1.97
6	Adm	2261	1721	1785	1380	0.035	3.05
	F/U	4648	3657	4174	3271	0.009	0.47

[0046]

N.A : ¹The number of nucleic acid (N.A.) sequences(핵산 서열의 수)A.A.: ²The number of amino acid (A.A.) sequences. (아미노산 서열의 수)

[0047]

CDR3 길이는 15 내지 78 개 아미노산의 범위였으며, 경증 SAH 환자는 42에서, 중증 SAH 환자는 45에서 피크를 나타냈다. 가장 일반적인 CDR3 길이는 36, 39, 42, 45 및 48이다. 결과는 5 명의 개인의 평균으로 계산되어TEK. 도 1(B)은 경증 및 중증의 지주막하 출혈 (SAH) 중증도에 따른 CDR3 길이 레퍼토리로, SAH 등급이 우수한 환자는 SAH 등급이 낮은 환자보다 CDR 길이가 짧은 경향이 있다. 즉, 경증 SAH 환자는 중증 SAH에 비해 CDR 길이가 더 짧은 경향이 있다. 도 2는 입원 일과 추적 관찰 사이에 각 환자에서 TCRB CDR3 서열을 정량화한 것으로, 가장 일반적인 열 개의 시퀀스는 다른 색상으로 표시된다. 가장 확장된 10 개의 서열이 아미노산 수준으로 제시되고 비교되었으며, 20 개의 공통 서열의 분포는 각 환자마다 다르다. 전반적으로, 중증 SAH 환자는 경증 SAH 환자보다 상위 10 개의 공통 서열의 비율이 낮았다.

[0048]

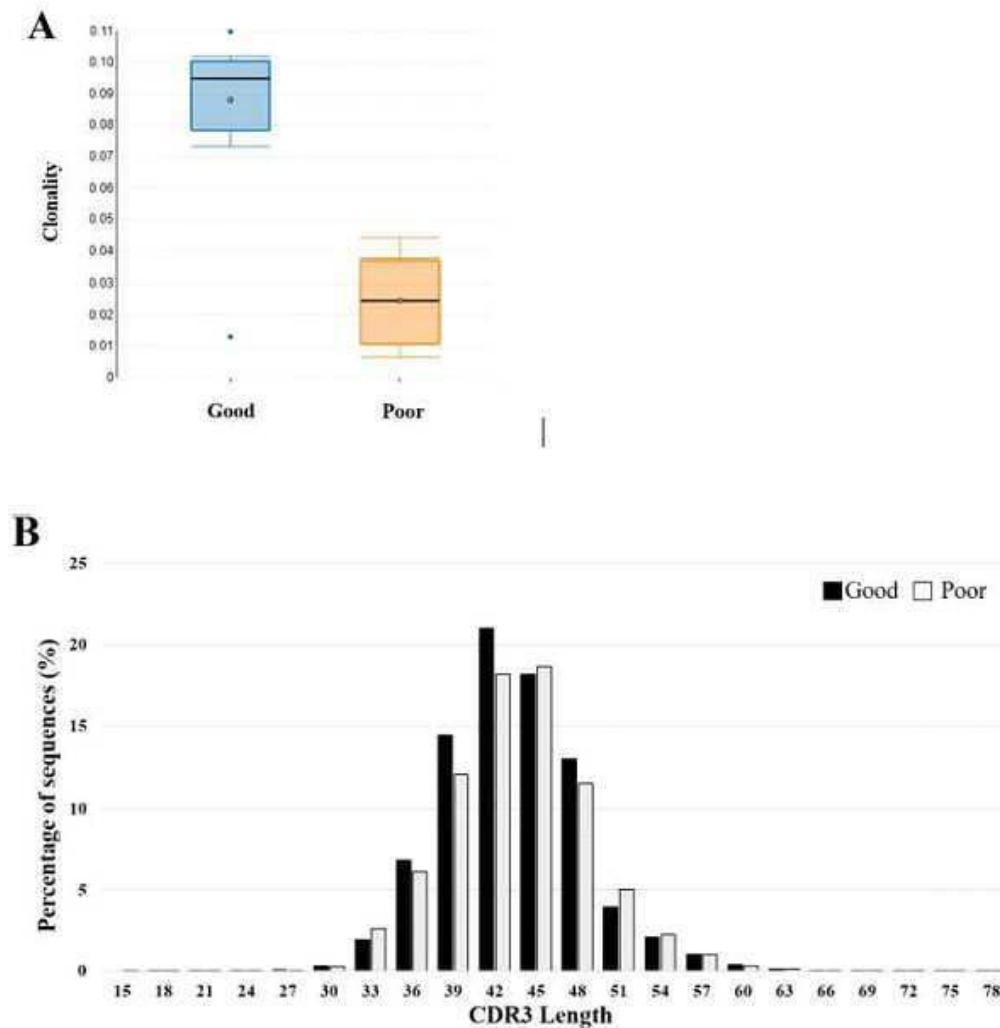
실험예 3 : TCRBV 및 TCRBJ의 분포

[0049]

TCRBV와 TCRBJ의 유전자조각에서 고유한 clonotypes의 분포를 분석했다. 전체적으로, 추적 관찰일로부터의 TCRBV 유전자 분절은 입원일과는 다른 클론형을 나타내었지만, TCRBJ 유전자 분절에서 유사한 분포를 나타냈다. 도 3은 지주막하 출혈 환자에서 TCRBV 유전자(A)와 TCRBJ 유전자(B)의 독특한 clonotypes의 분포와 변화를 나타낸 것으로, 경증 SAH 환자와 비교하여, 중증 SAH는 TCRBV 유전자 절편의 다른 clonotypes를 나타내는 경향이 있다. 또한, V-J 조합의 상대 빈도를 추가로 평가하고 질병 심각도에 따라 다른 색상을 사용하여 설명하였다. 도 4는 경증 환자와 중증환자의 SAH 심각도에 따른 평균 TCRB V-J 유전자 이용률 비교한 것으로, V 유전자와 J 유전자에서 나온 염기서열을 통해 재조합 되어 나온 것을 heatmap으로 그린 것이다. 이때, V 유전자 및 J 유전자 조각은 x- 축 및 y- 축 상에 배열되며, 색상이 다르면 SAH 환자와 SAH 환자의 평균 유전자 빈도 차이를 나타낸다. 754 개의 주석이 달린 V-J 쌍을 얻었으며, 중증의 SAH에서 가장 많이 감소한 V-J (TCRBV19-01, TCRBJ01-05), (TCRBV05-01, TCRBJ02-02), (TCRBV19-01, TCRBJ02-04) 이다.

도면

도면1



도면2

