(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0078611
(43) 공개일자 2022년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
C12Q 1/6816 (2018.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6878 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7012313
(22) 출원일자(국제) 2020년10월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년04월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/054125
(87) 국제공개번호 WO 2021/067851
국제공개일자 2021년04월08일
(30) 우선권주장
62/910,379 2019년10월03일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
디어링 라켈
미국 뉴욕 10591 테리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
다닉 안쿠르
미국 뉴욕 10591 테리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
포페 스테판
미국 뉴욕 10591 테리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **일차 인간 세포에서 동족 T 세포 및 에피토프 반응성을 스크리닝하기 위한 고처리량 방법**

(57) 요 약

개체 자신의 혈액 세포가 HLA 일배체형 특이적 시약 없이 동시에 관심 있는 개별 항원, 예를 들어, 세포 에피토프에 대해 기능적으로 스크리닝될 수 있는 자가 일차 면역 세포 검정이 기재되어 있다. 항원 반응성은 올리고뉴클레오티드 태깅 해싱 추적 시스템을 사용하여 개별 T 세포에 연결되며, 이는 나중에 단일 세포 서열분석에 의해 디컨볼루션된다.

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2018.05)
G01N 33/5005 (2013.01)
C12Q 2565/514 (2013.01)
G01N 2333/70578 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

T 세포, 및 선택적으로 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 T-세포 수용체(TCR) α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 활성화할 수 있는 항원을 확인하는 방법으로서, 하기를 포함하는, 방법:

(I) 독특한 생물학적 샘플을 포함하는 조성물로부터 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류하는 단계로서, 상기 독특한 생물학적 샘플은 하기를 포함하는 단계:

(a) 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC),

(b) 독특한 항원,

(c) 독특한 항원을 특이적으로 확인하는 데 사용되는 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, 독특한 HTO로 T 세포를 표지하는 분자에 접합되는 독특한 HTO, 및 선택적으로,

(d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지, 및

(II) (I)에서 분류된 활성화 T 세포에 대해 단일 세포 시퀀싱 분석을 수행하여 활성화 T 세포를 독특한 HTO로 표지한 분자에 접합된 독특한 HTO를 확인하는 단계로서, 상기 독특한 HTO를 확인하는 것은 활성화 T 세포를 활성화할 수 있는 항원을 확인하고, 그리고 선택적으로 단일 세포 시퀀싱 분석은 또한 다음 중 하나 이상을 확인하는 단계:

(i) 활성화 T 세포에 의해 발현되는 하나 이상의 유전자, 및/또는

(ii) 활성화 T 세포에 의해 발현되는 TCR의 TCR α 및/또는 β 사슬 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, 분류하기 전에, 하기 단계(들):

대상체로부터 단리된 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포 수집을 개별 샘플로 동등하게 분배함으로써 복수의 생물학적 샘플을 생성하는 단계로서, 각각의 생물학적 샘플은 선택적으로 T 세포 및/또는 APC 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 배지 및 사이토카인을 포함하는 단계, 및

복수의 생물학적 샘플 각각에 독특한 항원 및/또는 독특한 항원을 특이적으로 확인하는 데 사용되는 독특한 HTO를 전달함으로써 복수의 독특한 생물학적 샘플을 생성하는 단계로서, 상기 독특한 HTO는 T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자에에 접합되는 단계 중 하나 또는 둘 다를 포함하고,

상기 복수의 생물학적 샘플 각각은 대상체로부터 단리된 T 세포 및 APC를 포함하는 세포의 수집 및 선택적으로 T 세포 및 APC의 생존력, 활성 및/또는 활성화를 지원하는 배지를 포함하고,

T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 항원 및/또는 독특한 HTO의 전달 후, 복수의 생물학적 샘플 각각은 하기를 포함하는 독특한 생물학적 샘플이 되고:

(a) 대상체로부터 단리된 T 세포 및 APC를 포함하는 세포의 수집,

(b) 독특한 항원,

(c) 독특한 항원을 특이적으로 확인하고 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 HTO, 및 선택적으로

(d) T 세포 및 APC의 생존력, 활성 및/또는 활성화를 지원하는 배지,

(I)에서 분류된 이러한 조성물은 복수의 독특한 생물학적 샘플을 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 APC는 단핵구 유래 수지상 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, B 세포, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 분류는 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포의 형광 활성화 세포 분류를 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 AIM은 CD137/4-1BB, CD107, IFNɣ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, TIGIT, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 형광 활성화 세포 분류는 AIM에 대한 형광 표지 항체를 사용한 검출에 기초하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, II에서 분석된 활성화 T 세포에 대한 추가 기능적 및/또는 표현형 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 유동 세포측정 분석, CITE-seq 분석, 다량체 분석, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD62L, HLA-DR, CD137/4-1BB, CD69, CD278, CD274, CD279, CD127, CD197, IFNɣ, GZMH, GNLY, CD38, CCL3, 및 LAG3 중 하나 이상의 단백질 및/또는 RNA 발현 수준을 측정하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 말초 혈액 단핵 세포는 T 세포 및 표면 결합 MHC를 제공하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자는 세포 표면 분자에 결합하는 항체를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AIM은 CD137/4-1BB이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하는 단계를 포함하고, 상기 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열은 각각 TCR α 사슬 가변 영역 서열 및/또는 TCR β 사슬 가변 영역 서열인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 치료제를 만드는 데 있어 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

하기를 포함하는 생물학적 샘플을 포함하는 조성물:

(a) 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC),

(b) 항원,

(c) 항원을 특이적으로 확인하는 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되는, HTO,

그리고 선택적으로

(d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지.

청구항 15

제14항에 있어서,

(a) MHC는 항원 제시 세포(APC)의 표면 상에서 발현되고, 선택적으로,

상기 T 세포와 APC는 자가 유래이고,

상기 T 세포 및 APC는 각각 인간 공여체로부터 단리되고/거나

상기 APC는 단핵구 유래 수지상 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, B 세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

(b) 항원

(I)은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되고:

(i) 박테리아 항원 또는 이의 부분,

(ii) 바이러스 항원 또는 이의 부분,

(iii) 알러지항원 또는 이의 부분,

(iv) 종양 연관 항원 또는 이의 부분, 및

(v) 이들의 조합, 및/또는

(II)는 하기를 포함하고:

(i) 아미노산 서열,

(ii) 뉴클레오티드 서열,

(iii) 용해물, 및

(iv) 이들의 조합,

(c) 상기 HTO 접합된 분자는 세포 표면 분자 또는 지질에 결합하는 항체를 포함하고/하거나

(d) 상기 배지는 T 세포 및/또는 APC의 생존력을 지원하는 사이토카인을 포함하는, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 항체는 β2 마이크로글로불린, CD298, CD2, CD3, CD4, CD8, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표면 마커에 결합하거나, 또는

상기 지질은 세포막에 결합하는, 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 T 세포 및/또는 APC의 생존력을 지원하는 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15, GM-CSF, IL-4, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 생물학적 샘플을 추가로 포함하고, 상기 제2 생물학적 샘플은,

(a) 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC로서, 상기 제2 T 세포는 제2 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는, 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC,

(b) 제2 항원,

(c) 제2 항원을 특이적으로 확인하는 제2 HTO로서, 상기 HTO는 제2 T 세포를 제2 HTO로 표지하는 제2 분자에 접합되는, 제2 HTO,

그리고 선택적으로

(d) 제2 T 세포의 활성화를 지원하는 배지를 포함하고,

여기서,

(i) 상기 T 세포 및 제2 T 세포는 동일한 대상체로부터 단리되고,

(ii) 상기 항원 및 제2 항원이 동일하지 않고,

(iii) 상기 T 세포를 HTO로 표지하는 분자 및 상기 제2 T 세포를 제2 HTO로 표지하는 제2 분자는 동일하고, 그리고 상기 HTO 및 제2 HTO는 동일하지 않는, 조성물.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류할 수 있게 하는 제제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, AIM의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류할 수 있게 하는 제제는 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체인, 조성물.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 AIM은 CD137/4-1BB, CD107, IFNγ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, 및/또는 TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 22

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 유동 세포측정 분석 또는 CITE-seq 분석에 유용한 항체 및/또는 MHC 다량체를 포함하는, 조성물.

청구항 23

하기를 포함하는 키트:

복수의 독특한 항원, 및

각각이 복수의 독특한 항원 중 하나만 특이적으로 확인하는, 복수의 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO).

청구항 24

제23항에 있어서, 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포의 분류를 허용하는 제제를 추가로 포함하고, 선택적으로 AIM의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류할 수 있는 제제는 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체인, 키트.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 복수의 독특한 HTO 각각은 키트가 복수의 독특한 HTO 접합 분자를 포함하도록 동일한 분자에 접합된 것인, 키트.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 독특한 항원 각각은 단일 단백질로부터 독특하고 중

첨되는 펩티드 서열을 포함하는, 키트.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 단일 단백질은 병원성 항원, 종양 연관 항원 또는 이식 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 28

백신에 대한 환자의 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트의 용도.

청구항 29

면역요법에 대한 환자의 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트의 용도.

청구항 30

환자의 면역요법 동안 환자에서 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트의 용도.

청구항 31

자가항원에 대한 환자의 T 세포 반응을 분석하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트의 용도.

청구항 32

이식 항원에 대한 환자의 T 세포 반응을 분석하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트의 용도.

청구항 33

활성화 T 세포의 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열을 확인하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트의 용도.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열은 TCRα 사슬의 CDR3 서열 및/또는 TCRβ 사슬의 CDR3 서열을 포함하는, 용도.

청구항 35

인간 치료제를 제조하는 데 있어서 제33항 또는 제34항에서 확인된 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열의 용도.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 인간 치료제는 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법, 제14항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물, 또는 제23항 내지 제27항 중 어느 한 항의 키트를 사용하여 확인된 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열을 포함하는 T 세포를 포함하는, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2019년 10월 3일자로 출원된 미국 가특허 출원 일련 제62/910,379호에 대한 우선권을 주장하며, 그 개시내용은 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0002] **EFS 웹을 통해 텍스트 파일로 제출된 서열 목록에 대한 참조**

[0003] 파일 10669_ST25.txt에 작성된 서열 목록은 5 킬로바이트이며 2020년 10월 2일에 생성되었으며 본 명세서에 참

조로 포함된다.

배 경 기 술

[0004] 인간 질환에서 항원 특이적 T 세포 활성에 대한 관심이 더 예리하게 초점이 맞춰지면서, 에피토프 특이적 TCR 서열을 HLA의 맥락에서 제시된 동족 에피토프와 상관시킬 수 있어야 할 필요가 있다. 그러나 생산적인 T 세포 활성화를 초래하는 에피토프와 반응하는 T 세포의 TCR 서열을 확인하는 것은 역사적으로 기술적으로 도전적인 과제였고 계속되고 있다.

[0005] 항원 특이적 T 세포 결합 및 반응성을 평가하는 데 사용되는 전통적인 방법에는, T 세포가 사이토카인 또는 세포용해 반응(예를 들어, ELISPOT, 세포 사멸 검정)에 의해 검출될 에피토프에 재노출되는 다량체 염색 및 기능적 T 세포 검정이 포함된다. 이러한 방법은 유용하지만 고처리량에서 잠재적인 반응성을 평가하기 위해 값비싼 개별 HLA 일배체형 특이적 시약(다량체)과 많은 혈액량이 필요할 수 있다. 또한 HLA 클래스 II(CD4+ T 세포) 다량체가 거의 없으므로 대부분의 다량체 기반 의문은 HLA 클래스 I(CD8+ T 세포) 반응성에 중점을 둔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, TCR의 동족 TCR α 및 β 폴리펩티드를 특히 TCR에 의해 인식되는 에피토프와 상관시키는 정보를 제공할 수 있는 고처리량 방법이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0007] 자가 및 일차 면역 세포에 사용할 수 있는 면역 세포 검정이 본 명세서에 기재되어 있으며, 여기서 관심 있는 다중 T 세포 에피토프에 대한 CD8+ 및/또는 CD4+ T 세포 반응이 동시에 검정될 수 있다. 항원 반응성은 해시태그 올리고뉴클레오타이드(HTO) 추적 시스템을 사용하여 개별 T 세포에 연결되며, 나중에 단일 세포 서열분석에 의해 디컨볼류션되어(deconvoluted) 다음과 같은 단일 세포 수준 정보를 제공할 수 있다: (a) 에피토프 특이성, (b) 단일 세포 쌍 형성 알파 /베타 사슬 TCR 서열, (c) 내인성 단일 세포 RNA 전사체 정보, (d) 세포 표면 단백질 발현(예를 들어, CITE-seq 항체 사용), (e) 다량체 염색(다량체가 포함된 경우), 및 이들의 임의의 조합. 따라서, 면역 세포 검정 방법, 이를 위한 조성물 및 키트, 및 예를 들어, TCR 치료제를 제조하기 위한 그의 용도가 본 명세서에 제공된다.

[0008] 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 다른 세포, 예를 들어 자가 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 조성물로부터, 예를 들어 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류하는 단계를 포함하며, 상기 활성화 T 세포는 HTO 접합된 분자로 표지된다.

[0009] 일부 구현예에서, (예를 들어, T 세포, 및 선택적으로 항원에 특이적으로 결합하는 TCR T 세포 수용체 (TCR) α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 활성화할 수 있는 항원을 확인하기 위해) 본 명세서에 기재된 방법은 하기를 포함한다:

[0010] (I) 독특한(unique) 생물학적 샘플을 포함하는 조성물로부터 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류하는 단계로서, 이 독특한 생물학적 샘플은 하기를 포함하는 단계: (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC, (b) 독특한 항원, (c) 독특한 항원을 특이적으로 확인 (및/또는 특이적으로 확인)하는 데 사용될 수 있는 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, 상기 독특한 HTO는 독특한 HTO로 T 세포를 표지하는 분자에 접합된 독특한 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO), 및 선택적으로 (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지, 및

[0011] (II) (I)에서 분류된 활성화 T 세포에 대해 단일 세포 시퀀싱 분석을 수행하여 활성화 T 세포를 독특한 HTO로 표지한 분자에 접합된 독특한 HTO를 확인하는 단계로서, 상기 독특한 HTO를 확인하는 것은 활성화 T 세포를 활성화할 수 있는 항원을 확인하고, 그리고 선택적으로 단일 세포 시퀀싱 분석은 또한 (i) 활성화 T 세포에 의해 발현된 하나 이상의 유전자, 및/또는 (ii) 활성화 T 세포에 의해 발현된 TCR의 TCR α 및/또는 β 사슬 서열을 확인하는 단계.

[0012] 본 명세서에 기재된 일부 방법은, 분류된 조성물이 복수의 독특한 생물학적 샘플을 포함하도록 분류 단계 전에 복수의 생물학적 샘플, 예를 들어 독특한 생물학적 샘플을 생성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 방법 구현예는 분류하기 전에, 개체로부터 단리된 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포 수집을 개별 샘플로 동등하

게 분배함으로써 복수의 생물학적 샘플을 생성하는 단계로서, 각각의 생물학적 샘플은 선택적으로 T 세포 및/또는 APC 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 배지 및 사이토카인을 포함하는 단계를 포함한다.

[0013] 일부 방법 구현예는 복수의 생물학적 샘플 각각에 독특한 항원을 특이적으로 확인 (및/또는 특이적으로 확인)하는 데 사용될 수 있는 독특한 항원 및/또는 독특한 HTO을 전달함으로써 복수 독특한 생물학적 샘플을 생성하는 단계를 분류 전에 포함하고, 상기 독특한 HTO는 T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자에 접합되고, 복수의 생물학적 샘플 각각은 대상체로부터 단리된 T 세포 및 APC를 포함하는 세포의 수집을 포함하고, T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 항원 및/또는 독특한 HTO의 전달 후, 복수의 생물학적 샘플 각각은 (a) 대상체로부터 단리된 T 세포 및 APC를 포함하는 세포의 수집, (b) 독특한 항원, (c) 독특한 항원을 특이적으로 확인하고 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 HTO, 및 선택적으로 (d) T 세포 및 APC의 생존력, 활성 및/또는 활성화를 지원하는 배지를 포함하는 독특한 생물학적 샘플이 된다. 선택적으로, 복수의 독특한 생물학적 샘플은 (I)에서 분류된 조성물이 복수의 독특한 생물학적 샘플을 포함하도록 본 명세서에 기재된 방법에서 분류하기 전에 풀링될 수 있다. 본 명세서의 일부 방법 구현예는 복수의 생물학적 샘플을 생성하는 단계 및 복수의 독특한 생물학적 샘플을 (예를 들어, 복수의 생물학적 샘플로부터) 생성하는 단계 둘 모두 및 선택적으로 복수의 독특한 생물학적 샘플을 풀링하여 본 명세서에 기재된 방법에 따라 분류될 수 있는 조성물을 생성하는 단계를 분류 단계 전에 포함한다.

[0014] 본 명세서에 기재된 일부 방법에서, 분류는 AIM의 발현에 기초한 활성화 T 세포의 형광 활성화 세포 분류를 포함하고, 예를 들어, 형광 활성화 세포 분류는 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체로 AIM을 발현하는 T 세포의 검출에 기초한다. 이러한 방법은 독특한 생물학적 샘플(또는 하나 또는 복수의 독특한 생물학적 샘플을 포함하는 조성물)을 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 리간드(예를 들어, 형광 표지 항체)와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 단일 세포 서열분석에 의해 분석된 활성화 T 세포에 대한 기능적 및/또는 표현형 분석을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 단일 세포 시퀀싱 분석 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 단일 세포 시퀀싱 분석과 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 단일 세포 시퀀싱 분석 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 단일 세포 시퀀싱 분석 이전, 동시 및/또는 이후에 수행된다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 유동 세포측정 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 CITE-seq 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 다량체 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 및/또는 표현형 분석은 유동 세포측정 분석, CITE-seq 분석 및 다량체 분석의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD62L, HLA DR, CD137/4-1BB, CD69, CD278, CD274, CD279, CD127, CD197, IFNγ, GZMH, GNLY, CD38, CCL3, 및 LAG3 중 하나 이상의 단백질 및/또는 RNA 발현 수준을 측정한다.

[0016] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하는 것을 포함하고, 바람직하게는 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열은 각각 TCR α 사슬 가변 영역 서열 (Vα/Jα 서열) 및/또는 TCR β 사슬 가변 영역 서열 (Vβ/Jβ 서열)이다. 일부 구현예에서, 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하는 단계를 포함하고, 방법은 치료제, 예를 들어, 인간 치료제의 제조에서 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 이용하는 것을 추가로 포함한다. 대안적으로, 방법은 또한 TCRδ/TCRγ 서열, 예를 들어, TCRδ/TCRγ 가변 영역 서열을 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0017] 또한 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있는 조성물이 본 명세서에 기재된다. 일부 구현예에서, 조성물은 하기를 포함하는 독특한 생물학적 샘플을 포함한다: (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체 (MHC)로서, T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC, (b) 항원, (c) 항원을 특이적으로 확인하는 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO)로서, HTO는 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되는 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO), 및 선택적으로 (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지. 일부 구현예에서, 조성물은 하나 초과의 생물학적 샘플, 예를 들어, 제1 및 제2 생물학적 샘플을 포함하고, 제1 생물학적 샘플은 (a) 제1 T 세포는 제1 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 제1 T 세포 및 제1 표면 결합 MHC, (b) 제1 항원, 및 (c) 제1 항원을 특이적으로, 바람직하게는 특이적으로 확인하기 위해 사용될 수 있는 제1 HTO로서, 제1 T 세포를 제1 HTO로 표지할 수 있는 제1 분자에 접합되는 제1 HTO를 포함하고, 제2 생물학적 샘플은 (a) 제2 T 세포가 제2 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는, 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC, (b) 제2 항원, 및 (c) 제2 항원을 특이적으로 확인하는 제2 HTO로서, 제2 T 세포를 제2 HTO로 표지하는

제2 분자에 접합되는 제2 HTO를 포함하고, (i) 제1 T 세포 및 제2 T 세포는 동일한 대상체로부터 단리되고, (ii) 제1 항원 및 제2 항원는 동일하지 않고, (iii) 제1 T 세포를 제1 HTO로 표지할 수 있는 제1 분자 및 제2 T 세포를 제2 HTO로 표지하는 제2 분자는 동일하고, 그리고 제1 HTO 및 제2 HTO는 동일하지 않고, 및 선택적으로 제1 및 제2 생물학적 샘플 중 하나 또는 둘 모두는 제1 및 제2 T 세포의 활성화를 지원하는 배지를 추가로 포함한다.

[0018] 또한 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 키트는 복수의 독특한 항원, 및 복수의 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)를 포함하며, 복수의 독특한 HTO 각각는 복수의 독특한 항원 단 하나를을 특이적으로 확인하고 바람직하게는 특이적으로 확인하는 데 사용될 수 있다. 일부 키트 구현예에서, 복수의 독특한 HTO 각각은 키트가 복수의 독특한 HTO 접합된 분자를 포함하도록 동일한 분자에 접합된다. 본 명세서에 기재된 일부 키트 구현예에서, 복수의 독특한 항원 각각은 단일 단백질, 예를 들어, 병원성 항원, 종양 연관 항원, 또는 이식 항원으로부터의 독특하고 중첩되는 펩티드 서열을 포함한다.

[0019] 본원의 일부 구현예에서, 표면 결합 MHC는 세포막 결합된 MHC이고, 예를 들어 표면 결합 MHC는 세포, 예를 들어 항원 제시 세포(APC)의 표면 상에서 발현된다. 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, APC는 단핵구 유래 수지상 세포이다. 일부 조성물, 방법, 키트 또는 용도 구현예에서, APC는 수지상 세포이다. 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, APC는 단핵구이다. 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, APC는 대식세포이다. 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, APC는 B 세포이다. 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, 표면 결합 MHC는 세포의 집단, 예를 들어 APC의 집단의 표면 상에서 발현되고, 예를 들어 APC의 집단은 단핵구 유래 수지상 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, B 세포, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포 및 APC(들)는 자가 유래이다. 일부 구현예에서, T 세포 및 APC(들)는 각각 인간 공여체로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 말초 혈액 단핵 세포(예를 들어, 인간 공여체로부터 단리됨)는 T 세포 및 표면 결합 MHC(예를 들어, APC(들)의 표면 상에서 발현된 MHC)를 제공한다.

[0020] 본 명세서에 기재된 방법, 조성물, 키트 및 용도는 유리하게는 낮은 부피 샘플, 예를 들어, 낮은 부피 인간 샘플로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 세포의 수집이 복수의 개별 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 대상체, 예를 들어 인간 대상체로부터 단리된 충분한 수의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 2개의 개별 생물제제 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 3개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 5개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 10개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 20개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 30개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리

된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 50개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은 충분한 수의 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)(예를 들어, 수지상 세포(DC))를 포함하여 세포의 수집이 복수의 개별 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 충분한 수의 APC 및 T 세포를 포함하여, 세포의 수집은 복수의 개별 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있고, 샘플 각각은 APC 및 T 세포 (예를 들어, DC 및 T 세포)를 약 1:1, 약 1:5, 또는 약 1:10의 APC:T 세포 비로 포함하고, 예를 들어, 각각의 샘플은 적어도 $5X10^3$, $5X10^4$, 또는 $5X10^5$ DC 및 약 $5X10^3$, $1X10^4$, $2.5X10^4$, $5X10^4$, $1X10^6$, $2.5X10^5$, $5X10^5$, $1X10^6$, $2.5X10^6$, 또는 $5X10^6$ T 세포를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다.

[0021] 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법에 사용되거나 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물 또는 키트의 일부인 항원은 (I) (i) 박테리아 항원 또는 이의 부분, (ii) 바이러스 항원 또는 이의 부분, (iii) 알러지항원 또는 이의 부분, (iv) 종양 연관 항원 또는 그의 일부, 및 (v) 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 항원일 수 있고/거나 (II) (i) 아미노산 서열, (ii) 뉴클레오티드 서열, (iii) 용해물, 및 (iv) 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0022] 본 명세서에 기재된 방법, 조성물, 키트 및 용도는 각각 분자에 접합된 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)를 포함하며, 이 분자는 HTO로 세포(예를 들어, T 세포)를 표지하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포를 HTO로 표지하는 데 사용되는 분자는 리간드, 예를 들어 항체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, HTO 접합된 리간드, 예를 들어 HTO 접합된 항체는 세포 표면 분자에 결합한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 대부분의 세포에 의해 편재적으로 발현된다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 β2 마이크로글로불린이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 CD298이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 T 세포에 의해 선택적으로 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 CD2, CD3, CD4, CD8, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 T 세포 표면 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 CD2이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 CD3이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 CD4이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서 세포 표면 분자는 CD8이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포를 HTO로 표지하기 위해 사용되는 분자는 지질을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 지질은 바람직하게는 세포막, 예를 들어 분열 세포의 세포막에 자체적으로 혼입된다. 일부 구현예에서, HTO 접합된 분자는 HTO 접합된 지질, 예를 들어 지질-변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포를 HTO로 표지하는 데 사용되는 분자는 콜레스테롤이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 HTO 접합된 분자는 HTO 접합된 콜레스테롤, 예를 들어 콜레스테롤-변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0023] 본 명세서에 기재된 방법은 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류하는 것을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 일부 방법, 조성물, 키트 및 용도 구현예는 이러한 분류 단계에 유용한 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 리간드, 예를 들어 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물 또는 키트 구현예에서, AIM은 T 세포의 활성화 시 T 세포에 의해 상향조절되는 임의의 마커이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, AIM은 CD137/4-1BB, CD107, IFNγ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, TIGIT, 및 이들의 임의의 조합로 이루어진 군으로부터 선택된 AIM이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, AIM은 CD137/4-1BB이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 CD107이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, AIM은 IFNγ이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 PD-1이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 CD40L이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 OX40이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 CD25이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, AIM은 CD69이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 CD28이거나 이를 포함한다. 본 명세서

의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, AIM은 HLA-DR이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 CX3CR1이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서, AIM은 TIM3이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 LAG3이거나 이를 포함한다. 본 명세서의 일부 방법, 조성물, 키트 또는 용도 구현예에서 AIM은 TIGIT이거나 이를 포함한다.

[0024] 본 명세서에 기재된 방법은 단일 세포 서열분석에 의해 분석된 활성화 T 세포에 대한 기능적 및/또는 표현형 분석을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물, 키트 또는 용도는 추가 시약, 예를 들어 항체 및/또는 MHC 다량체를 포함할 수 있으며, 이들 중 하나 또는 둘 모두는 유동 세포측정 분석 및/또는 CITE-seq 분석에 유용할 수 있다.

[0025] 본 명세서에 기재된 일부 방법, 조성물, 키트 및 용도 구현예는 존재하는 T 세포(및 선택적으로 다른 세포, 예를 들어, 항원 제시 세포, 예를 들어, 수지상 세포)의 생존력, 활성화, 및/또는 활성을 지원하는 배지를 포함한다. 일부 구현예에서 배지는 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-2를 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-4를 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-7을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-21을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 GM-CSF를 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 FLT3L을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, GM-CSF, 및 FLT3L의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 IL-2, IL-7, IL-15, GM-CSF, IL-4, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인을 포함한다.

[0026] 또한 백신에 대한 환자의 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물, 및/또는 키트의 용도가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물 및/또는 키트는 면역요법에 대한 환자의 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물 및/또는 키트는 환자의 면역요법 동안 환자에서 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물, 및/또는 키트는 자가항원에 대한 환자의 T 세포 반응을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물, 및/또는 키트는 이식 항원에 대한 환자의 T 세포 반응을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물 및/또는 키트는 활성화 T 세포의 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열(예를 들어, TCRα 사슬의 CDR3 서열 및/또는 TCRβ 사슬의 CDR3 서열)을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 그렇게 확인된 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열은 인간 치료제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 조성물 및/또는 키트를 사용하여 확인된 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열을 포함하는 T 세포를 생성하는 데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] **도 1**은 본 발명의 비제한적인 예시적인 구현예의 예시(축척에 맞지 않음)

를 제공한다. 간단히 말해서, 각각이 세포(예를 들어, 전체 말초 혈액 단핵 세포, 자가 항원 제시 세포 및 T 세포 등), 독특한 항원, 및 독특한 항원을 확인하는 독특한 HTO를 포함하는 독특한 생물학적 샘플은 풀링된다. 독특한 생물학적 샘플의 풀은 활성화 T 세포에 대해 풍부하며, 활성화 T 세포는 기능적 및 표현형 특성에 대해 분석될 수 있다. 방법의 상세한 단계는 아래에 기재되어 있다.

도 2a는 (a) 사전-확장 후 및 재자극 전, 및 (b) 동일한 항원으로 24시간 재자극 후, DMSO, CMV pp65 또는 MART 1 항원으로 프라이밍한 후, T 세포:수지상 세포 공동 배양물의 형광 활성화 세포 분류(FACS) 도트 블롯을 제공한다. CD137/4-1BB 또는 다량체 염색에 의해 측정된 CD8의 세포 표면 발현 및 기능적 활성화는 형광 태깅된 단클론성 항체(CD8 및 CD137/4-1BB) 또는 유동 세포측정 분석에 의한 덱스트라머 다량체를 사용하여 평가되었다. 도 2b는 DMSO 또는 CMV pp65와 함께 배양되고 음성 다량체 또는 pp65 표지된 다량체 (최상부 패널) 또는 항-4-1BB 항체 (바닥 패널)에 결합된 4개의 상이한 공여체(x-축)에서 단리된 $CD8^+$T 세포(y-축)의 백분율을 제공한다. * 음성 다량체 = 무관한 펩티드가 있는 다량체; FMO = 형광 마이너스 1개의 대조군

도 3a는 DMSO (기준선) 또는 MART1 (ELAGIGILTV: 서열번호:15) 합성 짧은 펩티드 (MART-1 재노출)에 의한 10-일 사전 확장 및 24-시간 재자극 후 건강한 HLA-A*0201+ 인간 공여체 (HD3 및 HD27; x-축)로부터의 전체 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 집단 내의 기능적 CD8+ T 세포 (y-축)의 백분율을 나타낸다. 다량체를 사용하여 기준 집단을 염색하고 항-CD137/4-1BB 항체를 사용하여 재자극된 집단을 염색하였다.* FMO = 형광 마이너스 1개의 대조군; 음성 다량체 = 무관한 펩티드가 있는 다량체. **도 3b**는 공여체 HD27로부터의 MART1에 특이적이고 CD137/4-

1BB 또는 다량체 염색(x-축)에 의해 확인된 모든 TCR 클론의 T 세포 (최상부 패널; y-축)의 백분율로서의 클론 빈도 및 T 세포 (바닥 패널; y-축)의 수로서의 클론 크기를 보여주는 바이올린 플롯을 제공한다. 바이올린 플롯에는 중앙값, 상위 및 하위 사분위수와 사분위수 범위(상위 및 하위 사분위수 사이의 거리)를 보여주는 박스 플롯이 포함되어 있다.

도 4a-b는 hCMV pp65 펩티드로 사전 확장 및 재자극되고 다음의 독특한 항원: EBV YVL-9, hCMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 또는 인플루엔자 M 바이러스 중 하나와 함께 인큐베이션된 T 세포를 포함하는 독특한 생물학적 샘플에서 파생된 데이터를 제공한다. **도 4a**는 이러한 생물학적 샘플에 의한 IFNɣ 생산(SFC/2x10^6; y-축)을 측정하여 펩티드 특이적 T 세포의 수가 열거된 ELISPOT 검정의 데이터를 보여준다. SPC = 스폿 형성 콜로니. **도 4b**는 항-CD137/4-1BB(y-축) 및 항-CD8(x-축) 항체로 염색된 이러한 생물학적 샘플의 유동 세포측정 분석에서 얻은 도트 플롯을 보여준다. DMSO와 함께 인큐베이션된 CD137/4-1BB+CD8+ 세포의 백분율은 0.25%였고, EBV YVL-9 펩티드는 1.27%였고, CMV pp65 펩티드는 약 26.2%였고, EBV LMP2A 펩티드는 약 3.21%였고, EBV BMLF1 펩티드는 약 9.67%였거나, 인플루엔자 바이러스 펩티드는 약 5.2%였다.

도 5는 PBMC, 예를 들어 도 4에 기재된 바와 같은 독특한 항원 폴리펩티드, 및 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드 접합된 항-CD2 항체 (HTO; 1-6)를 포함하는 독특한 생물학적 샘플이 풀링되고, CD137/4-1BB 및 CD8을 발현하는 이들 세포에 대해 풍부화되고, 단일 세포 시퀀싱 (5'scSEQ) 분석에 의해 분석되는, 본 발명의 비-제한적인 구현예의 비-제한적 예시 (축척에 맞지 않음)를 제공한다. 예를 들어 DMSO, EBV YVL-9, hCMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 또는 인플루엔자 M 바이러스로 자극된 독특한 생물학적 샘플 각각에 대해 6개의 해싱된 웰이 표시되지만, DMSO 집단은 궁극적으로 단일 세포 시퀀싱 분석을 위한 많은 $CD8^+CD137/4\text{-}1BB^+$ T 세포를 제공하지 않는다.

도 6a는 독특한 항원(EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 또는 인플루엔자 M; y-축)으로 각각 자극된 독특한 생물학적 샘플로부터 풍부한 개별적인 $CD137/4\text{-}1BB^+CD8^+$ T 세포와 연관된 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO-1, HTO-2, HTO-3, HTO-4, HTO-5) (y-축)의 수준 (0 내지 2.5의 규모)을 나타낸다. 또한 하나 초과의 HTO가 서열분석된(이중선) 또는 HTO가 서열분석되지 않은(HTO 없음) $CD137/4\text{-}1BB^+CD8^+$ T 세포가 표시된다. **도 6b**는 각각의 독특한 항원, 예를 들어 EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 또는 인플루엔자 M 각각이 그의 연관된 독특한 생물학적 샘플을 동등하게 확장시키는 경우에 도 6A가 어떻게 보이는지에 대한 개략적인 (축척에 맞지 않음) 예를 제공한다. **도 6c**는 EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 인플루엔자 M에 대한 반응성에 대해 확인되고 각각 HTO-1, HTO-2, HTO-3, HTO-4, 및 HTO-5에 상응하는 $CD137/4\text{-}1BB^+CD8^+$ T 세포의 각각의 집단에 대한 도 6a의 분류된 풀(y-축)로부터의 해싱된 세포의 수를 나타낸다. 또한 하나 초과의 HTO가 서열분석된(이중선) 또는 HTO가 서열분석되지 않은(HTO 없음) $CD137/4\text{-}1BB^+CD8^+$ T 세포의 수가 표시된다. **도 6d**의 최상부 패널은 다양한 펩티드 (x-축)가 로딩된 텍스트라머로 염색한 후, H내지 40 (이는 HTO-5 와 마찬가지로, 인플루엔자 M 항원을 확인함), HTO 47 (이는 HTO-4와 마찬가지로, EBV BMLF1 항원을 확인함) 또는 HTO 48 (이는 HTO-2와 마찬가지로, CMV pp65 항원을 확인함)로 해싱된 풍부한 $CD137/4\text{-}1BB^+$ T 세포에 의한 정규화된 텍스트라머 발현 (카운트; y-축)을 보여주는 그래프를 제공한다. **도 6d**의 바닥 패널은 HTO-40, HTO-47, 및 HTO-48로 해시태깅되고 CD137/4-1BB 발현(x-축)에 대해 풍부한 T-세포 클론의 클론 크기 및 최상부 패널에 묘사된 실험에서 확인된 클론들의 클론 크기를 제공한다. 독특한 클론의 총 수, 예를 들어 총 클론은 TC로 표시된다. 해싱된 항원에 해당하는 덱스트라머의 높은 발현을 나타내는 클론, 예를 들어 중첩 클론의 수는 OC로 표시된다.

도 7a는 독특한 항원(EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 또는 인플루엔자 M; y-축)으로 각각 자극된 독특한 생물학적 샘플로부터 풍부한 개별적인 $CD137/4\text{-}1BB^+CD8^+$ T 세포의 RNA 전사체 분석으로부터 분해된 7개의 독특한 클러스터(클러스터 0-6)를 나타낸다. 각 점은 단일 세포를 나타낸다. **도 7b**는 EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1 또는 인플루엔자 M에 대한 동족 반응성에 해당하는 개별 T 세포 및 각 반응성에 대한 상대적 TCR 클론 크기를 보여주는 TCR 클론형성능 맵을 제공한다. 각 점은 단일 세포를 나타낸다.

도 8a는 독특한 항원 (EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 또는 인플루엔자 M; y-축)로 각각 자극된 독특한 생물학적 샘플로부터 풍부한 개별 $CD137/4\text{-}1BB^+$ T 세포에 의해 표현형 및 기능적 T 세포 마커 (CD3, CD4, CD8a, CD45RA, CD62L, HLA-DR, CD274-PDL1, CD279-PD1, CD127, CD25, CD27, CD28, CD137/4-1BB, CD69, CD278/ICOS, CD197/CCR7)의 상대 단백질 발현 수준을 제공하고, 여기서 개별 세포는 점으로 표시되고 도 7에 도

사된 RNA 전사체 분석에 따라 클러스터링된다. 각 세포에 의한 이러한 동일한 표현형 및 기능적 T 세포 마커의 해당 RNAseq 전사체 발현 수준은 각각 점으로 표시되어 있으며 **도 8b**에 도시되어 있다.

도 9a는 HTO-1, HTO-2, HTO-3, HTO-4, 또는 HTO-5에 의해 확인된 독특한 HPV 항원으로 자극된 독특한 생물학적 샘플에서 풍부한 개별 CD137/4-1BB+ T 세포의 HTO 확인(1-5)에 기반한 5개의 독특한 클러스터를 보여준다. 각 클러스터는 숫자와 그레이스케일 그라데이션(grayscale gradation)으로 확인된다. 클러스터 "M"은 다중 HTO로 확인되는 개별 세포이다. 각 점은 개별 세포를 나타낸다. **도 9b**는 도 9a의 클러스터 맵을 복제하고 HTO 클러스터에서 공유되지 않는 TCR 클론을 나타내는 세포를 보여주고, 예를 들어, HTO에 의해 확인된 독특한 항원에 특이적인 TCR을 발현한다 동일한 클론의 세포는 동일한 그레이스케일 착색으로 표시된다. **도 9c**는 개별 세포에 의한 CD137/4-1BB, IFNγ, GZMH, GNLY, CD38, CCL3, 및 LAG3의 상대적인 RNA 발현 수준을 보여주는 도 9a-b의 클러스터 맵의 복제물을 제공한다. 또한 이들 세포에 의한 CD137/4-1BB 단백질 발현 수준(CITE-Seq)이 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 올리고뉴클레오티드(올리고) 태깅된 항체는 전통적인 유동 세포측정 분석을 우회하는 방법으로 개발되었다. 예를 들어, WO2018144813을 참조하고, 그 전체 내용은 참고로 본 명세서에 포함된다. 이러한 올리고 태깅된 항체는 단일 세포 RNA 서열분석(scRNA SEQ) 실험을 위한 단일 세포 추적을 돕기 위해 생존 새포의 표면의 단백질을 결합하는 도구로 사용될 수 있다. 문헌[Stoeckius(2017) bioRxiv((2018) Genome Biology 19:224에도 인쇄됨)]에 기재된 방법은 모든 표적 세포에서 발현되는 단일 단백질 특이성을 가진 올리고 태깅된 항체뿐만 아니라 서열분석 라이브러리 제조를 위해 궁극적으로 풀링되는 개별 샘플을 추적하기 위해 샘플당 독특한 서열을 갖는 독특한 올리고뉴클레오티드 태그(또한 해시태그 올리고뉴클레오티드 또는 HTO로 지칭됨)을 사용한다. 이 방법에서, 각 세포는 세포가 온 곳에서 샘플을 확인하는 독특한 올리고뉴클레오티드 서열로 태깅될 수 있다. 이 올리고뉴클레오티드 서열는 서열분석 라이브러리에 포함되어 있어 서열분석 정보를 통해 샘플의 동일성이 결정될 수 있다. 전통적으로 해싱 항체는 데이터를 정규화하고 효율성을 개선하기 위해 하나의 단일 세포 서열분석(scSEQ) 라이브러리 제조로 다중 샘플을 풀링하는 데 (예를 들어, 샘플을 다중화(multiplex)하는 데) 사용된다.

[0029] 예를 들어, 특정 T 세포 반응을 특성화하기 위한 기능적 검정에서 HTO의 사용은 이전에 설명되었으며, 여기서 HTO는 주요 조직적합성 복합체 (MHC)의 다량체에 접합되고, 문헌[Bentzen 등 (2016) *Nature Biotechnology* 34:1037-45]를 참조한다. MHC는 항원 제시 세포(APC)에 의해 발현되고 펩티드를 인식하는 T 세포에 펩티드를 제시한다. 독단적으로 $CD8^+$ T 세포는 MHC I과 쌍을 이루는 반면 $CD4^+$ T 세포는 MHC II와 쌍을 이룬다. 또한, MHC의 극도의 다형성은 어느 대립유전자가 T 세포에 의해 자가 인지되는지를 아는 것을 중요하게 하여, 임의의 반응이 외래 MHC의 제시가 아닌 펩티드 자체의 제시로 인한 것이라고 말할 수 있다. 따라서 항원 특이적 T 세포를 효과적으로 자극하고 펩티드 특이적 T 세포 반응을 특성화할 수 있으려면 펩티드가 해당 T 세포에 클래스 및 일배체형이 일치하는 MHC에 제시되어야 한다.

[0030] 이전에, 펩티드 특이적 T 세포 반응은 기능적 검정 예컨대 증식 검정, 크로뮴 기반 세포독성 검정, Ca^{2+} 플럭스 검정, 및 더 통상적으로, 사이토카인 검출 검정 예컨대 ELISPOT 및 세포내 사이토카인 유동 세포측정 염색을 특징으로 하였다. 문헌[Klinger 등 (2015) PLoS One DOI:10.1371/journal.pone.0141561]은 그러한 분석의 다중화를 기재한다. 그러나 이러한 기능적 검정은 항원 특이성을 묘사하거나 단일 세포 수준에서 반응을 특성화할 수 없다는 점에서 제한적이었다. 이러한 한계 중 일부는 유동 세포측정 분석 MHC 사량체 염색으로 극복되었다. 유동 세포측정 분석 MHC 사량체 염색을 사용하여, 관심 펩티드가 로드된 형광단 접합 MHC 다량체를 사용하여 특정 T 세포 반응을 평가할 수 있다. 관심 펩티드가 로딩된 MHC 다량체에 특이적으로 결합하고, 그와 함께 활성화될 가능성이 있는 T 세포의 확인은 형광성 MHC 다량체, 및 때때로 다른 항체에 결합된 이들 세포를 스크리닝함으로써 달성되었다. 형광 표지된 MHC 다량체에서 HTO 접합된 MHC 다량체로의 전환은 활성화 T 세포를 특성화하는 데 사용할 수 있는 소수의 형광 태그의 제한 인자를 제거한다. 추가로, 항체를 해싱하는 것과 유사하게, MHC 다량체를 해싱하는 것은 서열 분석을 위해 궁극적으로 풀링되는 개별 샘플을 추적하는 데 유용하며, 이에 의해 HTO 서열이 검출되어 서열분석 라이브러리에 포함되고, 분석되는 T 세포에 결합된 MHC/펩티드 조합을 확인한다. 그러나, 상기 문헌[Stoeckius(2017) bioRxiv(또한 (2018) Genome Biology 19:224에도 인쇄됨)]에 설명된 방법과 달리, HTO 접합된 MHC 멀티머의 사용은 이러한 사용이 또한 기능적 분석, 예를 들어, 특정 T 세포에 결합할 수 있는 MHC/펩티드 조합의 확인을 제공한다는 점에서 샘플의 추적 이상을 제공한다.

[0031] 단일 세포 수준에서 항원 특이적 T 세포 반응을 추적하기 위한 기능적 검정이 본 명세서에 기재되어 있지만, 이러한 기능적 검정은 MHC 다량체의 사용을 요구하지 않는다(비록 금지하지도 않음). 일반적으로, 본 명세서에 기

재된 방법은 해싱 분자를 사용하여 개별 검정 웰에서 활성화 T 세포를 추적한다. 모든 웰의 세포가 예를 들어 세포막(예를 들어, 하나 이상의 올리고 태깅된 지질)에 통합될 수 있고/거나 하나 이상의 편재성 세포 표면 마커 (예를 들어, 하나 이상의 올리고 태깅된 항원 결합 단백질)에 결합하는 하나 이상의 올리고 태깅된 분자로 독특하게 표지된 후에만, 각각은 풀링된 상이한 독특한 배양물이다. 세포에 해시태깅되기 때문에, 그의 공급원 및 동족 항원을 확인할 수 있으며 샘플을 따로 보관할 필요가 없다. 풀링 후, 활성화 유도 마커(AIM)에 대한 유동 세포측정 분석의 기능적 검정을 사용하여 활성화되지 않은 풀의 세포에서 활성화 세포를 분류할 수 있다.

[0032] 본 명세서에 기술된 방법의 비제한적인 예시적인 예시가 **도 1**에 예시적으로 도시되어 있다. 이 비제한적 예에 나타낸 바와 같이, 단계 (1)에서 단백질, 펩티드, RNA, 세포, 세포 용해물 등. 및/또는 단일 자극 또는 자극의 풀일 수 있는 독특한 항원, 예를 들어, 독특한 T 세포 에피토프 (예를 들어, "1", "2", "3")는 복수의 생물학적 샘플 중 하나를 포함하는 각각의 개별적인 웰에 첨가되고, 복수의 생물학적 샘플 각각은 T 세포 및 T 세포에 의해 인식되는 MHC를 포함하고, 예를 들어, 복수의 샘플 각각은 자가 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함한다. 생물학적 샘플은 활성화 T 세포에 의한 활성화 유도 마커의 상향조절에 충분한 시간(예를 들어, 6-72시간) 동안 독특한 항원과 함께 배양된다. 일부 비제한적인 예시적 구현예에서, 예를 들어 활성화 T 세포의 재자극 동안 활성화 T 세포에 의한 AIM의 상향조절을 위해 항원과 함께 생물학적 샘플의 밤새 배양(예를 들어, 약 18-24시간)만이 필요하다. 일부 비제한적 구현예에서, 생물학적 샘플은 먼저 항원으로, 예를 들어, 약 1 또는 2주 동안, 예를 들어, 약 7-14일 동안 프라이밍되어, 밤새 재자극 배양 전에 반응성 T 세포의 사전 확장을 허용한다. 재자극 후, 단계 (2)에서, 각 개별 웰은 세포막에 통합되고/거나 활성화 상태와 무관한 T 세포에 의해 발현된 세포 표면 마커 (예를 들어, β2 마이크로글로불린, CD2, CD298, CD3, CD4, 및/또는 CD8 등)에 특이적으로 결합하는 (예를 들어, 지질, 항체 등)에 접합된 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO) 와 함께 인큐베이션되고, 독특한 HTO (예를 들어, "1", "2", "3") 각각은 개별적인 웰에서 각각에서 독특한 항원을 확인한다. 단계 (3)에서, 모든 독특한 생물학적 샘플은 다중화, 예를 들어 풀링되고, 풀링 후, 단계 (4)에서 독특한 생물학적 샘플의 풀을 포함하는 조성물은 활성화 T 세포 (예를 들어, CD137/4-1BB) 및 다른 단일 세포 서열분석 및 유동 세포측정 시약 원하는 경우, 예컨대 CITE-seq 항체, 형광 태그된 항체, 및 올리고뉴클레오티드 태깅된 다량체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 것에 의해 발현된 활성화 유도 마커를 검출하는 데 유용한 제제와 함께 인큐베이션된다. 도 1에 도시된 비제한적 구현예는 풀링 후 이러한 추가 시약의 첨가를 예시하지만, 다른 비제한적 구현예에서, 이러한 추가 시약은 풀링 전에 첨가될 수 있다. 단계 (5)에서, 활성화 유도된 마커, 예를 들어, 활성화 유도된 마커에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체, 및 또 다른 T 세포 마커 (예를 들어, CD137/4-1BB+ CD3+ T 세포)를 검출하는 데 유용한 제제로 표지된 세포는 AIM 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)에 의해 기능적으로 풍부하다. (6) 단계에서, 그 다음, 풍부한 세포 각각의 전사체는 분석되고, 예를 들어, 분류된 세포 집단은 10X Genomics 단일 세포 Gel Bead-In Emulsions(GEMS)로 캡슐화되어 세포를 단일 세포로 분할하고, RNA 서열분석은 각 세포에서 수행된다. 도 1에 도시된 비제한적인 구현예에서, HTO, 전사체(5'mRNA), TCR-seq, CITE-seq 및/또는 올리고-다량체에 대한 5' 서열분석 라이브러리가 단계 (6)에서 고처리량 단일 세포 서열분석을 위해 생성된다. 단계 (7)에서 개별 HTO 클러스터는 생물정보학적으로 역다중화되어 항원 개별 세포가 노출된 것을 설명한다.

[0033] 기재된 기능적 검정은 많은 이점을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법은 예를 들어 자가 T 세포 및 MHC의 사용에 의해 충분히 개체화될 수 있다. 또한 이는 테스트되는 생물학적 샘플이 제한되더라도 다수의 반응성의 조사를 동시에 허용한다. 동종 항원/T 세포 반응성은 단일 세포 또는 풀링된 세포 수준에서 확인될 수 있다. MHC에 특이적이지 않은 시약을 사용하면 환자 샘플 전체에 이 방법을 유연하게 적용할 수 있을 뿐만 아니라 MHC가 아닌 제한된 방식으로 정보를 캡처할 수 있고, 예를 들어, CD4+ 및 CD8+ T 세포 정보 모두 동시에 캡처할 수 있고, 그리고 기능적 표현형(예를 들어, 활성화 유도 마커)의 사용은 활성화 T 세포만을 확인하고 평가하는 데 도움이 된다. 또한, 본 명세서에 기재된 방법은 개체화된 요법 개발 및/또는 결정을 알릴 수 있는 빠르고 비용 효율적인 방식으로 활성화 T 세포의 표현형 및 전사체를 평가하는 후속 방법과 호환된다. 이러한 방식으로, 요법(백신, 면역요법 등)에 대한 면역 반응, 예를 들어 백신 인코딩 항원, 바이러스 항원 및/또는 종양 항원에 대한 T 세포 반응성이 평가될 수 있다. 유사하게, 자가면역 반응성, 예를 들어 자가 항원에 대한 T 세포 반응성의 면역 모니터링도 분석될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법은 TCR 발견 및 치료제 개발, 예를 들어 다수의 관심 항원에 걸친 관심 TCR에 대해 스크리닝 및/또는 TCR:에피토프 결합 발견 및 알고리즘 생성에 유용할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제공된 에피토프:TCR 서열 데이터의 편집은 TCR 서열(들) 및/또는 특이적 HLA-펩티드 결합과 연관된 구조적 특징에 관한 일배체형 특이적 규칙의 발견에 도움이 될 수 있다.

[0034] 따라서, 다음 단계 중 하나 이상을 포함하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다:

[0035] T 세포 및 MHC를 포함하는 생물학적 샘플을 해싱하고, 예를 들어 생물학적 샘플을 독특한 항원(예를 들어, T 세포 에피토프) 및 독특한 바코드(예를 들어, 해시태그 올리고뉴클레오티드)와 함께 인큐베이션하여 독특한 생물학적 샘플을 형성하는 단계,

[0036] 복수의 독특한 생물학적 샘플을 풀링하는 단계,

[0037] 기능적 검정(예를 들어, AIM 분류, 예를 들어 활성화 유도 마커, 예를 들어 CD137/4-1BB, CD107, IFNɣ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, 및/또는 TIGIT에 대한 형광 표지 항체 사용)에 기초한 활성화 T 세포를 풍부화하는 단계,

[0038] (a) 활성화된 T 세포의 독특한 바코드 및 이에 따른 T 세포를 활성화시키는 항원, 및 선택적으로 (b) 예를 들어 치료제 개발을 위해, 예를 들어, 활성화 T 세포를 확인하는 데 유용할 수 있는 다른 서열, 예를 들어, TCR α 및 β 서열을 확인하기 위해 예를 들어 단일 세포 기준으로 활성화 세포에 대해 서열분석 방법, 및 선택적으로 다른 잘 알려진 방법 (예를 들어, CITE-seq 분석, 유동 세포측정 분석, 및/또는 다량체 염색)을 수행하는 단계.

[0039] ***정의***

[0040] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0041] 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 하나 이상의 방법 및/또는 본 명세서에 기재된 유형의 단계 및/또는 본 개시 내용을 읽을 때 당업자에게 명백해질 것을 포함한다.

[0042] 용어 "약" 또는 "대략"은 값의 의미 있는 범위 내에 있는 것을 포함한다. "약" 또는 "대략"이라는 용어에 포함되는 허용 가능한 변동은 연구 중인 특정 시스템에 따라 달라지며, 당업자는 쉽게 이해할 수 있다.

[0043] T 세포는 주요 조직적합성 복합체(MHC)와 연관된 항원 제시 세포의 표면에 있는 작은 항원 결정인자의 에피토프에 결합한다. T 세포는 T 세포 표면의 T 세포 수용체(TCR) 복합체를 통해 이러한 에피토프에 결합한다. T 세포 수용체는 사슬의 두 가지 유형: α (알파) 및 β (베타) 사슬, 또는 ɣ (감마) 및 δ (델타) 사슬으로 구성된 이종이량체 구조이다. α 사슬은 인간 염색체 14의 α 유전자좌 내에 위치한 핵산 서열에 의해 인코딩되며, 이는 또한 전체 δ 유전자좌를 포함하고, β 사슬은 인간 염색체 7 상의 β 유전자좌 내에 위치한 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 대부분의 T 세포에는 αβ TCR이 있지만; 소수의 T 세포에는 ɣδ TCR이 있다. α 및 β 사슬이 본 명세서에서 일반적으로 언급되지만, 본 명세서에 기재된 방법, 조성물 및 키트는 ɣδ TCR 사슬에 유사하게 적용될 수 있다.

[0044] T 세포 수용체 α 및 β 폴리펩티드(및 유사하게 ɣ 및 δ 폴리펩티드)는 디설파이드 결합을 통해 서로 연결된다. TCR을 구성하는 2개의 폴리펩티드 각각은 불변 및 가변 영역을 포함하는 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포질 꼬리(막횡단 도메인 및 세포질 꼬리도 불변 영역의 일부임)를 함유한다. TCR의 가변 영역은 항원 특이성을 결정하고 면역글로불린과 유사하게 3개의 상보적 결정 영역(CDR), 예를 들어 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 또한 면역글로불린 유전자와 유사하게, T 세포 수용체 가변 유전자 좌(예를 들어, TCRα 및 TCRβ 유전자좌)는 다수의 재배열되지 않은 V(D)J 세그먼트 (가변 (V), 연결 (J), 및 TCRβ 및 δ, 다양성 (D) 세그먼트)를 함유한다. 흉선에서 T 세포가 발달하는 동안, TCRα 가변 유전자 좌는 재배열을 거쳐, 생성된 TCR α 가변 도메인이 VJ 세그먼트 (Vα/Jα 서열)의 특정 조합에 의해 인코딩되도록 하고; TCRβ 가변 유전자 좌는 재배열을 거쳐, 생성된 TCR β 가변 도메인이 VDJ 세그먼트 (Vβ/Dβ/Jβ 서열)의 특정 조합에 의해 인코딩된다. TCR α 및 β 가변 도메인, 특히 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 보다 특히 CDR3은 TCR이 MHC에 결합하는 특이성을 제공한다.

[0045] 용어 "주요 조직적합성 복합체" 및 "MHC"는 용어들 "인간 백혈구 항원" 또는 "HLA" (후자의 2개는 일반적으로 인간 MHC용으로 예약됨), 자연 발생 MHC, MHC의 개별 사슬 (예를 들어, MHC 클래스 I α (중) 쇄, β2 마이크로글로불린, MHC 클래스 II α 사슬, 및 MHC 클래스 II β 사슬), MHC의 그러한 사슬의 개별 서스유닛 (예를 들어, MHC 클래스 I α 사슬의 α1, α2, 및/또는 α3 서브유닛, MHC 클래스 II α 사슬의 α1-α2 서브유닛, MHC 클래스 II β 사슬의 β1- β2 서브유닛) 뿐만 아니라 부분 (예를 들어, 펩티드 결합 부분, 예를 들어, 펩티드 결합 홈), 그의 돌연변이체 및 다양한 유도체 (융합 단백질 포함)을 포괄하고, 여기서 이러한 부분, 돌연변이체 및 유도체는 T 세포 수용체(TCR), 예를 들어 항원 특이적 TCR에 의한 인식을 위해 항원성 펩티드를 표시하는 능력을 보유한다. MHC I은 약 8-10개 아미노산의 펩티드를 담을 수 있는 중쇄 α 사슬의 α1 및 α2 도메

인에 의해 형성된 펩티드 결합 홈을 포함한다. 두 클래스의 MHC가 펩티드 내에서 약 9개 아미노산(예를 들어, 5 내지 17개 아미노산)의 코어에 결합한다는 사실에도 불구하고, MHC 클래스 II 펩티드 결합 홈(클래스 II MHC β 폴리펩티드의 β1 도메인과 회합된 클래스 II MHC α 폴리펩티드의 α1 도메인)의 개방형 특성은 더 넓은 범위의 펩티드 길이를 허용한다. MHC 클래스 II에 결합하는 펩티드는 일반적으로 길이가 13 내지 17개의 아미노산으로 다양하지만 더 짧거나 더 긴 길이가 드문 것은 아니다. 결과적으로, 펩티드는 MHC 클래스 II 펩티드 결합 홈 내에서 이동하여, 임의의 주어진 시간에 홈 내에 직접 위치하는 9-mer를 변경할 수 있다.

[0046] 용어 "항원"은 면역적격 숙주 내로 도입될 때 숙주의 면역계에 의해 인식되고 숙주에 의해 면역 반응을 유발하는 임의의 작용제 (예를 들어, 단백질, 펩티드, 폴리사카라이드, 당단백질, 당지질, 뉴클레오티드, 그의 부분, 또는 그의 조합)를 포괄한다. T-세포 수용체(TCR)는 면역학적 시냅스의 일부로서 주요 조직적합성 복합체(MHC)의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식한다. 펩티드-MHC(pMHC) 복합체는 상호작용의 특이성을 제공하는 펩티드(항원 결정인자) 및 TCR 개체특이형과 함께 TCR에 의해 인식된다. 따라서, 용어 "항원"은 MHC, 예를 들어, 펩티드-MHC 복합체, 예를 들어, pMHC 복합체의 맥락에서 제시된 펩티드를 포괄한다. MHC에 표시되는 펩티드는 "에피토프" 또는 "항원 결정인자"로도 지칭될 수 있다. 용어들 "펩티드", "항원 결정인자", "에피토프" 등은 항원 제시 세포(APC)에 의해 자연적으로 제공된 것을 포괄할 뿐만 아니라 T 세포에 적절하게 제시될 때 T 세포에 의해 인식되는 한 원하는 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 인공적으로 제조된 아미노산 서열을 갖는 펩티드도 에피토프로 사용될 수 있다.

[0047] 동족 pMHC와의 TCR 결합은 일반적으로 수명이 짧지만, 이러한 상호작용은 단일 골격, 예를 들어, 표면에 다중 pMHC를 통합함으로써 제공되는 "결합능 효과", 예를 들어, 다량체, 예를 들어, 사량체, 텍스트라머 등의 사용에 의해 안정화될 수 있다. 다양한 pMHC 다량체화 플랫폼이 활용되었으며, 이들 중 다수는 상업적으로 이용 가능하다. 예를 들어, 문헌[Wooldridge 등 (2009) *Immunol.* 126:147-64] 참조. 이러한 결합능 효과를 수용하기 위해, 일부 구현예에서, MHC의 적절한 밀도가 달성될 수 있도록 본 명세서의 MHC는 바람직하게는 표면 결합된다.

[0048] 본 명세서에 개시된 비제한적인 구현예에서 MHC가 결합될 수 있는 비제한적인 예시적인 표면은 하기를 포함한다:

[0049] a. 세포막, 예를 들어 MHC가 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포 및 B 세포와 같은 전문 항원 제시 세포)의 표면, 리포솜의 표면, 바이러스 벡터의 외피 막 등에서 발현됨,

[0050] b. 비드,

[0051] c. 세포 배양 접시, 예를 들어 다중 웰 플레이트의 웰, 및

[0052] d. 다량체, 예를 들어 사량체, 덱스트라머 등

[0053] 항원은 합성 펩티드, 단백질, mRNA, 바이러스, 바이러스 벡터, DNA, 생존 세포, 세포 용해물 등을 포함할 수 있다. 일부 비제한적 구현예에서, 항원은 그의 펩티드 부분을 비롯한 종양 연관 항원이다. 이러한 구현예에서, 종양 연관 항원은 ALK, BAGE 단백질, BIRC5 (서바이빈), BIRC7, CA9, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD27, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD79, CDK4, CEACAM3, CEACAM5, CLEC12A, EGFR, EGFR 변이체 III, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, EPCAM, EPHA2, EPHA3, FCRL5, FLT3, FOLR1, GAGE 단백질, GD2, GD3, GPNMB, GM3, GPR112, IL3RA, KIT, KRAS, LGR5, EBV 유래 LMP2, L1CAM, MAGE 단백질, MLANA, MSLN, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC16, MUM1, ANKRD30A, NY-ESO1 (CTAG1B), OX40, PAP, PAX3, PAX5, PLAC1, PRLR, PMEL, PRAME, PSMA (FOLH1), RAGE 단백질, RET, RGS5, ROR1, SART1, SART3, SLAMF7, SLC39A6 (LIV1), STEAP1, STEAP2, TERT, TMPRSS2, 톰슨-누벨(Thompson-nouvelle) 항원, TNFRSF17, TYR, UPK3A, VTCN1, WT1로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0054] 또 다른 구현예에서, 항원은 감염성 질환과 연관될 수 있다. 이러한 구현예에서, 예를 들어 생물학적 샘플은 감염원 또는 이로부터 유래된 에피토프가 추가되어 독특한 생물학적 샘플이 될 수 있다. 하나의 이러한 구현예에서, 감염성 질환 연관 항원은 바이러스 항원일 수 있고 바이러스 항원은 HIV, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 헤르페스 바이러스 (예를 들어, HSV-1, HSV-2, CMV, HAV-6, VZV, 엡슈타인 바르 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코로나바이러스 (예를 들어, SARS-CoV-2), 호흡기 세포융합 바이러스, 볼거리 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV, 뎅기열 바이러스, 파필로마바이러스, 연성종양 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스, 에볼라 바이러스, 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 이러한 구현예에서, 감염성 질환 연관 항원은 박테리아 항원일 수 있고 박테리아

항원은 클라마이디아, 리케차, 마이코박테리아, 스타필로코쿠스, 연쇄상구균, 폐렴구균, 수막구균, 임균, 클렙시엘라, 프로테우스, 세라티아, 슈도모나스, 레지오넬라, 디프테리아, 살모넬라, 바실러스, 콜레라, 테타누스독소증, 보툴리눔독소증, 탄저병, 흑사병, 렙토스피라, 및 라임병 박테리아 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0055] 본 명세서에 기재된 방법에 사용된 용어 "생물학적 샘플"은 생물학적 활성 세포, 생물학적 활성 세포의 활성제, 및 선택적으로 세포의 생존력 및/또는 세포의 생물학적 활성화, 예를 들어, 활성을 지원하는 배지를 포함하는 배양물을 지칭한다. 생물학적 활성 세포는 특정 유형의 단리된 세포(예를 들어, T 세포) 또는 상이한 세포 유형의 혼합물(예를 들어, 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 항원 제시 세포 (APC) 및 T 세포의 공동-배양물, 수지상 세포 (DC) 및 T 세포의 공동-배양물, 등)의 균질한 집단일 수 있고, 이는 대상체, 예를 들어, 인간 또는 포유동물 또는 다른 종 대상체로부터 단리될 수 있거나 그로부터 단리된 생물학적 유체 또는 조직을 포함할 수 있다. 생물학적 유체 또는 조직은 비제한적인 예로서 혈청, 혈장, 전혈, 말초 혈액, 타액, 소변, 질 또는 자궁경부 분비, 양수, 태반 유체, 뇌척수액, 장액 유체, 또는 점막 분비 (예를 들어, 협측, 질 또는 직장)을 포함할 수 있다. 또 다른 샘플은 혈액 유래 또는 생검 유래 생물학적 샘플 또는 조직, 예를 들어 종양 침윤 림프구(예를 들어, 종양), 경결 등을 포함하는 조직을 포함한다.

[0056] 본 명세서에 개시된 일부 비제한적인 생물학적 샘플은 T 세포 및 표면-결합된 MHC 제시 항원 (예를 들어, T 세포 에피토프)를 포함하고, 예를 들어, 생물학적 활성 세포는 T 세포 및 활성화제는 항원 제시 표면 결합 MHC (예를 들어, T 세포 에피토프)이다. 본 명세서에 개시된 일부 비제한적인 생물학적 샘플은 T 세포, 항원 제시 표면 결합 MHC (예를 들어, T 세포 에피토프), 및 T 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 하나 이상의 사이토카인을 포함하고, 예를 들어, 생물학적 활성 세포는 T 세포이고, 활성화제는 항원 제시 표면 결합 MHC (예를 들어, T 세포 에피토프)이고, 그리고 배지는 T 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 사이토카인은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 인터류킨을 포함한다. 본 명세서에 개시된 일부 비제한적인 생물학적 샘플은 T 세포 및 항원 제시 표면 결합 MHC을 포함하고, MHC는 항원 제시 세포, 예를 들어, 체세포의 표면 상에서 발현되고, 이는 선택적으로 단핵구 유래된 수지상 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 및 B 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 전문 항원 제시 세포일 수 있다. T 세포 및 항원 제시 표면 결합 MHC를 포함하는 이러한 비제한적인 생물학적 샘플(여기서 MHC는 항원 제시 세포의 표면에서 발현됨)은 선택적으로 T 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 사이토카인 (예를 들어, IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21) 및/또는 항원 제시 세포의 생존력, 활성화, 및/또는 활성을 지원하는 사이토카인 (예를 들어, GM-CSF, FLT3L, 및/또는 IL-4)을 추가로 포함할 수 있다. T 세포 및/또는 항원 제시 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 데 유용한 추가 사이토카인 또는 사이토카인의 조합(및 T 세포 및/또는 항원 제시 세포의 생존, 활성화 및/또는 활성을 지원하기 위한 상기 사이토카인의 양)는 당업계에 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, APC를 활성화하는 추가 인자, 예를 들어 IFNα, LPS, 폴리-IC, TNF, IL-1β, IL-6, PGE2 등이 세포의 생존력을 지원하는 배지에 포함된다.

[0057] 생물학적 샘플은 종종 특정 공급원, 대상체 또는 환자로부터 얻거나 유래된다.

[0058] "개체" 또는 "대상체" 또는 "동물"은 인간, 수의과 동물 (예를 들어, 고양이, 개, 소, 말, 양, 피그, 등) 및 질환의 실험 동물 모델 (예를 들어, 마우스, 랫트)을 지칭한다. 일 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0059] 본 명세서의 비제한적 구현예에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 유래된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 생물학적 샘플은 새로 단리된 PBMC, 동결보존된 새롭게 해동된 PBMC, 또는 기억 반응성을 확장하고 검정 신호를 증가시키기 위해 항원의 존재 하에 약 1주일 동안 프라이밍된, 예를 들어 배양된 PBMC를 포함할 수 있다.

[0060] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 생물학적 샘플(예를 들어, 독특한 생물학적 샘플)은 항원, 예를 들어, 적어도 $1X10^5$, $5X10^5$, $1X10^6$, 또는 그 초과 개의 전체 말초 혈액 단핵 세포에 반응하여 T 세포의 활성화를 지원하기에 충분한 수로 T 세포 및 표면 결합된 MHC를 포함한다. 해싱(hashing)과 다중화(multiplexing)의 조합이 유리하게는 낮은 혈액량 샘플, 예를 들어, 낮은 부피 인간 혈액 샘플 상에서 수행될 본 명세서에 기재된 방법을 제공할 수 있는 것은, 1 mL의 전체 (인간) 혈액이 어디든지 $5X10^5$ 내지 $3X10^6$개의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)을 포함할 수 있고/거나 어디든지 $5X10^3$ 내지 $5X10^5$개의 APC (예를 들어, 수지상 세포) 및 어디든지 $5X10^3$ 내지 $5X10^6$개의 T 세포로부터 단리하는 데 사용될 수 있기 때문이다. 비제한적인 예로서, 대상체로부터 단리된 10 mL의 전혈

에서 유래한 세포의 수집은 어디든지 $5X10^6$ 내지 $3X10^7$개의 PBMC를 포함할 수 있으므로, 세포의 수집은 복수의 개별 생물학적 샘플(예를 들어, 적어도 20개의 생물학적 샘플 각각은 약 $1X10^5$ 내지 $1X10^6$ PBMC 및/또는 $1X10^5$ 내지 $5X10^5$ DC 및 $1X10^5$ 내지 $5X10^6$ T 세포 등을 포함함)에 동등하게 분배될 수 있고, 이어서, 이들은 풀링되고(각각에 독특한 항원 및/또는 독특한 HTO의 첨가 후), 본원에 기재된 방법에 따라 검정될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 세포의 수집이 복수의 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 2개의 개별 생물제제 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 3개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 5개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 10개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 20개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 30개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은, 적어도 세포의 수집이 적어도 50개의 개별 샘플에 동등하게 분배될 수 있도록 충분한 수의 PBMC를 포함하고, 샘플 각각은 적어도 약 $1X10^5$ PBMC, 적어도 약 $5X10^5$ PBMC, 또는 적어도 약 $1X10^6$ PBMC를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 1 mL, 약 3 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은 충분한 수의 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)(예를 들어, 수지상 세포(DC))를 포함하여 세포의 수집이 복수의 개별 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은 충분한 수의 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)(예를 들어, 수지상 세포(DC))를 포함하여 세포의 수집이 복수의 개별 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 충분한 수의 APC 및 T 세포를 포함하여, 세포의 수집은 복수의 개별 생물학적 샘플에 동등하게 분배될 수 있고, 샘플 각각은 APC 및 T 세포 (예를 들어, DC 및 T 세포)를 약 1:1, 약 1:5, 또는 약 1:10의 APC:T 세포 비로 포함하고, 예를 들어, 각각의 샘플은 적어도 $5X10^3$, $5X10^4$, 또는 $5X10^5$ DC 및 약 $5X10^3$, $1X10^4$, $2.5X10^4$, $5X10^4$, $1X10^6$, $2.5X10^5$, $5X10^5$, $1X10^6$, $2.5X10^6$, 또는 $5X10^6$ T 세포를 포함하고, 예를 들어, 세포의 수집은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 단리된 전혈 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 또는 약 50 mL로부터 유래될 수 있다.

[0061] 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플은 염수, 완충액 또는 생리학적으로 허용되는 희석제로 추가로 희석될 수 있다. 대안적으로, 대상체의 생물학적 샘플은 통상적인 수단에 의해 농축될 수 있다. 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플은 또한 "복수의 생물학적 샘플"을 형성하기 위해 2개 이상의 분취물로 나눌 수 있으며, 여기서 복수의

생물학적 샘플 각각은 대략 동일한 수의 생물학적 활성 세포(예를 들어, T 세포) 및 거의 같은 양의 지원 시약을 포함한다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 "복수의 생물학적 샘플"은 생물학적 활성 세포의 복수의 별개의 집단을 지칭하며, 여기서 생물학적 활성 세포의 각 집단은 동일한 대상으로부터 단리되고, 대략 동일한 수의 생물학적 활성 세포를 포함하고, 그리고 생물학적 활성 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 유사한 배양 조건에서, 예를 들어 지원 시약과 함께 유지된다.

[0062] 본 발명의 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 약 1 내지 3일 (예를 들어, 6 내지 72시간, 예를 들어 18 내지 24시간) 동안 항원으로 시험관내 재자극하기 전에 약 1주일 (예를 들어, 약 7 내지 10 일) 동안 항원과 함께 인큐베이션하고, 이어서 독특한 생물학적 샘플의 해싱, 풍부화 및/또는 분석에 의해 생체외에서 프라이밍, 예컨대 사전-확장된다. 본 발명의 일부 구현예에서, 생물학적 샘플을 생체외에서 프라이밍하지 않은 후, 항원으로 시험관내 재자극하고, 이어서 독특한 생물학적 샘플의 해싱, 독특한 생물학적 샘플의 풍부화 및/또는 분석을 수행한다. 생체 외 프라이밍은 일반적으로 생체 내에서 항원과 마주쳤을 수 있는 생물학적 샘플에 필요하지 않다. T 세포를 포함하는 생물학적 샘플에 대한 타이밍(예를 들어, 프라이밍의 경우 7-10일 및 재자극의 경우 6-72시간, 예컨대 18-24시간)을 포함하는 프라이밍 및 재자극 프로토콜은 당해 분야에서 잘 알려져 있다.

[0063] 일부 비제한적 구현예에서, 복수의 생물학적 샘플 각각은 독특한 자극 또는 자극의 독특한 조합(예를 들어, 항원 또는 항원 풀(예를 들어, T 세포 에피토프)) 및/또는 해시 태깅 및 선택적 다중화에 대한 자체 독특한 바코드 예를 들어 (해시태그 올리고뉴클레오티드)과 함께 인큐베이션함으로써 독특한 생물학적 샘플이 된다.

[0064] 본원에 사용된 "해시태깅", "해싱", "태깅" 등은 독특한 생물학적 샘플의 생물학적 활성 세포를 독특한 바코드, 예를 들어 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)에 접합된 분자와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 독특한 바코드는 독특한 생물학적 샘플, 예를 들어, 독특한 항원 (예를 들어, 독특한 T 세포 에피토프)의 독특한 특성, 또는 독특한 항원의 결핍을 확인하며, 상기 분자는 생물학적 활성 세포의 활성화 상태에 관계없이, 세포막에 통합되고/거나 생물학적 활성 세포에 의해 발현되는 세포 표면 마커에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, HTO-분자는 임의의 세포, 예를 들어 임의의 분열 세포 내로 통합될 수 있고/있거나 대부분 또는 모든 세포에 의해 발현되는 세포 표면 마커(예를 들어, β2 마이크로글로불린, CD298)에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 선택된 세포 마커는 활성화 상태(예를 들어, CD2, CD3, CD4, 및/또는 CD8 등)에 관계없이 T 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 상이한 방식으로 세포를 HTO로 표지하는 2개 이상의 분자(예를 들어, 1개의 분자는 세포막에 자체적으로 혼입될 수 있지만, 다른 분자는 마커에 결합하고, 2개 이상의 분자는 2개 또는 더 많은 다른 마커에 결합함)는 각각 HTO에 접합되고 각각은 동일한 독특한 생물학적 샘플에 태깅하기 위해 해시태깅 방법에 사용되며, 2개 이상의 분자는 동일한 바코드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 독특한 생물학적 샘플을 해시태그하는 데 사용되는 2개 이상의 마커는 동일하거나 상이한 마커일 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 독특한 생물학적 마커는 제1 독특한 바코드, 예를 들어, 제1 HTO에 접합된 제1 분자로 태깅될 수 있고, 제2 독특한 생물학적 샘플은 제2 독특한 바코드, 예를 들어, 제2 HTO에 접합된 제2 분자로 태깅될 수 있고, 그리고 제3 생물학적 샘플은 제3 바코드, 예를 들어, 제3 바코드에 접합된 제3 분자로 태깅되며, 여기서 제1, 제2 및 제3 분자 각각은 동일하고, 예를 들어 각각이 세포막 내로 통합되거나 또는 동일한 마커에 특이적으로 결합하지만, 여기서 제1, 제2 및 제3 분자 각각은, 제1, 제2 및 제3 분자 각각이 구별될 수 있을 정도로 충분히 상이한 독특한 바코드를 포함한다. 결합되지 않은 분자를 세척한 후, 독특하게 해싱된 독특한 생물학적 샘플을 풀링하고 항원 특이적 활성화 T 세포 집단의 추가 기능적 및 표현형 분석(예를 들어, 유동 세포측정 분석 및/또는 형광 세포 활성화된 분류, 단일-세포 서열 분석, 등)을 위한 추가 시약을 선택적으로 배양할 수 있는 것은, 해시태그를 사용하면 동일한 샘플에서 파생된 각 샘플 및 표적의 나중 검출, 추적 및/또는 정량화할 수 있기 때문이다.

[0065] 일부 비제한적인 구현예는 본 명세서에 기재된 방법의 민감성 및/또는 견고성을 추가로 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 비제한적 구현예에서, scSEQ 샘플당 20개의 잠재적 반응성 올리고 해싱된 검정 샘플을 풀링하면 일반적으로 적절한 풍부화가 발생한다. 일부 구현예에서, 조합 해싱 접근법을 사용하여 검정의 민감성을 높일 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 상이한 방식으로 세포를 각각의 HTO로 각각 표지하는 2개 이상의 분자(예를 들어, 1개의 분자는 세포막에 자체적으로 혼입될 수 있지만, 다른 분자는 마커에 결합하고, 2개 이상의 분자는 2개 이상의 상이한 마커 등(예를 들어, β2 마이크로글로불린 및 CD2)에 결합할 수 있음), 각각은 동일한 바코드, 예를 들어 동일한 서열을 포함하는 HTO에 접합되고, 동일한 독특한 생물학적 샘플에 태깅하기 위해 해시태깅 방법에 사용된다.

[0066] 예를 들어, 임의로 및 일부 비제한적 구현예에서 바람직하게는 활성화 유도된 마커에 결합하는 분자 (예를 들어, 항체 또는 다른 거대분자, 예를 들어 지질)에 대한 해시태그 올리고뉴클레오티드의 접합을 포함한 "해시

태그 올리고뉴클레오티드", "HTO" 등의 생성 및 사용은 널리 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[WO2018144813; Stoeckius 등 (2018) *Genome Biol.* 19:224; van Buggenum JAGL 등]를 참조하며, 각각의 참고문헌은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다. 일반적으로, HTO는 독특한 바코드, 예를 들어, 표준 중합효소 연쇄 반응 프로토콜, 예컨대, 세포 전사체을 서열분석하는 단일 세포 RNA 서열분석 프로토콜에 따라 결정될 수 있는 독특한 서열을 포함하는 핵산을 포함하고(예를 들어, 문헌[Stoeckius 등 참조 (2017) Nat. Method 9:2579-10] 참조), 상기 독특한 서열은, 본원에 기재된 구현예에서, 생물학적 샘플을 활성화시키는 자극 또는 자극의 조합을 확인하며, 예를 들어 생물학적 샘플이 활성화 유도된 마커를 발현하게 한다. 접합 화학, 예를 들어 iEDDA 클릭 화학은 접합, 예를 들어 해시태그 올리고뉴클레오티드를 분자, 예를 들어 세포 표면 마커, 예를 들어 구성적으로 발현된 세포 표면 마커에 결합하는 리간드에 공유 부착하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 표면 마커는 T 세포(예를 들어, β2 마이크로글로불린, CD298)를 포함하는 대부분 또는 모든 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 선택된 세포 마커는 활성화 상태(예를 들어, CD2, CD3, CD4, 및/또는 CD8 등)에 관계없이 T 세포에 의해 발현된다. 올리고 태깅된 항체가 본 명세서에 기재되어 있지만, 특히 단일 세포 시퀀싱 분석에 기초한 추가 기능적 및/또는 표현형 특성화를 위해 지질 및 세포 침투 핵산을 포함하는 올리고 태깅된 세포막과 같은 항체 이외의 다른 올리고 태깅된 추적 분자를 사용할 수 있다.

[0067] 이들 조성물 및 방법에 사용되는 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO)는 세포, 예를 들어 세포 막 내로 혼입된 지질 및/또는 단일 확인된 마커에 특이적으로 결합하는 리간드를 표지하는 데 사용될 수 있는 임의의 자연 발생 또는 합성 생물학적 또는 화학적 분자에 접합될 수 있다. 결합은 공유적 또는 비공유적일 수 있으며, 즉 접합되거나 리간드 및 이의 각각의 표적의 특성을 고려하는 임의의 공지된 수단에 의해 이루어질 수 있다. 용어 "제1 HTO 접합 분자" 및 "추가 HTO 접합 분자" 또는 "제2 HTO 접합 분자" 등은 세포를 다른 방식으로 표지하는 HTO 접합 분자를 지칭하고, 예를 들어, 1개의 분자는 세포막에 자체적으로 통합될 수 있지만, 제2 분자는 마커에 결합하고, 2개 이상의 분자는 상이한 표적 또는 표적의 상이한 부분에 결합할 수 있다. 예를 들어, 여러 개의 "제1 HTO 접합 분자"가 세포막에 통합되거나 동일한 부위에서 동일한 마커에 결합한다. 다중 추가 HTO 접합 분자는 제1 HTO 접합 분자와 상이하고 임의의 추가 HTO 접합 분자와 상이한 마커에 결합한다. HTO-접합된 분자 (예를 들어, 제1 HTO-접합된 분자, 및 추가의 HTO-접합된 분자, 예를 들어, 제2, 제3, 제4 및 제5 HTO-접합된 분자, 등)은 독립적으로 펩티드, 단백질, 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 항체의 항원 결합 부분), 항체 모방체, 아피바디, 리보- 또는 데옥시리보-핵산 서열, 압타머, 지질, 콜레스테롤, 다당류, 렉틴, 또는 동일하거나 상이한 분자의 배수로 형성된 키메라 분자로부터 선택될 수 있다. HTO 접합 분자의 추가의 비제한적인 예는 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 단쇄 Fv (scFv), 디아바디 (Dab), 신바디, 나노바디, BiTE, SMIP, DARPin, DNL, 두오칼린, 아드넥틴, 파미노머, 쿠니츠 도메인 Albu-dab, DART, DVD-IG, Covx-바디, 펩티바디, scFv-Ig, SVD-Ig, dAb-Ig, 놉-인-홀, triomAb 등 또는 이들의 조합을 포함하는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, HTO에 접합된 분자는 재조합 또는 자연 발생 단백질이다. 특정 구현예에서, HTO에 접합된 분자는 단클론성 또는 다클론성 항체, 또는 그의 단편이다. 일 구현예에서, HTO가 접합된 분자는 그 자체가 또한 하나 이상의 검출가능한 표지, 예컨대 바코드, 예를 들어, HTO를 측정 또는 검출하는 방법과 독립적인 방법에 의해 널리 공지된 방법에 따라 측정될 수 있는 형광단으로 직접적으로 표지될 수 있다.

[0068] 일부 구현예에서, HTO 접합된 분자는 그 자체를 세포막에 통합하는 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, HTO 접합된 분자는 그 자체를 세포막에 통합하는 콜레스테롤을 포함한다. 일부 구현예에서, HTO 접합 분자는 지질- 및 콜레스테롤-변형된 올리고뉴클레오티드(LMO 및 CMO)를 포함한다. 예를 들어, 그 전체가 참조로 포함된 문헌[McGinnis 등 (2019) Nature Methods 16:619-26]를 참조한다.

[0069] 항원 특이적 활성화 T 세포 집단의 추가 기능적 및 표현형 분석을 위한 검정은 당업계에 잘 알려져 있으며 형광 표지 결합 단백질 (예를 들어, 항체) 또는 MHC 다량체를 사용하는 형광 세포 활성화된 분류 및/또는 유동 세포측정 분석, 단일-세포 RNA 시퀀싱 (scRNA-seq) 및/또는 시퀀싱 (CITE-seq) 분석에 의한 전사체 및 에피토프의 세포 인덱싱 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "유동 세포측정"은 세포 또는 입자를 유체 중에 현탁시키고, 현탁액을 유동 세포분석기 내로 주사하는 것을 포함하는 방법을 포함하며, 이는 샘플을 레이저 빔을 통해 한번에 하나의 세포를 이상적으로 유동시키도록 초점을 맞추고, 여기서 산란된 광은 세포 및 그의 성분에 특징적이다. 형광 표지로 표지된 세포는 레이저 광을 흡수하고 세포를 구별하는 데 사용할 수 있는 파장 대역에서 방출된다. 바람직한 구현예에서, 해싱 및 풀링 후, 독특한 생물학적 샘플이 활성화 T 세포에 대해 풍부화되고, 예를 들어 활성화 유도 마커를 발현하는 세포에 대해 분류된다. 일 구현예에서, 세포는 활성화 T 세포에 대해 풍부해지고, 예를 들어 세포의 임의의 추가 기능적 및 표현형 분석 이전 또는 이와 동시에, 예를 들어 임의의 추가적인 유세포분석 및/또는 단일 세포 서열 분석(분류 전 또는 후에 생물학적 샘플에 첨가된 임의의 CITE-seq 시약의 CETE-Seq 분석을 포함할 수 있음) 전에 또는 그와 동시에 활성화 유도 마커에 대한 형광 표지 항체 및

형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 분류된다. "CITE-seq"는 예를 들어 본 명세서에 전체적으로 참조로 포함된 문헌[Stoeckius 등 (20017) *Nat. Methods* 14:865-868]에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 표지 분자, 예를 들어 올리고뉴클레오티드 표지 항체가 예를 들어 단일 세포 서열분석 접근법 동안 샘플의 단백질 발현 수준을 측정하는 데 사용되는 방법을 포괄한다. 일부 비제한적 구현예에서, 세포의 추가 기능적 및 표현형 분석은 세포 표면 마커, 예를 들어, 추가 활성화 마커, 또는 세포내 단백질, 예를 들어, 세포내 사이토카인의 단백질 발현 수준을 검출하는 형광 표지 항체를 사용한 유동 세포측정 분석을 포함한다. 일부 비제한적 구현예에서, 세포의 추가 기능적 및 표현형 분석은 각각의 활성화 세포의 단일 세포 RNA 서열분석을 포함한다. 단일 세포 RNA 서열분석을 위한 비제한적인 예시적인 플랫폼은 플레이트 기반 접근법 또는 마이크로유체/나노웰 접근법, 예를 들어, 액적 기반 마이크로유체 접근법 예컨대 Drop-seq (Macosko, 등 (2015) Cell 161:1202-14), InDrop (Kein 등 (2015) Cell161:1187-1201), 10X Genomics (Zhen 등 (2017) Nat. Commun. 8:1-12), 및 ILLUMINA®/BIO-RAD 단일-세포 시퀀싱 솔루션으로 제한되지 않는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. mRNA 발현 수준은 세포에서 단백질 발현 수준과 잘 상관관계가 없을 수 있기 때문에, 일부 비제한적 구현예에서, 단일 세포 RNA 서열분석은 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 태깅된 항체, MHC 다량체 등을 사용하여 CITE-Seq 분석과 조합하여 수행될 수 있다(예를 들어, WO2018144813 참조, 그 전체가 본원에 참고로 포함됨).

[0070] "활성화 유도 마커"(AIM)는 T 세포의 활성화 후에 발현되거나 발현이 상향조절되는 마커이다. T 세포에 대한 잘 알려진 활성화 유도 마커는 CD137/4-1BB, CD107, IFNγ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, TIGIT 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화 마커, 예를 들어 활성화 유도 마커는 CD40L을 포함한다. CD40L은 또한 CD154로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화 마커, 예를 들어 활성화 유도 마커는 CD137을 포함한다. CD137은 또한 본원에서 4-1BB로 지칭된다. 따라서, CD137/4-1BB는 CD137, 4-1BB 등으로 당업계에 알려진 분자를 지칭하고, 문구 "CD137", "4-1BB", 및 "CD137/4-1BB"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. CD137/4-1BB는 항원 특이적 TCR 결합 시 빠르게 상향조절되고 약 72시간 동안 세포에서 발현된 상태로 유지되는 일시적인 T 세포 활성화 마커이다. 본 명세서에 기재된 방법에서, 항원에 노출된 후 20 내지 36시간이 CD137/4-1BB 발현 및 검출의 기능적 풍부화를 위한 최적의 시점인 것으로 보인다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 CD107을 포함한다. CD107은 CD107a 또는 LAMP1로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 감마 인터페론, IFNG, IFG 등으로도 지칭될 수 있는 인터페론 감마(IFNγ)를 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 PD-1을 포함하며, 이는 프로그래밍된 세포사 1, CD279, 및 HPD-1로도 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 OX40 및/또는 CD134로도 지칭될 수 있는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 4를 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 IL-2R, IL-2Rα 및/또는 CD25로도 지칭될 수 있는 인터루킨-2 수용체 알파를 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 백혈구 표면 항원 Leu-23 및/또는 MLR3으로도 지칭될 수 있는 CD69를 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 Tp44 및/또는 T-세포 특이적 표면 당단백질로도 지칭될 수 있는 CD28을 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 HLA-DR로도 지칭될 수 있는 주요 조직적합성 복합체 클래스 II DR을 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 IL-8 수용체, IL-8Rα 및/또는 CDw128a로도 지칭될 수 있는 C X C 모티프 케모카인 수용체(CX3CR1)를 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 A형 간염 바이러스 세포 수용체 2, T 세포 막 단백질 3 및/또는 CD366으로도 지칭될 수 있는 TIM3을 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 CD223으로도 지칭될 수 있는 림프구 활성화 유전자 3(LAG3)을 포함한다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 V-Set 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 9 (VSIG9) 및/또는 V-Set 및/또는 막횡단 도메인 함유 3 (VSTM3)으로도 지칭될 수 있는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT)를 포함한다.

[0071] 용어들 " "면역글로불린, "항체", "항체", "결합 단백질" 등은 단클론성 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs (scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 디설파이드-연결된 Fvs (sdFv), 인트라바디, 미니바디, 디아바디 및 항-개체특이형 (항-Id) 항체 (예를 들어, 항원 특이적 TCR에 대한 항-Id 항체 포함), 및 상기 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편을 지칭한다. 용어 "항체" 및 "항체들"은 또한 공유 디아바디 예컨대 본 명세서에 참조로 전체적으로 포함된 미국 특허 출원 공개 20070004909에 개시된 것들, 및 Ig-DARTS 예컨대 본 명세서에 참조로 전체적으로 포함된 미국 특허 출원 공개 20090060910에 개시된 것들을 지칭한다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "검출 가능한 표지"는 이용된 검정 형식에 따라 검출 가능한 신호를 제공할 수 있는 시약, 모이어티 또는 화합물을 의미한다. 표지는 분자에만 및/또는 독특한 바코드(예를 들어, 독특한 HTO) 또는 이의 기능적 부분과 연관될 수 있다. 대안적으로, HTO 접합 분자의 각 성분에 대해 상이한 표지가 사용될 수 있다. 이러한 표지는 단독으로 또는 다른 조성물 또는 화합물과 함께 검출 가능한 신호를 제공할 수 있다. 일 구현예에서, 표지는 상호작용하여 검출가능한 신호를 생성한다. 하나의 특정 구현예에서, 표지는 시각적으로, 예를 들

어, 비색적으로 검출가능하다. 다양한 효소 시스템은 검정에서 비색 신호를 드러내기 위해 작동하며, 예를 들어 글루코스 산화효소 (이는 글루코스를 기질로서 사용함)는 과산화효소 및 수소 공여체, 예컨대 테트라메틸 벤지딘 (TMB)의 존재 하에 청색으로 보이는 산화된 TMB를 생성하는 생성물로서 퍼옥시드를 방출한다. 다른 예는 서양고추냉이 과산화효소 (HRP) 또는 알칼리성 포스파타제 (AP), 및 ATP, 글루코스 및 NAD+와 반응하여 다른 생성물 중에서 340 nm 파장에서 증가된 흡광도로서 검출되는 NADH를 생성하는 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소와 함께 헥소키나제를 포함한다. 기술된 방법 및 분자에 사용될 수 있는 또 다른 표지 시스템은 다른 수단, 예를 들어, 착색된 라텍스 마이크로입자 (Bangs Laboratories, Indiana)에 의해 검출 가능하고, 여기서 염료는 효소 대신에 사용되어 적용가능한 검정에서 표지된 분자의 존재를 나타내는 시각적 신호를 제공할 수 있다. 또 다른 표지에는 형광 화합물, 형광단, 방사성활성 화합물 또는 원소가 포함된다. 일 구현예에서, 형광 검출가능한 형광색소, 예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 파이코에리트린 (PE), 알로피코시아닌 (APC), 코리포스핀-0 (CPO) 또는 탠덤 염료, PE-시이닌-5 또는 -7 (PC5 또는 PC7)), PE-텍사스 레드 (ECD), PE-시이닌-5.5, 로다민, PerCP, 및 알렉사(Alexa) 염료. 특히 이러한 라벨, 예컨대 텍사스 레드 및 로다민, FITC +PE, FITC + PECy5 및 PE + PECy7의 조합은 검정 방법에 따라 사용될 수 있다. 분자 및/또는 중합체 분자의 임의의 성분을 표지하는 데 사용하기 위한 적합한 표지의 선택 및/또는 생성은 본 명세서와 함께 제공된 당업계의 기술 내에 있다.

[0073] 용어 "특이적으로 결합한다", "특정 방식으로 결합한다" 등은 특이적 결합에 관여하는 분자가 (1) 생리학적 조건하에서 안정하게 결합하여, 예를 들어 회합하여, 예를 들어 분자간 비공유 결합을 형성할 수 있고, 그리고 (2) 생리학적 조건하에서 명시된 결합 쌍 외부의 다른 분자에 안정적으로 결합할 수 없음을 나타낸다.

[0074] 용더 "단백질"은 모든 길이의 단백질 단편을 포함하는 모든 종류의 자연 발생 및 합성 단백, 당단백질, 뿐만 아니라 모든 다른 유형의 변형된 단백질 (예를 들어, 인산화, 아세틸화, 미리스토일화, 팔미토일화, 글리코실화, 산화, 포르밀화, 아미드화, 폴리글루타밀화, ADP-리보실화, 페길화, 바이오티닐화 등으로부터 생성된 단백질)을 비제한적으로 포함하는 융합 단백질 및 변형된 단백질을 포괄한다.

[0075] 용어 "올리고뉴클레오타이드", "핵산" 및 "뉴클레오타이드"는 달리 명시되지 않는 한 DNA, RNA, 변형된 염기 또는 이들 염기의 조합을 모두 포괄한다. 일부 구현예에서, 해시태그 올리고뉴클레오티드는 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 해시태그 올리고뉴클레오티드는 3 내지 100, 3 내지 50, 3 내지 30, 5 내지 30, 10 내지 20, 5 내지 20, 또는 5 내지 15개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 해시태그 올리고뉴클레오티드는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 80, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 최대 100개의 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 해시태그 올리고뉴클레오티드는 10개 이상(예를 들어, 10-40, 10-30 또는 10-20)개의 연속적인 아데노신 뉴클레오티드, 아데노신 뉴클레오티드의 유도체 또는 변이체를 포함할 수 있는 폴리A 서열을 포함한다.

[0076] "자가 유래"라는 용어는 동일한 공급원에서 단리된 생물학적 성분을 지칭하며, 동일한 공급원에서 단리되지는 않았지만 생물학적 성분이 동일한 공급원에서 분리된 것과 같은 물리적(예를 들어, 아미노산 서열) 및 기능적 특성을 갖는 생물학적 성분을 포함한다. 대조적으로, "이종"은 다른 공급원의 제제 또는 독립체를 지칭한다.

[0077] 본원의 개시내용에 따르면, 당해 기술 분야의 기술 내에서 통상적인 분자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 기재되어 있다. 예를 들어 문헌[Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (herein "Sambrook 등, 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); Ausubel, F.M. 등 (eds.). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 1994]를 참조하고, 각각의 간행물은 그 전체가 참조로 여기에 포함된다. 이들 기술은 부위 지정 돌연변이유발을 포함한다(예를 들어, 문헌 [Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488- 492 (1985), 미국 특허 번호 5,071, 743, Fukuoka 등, Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 357-360 (1999); Kim and Maas, BioTech. 28: 196-198 (2000); Parikh and Guengerich, BioTech. 24: 4 28-431 (1998); Ray and Nickoloff, BioTech. 13: 342-346 (1992); Wang 등,

BioTech. 19: 556-559 (1995); Wang and Malcolm, BioTech. 26: 680-682 (1999); Xu and Gong, BioTech. 26: 639-641 (1999), U.S. Patents Nos. 5,789, 166 and 5,932, 419, Hogrefe, Strategies 14. 3: 74-75 (2001), 미국 특허 번호 5,702,931, 5,780,270, and 6,242,222, Angag and Schutz, Biotech. 30: 486-488 (2001), Wang and Wilkinson, Biotech. 29: 976-978 (2000), Kang 등, Biotech. 20: 44-46 (1996), Ogel and McPherson, Protein Engineer. 5: 467-468 (1992), Kirsch and Joly, Nucl. Acids. Res. 26: 1848-1850 (1998), Rhem and Hancock, J. Bacteriol. 178: 3346-3,349 (1996), Boles and Miogsa, Curr. Genet. 28: 197-198 (1995), Barrenttino 등, Nuc. Acids. Res. 22: 541-542 (1993), Tessier and Thomas, Meths. Molec. Biol. 57: 229-237, 및 Pons 등, Meth. Molec. Biol. 67: 209-218; 각각의 간행물은 그 전체가 참조로 여기에 포함된다.

[0078] ***방법 및 조성물***

[0079] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 (a) 대상체, 예를 들어 인간 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플, 예를 들어 세포의 기능적 활성화의 부재 또는 존재를 검출하고/하거나 (b) 자극 및 선택적으로 독특한 동족 TCR 서열을 확인하는 데 유용하다.

[0080] 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된, T 세포를 활성화할 수 있는 항원, 예를 들어 T 세포 에피토프, 및 선택적으로 항원, 예를 들어, T 세포 에피토프에 특이적으로 결합하는 TCR의 T-세포 수용체 (TCR) α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하는 방법은 하기를 포함한다:

[0081] (I) 독특한 생물학적 샘플을 포함하는 조성물로부터 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화된 T 세포를 분류하는 단계로서, 이 독특한 생물학적 샘플은 하기를 포함하는 단계:

[0082] (a) T 세포 및 표면 결합된 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC,

[0083] (b) 독특한 항원,

[0084] (c) 독특한 항원을 특이적으로 확인하는, 바람직하게는 특이적으로 확인하기 위해 사용될 수 있는 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, 독특한 HTO로 T 세포를 표지하는 분자에 접합되는 독특한 HTO, 및 선택적으로,

[0085] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지,

[0086] (II) (I)에서 분류된 활성화 T 세포에 대해 단일 세포 시퀀싱 분석을 수행하여 활성화 T 세포를 독특한 HTO로 표지한 분자에 접합된 독특한 HTO를 확인하는 단계로서, 상기 독특한 HTO를 확인하는 것은 활성화 T 세포를 활성화할 수 있는 항원을 확인하고, 그리고 선택적으로 단일 세포 시퀀싱 분석은 또한 다음 중 하나 이상을 확인하는 단계:

[0087] (i) 활성화 T 세포에 의해 발현되는 하나 이상의 유전자, 및/또는

[0088] (ii) 활성화된 T 세포에 의해 발현되는 TCR의 TCR α 및/또는 β 사슬 서열.

[0089] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법은 하기를 포함한다:

[0090] (I) 독특한 생물학적 샘플의 풀을 포함하는 조성물로부터 하나 이상의 활성화 T 세포(들)를 분류하는 단계, 및

[0091] (II) (I)에서 분류된 활성화 T 세포에 대해 단일 세포 시퀀싱 분석을 수행하여 활성화 T 세포가 반응성인 항원을 확인하는 단계.

[0092] 일부 구현예에서, (I)에서 분류된 독특한 생물학적 샘플 각각은,

[0093] (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체 (MHC)로서, T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있고, 독특한 생물학적 샘플 각각의 T 세포 각각은 동일한 대상체로부터 단리되고, 그리고 독특한 생물학적 샘플 각각의 MHC 각각은 동일한 일배체형을 갖는 (선택적으로 독특한 생물학적 샘플 각각의 MHC 각각은 동일한 표면 (예를 들어, 항원 제시 세포의 세포막) 등에 결합된 동일한 샘플로부터 유래되는) MHC,

[0094] (b) 독특한 항원, 예를 들어 T 세포 에피토프,

[0095] (c) 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO)로서, 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드는 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되고, 독특한 HTO는 (b)의 독특한 항원, 예를 들어, T 세포 에피토프를 특이적으로 확인하는

독특한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HTO, 및 선택적으로,

[0096] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지를 포함하고,

[0097] 이로써, (II)에서 단일 세포 시퀀싱 분석이 독립체에 접합된 독특한 HTO를 확인하도록 하고, 여기서 독특한 HTO의 독특한 뉴클레오티드 서열을 확인하는 것은 활성화 T 세포를 활성화할 수 있는 항원, 예를 들어, T 세포 에피토프를 확인한다. 일부 구현예에서, HTO 접합된 분자는 그 자체를 세포막에 통합하는 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, HTO 접합 분자는 T 세포에 의해 발현되는 세포 표면 마커에 특이적으로 결합된 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포에 의해 발현된 세포 표면 마커는 많은 세포에 의해 편재적으로 발현되며, 예를 들어 세포 표면 마커는 β2 마이크로글로불린일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 표면 마커는 활성화 상태에 관계없이 모든 T 세포에 의해 선택적으로 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 마커는 β2 마이크로글로불린, CD298, CD2, CD3 CD4, CD8 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 단일 세포 시퀀싱 분석은 또한 활성화 T 세포에 의해 발현된 하나 이상의 유전자, 및/또는 활성화 T 세포에 의해 발현된 TCR의 TCR α 및/또는 β 사슬 서열을 확인한다.

[0098] 일부 구현예에서, 방법은 독특한 생물학적 샘플의 풀을 형성하는 것을 추가로 포함한다. 독특한 생물학적 샘플의 풀을 형성하는 것은 예를 들어 대상체로부터 단리되고 적어도 T 세포 및 바람직하게는 MHC(예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC))를 포함하는 생물학적 샘플을 개별 샘플로 동등하게 분배하고, T 세포의 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 조건에서 생물학적 샘플(예를 들어, 각각의 생물학적 샘플은 PBMC, 예를 들어, T 세포 및 APC, 생존력 및 활성을 지원하는 배치 및 사이코카인을 포함함)을 유지하여 복수의 생물학적 생물을 생성하는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법에 사용되는 T 세포 및 MHC는 임의의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, MHC는 항원 제시 세포 상에서 발현되고, 예를 들어 생물학적 샘플은 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)의 표면 상에서 발현된 MHC를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포 및 APC는 자가 유래이다. APC의 비제한적이고 예시적인 공급원은 전체 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 단핵구 유래 수지상 세포 (DC), B 세포, 대식세포, 정상 조직 또는 종양 세포, APC 세포주 등을 포함한다. T 세포는 APC와 T 세포와의 공동 배양을 사용하여 자극될 수 있다. 일부 구현예에서, 전체 PBMC는 APC 및 T 세포 둘 다를 제공한다.

[0099] 이들 및 다른 구현예 중 일부에서, 방법은 (i) 독특한 항원, 예를 들어, 독특한 T 세포 에피토프 및/또는 (ii) T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 HTO를 대상체로부터 단리되고 적어도 T 세포 및 바람직하게는 또한 MHC를 포함하는 생물학적 샘플에 전달함으로써 독특한 생물학적 샘플을 생성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 독특한 생물학적 샘플은 항원으로 동시에 재자극되기 전에 약 7-10일 동안 독특한 항원으로 프라이밍되고, 그 후 재자극된 후 샘플은 독특한 HTO로 해싱(hashing)된다. 일부 구현예에서, 독특한 생물학적 샘플은 항원으로 동시에 재자극되고 독특한 HTO(예를 들어, 샘플은 생체내에서 프라이밍됨)로 해시되기 전에 생체외에서 프라이밍되지 않는다. 일부 구현예에서, 샘플은 해시되기 전에 적어도 6시간 동안 재자극된다. 일부 구현예에서, 샘플은 해시되기 전에 적어도 16시간 동안 재자극된다. 일부 구현예에서, 샘플은 해시되기 전에 적어도 약 18-24시간 동안 재자극된다. 일부 구현예에서, 샘플은 해시되기 전에 약 48시간 동안 재자극된다. 일부 구현예에서, 샘플은 해시되기 전에 약 72시간 동안 재자극된다. 일부 구현예에서, 샘플은 해시되기 전에 96시간 이하 동안 재자극된다. 일부 구현예에서, 방법은 독특한 생물학적 샘플을 풀링하여 독특한 생물학적 샘플을 포함하는 조성물을 생성하는 것을 추가로 포함한다.

[0100] 일부 구현예에서, 하나 이상의 활성화 T 세포(들)의 분류는 활성화 유도 마커(AIM) 검정을 포함한다. 일부 구현예에서, AIM 검정은 활성화 유도 마커에 특이적으로 결합하는 형광 표지 리간드에 결합된 활성화 T 세포의 형광 활성화 세포 분류를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 독특한 생물학적 샘플의 풀을 포함하는 조성물로부터 활성화 T 세포를 분류하기 전에 독특한 생물학적 샘플을 활성화 유도 마커에 특이적으로 결합하는 형광 표지 리간드와 함께 인큐베이션하는 것을 포함한다. 인큐베이션 단계는 해싱 단계와 동시에 및/또는 독특한 생물학적 샘플을 풀링한 후에 일어날 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 형광 표지 리간드는 형광 표지 항체이고/거나 활성화 유도 마커는 CD137/4-1BB, CD107, IFNɣ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, 및/또는 TIGIT, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 활성화 유도 마커는 CD137/4-1BB를 포함한다.

[0102] 일부 구현예에서, 방법은 활성화 T 세포의 추가 기능적 및/또는 표현형 분석을 수행하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 유동 세포측정 분석, CITE-seq 분석, 다량체 분석, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28,

CD45RA, CD62L, HLA-DR, CD137/4-1BB, CD69, CD278, CD274, CD279, CD127, CD197, IFNγ, GZMH, GNLY, CD38, CCL3, 및 LAG3 중 하나 이상의 단백질 및/또는 RNA 발현 수준을 측정한다.

[0103] 또한 생물학적 활성 해싱된 샘플이 본 명세서에 기재되어 있으며, 예를 들어 세포는 검출 가능한 기능을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 하기를 포함하는 생물학적 샘플을 포함한다:

[0104] (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC,

[0105] (b) 항원, 예를 들어 T 세포 에피토프,

[0106] (c) 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO)로서, HTO는 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되고, 그리고 HTO는 (b)의 항원, 예를 들어, T 세포 에피토프를 특이적으로 확인하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HTO, 및 선택적으로,

[0107] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지.

[0108] 일부 구현예에서, T 세포를 HTO로 표지하는 분자는 지질이다. 일부 구현예에서, T 세포를 HTO로 표지하는 분자는 세포 마커에 결합하는 항체이다.

[0109] 또한 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있는 조성물이 본 명세서에 기재된다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 하기를 포함하는 생물학적 샘플을 포함한다:

[0110] (a) T 세포 및 표면 결합된 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는, MHC,

[0111] (b) 항원,

[0112] (c) 항원을 특이적으로 확인하는 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되는, HTO,

[0113] 그리고 선택적으로

[0114] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지.

[0115] 일부 구현예에서, 조성물은 (예를 들어, 적어도 2개의) 독특한 생물학적 샘플의 풀을 포함하고, 예를 들어, 조성물은 제1 및 제2 생물학적 샘플 (및 일부 구현예에서 추가의 생물학적 샘플)을 포함하고, 제1 및 제2 생물학적 샘플 각각은 하기를 포함한다:

[0116] (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC,

[0117] (b) 항원, 예를 들어 T 세포 에피토프,

[0118] (c) 해시태그 올리고뉴클레오티드 (HTO)로서, HTO는 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되고, 그리고 HTO는 (b)의 항원을 특이적으로 확인하는, 바람직하게는 특이적으로 확인하는 데 사용될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HTO, 및 선택적으로,

[0119] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지.

[0120] 일부 구현예에서, 제2 생물학적 샘플은,

[0121] (a) 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC로서, 상기 제2 T 세포는 제2 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는, 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC,

[0122] (b) 제2 항원, 예를 들어, 제2 T 세포 에피토프,

[0123] (c) 제2 HTO로서, 해시태그 올리고뉴클레오티드가 T 세포를 HTO로 표지하는 제2 분자에 접합되고, 그리고 제2 HTO는 (b)의 제2 항원, 예를 들어, 제2 T 세포 에피토프를 특이적으로 확인하는 제2 서열을 포함하는 제2 HTO, 및 선택적으로

[0124] (d) 제2 T 세포의 활성화를 지원하는 제2 배지를 포함하고,

[0125] 여기서 (i) 제1 샘플의 T 세포 및 제2 T 세포는 동일한 대상체로부터 단리되고, 제1 샘플의 MHC 및 제2 MHC는

동일한 표면에 결합되며, 바람직하게는 동일한 일배체형(예를 들어, 분리된 동일한 공급원으로부터 단리됨)을 가지며, (ii) 제1 샘플의 항원, 예를 들어, 제1 T 세포 에피토프 및 제2 항원, 예를 들어, 제2 T 세포 에피토프는 동일하지 않고, (iii) 제1 분자와 제2 분자 동일하고, 제1 HTO의 제1 뉴클레오티드 서열 및 제2 HTO의 제2 뉴클레오티드 서열은 동일하지 않다.

[0126] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 2개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 3개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 4개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 5개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 6개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 7개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 8개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 9개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 10개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 11개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 12개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 13개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 14개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 15개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 17개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 18개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 19개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 20개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 30개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 50개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 80개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 적어도 100개의 독특한 생물학적 샘플을 포함한다.

[0127] 본 명세서에 기재된 일부 조성물 구현예에서, MHC는 항원 제시 세포(APC), 예를 들어 수지상 세포의 표면 상에서 발현된다. 일부 구현예에서, T 세포 및 APC는 자가 유래이고, T 세포 및 APC는 각각 인간 공여체로부터 단리되고/거나 APC는 수지상 세포이다.

[0128] 본 명세서에 기재된 일부 조성물 구현예에서, 항원, 예를 들어, T 세포 에피토프는 (i) 박테리아 항원 또는 이의 부분, (ii) 바이러스 항원 또는 이의 부분, (iii) 알러지항원 또는 이의 부분, (iv) 종양 연관 항원 또는 그의 일부, 및 (v) 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 명세서에 기재된 일부 조성물 구현예에서, 항원, 예를 들어 T 세포 에피토프는 (i) 아미노산 서열, (ii) 뉴클레오티드 서열, (iii) 세포 용해물, 및 (iv) 이들의 조합을 포함한다.

[0129] 본 명세서에 기재된 일부 조성물 구현예에서, HTO는 항체인 분자에 접합되고/거나 분자는 β2 마이크로글로불린, CD298, CD2, CD3, CD4 및/또는 CD8로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표면 마커에 결합한다.

[0130] 일부 구현예에서, 배지는 T 세포 및/또는 APC의 생존력을 지원하는 사이토카인을 포함하고, 선택적으로 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, GM-CSF, IL-4, FLT3L, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 배지는 T 세포 및/또는 APC의 생존력을 지원하는 사이토카인(들) 대신에 또는 추가로 항-CD28 및/또는 항-CD3 항체를 포함한다.

[0131] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다. 일부 구현예에서, PBMC는 새로 단리된 PBMC이다. 다른 구현예에서, PBMC는 동결보존된 새롭게 해동된 PBMC이다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 수지상 세포 및 T 세포, 예를 들어 자가 수지상 세포 및 T 세포의 공동-배양물을 포함한다.

[0132] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 T 세포 활성화 마커에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체를 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 T 세포 활성화 마커는 CD137/4-1BB, CD107, IFNγ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, 및/또는 TIGIT, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선

택된다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 유동 세포측정 분석 또는 CITE-seq 분석 및/또는 MHC 다량체 (예를 들어, 형광 표지 다량체 및/또는 올리고 태깅된 다량체)에 유용한 추가 항체를 추가로 포함한다.

[0133] ***키트***

[0134] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물은 면역 반응의 고처리량 평가에 유용할 수 있다. 본 명세서에 제공된 방법이 MHC 일배체형에 관계없이 환자 샘플에 이용될 수 있기 때문에 이러한 T 세포 반응의 재고 분석을 위한 키트도 본 명세서에 제공된다.

[0135] 일부 구현예에서, 키트는 복수의 독특한 항원, 예를 들어, 복수의 독특한 T-세포 에피토프, 및 복수의 독특한 HTO-접합된 분자를 포함하고, 복수의 독특한 HTO-접합된 분자 각각은 독특한 HTO 서열 및 동일한 분자를 포함하는 독특한 HTO를 포함하고, 그리고 복수의 독특한 HTO 서열 각각은복수의 독특한 항원 중 단 하나 (예를 들어, 복수의 독특한 T 세포 에피토프 중 하나)에 할당되어, 독특한 HTO 서열은 할당된 독특한 항원 (예를 들어, T 세포 에피토프)를 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 복수의 항원 각각은 동일한 공급원으로부터 유래되고, 예를 들어, 복수의 항원은 예를 들어 에피토프 맵핑을 돕기 위해 단일 항원으로부터의 중첩 펩티드의 패널을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 항원은 병원성 항원, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 항원일 수 있다. 비제한적 구현예에서, 이러한 키트는 백신 개발 또는 확립된 백신에 대한 환자의 면역 반응 모니터링에 유용할 수 있는 병원성 항원으로부터 유래된 복수의 항원(예를 들어, T 세포 에피토프)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 항원은 종양 연관 항원일 수 있다. 비제한적 구현예에서, 이러한 키트는 면역요법 개발에서, 예를 들어 종양 세포에 대한 T 세포 매개 세포독성과 연관된 TCR 가변(예를 들어, CDR3) 서열을 확인하는 데 유용할 수 있는 종양 연관 항원으로부터 유래된 복수의 항원(예를 들어, T 세포 에피토프)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 항원은 자가항원일 수 있다. 비제한적인 구현예에서, 이러한 키트는 환자의 자가면역 반응을 모니터링하는 데 유용할 수 있는 자가항원으로부터 유래된 복수의 항원(예를 들어, T 세포 에피토프)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 항원은 이식 항원일 수 있다. 비제한적인 구현예에서, 이러한 키트는 대상체에 의해 거부되고/거나 이식편 대숙주 질환을 확립할 가능성이 덜한 공여체 기관에 유용할 수 있는 이식 항원으로부터 유래된 복수의 항원(예를 들어, T 세포 에피토프)을 포함한다. 일부 키트 구현예는 추가 성분, 예를 들어, 음성 및/또는 양성 대조군 항원, 완충액, 바이알, 사용 설명서, 다중-웰 배양판, 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0136] 이러한 키트는 예를 들어 (1) 백신, 면역 요법 등과 같은 잠재적 또는 진행 중인 치료법에 대한, (2) 자가면역 장애 또는 이식 거부 반응 동안, (3) TCR 기반 치료제의 개발을 위한, 및/또는 (4) TCR:에피토프 결합 알고리즘을 결정하기 위한 T 세포 반응의 고처리량 분석에 유용할 수 있다. 따라서, 또한 면역 반응을 평가하고/거나 면역 반응에 참여한 활성화 T 세포와 연관된 TCR 서열 (예를 들어, TCR 가변 서열, 예를 들어, TCR α 및/또는 β 가변 서열, 예를 들어, TCR α 및/또는 β CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3 서열)을 확인하기 위해 본 명세서에 기재된 고처리량 스크리닝 방법, 조성물 및/또는 키트를 사용하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0137] ***용도***

[0138] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물은 면역 반응을 평가하는 데 유용할 수 있다. 따라서, T 세포 활성화, 면역학적 허용도 등의 맥락에서 면역학적 반응을 연구하기 위한 고처리량 스크리닝 방법, 관련 조성물 및/또는 관련 키트를 사용하는 방법이 또한 본 명세서에 기재되어 있다.

[0139] 본 명세서에 기재된 방법은 사전 자극 또는 재자극 배양을 통해 단리의 시간으로부터 세포 분류의 시간까지 샘플(예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PMBC), 흡인물)의 상이한 세포 분획, 특히 항원 특이적 T 세포 집단의 상대적 분획에 영향을 미치지 않는 것으로 보이다. 따라서, 샘플에서 항원 특이적 T 세포의 상대적인 집단 크기를 평가하기 위해 본 명세서에 기재된 고처리량 스크리닝 방법, 조성물 및/또는 키트를 사용하는 방법이 제공된다.

[0140] 또한 백신 후보를 테스트하기 위해 본 명세서에 기재된 고처리량 스크리닝 방법, 조성물 및/또는 키트를 사용하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 백신이 대상체에서 면역학적 반응(예를 들어, T 세포 증식, 사이토카인 방출 등)을 활성화하고 효과기, 뿐만 아니라 기억 T 세포(예를 들어, 중추 및 효과기 기억 T 세포)의 생성으로 이어지는 지를 평가하고/거나 활성화된 면역학적 면역 반응의 분자 표현형을 확인하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0141] 본 발명은 또한 입양 T 세포 요법을 위해 본 명세서에 기재된 고처리량 스크리닝 방법, 관련 조성물 및/또는 키트를 사용하는 방법을 제공한다. 따라서, 대상체(예를 들어, 포유동물 대상체, 예를 들어, 인간 대상체)에서 질환 또는 병태(예를 들어, 암)를 치료하거나 개선하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 질환 또

는 병태는 암이다. 다른 구현예에서, 질환 또는 병태는 바이러스 또는 박테리아에 의해 유발된다.

[0142] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 입양 T 세포 요법 방법은 본 명세서에 기재된 고처리량 스크리닝 방법, 조성물 및/또는 키트를 사용하여 항원 특이적 T 세포 및 동족 항원 TCR α 및/또는 β 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 서열, 예를 들어, TCR α 및/또는 β 가변 도메인의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3의 서열, (또는 다른 구현예에서, TCRδ 및/또는 γ 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 서열)을 확인하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 확인된 TCR α 및/또는 β 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 서열, 예를 들어, TCR α 및/또는 β 가변 도메인의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3의 서열, (또는 다른 구현예에서, TCRδ 및/또는 γ 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 서열)은 인간 치료제의 생성에 사용된다.

[0143] 일 구현예에서, 인간 치료제는 관심 핵산 서열(예를 들어, 관심 핵산으로 형질감염되거나 형질도입되거나 그렇지 않으면 도입됨)을 보유하는 T 세포(예를 들어, 인간 T 세포, 예를 들어, 인간 대상체로부터 유래된 T 세포)이고, 이로써 T 세포는 관심 항원에 대해 친화성을 갖는 TCR을 발현하도록 한다. 한 양태에서, 치료제가 사용되는 대상체는 특정 질환 또는 병태에 대한 요법을 필요로 하고, 항원은 질환 또는 병태와 연관되어 있다. 한 양태에서, T 세포는 세포독성 T 세포이고, 항원은 종양 연관 항원이고, 질환 또는 병태는 암이다. 한 양태에서, T 세포는 대상체로부터 유래된다. 따라서, 핵산 및 동족 항원의 확인 시, 본 명세서에 기재된 입양 T 세포 요법 방법은 본 명세서에 기재된 방법에 의해 확인된 T 세포 수용체의 핵산 서열 또는 그의 일부(예를 들어, TCR 가변 도메인의 핵산 서열)를 발현 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터)로 클로닝하고, T 세포가 항원 특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 대상체로부터 유래된 T 세포 내로 벡터를 도입하고, 그리고 T 세포를 대상체로 주입하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0144] 본 명세서에 기재된 입양 T 세포 요법의 다른 구현예에서, 항원 특이적 T 세포의 TCR α 및/또는 β 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 서열(들), 예를 들어, TCR α 및/또는 β 가변 도메인의 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3의 서열, (또는 다른 구현예에서, TCRδ 및/또는 γ 가변 도메인을 인코딩하는 핵산 서열)은 인간 T 세포 수용체 치료제의 생성에 이용된다. 일 구현예에서, 치료 수용체는 가용성 T 세포 수용체이다. 치료제를 사용하기 위한 가용성 T 세포 수용체 또는 TCR 가변 영역을 생성하기 위한 많은 노력이 확장되었다. 가용성 T 세포 수용체의 생성은 재배열된 TCR 가변 영역을 획득하는 것에 달려 있다. 한 가지 접근법은 TCRα 및 TCRβ를 포함하는 단일 사슬 TCR을 설계하고 scFv 면역글로불린 형식과 유사하게, 링커를 통해 이들을 함께 융합하는 것이다(예를 들어, 국제 출원 번호 WO 2011/044186 참조). 생성된 scTv는, scFv와 유사할 경우 열적으로 안정하고 가용성인 형태의 TCRα/β 결합 단백질을 제공할 것이다. 대안적 접근법은 TCRβ 불변 도메인을 갖는 가용성 TCR을 설계하고(예를 들어, 문헌[Chung 등, (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:12654-58] 참조); 뿐만 아니라 TCR 불변 도메인 사이의 계면에 비천연 디설파이드 결합을 조작하는 것을 포함한다(문헌[Boulter and Jakobsen (2005) Stable, soluble, high-affinity, engineered T cell receptors: novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens, Clinical and Experimental Immunology 142:454-60]에서 검토, 미국 특허 제7,569,664호 참조). 가용성 T 세포 수용체의 다른 형식이 기재되었다. 본 명세서에 기재된 방법은 관심 항원에 고친화도로 결합하는 T 세포 수용체의 서열을 결정하고, 이어서 서열에 기초하여 가용성 T 세포 수용체를 설계하는 데 사용될 수 있다.

[0145] 본 명세서에 기재된 고처리량 방법, 조성물, 및/또는 키트에 따라 확인된 서열을 포함하는 가용성 T 세포 수용체는 관심 단백질, 예를 들어 바이러스, 박테리아 또는 종양 관련 단백질의 기능을 차단하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 가용성 T 세포 수용체는 감염 또는 암 세포, 예를 들어 세포독성 분자(예를 들어, 화학요법제), 독소, 방사성핵종, 전구약물, 항체 등을 사멸시킬 수 있는 모이어티에 융합될 수 있다. 가용성 T 세포 수용체는 또한 면역조절 분자, 예를 들어 사이토카인, 케모카인 등과 융합될 수 있다. 가용성 T 세포 수용체는 또한 면역 억제 분자, 예를 들어 T 세포가 T 세포에 의해 인식되는 항원을 보유하는 다른 세포를 죽이는 것을 억제하는 분자에 융합될 수 있다. 면역 억제 분자에 융합된 이러한 가용성 T 세포 수용체는 예를 들어 자가면역 차단에 사용될 수 있다. 가용성 T 세포 수용체에 융합될 수 있는 다양한 예시적인 면역 억제 분자는 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Ravetch and Lanier (2000) Immune Inhibitory Receptors, Science 290:84-89]에서 검토된다.

[0146] 비제한적이고 예시적인 구현예가 아래에 제공된다.

[0147] 구현예 1. 관심 에피토프를 인식하는 TCR의 T-세포 수용체(TCR) α 및/또는 β 사슬 서열을 확인하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드 접합 항체로 표지된 T 세포 집단을 T 세포의 풀로부터 분류하는 것을 포함하고, 상기 올리고뉴클레오티드는 태그는 독특한 에피토프, 항원 또는 항원 풀과 관련된 서열을 포함하는, 방법.

[0148] 구현예 2. 구현예 1에 있어서, 분류 후, 올리고뉴클레오티드 태그의 서열을 결정하여 올리고뉴클레오티드 접합 항체로 표지된 T 세포를 활성화시킨 에피토프, 항원 또는 항원 풀을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

[0149] 구현예 3. 구현예 1 또는 구현예 2에 있어서, 분류 단계 이전에 하기 단계들 중 하나 이상을 포함하는 방법:

[0150] 예를 들어, 다중-웰 배양판에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플로부터 복수의 배양물을 생성하는 단계로서, 각각의 배양물은 항원 제시 세포(APC) 및 T 세포 기능 및 성장을 지원하는 배지 및 사이토카인을 포함하는, 단계,

[0151] 복수의 배양물 각각에 독특한 항원 또는 관심 항원 풀을 전달하여 독특한 배양물을 생성하고, 예를 들어 관심 단일 항원(또는 항원 풀)을 복수의 배양물 중 하나, 예를 들어배양판의 하나의 웰에 첨가하는 단계로서, 각각의 배양물(웰)은 독특한 항원 또는 항원 풀을 포함하는 단계,

[0152] 독특한 배양물에 독특한 배양물과 연관된 독특한 올리고뉴클레오티드 태그를 추가하는 단계, 및

[0153] 선택적으로 올리고머 태그, 예를 들어 CITE-seq 및 올리고-덱스트라머 시약을 포함할 수 있는 다른 표면 염색 항체 및 다량체를 추가하는 단계, 및

[0154] 상기 배양물 풀링하는 단계.

[0155] 구현예 4. 구현예 1-3 중 어느 일 구현예에서, 하기를 포함하는, 방법:

[0156] 예를 들어, 다중-웰 배양판에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플로부터 복수의 배양물을 생성하는 단계로서, 각각의 배양물은 항원 제시 세포(APC) 및 T 세포 기능 및 성장을 지원하는 배지 및 사이토카인을 포함하는, 단계.

[0157] 복수의 배양물 각각에 독특한 항원 또는 관심 항원 풀을 전달하여 독특한 배양물을 생성하고, 예를 들어 관심 단일 항원(또는 항원 풀)을 복수의 배양물 중 하나, 예를 들어배양판의 하나의 웰에 첨가하는 단계로서, 각각의 배양물(웰)은 독특한 항원 또는 항원 풀을 포함하는 단계,

[0158] 독특한 배양물에 각 웰에 존재하는 모든 세포를 표지하기에 충분한 양으로 T 세포 활성화 마커에 결합하는 항체, 및 독특한 배양물과 연관된 독특한 올리고뉴클레오티드 태그로 태깅된 분자를 첨가하는 단계, 및

[0159] 선택적으로 올리고머 태그, 예를 들어 CITE-seq 및 올리고-덱스트라머 시약을 포함할 수 있는 다른 표면 염색 항체 및 다량체를 추가하는 단계,

[0160] 상기 배양물 풀링하는 단계.

[0161] T 세포 활성화 마커에 결합하고 독특한 올리고뉴클레오티드 태그로 태깅된 항체로 표지된 T 세포를 분류하는 단계, 및

[0162] 독특한 올리고뉴클레오티드 태그의 핵산 서열을 포함하는, 단계 (5)에서 분류된 T 세포로부터 핵산 서열을 결정하는 단계.

[0163] 구현예 5. 구현예 1-4 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 T 세포 활성 마커는 CD137/4-1BB를 포함하는, 방법.

[0164] 구현예 6. T 세포, 및 선택적으로 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 T-세포 수용체(TCR) α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 활성화할 수 있는 항원을 확인하는 방법으로서, 하기를 포함하는, 방법:

[0165] (I) 독특한 생물학적 샘플을 포함하는 조성물로부터 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류하는 단계로서, 이 독특한 생물학적 샘플은 하기를 포함하는 단계:

[0166] (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC,

[0167] (b) 독특한 항원,

[0168] (c) 예를 들어, 독특한 항원을 특이적으로 확인하는 독특한 HTO를 특이적으로 확인하기 위해 사용될 수 있고/있거나 사용되는 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, 독특한 HTO로 T 세포를 표지하는 분자에 접합되는 독특한 HTO, 및 선택적으로,

[0169] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지,

[0170] (II) (I)에서 분류된 활성화 T 세포에 대해 단일 세포 시퀀싱 분석을 수행하여 활성화 T 세포를 독특한 HTO로 표지한 분자에 접합된 독특한 HTO를 확인하는 단계로서, 상기 독특한 HTO를 확인하는 것은 활성화 T 세포를 활

성화할 수 있는 항원을 확인하고, 그리고 선택적으로 단일 세포 시퀀싱 분석은 또한 다음 중 하나 이상을 확인하는 단계:

[0171] (i) 활성화 T 세포에 의해 발현되는 하나 이상의 유전자, 및/또는

[0172] (ii) 활성화 T 세포에 의해 발현되는 TCR의 TCR α 및/또는 β 사슬 서열.

[0173] 구현예 7. 구현예 6에 있어서, 분류하기 전에, 하기 단계(들):

[0174] 개체로부터 단리된 T 세포 및 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 세포 수집을 개별 샘플로 동등하게 분배함으로써 복수의 생물학적 샘플을 생성하는 단계로서, 각각의 생물학적 샘플은 선택적으로 T 세포 및/또는 APC 생존력, 활성화 및/또는 활성을 지원하는 배지 및 사이토카인을 포함하는 단계, 및

[0175] 복수의 생물학적 샘플 각각에 독특한 항원 및/또는 예를 들어 독특한 항원을 특이적으로 확인하는 독특한 HTO를 특이적으로 확인하는 데 사용될 수 있고/거나사용되는 독특한 HTO를 전달함으로써 복수의 독특한 생물학적 샘플을 생성하는 단계로서, 상기 독특한 HTO는 T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자에 접합되는 단계, 및 선택적으로, (I)에서 분류된 조성물이 복수의 독특한 생물학적 샘플을 포함하도록 복수의 독특한 생물학적 샘플과 조합하는 단계를 포함하고,

[0176] 상기 복수의 생물학적 샘플 각각은 대상체로부터 단리된 T 세포 및 APC를 포함하는 세포의 수집 및 선택적으로 T 세포 및 APC의 생존력, 활성 및/또는 활성화를 지원하는 배지를 포함하고,

[0177] T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 항원 및/또는 독특한 HTO의 전달 후, 복수의 생물학적 샘플 각각은 하기를 포함하는 독특한 생물학적 샘플이 되는, 방법:

[0178] (a) 대상체로부터 단리된 T 세포 및 APC를 포함하는 세포의 수집,

[0179] (b) 독특한 항원,

[0180] (c) 독특한 항원을 특이적으로 확인하고 T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합된 독특한 HTO, 및 선택적으로

[0181] (d) T 세포 및 APC의 생존력, 활성 및/또는 활성화를 지원하는 배지.

[0182] 구현예 8. 구현예 7에 있어서, 상기 APC는 단핵구 유래 수지상 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, B 세포, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0183] 구현예 9. 구현예 6-8 중 어느 한 구현예에 있어서, 분류는 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포의 형광 활성화 세포 분류를 포함하는, 방법.

[0184] 구현예 10. 구현예 9에 있어서, 상기 AIM은 CD137/4-1BB, CD107, IFNγ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, TIGIT, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

[0185] 구현예 11. 구현예 9 또는 구현예 10에 있어서, 형광 활성화 세포 분류는 AIM에 대한 형광 표지 항체를 사용한 검출에 기초하는, 방법.

[0186] 구현예 12. 구현예 6-11 중 어느 한 구현예에 있어서, II에서 분석된 활성화 T 세포에 대한 추가 기능적 및/또는 표현형 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 유동 세포측정 분석, CITE-seq 분석, 다량체 분석, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

[0187] 구현예 13. 구현예 12에 있어서, 상기 추가 기능적 및/또는 표현형 분석은 CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD62L, HLA-DR, CD137/4-1BB, CD69, CD278, CD274, CD279, CD127, CD197, IFNγ, GZMH, GNLY, CD38, CCL3, 및 LAG3 중 하나 이상의 단백질 및/또는 RNA 발현 수준을 측정하는, 방법.

[0188] 구현예 14. 구현예 6-13 중 어느 한 구현예에 있어서, 말초 혈액 단핵 세포는 T 세포 및 표면 결합 MHC를 제공하는, 방법.

[0189] 구현예 15. 구현예 6-14 중 어느 한 구현예에 있어서, T 세포를 독특한 HTO로 표지하는 분자는 세포 표면 분자에 결합하는 항체를 포함하는, 방법.

[0190] 구현예 16. 구현예 6-15 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 AIM은 CD137/4-1BB이거나 이를 포함하는, 방법.

[0191] 구현예 17. 구현예 6-16 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하고, 그리고 상기 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열은

각각 TCR α 사슬 가변 영역 서열 및/또는 TCR β 사슬 가변 영역 서열인, 방법.

[0192] 구현예 18. 구현예 6-17 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 TCR의 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 확인하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 치료제를 만드는 데 있어 TCR α 사슬 서열 및/또는 TCR β 사슬 서열을 추가로 포함하는, 방법.

[0193] 구현예 19. 하기를 포함하는 생물학적 샘플을 포함하는 조성물:

[0194] (a) T 세포 및 표면 결합 주요 조직적합성 복합체(MHC)로서, 상기 T 세포는 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 MHC,

[0195] (b) 항원,

[0196] (c) 항원을 특이적으로 확인하는 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO)로서, T 세포를 HTO로 표지하는 분자에 접합되는, HTO,

[0197] 그리고 선택적으로

[0198] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 배지.

[0199] 구현예 20. 구현예 19에 있어서,

[0200] (a) MHC는 항원 제시 세포(APC)의 표면 상에서 발현되고, 선택적으로,

[0201] 상기 T 세포와 APC는 자가 유래이고,

[0202] 상기 T 세포 및 APC는 각각 인간 공여체로부터 단리되고/거나

[0203] 상기 APC는 단핵구 유래 수지상 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, B 세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0204] (b) 항원

[0205] (I)은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되고:

[0206] (i) 박테리아 항원 또는 이의 부분,

[0207] (ii) 바이러스 항원 또는 이의 부분,

[0208] (iii) 알러지항원 또는 이의 부분,

[0209] (iv) 종양 연관 항원 또는 이의 부분, 및

[0210] (v) 이들의 조합, 및/또는

[0211] (II)는 하기를 포함하고:

[0212] (i) 아미노산 서열,

[0213] (ii) 뉴클레오티드 서열,

[0214] (iii) 용해물, 및

[0215] (iv) 이들의 조합,

[0216] (c) 상기 HTO 접합 분자는,

[0217] (I) 세포 표면 분자에 결합하는 항체, 또는

[0218] (II) 지질을 포함하고/거나,

[0219] (d) 상기 배지는 T 세포 및/또는 APC의 생존력을 지원하는 사이토카인을 포함하는, 조성물.

[0220] 구현예 21. 구현예 20에 있어서,

[0221] 상기 항체는 β2 마이크로글로불린, CD298, CD2, CD3, CD4, CD8, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표면 마커에 결합하거나, 또는

[0222] 상기 지질은 세포막에 결합하는, 조성물.

[0223] 구현예 22. 구현예 20 또는 구현예 21에 있어서, T 세포 및/또는 APC의 생존력을 지원하는 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15, GM-CSF, IL-4, 및 이들의 임의의 조합로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

[0224] 구현예 23. 구현예 20-22 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 생물학적 샘플을 추가로 포함하고, 상기 제2 생물학적 샘플은,

[0225] (a) 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC로서, 상기 제2 T 세포는 제2 표면 결합 MHC의 맥락에서 제시된 펩티드를 인식할 수 있는, 제2 T 세포 및 제2 표면 결합 MHC,

[0226] (b) 제2 항원,

[0227] (c) 제2 항원을 특이적으로 확인하는 제2 HTO로서, 상기 HTO는 제2 T 세포를 제2 HTO로 표지하는 제2 분자에 접합되는, 제2 HTO,

[0228] 그리고 선택적으로

[0229] (d) T 세포의 활성화를 지원하는 제2 배지를 포함하고,

[0230] 여기서,

[0231] (i) 상기 T 세포 및 제2 T 세포는 동일한 대상체로부터 단리되고,

[0232] (ii) 상기 항원 및 제2 항원이 동일하지 않고,

[0233] (iii) 상기 T 세포를 HTO로 표지하는 분자 및 상기 제2 T 세포를 제2 HTO로 표지하는 제2 분자는 동일하고, 그리고 상기 HTO 및 제2 HTO는 동일하지 않는, 조성물.

[0234] 구현예 24. 구현예 19-23 중 어느 한 구현예에 있어서, 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류할 수 있게 하는 제제를 추가로 포함하는, 조성물.

[0235] 구현예 25. 구현예 24에 있어서, AIM의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류할 수 있게 하는 제제는 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체인, 조성물.

[0236] 구현예 26. 구현예 24 또는 구현예 25에 있어서, 상기 AIM은 CD137/4-1BB, CD107, IFNγ, PD-1, CD40L, OX40, CD25, CD69, CD28, HLA-DR, CX3CR1, TIM3, LAG3, 및/또는 TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

[0237] 구현예 27. 구현예 19-26 중 어느 한 구현예에 있어서, 조성물의 유동 세포측정 분석 또는 CITE-seq 분석에 유용한 항체 및/또는 MHC 다량체를 포함하는, 조성물.

[0238] 구현예 28. 하기를 포함하는 키트:

[0239] 복수의 독특한 항원, 및

[0240] 각각이 복수의 독특한 항원 중 하나만 특이적으로 확인하는, 복수의 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO).

[0241] 구현예 29. 구현예 28에 있어서, 활성화 유도 마커(AIM)의 발현에 기초하여 활성화 T 세포의 분류를 허용하는 제제를 추가로 포함하고, 선택적으로 AIM의 발현에 기초하여 활성화 T 세포를 분류할 수 있는 제제는 AIM에 특이적으로 결합하는 형광 표지 항체인, 키트.

[0242] 구현예 30. 구현예 28 또는 29에 있어서, 복수의 독특한 HTO 각각은 키트가 복수의 독특한 HTO 접합 분자를 포함하도록 동일한 분자에 접합된 것인, 키트.

[0243] 구현예 31. 구현예 28-30 중 어느 한 구현예에 있어서, 복수의 독특한 항원 각각은 단일 단백질로부터 독특하고 중첩되는 펩티드 서열을 포함하는, 키트.

[0244] 구현예 32. 구현예 31에 있어서, 상기 단일 단백질은 병원성 항원, 종양 연관 항원 또는 이식 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

[0245] 구현예 33. 백신에 대한 환자의 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한, 구현예 1-18 중 어느 하나의 방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트의 용도.

[0246] 구현예 34. 면역요법에 대한 환자의 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한, 구현예 1-18 중 어느 하나의

방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트의 용도.

[0247] 구현예 35. 환자의 면역요법 동안 환자에서 T 세포 매개 면역 반응을 분석하기 위한, 구현예 1-18 중 어느 하나의 방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트의 용도.

[0248] 구현예 36. 자가항원에 대한 환자의 T 세포 반응을 분석하기 위한, 구현예 1-18 중 어느 하나의 방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트의 용도.

[0249] 구현예 37. 이식 항원에 대한 환자의 T 세포 반응을 분석하기 위한, 구현예 1-18 중 어느 하나의 방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트의 용도.

[0250] 구현예 38. 활성화 T 세포의 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열을 확인하기 위한 구현예 1-18 중 어느 하나의 방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트의 용도.

[0251] 구현예 39. 구현예 38에 있어서, 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열은 TCRα 사슬의 CDR3 서열 및/또는 TCRβ 사슬의 CDR3 서열을 포함하는, 용도.

[0252] 구현예 40. 인간 치료제를 제조하는 데 있어서 구현예 38 또는 39에서 확인된 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열의 용도.

[0253] 구현예 41. 구현예 40에 있어서, 상기 인간 치료제는 구현예 1-18 중 어느 하나의 방법, 구현예 19-27 중 어느 하나의 조성물, 또는 구현예 28-32 중 어느 하나의 키트를 사용하여 확인된 하나 이상의 TCR 가변 영역 서열을 포함하는 T 세포를 포함하는, 용도.

[0254] 본 발명은 다수의 구현태를 참조하여 구체적으로 제시되고 기재되었지만, 형태 및 세부사항에서의 변화가 본 발명의 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 본 명세서에 개시된 다양한 구현예에 대해 이루어질 수 있고, 본 명세서에 기재된 다양한 구현예가 청구범위의 범주에 대한 제한으로서 작용하도록 의도되지 않는다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.

[0255] **실시예**

[0256] 본 명세서에 기재된 방법의 비제한적인 구현예가 **도 1**에 예시되어 있다. 본 명세서의 실시예는 동족 T 세포 및 항원 반응성, 예를 들어, T 세포 에피토프 반응성을 스크리닝하기 위해 활성화-유도된 마커 (AIM) 세포 풍부화 및 단일 세포 전사체 서열분석과 같은 기능적 검정과 조합하여 이용될 수 있고, 이러한 방법이 일차 인간 세포에서 특정한 유용성을 발견할 수 있다는 데이터를 제공한다.

[0257] 방법의 보다 구체적이고 예시적인 적용이 설명되기 전에 일반적인 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0258] **일반적인 물질 및 방법**

[0259] *인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC):* 동결보존된 PBMC를 구입하거나(Precision for Medicine Frederick, Maryland), 제조업체의 지침에 따라 Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare Life Sciences, 45-001,749) 시약을 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 단리된 인간 대상체의 신선한 혈액에서 단리하고, 나중 분석을 위해 냉동 배지 (90% 인간 혈청 (Millipore Sigma), 10% 조직 배양-등급 DMSO (Millipore Sigma, 2438)에 동결보존하였다.

[0260] *펩티드:* 펩티드는 Genscript(Piscataway, NJ)에서 맞춤 합성되었다. 동결건조된 펩티드를 스톡 용액에 대해 10-50 mg/mL로 DMSO에서 재구성한 다음, 사용을 위해 적절한 분석 배지에서 10 μg/mL로 추가로 희석하였다. CEF Control Peptide Pool(Anaspec, AS-61036-003)은 제조업체의 지침에 따라 10 ug/mL 및 세포 자극 칵테일(ThermoFisher, 00-4970-93)로 사용되었다.

[0261] *일차 세포 배양물:* 동결보존된 PBMC를 해동하고 5% 인간 혈청 AB (Millipore Sigma, H3667) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 (ThermoFisher Scientific, 15140163)를 갖는 CellGenix GMP DC 무혈청 배지 (CellGenix, 20801-0500)에서 인큐베이션하였다. 배양물은 수지상 세포 및 T 세포 지지적 사이토카인을 갖는 보충물이었다: T 세포 배지 (CellGenix 수지상 세포 배지, cat#20801-0500 + 5% 인간 혈청 AB (Sigma, cat#H3667)) + 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민 (ThermoFisher, cat#10378-016), 5 ng/ml에서 T 세포 지지적 사이토카인 IL-7 및 IL-15 (CellGenix, cat# 1410-050 및 1413-050, 각각), 및 10 U/ml에서 IL-2 (Peprotech, cat# 200-0).

[0262] *올리고 태깅된 해싱 항체 생성:* 모든 인간 T 세포(CD2, RPA-2.10; Biolegend 카탈로그 번호 300202))의 세포 표면 표적에 대해 고도로 특이적인 단클론성 항체는 공개된 방법을 사용하여 폴리A 꼬리가 있는 독특한 15-염기 올리고뉴클레오티드 서열의 분류에 맞춤 접합되었다. 예를 들어, 문헌[Stoeckius 2017, bioRxiv, 상기] 참조.

[0263] *직접적인 생체외 IFNɣ/그란자임B ELISPOT*: 이중 인간 IFNɣ/GranzymeB FluoroSpot 검정 키트는 ImmunoSpot(Cleveland, OH)에서 구입하여 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 간단히 말해서, PBMC를 해동하고 48시간 동안 펩티드 자극과 함께 웰당 200,000개 세포로 FluoroSpot 플레이트에서 200 uL에서 인큐베이션하였다. ELISPOT 반응성은 제조업체의 자동화 소프트웨어를 사용하여 ImmunoSpot 분석기에서 판독되었다.

[0264] *유동 세포측정에 의한 T 세포의 항체 및 표현형 특성화*: 형광 표지 항체를 상업적 공급업체에서 구입하였다. 표면 단백질의 유동 세포측정 분석 표현형 특성화를 수행하기 위해, 세포를 수확하고, 세척하고, 관심 항체를 함유하는 유동 세포측정 BD BSA 염색 완충액(BD Biosciences, #554657)에 재현탁하였다. 세포를 4C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, A3 Symphony cytometer(BD Biosciences)에서 유동 세포측정 분석 획득 전에 두 번 세척하였다. FlowJo 분석 소프트웨어(FlowJo, Ashland, OR)를 사용하여 유동 세포측정 데이터를 분석하였다. 게이트는 형광 마이너스 1(FMO) 대조군을 기반으로 설정되었다.

[0265] *항원 특이적 T 세포 반응성 검정*: 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 Ficoll-Paque Plus 구배 분리에 의해 분리되었다. PBMC를 배양판에 씨딩하고, 예를 들어 T 세포 배지(CellGenix GMP DC 배지, cat#20801-0500 + 5% 인간 혈청 AB (Sigma, cat#H3667)) + 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민 (ThermoFisher, cat#10378-016), 1000U/mL에서 수지상 세포 지지 인자 GM-CSF 및 500 U/mL에서 IL-4 (CellGenix, #1412-050 및 CellGenix, #1403-050, 각각), 5 ng/ml에서 T 세포 지지적 사이토카인 IL-7 및 IL-15 (CellGenix, # 1410-050 및 1413-050, 각각), 및 10 U/ml에서 IL-2 (Peprotech, cat# 200-0)에서 분취하였다. 개별 항원, 예를 들어 관심 펩티드를 10 ug/ml(Genscript)로 검정 웰에 추가하여 독특한 생물학적 샘플을 형성하였다.

[0266] 밤새 배양물을 펩티드 자극 후 24시간에 수확하고 분류 및 단일 세포 서열분석을 위해 제조하였다. 10일 사전 확장 배양의 경우, 초기 펩티드 첨가 후 1주일 동안 2일마다 세포에 새로운 배지 및 사이토카인을 공급하였다. 그런 다음, 활성화 유도 마커, 예를 들어, CD137/4-1BB의 발현을 상향 조절하고 항원 특이적 AIM 기반 기능적 T 세포 분류를 가능하게 하기 위해 밤새 재자극을 위해 관심 있는 개별 펩티드를 T 세포 확장 배양물에 첨가하였다. 펩티드 재자극 후, 세포는 유동 세포측정 특성화를 위해 제조되거나 해싱, 풀링 및 단일 세포 서열분석이 가능하도록 추가 처리되었다.

[0267] *기능적 T 세포 검정 성능에 따른 세포 해싱*: 기능적 자극 후, 개별 검정 웰의 세포를 96웰 분석 블록에 수집하고, 세척하고, 관심 있는 해싱 시약을 함유하는 유동 세포측정 BD BSA 염색 완충액(BD Biosciences, #554657)에 재현탁하였다. 세포는 각각 1 μg/10^6 세포에서 1 또는 2개의 해시태그 올리고뉴클레오티드(HTO) 항체로 염색되었다. 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고 두 번 세척한 다음, 풀링하였다. 올리고뉴클레오티드 태깅된 덱스트라머가 분석에 포함된 경우, 아래의 올리고 태깅된 덱스트라머 염색 프로토콜에 따라 CITE-seq 및 유동 세포측정 항체 염색을 진행하기 전에 샘플을 덱스트라머로 염색하였다.

[0268] *CITE-seq 항체 염색 및 형광 항체 염색*: 해싱 염색 절차 후, 풀링 및 해싱된 샘플을 각각의 최적 농도에서 CITE-seq 항체 뿐만 아니라 형광 태그된 유동 세포측정 항체를 모두 함유하는 BD BSA 염색 완충액에 재현탁하였다. 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고 두 번 세척한 다음, 단일 세포 서열분석을 위해 분류하였다.

[0269] *올리고 태깅된 덱스트라머 염색 및 FACS 분류*: 동결보존된 건강 공여체 PBMC를 37℃ 수조에서 간략하게 해동하였다. CD8+ T 세포는 자기 비드(Miltenyi Biotec)를 사용하여 풍부화되었다. 세포를 원심분리로 세척한 다음 벤조나제(Millipore, 70664) 및 50 nM 다사티닙(Axon Medchem, 1392)를 함유하는 PBS(Gibco, 14190-250)로 37℃에서 45분 동안 처리하였다. 세포를 96-웰 검정 블록(Corning, 3960)으로 옮기고, 원심분리하고, 상청액을 흡인하였다. 적절한 맞춤형 Immudex dCODE-PE 덱스트라머 풀(Copenhagen, Denmark)을 실온의 암실에서 30분 동안 1 ul/100 ul 반응으로 첨가하였다. 다음으로, 형광색소로 표지된 표면 마커를 추가하고 세포를 4℃에서 추가로 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 즉시 분류하였다. 유동 세포측정 항체 염색 및 세척은 염색 완충액(BD, 554657)에서 수행되었다. FACS용 표면 마커에는 다음 마커 및 형광체가 포함되었다: 라이브/데드(Live/Dead) - DAPI는 분류기(Sigma, 10236276001), CD3 BUV737 (BD Biosciences, 612750), CD4 BV510 (BD Biosciences, 563919), CD8 BUV805 (BD Biosciences, 612889), CCR7 AF647 (BioLegend 353218), 및 CD45RO BV605 (BioLegend 304238)에서 현장 추가됨.

[0270] *CD137/4-1BB+ T 세포 FACS 분류*: 재자극 후 24시간 후, 세포를 수집하고 다음 표면 항체를 사용하여 Astrios 세포 분류기(Beckman Coulter)를 사용하여 FACS에 대해 형광 표지 항체로 염색하였다: CD3 (BD Biosciences, cat#612750) 및 CD137/4-1BB (Biolegend, cat#309828). 전방 산포도, 측방 산포도 및 형광 채널에 대한 게이트는 잔해 및 이중체를 제외하면서 살아있는 세포를 선택하도록 설정되었다. 100 μm 노즐을 사용하여 추가 처리

를 위해 단일 CD3+ CD137/4-1BB+ 세포를 분류하였다.

[0271] *크로뮴 단일 세포 분할 및 라이브러리 제조:* 그런 다음, 분류된 세포를 Chromium Single Cell 5' Chip(10x Genomics, 1000287)에 로딩하고 Chromium Controller를 통해 처리하여 GEM(Gel Beads in Emulsion)을 생성하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 Chromium Single Cell 5' Library & Gel Bead Kit(10x Genomics, 1000265)로 RNA-Seq 라이브러리를 제조하였다.

[0272] *생물정보학적 방법*

[0273] 전사체, TCR(VDJ), 해싱, CITE-seq 및 텍스트라머 라이브러리를 서열분석하고 원시 서열분석 데이터를 10X CellRanger 분석 파이프라인을 사용하여 처리하였다. CellRanger 분석은 피처(feature)-바코드 UMI 계수 매트릭스와 TCR(VDJ) 아미노산 서열을 생성하였다. 피처에는 유전자 발현, 해싱 항체, CITE-seq 항체 및 덱스트라머 캡처가 포함된다. 피처-바코드 매트릭스를 입력으로 사용하여, R 패키지 Seurat v3.1.4(Butler 등 2018)가 다운스트림 분석에 사용되었다. 유전자 UMI 카운트의 표준 로그 정규화를 수행한 다음, 1000개의 가장 가변 유전자를 확인하고 데이터를 스케일링 및 센터링하였다. 다음, 주성분 분석(PCA)이 수행되었고 50개의 PC가 계산 및 저장되었다. 그 다음, Seurat의 그래프 기반 클러스터링 접근 방식을 사용하여 클러스터링을 수행하였다. k-최근접 이웃(KNN) 그래프는 20차원 PCA 공간에서 유클리드 거리를 기반으로 계산된 후 다양한 해상도에서 클러스터링되었다. 각 해상도에서, 상위 마커 유전자를 확인하고 상이한 클러스터에서 유전자 발현의 히트맵을 생성하는 데 사용하였다. 육안 검사 시, 최적의 클러스터링 해상도가 결정되었다. 미토콘드리아 유전자가 최상위 유전자 마커인 죽은 세포 클러스터에 속하는 모든 세포는 다운스트림 분석에서 제거되었다. 검출된 유전자 수가 500개 이하, 그리고 미토콘드리아 유전자 발현 분율이 0.25개 이상인 세포를 제거하였다. 검정의 주요 목표 중 하나는 TCR-항원 상호작용에 의해 유도되는 다양한 항원에 대한 T-세포 반응성을 확인하는 것이기 때문에, 단일 TCR 사슬, 비생산적 사슬, 또는 하나 초과의 알파 또는 베타 사슬도 제거되었다. 다수의 유전자가 검출되고/되거나 다수의 UMI가 검출된 임의의 이상치 세포도 제거되었다. 나머지 세포의 경우, 다른 피처(CITE-seq, 해싱, 덱스트라머)의 데이터가 처리되었다. 이러한 피처에 해당하는 카운트 매트릭스의 데이터는 중심 로그 비율 변환을 사용하여 정규화한 다음, 척호돠하였다. 해싱 데이터는 MultiSeqDemux 알고리즘을 사용하여 셀을 역다중화하는 데 사용되었다(McGinnis 등 (2019) Nature Methods 16:619-26; 디폴트 매개변수). 해싱 방식에 따라 해시태그가 할당되지 않은 세포는 다중화 후 제거되었다. 각 세포에 대해, 세포의 독특한 기능적 클론형을 정의하는 한 쌍의 TCR 아미노산 서열을 얻었다. 역다중화 후, 해시태깅된 검정 웰과 연관된 모든 세포 중 각 T 세포 클론의 클론형 크기를 계산하였다. 크기가 20보다 큰 모든 클론형은 해시태깅된 웰의 특정 항원에 대한 잠재적인 반응성이 있는 것으로 간주되었다.

[0274] **실시예 1: 다량체 염색과 비슷한 항원 특이적 T 세포 집단을 기능적으로 확인할 수 있는 활성화 유도된 마커(AIM)로서 CD137/4-1BB를 확인**

[0275] *물질 및 방법*

[0276] 일반적으로, 본 실시예에 기재된 방법에서, 건강한 HLA-A*0201+ 인간 공여체로부터의 T 세포를 본원에 기재된 방법에 따라 동족 합성 펩티드의 존재 하에 사전 확장시킨 다음, 유동 세포측정 분석을 위해 형광 태깅된 항체 및 덱스트라머 다량체로 염색하여 항원 특이적 T 세포 집단을 확인하였다.

[0277] *결과*

[0278] 도 2a에서 수지상 세포(DC)는 건강한 인간 공여체의 전체 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 파생되었다. 간단히 말해서, CD14+ 단핵구는 항-CD14-자기 비드(Miltenyi)를 사용한 자기 선택에 의해 PBMC로부터 단리되었다. CD14+ 세포를 IL-4 및 GM-CSF가 보충된 CellGenix CellGro DC 배지에서 5일 동안 배양하였다. 5일째에, DC는 2시간 동안 HLA-A*0201에 특이적인 CMV pp65 (NLVPMVATV; 서열번호:16), 또는 MART1 (ELAGIGILTV; 서열번호:15) 합성 짧은 펩티드로 펄스화되었다. 그 다음, IFNα를 세포에 첨가하여 세포를 활성화시켰다. 7일째에, 자가 T 세포를 배양물에 첨가하고 배지를 5% 인간 혈청 플러스 지지적 사이토카인 (IL7, IL-15, IL-2)이 보충된 CellGenix CellGro 배지로 교환하였다. 이러한 자가 DC 및 T 세포는 관련 기존 항원 특이적 T 세포 집단을 확장하기 위해 10일 동안 배양되었다. 배양에서 10일 사전 확장 후, T 세포를 관련 펩티드 또는 DMSO 음성 대조군으로 24시간 동안 재자극하였다. 관심 세포 표면 표적은 유동 세포측정 특성화(A3 Symphony Analyzer, BD)에 의해 형광 태깅된 단클론성 항체 및 덱스트라머 다량체를 사용하여 평가되었다.

[0279] **도 2a**의 유동 세포측정 분석 도트 플롯은, 배양물로부터의 CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포의 분율이 자극 전에 낮지만(x-축, 왼쪽 패널), 다량체가 관심 있는 CD8+T 세포 집단을 강력하게 염색한다는 것을 보여준다: 25.5% CMV

pp65 CD8+T 세포, 7.79% MART1+ T 세포. (x-축, 중간 패널). 다시 말해서, 이 특정 예에서 사용된 세포 배양 조건은 기존의 기억 T 세포를 확장했지만, 새로운 T 세포 확장을 유도하지 않았다. 그러나 24시간 동안 동족 펩티드로 재자극한 후, CD137/4-1BB 발현은 CD8+ T 세포에서 상향 조절되고 CD137/4-1BB+ 집단(x-축)의 전체 크기는 다량체+ 집단(오른쪽 패널)과 유사하다.

[0280] 도 2b에서, 본 실시예에서 설명한 것과 동일한 세포 배양 및 염색 방법을 사용하여, 4명의 HLA-A*0201+ 건강한 공여체(HD1, HD2, HD3 및 HD27)에서 분리한 세포를 DMSO 또는 CMV pp65 합성 펩티드 존재 하에 10일 동안 배양하였다. 음성 대조군 다량체에 대해 10일 확장 후 CMVpp65 다량체+ CD8+ T 세포의 분획은 유동 세포측정에 의해 평가되었다(도 2b, 최상부 패널). DMSO 대조군에 대해 CMV pp65 합성 펩티드로 24시간 재자극한 후, CD8+ T 세포에서 CD137/4-1BB의 발현을 유동 세포측정으로 평가하였다(도 2b, 바닥 패널). CMV에 대해 혈청반응양성인 4명의 건강한 공여체 중 3명은 측정 가능한 CMV pp65+ CD8+ T 세포(HD1, HD2, HD27)를 갖고 있는 반면, CMV 혈청검사 음성 공여체(HD3)는 검출 가능한 CMV pp65+ T 세포를 갖지 않았다. (**도 2b**). 일반적으로, 다량체+ CD8+ 및 CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포의 집단 크기에는 일치가 있다. (**도 2b**).

[0281] 도 3a-3b에서, 건강한 HLA-A*0201+ 인간 공여체(HD3 및 HD27)의 전체 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 지지적 사이토카인 (GM-CSF, IL-4, IL7, IL-15, IL-2), 및 DMSO 또는 MART1 (ELAGIGILTV; 서열번호:15) 합성 짧은 펩티드를 포함하는 배지에서 배양하여, 10일 동안 각각 기준선 집단(DMSO)을 제공하거나 관련 기존 MART1 특이적 T 세포를 확장하였다. 배양에서 10일 사전 확장 후, T 세포를 DMSO 음성 대조군 또는 MART1 펩티드로 24시간 동안 재자극하였다. 건강한 공여체 27(HD27)로부터의 MART1 다량체+ CD8+ T 세포 및 CD137/4-1BB CD8+ T 세포를 형광 활성화 세포 분류(FACS)로 분류하고 5' RNA 및 TCR 단일 세포 서열분석 라이브러리 제조용 10X Genomics 단일 세포 분할기에 캡슐화한 다음, 고처리량의 차세대 서열분석을 수행하였다. 완전한 짝을 이루는 알파 및 베타 TCR 정보를 생성한 세포만을 평가되었다. 다량체+ 및 CD137/4-1BB+ 샘플에 걸친 중첩을 평가하였다.

[0282] 재자극 전에, 두 공여체 모두는 MART1+ CD8+ T 세포를 검출할 수 있었다(**도 3a**, 최상부 패널). 동족 펩티드로 24시간 재자극한 후, 두 공여체(HD3 및 HD27) 모두는 세포 표면에서 CD137/4-1BB를 상향 조절하였다(**도 3a**, 바닥 패널). 그러나, 하나의 공여체(HD27)는 다량체+ CD8+ T 세포보다 현저하게 더 높은 CD137/4-1BB+ T 세포를 가졌다(**도 3a**). 이러한 불일치를 테스트하기 위해, 다량체 및 CD137/4-1BB 염색에 의해 확인된 기능적 T 세포 클론은 다량체+ 및 CD137/4-1BB+ 샘플에 걸쳐 중첩을 평가함으로써 추가로 평가되었다. 다량체+ 및 CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포 집단 간에 공유되는 TCR 서열에 상당한 중복이 있었다. (**도 3b**). 전반적으로, CD137/4-1BB+ 분획은 MART1 다량체+ 집단보다 더 많은 클론 집단을 함유하였다. 가장 클론적으로 확장된 MART1 다량체+ TCR은 CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포 집단에서 검출되었으며 많은 더 낮은 존재비의 TCR도 두 풍부 집단에서 모두 검출 가능하였다. 그러나 CD137/4-1BB+ 집단은 다량체+ 집단에서 검출되지 않은 TCR을 포착하였다. 또한, MART1 다량체+ 집단의 많은 낮은 존재비의 TCR 서열이 CD137/4-1BB+ 집단에서 더 큰 클론 크기로 존재하였다.

[0283] **도 2a-b** 및 **3a-b**에 표시된 데이터는, 활성화 유도 마커 CD137/4-1BB가 항원 특이적 활성화 후 인간 T 세포에서 상향 조절되고 본 명세서에 기재된 방법에 따라 배양된 다량체+와 CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포 사이의 단일 세포쌍 형성된 알파/베타 사슬 T 세포 수용체 (TCR) 서열 중에 상당한 중첩이 있음을 입증한다. 이와 같이, CD137/4-1BB는 예를 들어 항원 특이적 T 세포에 대한 기능적 풍부화 활성화 유도 마커(AIM)와 같은 기능적 검정에 사용될 수 있다. 또한, CD137/4-1BB를 기능적 마커로 사용하는 것은 기존의 다량체 염색만큼 효율적이며 유사한 기능적 분석 결과를 제공한다.

[0284] **실시예 2: 해시태그 올리고뉴클레오티드 및 활성화된 T 세포의 CD137/4-1BB 풍부화를 사용하는 일차 인간 세포에서 동족 T 세포 및 에피토프 반응성의 특성화**

[0285] 동족 항원 및 TCR 반응성을 평가하고 특성화하는 실행 가능한 방법으로서 해싱, AIM 분류 및/또는 단일 세포 시퀀싱 분석을 추가로 입증하기 위해 PBMC 및 독특한 바이러스 펩티드를 포함하는 독특한 생물학적 샘플을 해시태그 올리고뉴클레오티드 접합된 항-CD2 항체로 해싱하고 풀링하였다. 기능적 활성화는 CD137/4-1BB 염색에 의해 확인되었고 기능적 검정에서 CD137/4-1BB의 사용은 ELISPOT 및 덱스트라머 염색의 기존 기능적 검정과 비교되었다.

[0286] *물질 및 방법*

[0287] *ELISPOT*: CMV, EBV, 및 인플루엔자에 대해 공지된 혈청양성반응을 갖는 건강한 HLA-A*0201+ 인간 공여자로부터의 PBMC를 이중 인간 IFNɣ/그랜자임B 플루오로스팟 검정 플레이트 (ImmunoSpot, Cleveland, OH)에 $2X10^5$ 세포/웰의 농도로 48시간 동안 DMSO 또는 개별 HLA-A*0201+-제한된 바이러스 펩티드 자극 (EBV YVL-9, CMV pp65,

EBV LMP2A, EBV BMLF1, 인플루엔자 A)과 함께 플레이팅하였다. 인큐베이션 후, ELISPOT 반응성이 개발되었고 제조업체의 지침과 자동화된 소프트웨어를 사용하여 ImmunoSpot 분석기에서 판독되었다.

[0288] *해싱 및 AIM 풍부화를 위한 PBMC 배양물:* 건강한 HLA-A*0201+ 인간 공여체의 전체 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 배지, 지지적 사이토카인(GM-CSF, IL-4, IL7, IL-15, IL-2) 및 개별 HLA- A*0201+-제한된 바이러스 펩티드(EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 인플루엔자 A)를 10일 동안 배양하여 관련 기존 항원 특이적 T 세포 집단을 확장한다. 배양에서 10일 사전 확장 후, T 세포를 관련 펩티드 또는 DMSO 음성 대조군으로 24시간 동안 재자극하였다. 관심 세포 표면 표적은 유동 세포측정 특성화(A3 Symphony Analyzer, BD)에 의해 형광 태깅된 단클론성 항체를 사용하여 평가되었다. 바이러스 펩티드 자극에 걸친 CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포의 상대적인 분획을 유동 세포측정 분석에 의해 평가하였다(CD8+ CD137/4-1BB+ T 세포 분획은 게이트 위의 총 CD8+ T 세포의 백분율로 제공됨).

[0289] *해싱. AIM 풍부화 및 단일 세포 서열분석:* 독특한 해시태그 올리고뉴클레오티드로 표지된 단클론성 인간 항-CD2 항체를 이 실험에서 설명된 PBMC 생물학적 샘플의 각 검정 웰에 추가하여, 주어진 웰의 T 세포를 동일한 웰이 받은 자극으로 고유하게 바코드를 표시하였다. 그런 다음, 모든 검정 웰 샘플을 풀링하고 FACS 분류를 위한 형광 태깅된 표면 항체 및 scSEQ 표현형을 위한 CITE-seq 항체로 염색하였다. CD137/4-1BB+ CD8+ T 세포 집단을 단일 세포 서열분석(10X Genomics 5' RNA 및 TCR)에 의해 분류 및 역다중화, 예를 들어 분석하였다. 발현은 전체 발현으로 각 세포의 유전자 발현을 정규화하는 LogNormalize 방법을 사용하여 정규화된다. 수학적으로, 정규화된 발현은 log1p(UMI.Count*scaling.factor/(총 UMI 개수))와 같고, scaling.factor = 10,000이고 log1p는 log이다.

[0290] *올리고 태깅된 덱스트라머 활성화 및 염색* CD8+ T 세포는 Miltenyi CD8+ T 세포 음성 풍부화(Miltenyi)을 사용하여 농축되었다. 그 다음, 세포를 벤조나아제(Millipore) 및 다사티닙(Axon)과 함께 45분 동안 인큐베이션한 후, 실온에서 30분 동안 올리고 태깅된 덱스트라머 풀로 염색하였다. 그 다음, 세포를 CD3(BD Biosciences, cat#612750), CD4(BD Biosciences, cat#563919, CD8(BD Biosciences, cat#612889), CCR7(Biolegend, cat#353218) 및 CD45RO(Biolegend, cat#304238) 및 CITE-seq 항체에 대해 형광 표지로 얼음 위에서 추가로 30분 동안 염색하였다. Astrios 세포 분류기(Beckman Coulter)를 활용하여, 전방 산포도, 측방 산포도 및 형광 채널의 형광 활성화 세포 분류(FACS) 게이팅을 설정하여 진해 및 이중체를 제외하면서 살아있는 세포를 선택하였다. 100 μm 노즐을 사용하여 추가 처리를 위해 단일 CD3+CD8+텍스트라머+ 세포를 분류하였다.

[0291] *RNA 서열분석 클러스터링* RNA 전사체 발현은 AIM 풍부화에서 분류된 CD137/4-1BB+ T 세포에서 평가되었다. 클러스터링은 k-최근접 이웃(KNN) 그래프를 사용하는 Seurat의 그래프 기반 클러스터링 접근 방식을 사용하여 수행되었으며 20차원 PCA 공간에서 유클리드 거리를 기반으로 계산된 후 다양한 해상도에서 클러스터링되었다.

[0292] **결과**

[0293] **도 4a** 및 **4b**에 도시된 바와 같이, 생물학적 샘플 내의 항원 특이적 세포의 백분율은 해싱 및 AIM 풍부화에 의해 확인되며(**도 4b**), 기존 ELISPOT 기능적 검정으로 확인된 백분율과 상관관계가 있다(**도 4a**). 따라서, 본 명세서에 기재된 사전 확장 및 재자극 프로토콜은 항원 특이적 T 세포 집단의 상대적인 분획을 유지하는 것으로 보이다.

[0294] 본 명세서에 제공된 방법론의 검증은 도 6에 도시되어 있다. 비제한적인 구현예가 **도 5**에 예시된 본 명세서에 개시된 방법에 의해 풍부화되고 분석된 항원 특이적 세포의 단일 세포 서열 분석은 추가 검증을 제공한다. **도 6a-c**에 나타난 바와 같이, 단일 세포 서열 분석은 대부분의 세포를 개별 HTO(80%)에 할당한 반면, ~8%는 "이중체"로 분류되었고 "HTO 없음"은 세포의 ~12%에 대해 확인되었다. 각 HTO에 해당하는 세포의 상대적 수 및 이에 따른 각 반응성(EBV YVL-9, CMV pp65, EBV LMP2A, EBV BMLF1, 인플루엔자 M)은 도 4a에 나타낸 ELISPOT 검정 및 도 4b에 나타낸 유동 세포측정 분석을 포함하는 직교 기능적 검정에서 확인된 세포의 상대적 수를 반영하였다. **도 6b**에 표시된 것은 각 자극의 비현실적인 동일한 확장이 발생한 각 해시태그에 의해 확인된 세포의 상대적인 수이다.

[0295] CMV pp65, EBV BMLF1 또는 인플루엔자 M 클론에 해싱된 CD137/4-1BB^{+} T 세포의 반응성은 병렬 올리고태깅된 풀링된 덱스트라머 기반 실험에 의해 확인되었다. **도 6d**는, HTO-40, HTO-47 및 HTO-48 해싱된 CD137/41BB 확장된 TCR가 해시태그, 즉, 인플루엔자 M (HTO-40), EBV-BMLF1 (HTO-47), 및 pp65-CMV (HTO-48)에 의해 확인된 항원에 대한 반응성을 보여줌을 도시한다. 이는 항원에 해당하는 해시태깅된 웰에서 클론 크기 >=20인 T 세포 클론의 존재에 의해 관찰된다. 독특한 클론의 수는 총 클론(TC)으로 표시된다. 이러한 확장된 클론의 반응성은 병렬

올리고태깅된 풀링된 덱스트라머 기반 실험에 의해 확인된다. 클론 크기 >=10인 덱스트라머 실험의 클론과 동일한 CD137/4-1BB 확장 클론의 수는 OC로 표시된다. 이러한 중복 클론(OC)은 해싱된 항원에 해당하는 덱스트라머의 높은 발현 및 관련 없는 항원에 해당하는 덱스트라머의 낮은 발현을 보여준다.

[0296] scSEQ 데이터의 역다중화에서 추가 검증이 제공된다. 7개의 독특한 클러스터는 개별 세포에 의한 유전자 발현 패턴 및 수준을 기반으로 하는 RNA 전사체 분석에서 해결되었다. (**도 7a**). 특히, scSEQ 데이터를 역다중화하여 발견된 각 항원 특이적 T 세포에 대한 집단 크기의 비교(**도 7b**)는 기능적 유동 세포측정 검정에서 발견된 항원 특이적 T 세포의 집단 크기와 일치한다(**도 4b**). 데이터는, 독특한 항원 특이적 T 세포가 scSEQ 데이터의 HTO 역다중화에 의해 확인가능했고 각각의 항원 특이적 T 세포 집단에 대한 상대적 집단 크기가 역다중화 후에 유지되었음을 보여준다. 또한, CITE-seq 시약은 본 명세서에 기재된 해싱, AIM 분류 및 단일 세포 서열 분석 방법론과 호환된다. 이러한 CITE-seq 시약의 사용은 세포 하위세트 확인 및 표현형을 개선하기 위해 중요한 정보 층을 추가할 수 있다. 비제한적 예로서, CITE-seq 데이터는 각 세포 표면의 단백질 존재지의 측정을 제공하는 반면, RNA-seq 데이터는 각 세포의 전사체 존재비 측정을 제공한다. 단백질 존재비와 RNA-seq 발현은 상관관계가 없을 수 있으므로 두 측정 모두 상보적인 정보를 제공한다. 이것은 **도 8a**에 표시된 CD4 CITE-seq 데이터와 **도 8b**에 표시된 CD4 RNA-seq 데이터를 비교하여 강조 표시된다.

[0297] **실시예 3: 항원 특이적 T 세포의 기능적 및 표현형 분석**

[0298] 예를 들어 7-10일 사전 확장 없이 PBMC에서 직접 수행되는 항원 특이적 T 세포의 기능적 및 표현형 분석을 위한 해싱, AIM 분류, 단일 세포 서열분석 및 CITE-seq 항체 염색의 사용이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0299] *물질 및 방법*

[0300] *세포 표면 항체 염색을 갖는 5' 인간 TCR α/β: 세포 분할, 라이브러리 제조 및 서열분석*

[0301] 0.04% BSA를 갖는 PBS에 현탁된 단일 세포를 Chromium Single Cell Instrument(10X Genomics)에 로딩하였다. RNAseq, V(D)J 및 항체 유래 태그 라이브러리는 항체 유래 태그 프라이머가 추가된 Chromium Single Cell 5' Library, Gel Beads & Multiplex Kit(10X Genomics)를 사용하여 제조하였다. 증폭 후, cDNA는 작은(< 300 bp) 및 큰(> 300 bp) 단편 분획으로 분할되었다. RNAseq 및 V(D)J 라이브러리는 > 300bp 분획으로부터 제조되었고; 세포 표면 항체 유래 라이브러리는 < 300 bp 분획으로부터 제조되었다. TCR α/β에 대한 V(D)J 라이브러리 분취량을 풍부하게 하기 위해, cDNA를 2개의 20 ng 분취량으로 분할하고 프라이머를 사용하여 두 라운드로 증폭하였다.

[0302] 구체적으로, 제1 라운드 증폭을 위해, 사용된 프라이머는 짧은 R1의 경우 MP147 (ACACTCTTTCCCTACACGACGC; 서열번호:17), 인간 TRAC의 경우 MP120 (GCAGACAGACTTGTCACTGGA; 서열번호:18), 및 인간 TRBC의 경우 MP121(CTCTGCTTCTGATGGCTCAAACA; 서열번호:19)이었다. 제2 라운드 증폭의 경우, 제1 라운드로부터의 20 ng 분취량을 MP147, MP128

[0303] (GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGGGTCAGGGTTCTGGATA; 서열번호:20) 내재된 R2 플러스 인간 TRAC, 및 MP129 (GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGGGTCAGGGTTCTGGATA; 서열번호:21) 내재된 R2 플러스 인간 TRBC을 사용하여 증폭하였다. V(D)J 라이브러리는 각각 25 ng의 hTRAC 및 hTRBC 증폭된 cDNA로부터 제조되었다. RNAseq 및 항체 유래 태그 라이브러리 (UMI 및 세포 바코드의 경우 판독 1 26-bp, 8-bp i7 샘플 인덱스, 및 판독 2 55-bp 전사체 판독) 및 V(D)J 라이브러리 (판독 1 150-bp, 8-bp i7 샘플 인덱스, 및 판독 2 150-bp 판독을 위해 Illumina NextSeq500 상에서 페어링-엔드(Paired-end) 서열분석을 수행하였다.

[0304] *결과*

[0305] 공여체로부터 단리된 PBMC를 5가지 독특한 HPV 펩티드 중 하나와 함께 인큐베이션하였다. 항원 특이적 T 세포는 CD137/4-1BB 및 단일 세포 서열 분석을 기반으로 하는 AIM 분류를 사용하여 HTO 서열을 기반으로 클러스터링되었다(**도 9a**). HTO 샘플(양성 신호 역치 이상)에서 공유되지 않는 TCR 클론을 나타내는 세포를 확인하고 이러한 클론의 TCR 서열을 얻었다(예를 들어, **도 9b** 참조). **도 9b**는 각각의 독특한 세포 클론이 그레이스케일에서 상이한 색상으로 표현되는 예시적인 예시를 제공하며, 여기서 클론의 각 세포는 그레이스케일에서 동일한 색상으로 표시된다. 해시태그 제한된 클론의 수, 즉, 각 클론 내의 세포의 수 및 각 합시의태그에 대해 단지 하나의 HTO와 연관된 클론의 개수가 하기 표 1에 제공된다.

표 1

해시태그	독특한 클론의 수	세포의 수
HTO-1	168	233
HTO-2	176	209
HTO-3	416	1128
HTO-4	188	225
HTO-5	179	342

[0306]

[0307] 표 1에 나타낸 바와 같이, HTO-3에 의해 확인된 세포는 동족 항원에 대해 특이적인 TCR을 발현하는 TCR 클론의 가장 많은 수를 나타내고, 그 다음으로 HTO-5에 클러스터링된 세포를 나타낸다. 클론은 아미노산 서열에 의해 확인되며, 일부 HTO-3 제한된 TCR의 TCR α 및 β 쌍의 예시적인 CDR3 서열이 하기 표 2에 제공된다.

[0308] **관련 출원의 교차 참조**HTO-3 제한된 TCR의 TCR α 및 β 쌍의 예시적인 CDR3 서열이 하기 표 2에 제공된다.

[0309] **표 2**

해시태그	α CDR3 아미노산 서열 (서열번호:) β CDR3 아미노산 서열 (서열번호:)
HTO-3	CAGGGSGNTGKLIF (서열번호:1) CASSVRSSYEQYF (서열번호:2)
HTO-3	CAGGGSQGNLIF (서열번호:3) CASSIRSSYEQYF (서열번호:4)
HTO-3	CVVWGSQGNLIF (서열번호:5) CASSIRSSYEQYF (서열번호:6)
HTO-3	CAGGGSSNTGKLIF (서열번호:7) CASSIRSSYEQYF (서열번호:8)
HTO-3	CAMRGSPGGTSYGKLTF (서열번호:9) CASSEYSNQPQHF (서열번호:10)
HTO-3	CAYMTNAGGTSYGKLIF (서열번호:11) CASSQGSYGTF (서열번호:12)
HTO-3	CAGALGGGSQGNLIF (서열번호:13) CASSVRSSYEQYF (서열번호:14)

[0310]

[0311] 단일 세포 시퀀싱 분석은, 대시가 제한된, 즉 HTO 샘플에 걸쳐 공유되지 않은 T 세포 클론이 기능적 T 세포 반응과 연관된 마커를 보다 고도로 발현한다는 것을 보여준다. (**도 9c**; 또한 **도 9b** 참조).

[0312] 항원에 특이적으로 결합하는 T 세포 수용체의 독특한 아미노산 서열을 신속하게 확인할 뿐만 아니라 항원 특이적 T 세포 수용체 서열을 발현하는 세포의 표현형 특성을 제공하는 독특한 방법이 본원에 제시되어 있다. 이 고처리량 방법을 사용하면, 새롭고 잠재적으로 개체화된 치료제를 빠르게 확인하고 생성할 수 있다.

[0313] **등가물**

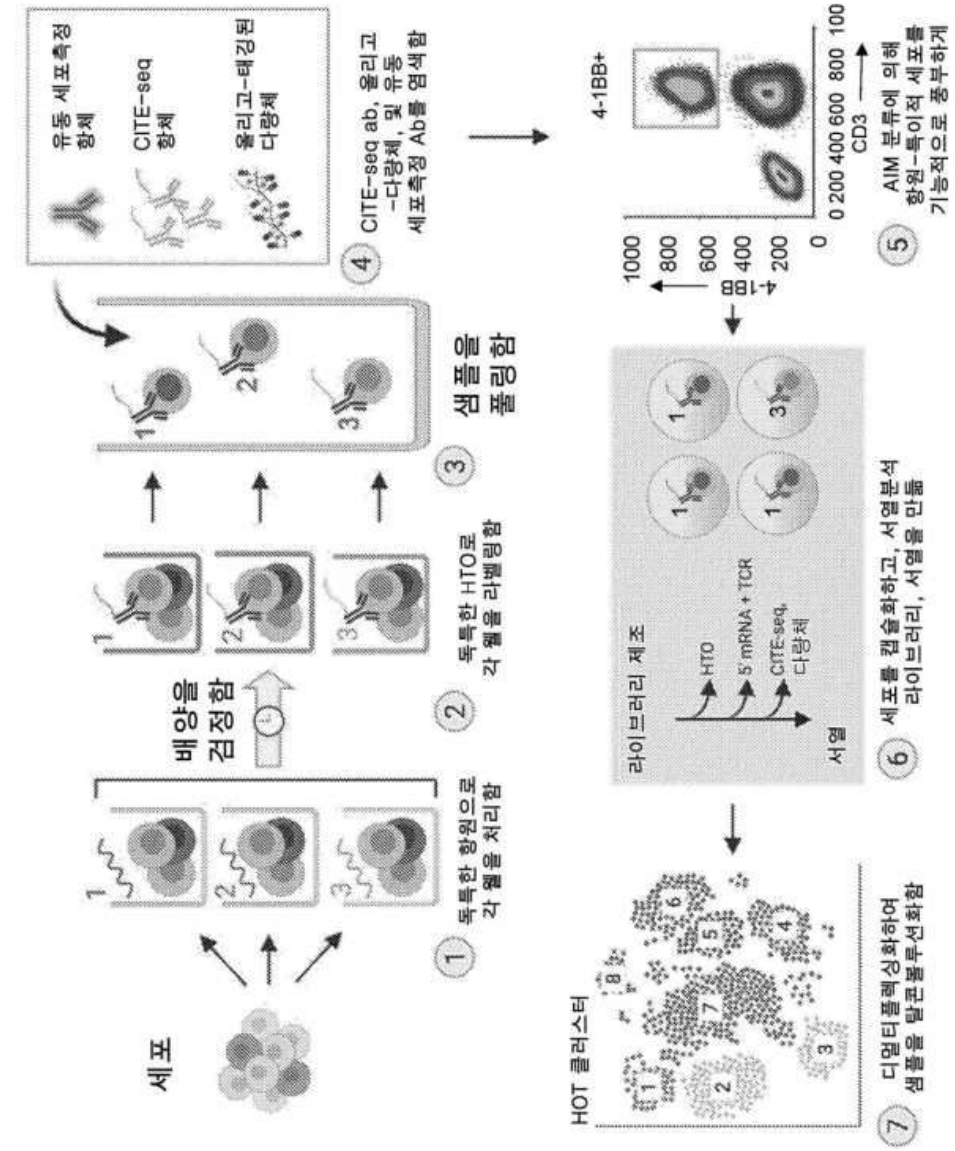
[0314] 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 구체예의 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음 청구범위에 포함되도록 의도된다.

[0315] 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 비특허 문서, 특허 출원 및 특허의 전체 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서

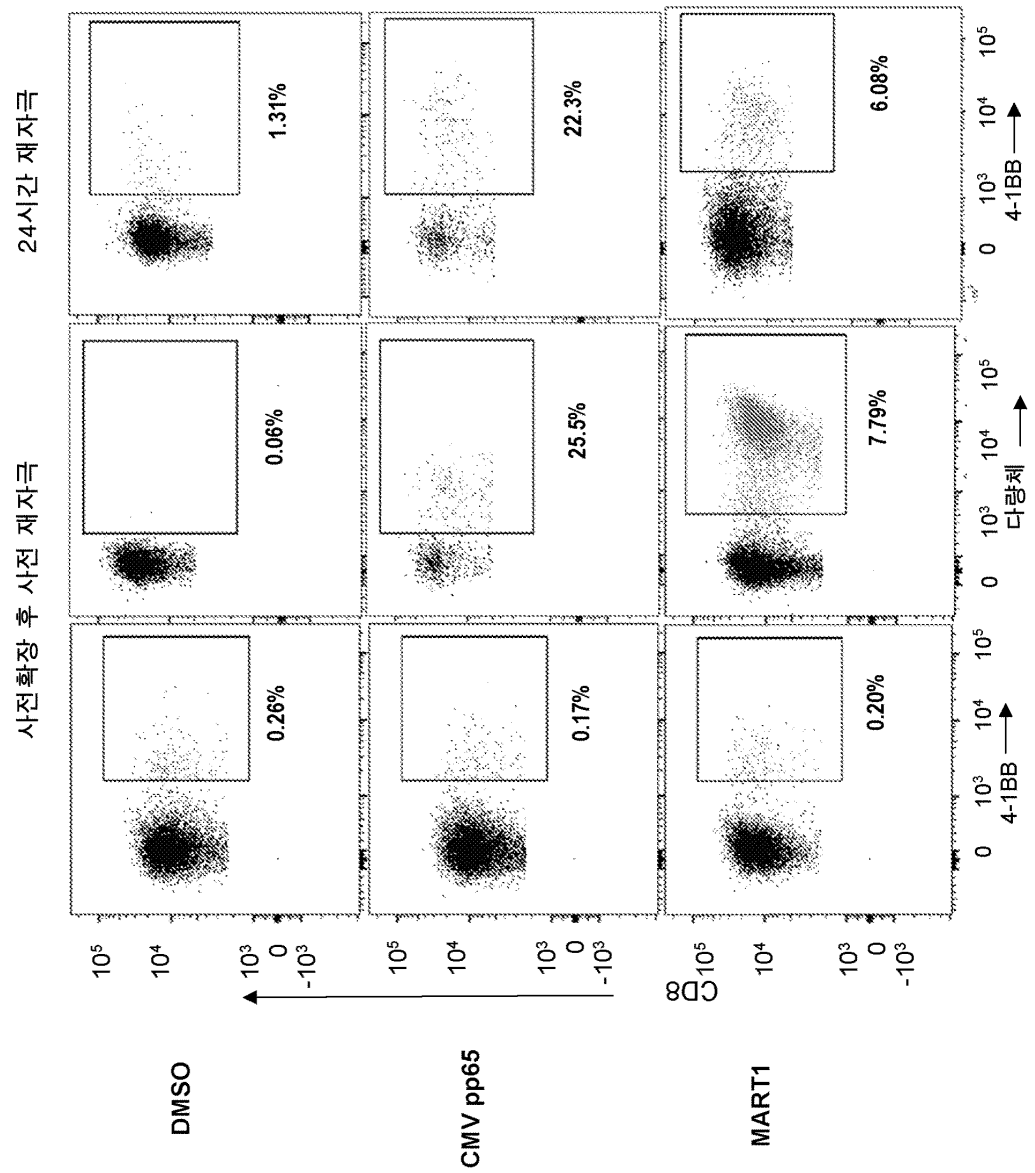
에에 포함된다.

도면

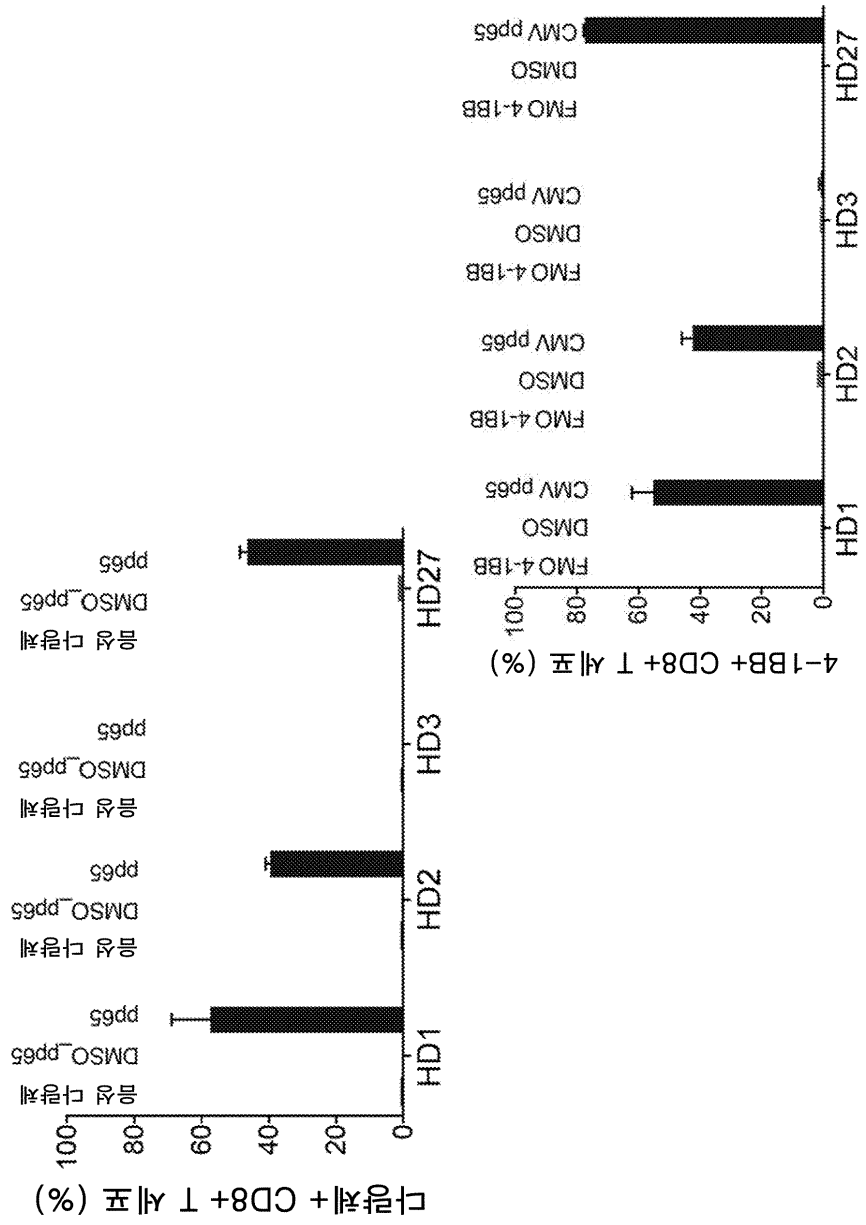
도면1



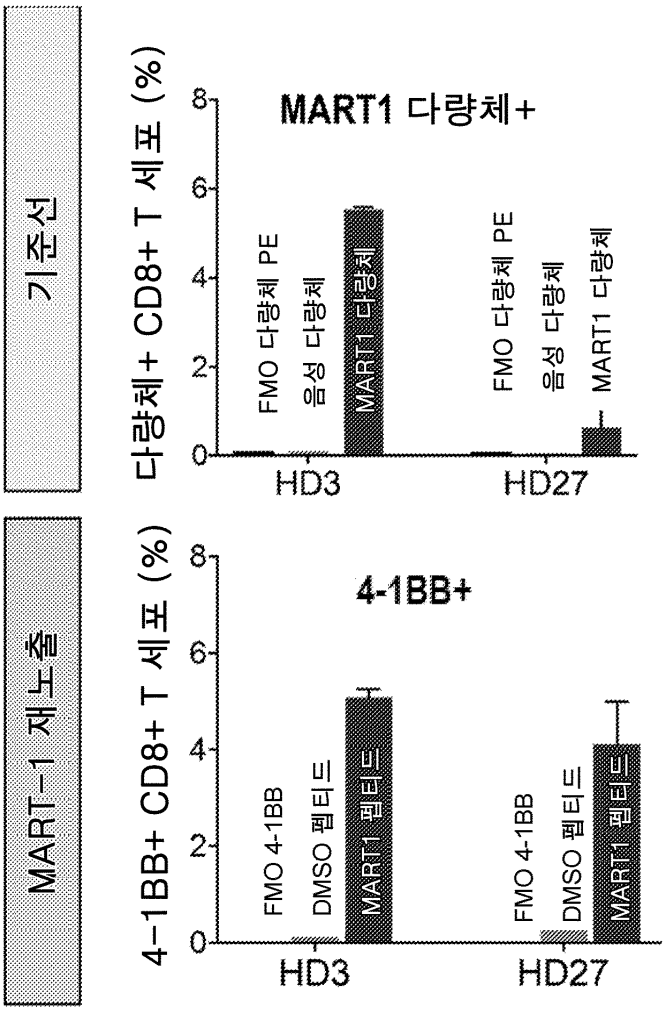
도면2a


24시간 재자극
사전확장 후 사전 재자극
DMSO
CMV pp65
MART1
CD8
4-1BB
다량체
0.26%
0.06%
1.31%
0.17%
25.5%
22.3%
0.20%
7.79%
6.08%

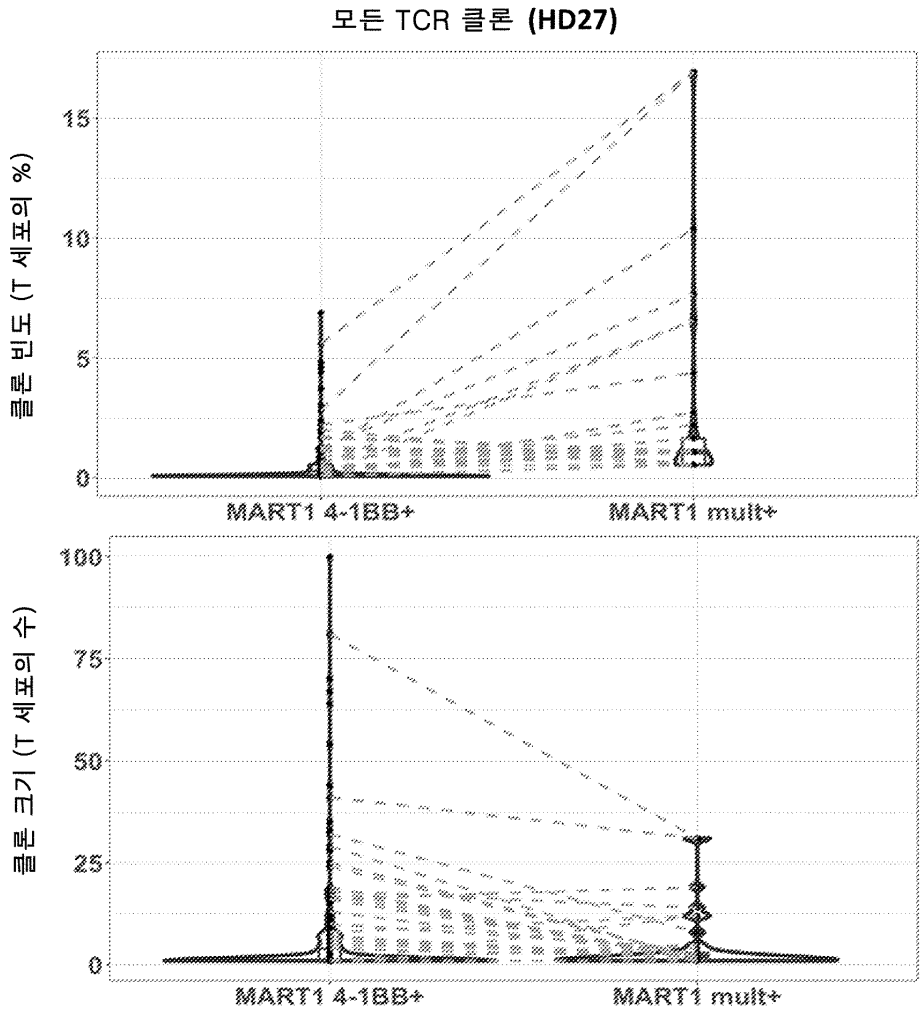
도면2b


4-1BB+ CD8+ T 세포 (%)
0
20
40
60
80
100
FMO 4-1BB
DMSO
CMV pp65
HD1
HD2
HD3
HD27
다량체+ CD8+ T 세포 (%)
음성 다량체
DMSO_pp65
pp65

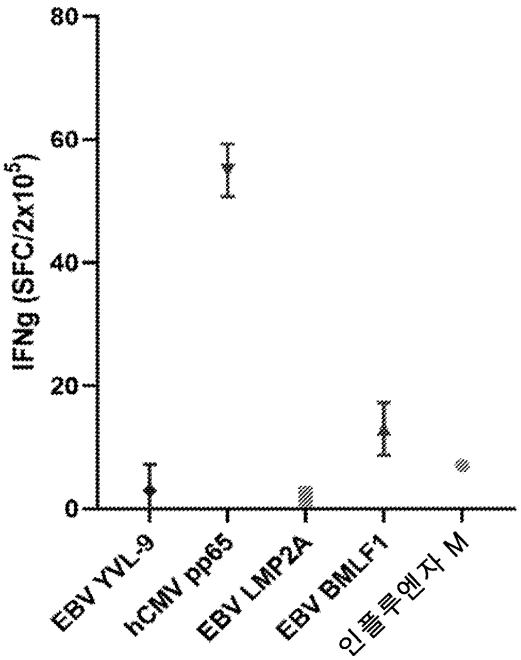
도면3a


기준선
MART1 다량체+
다량체+ CD8+ T 세포 (%)
8
6
4
2
0
FMO 다량체 PE
음성 다량체
MART1 다량체
FMO 다량체 PE
음성 다량체
MART1 다량체
HD3
HD27
MART-1 재노출
4-1BB+
4-1BB+ CD8+ T 세포 (%)
8
6
4
2
0
FMO 4-1BB
DMSO 펩티드
MART1 펩티드
FMO 4-1BB
DMSO 펩티드
MART1 펩티드
HD3
HD27

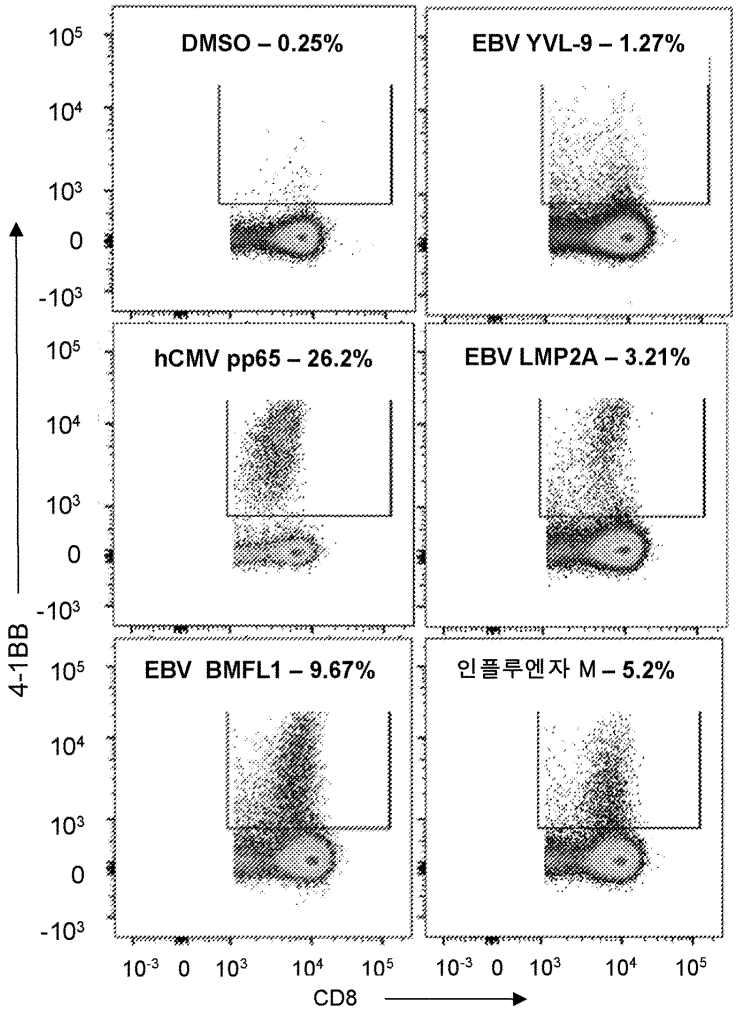
도면3b


모든 TCR 클론 (HD27)
클론 빈도 (T 세포의 %)
15
10
5
0
MART1 4-1BB+
MART1 mult+
클론 크기 (T 세포의 수)
100
75
50
25
0
MART1 4-1BB+
MART1 mult+

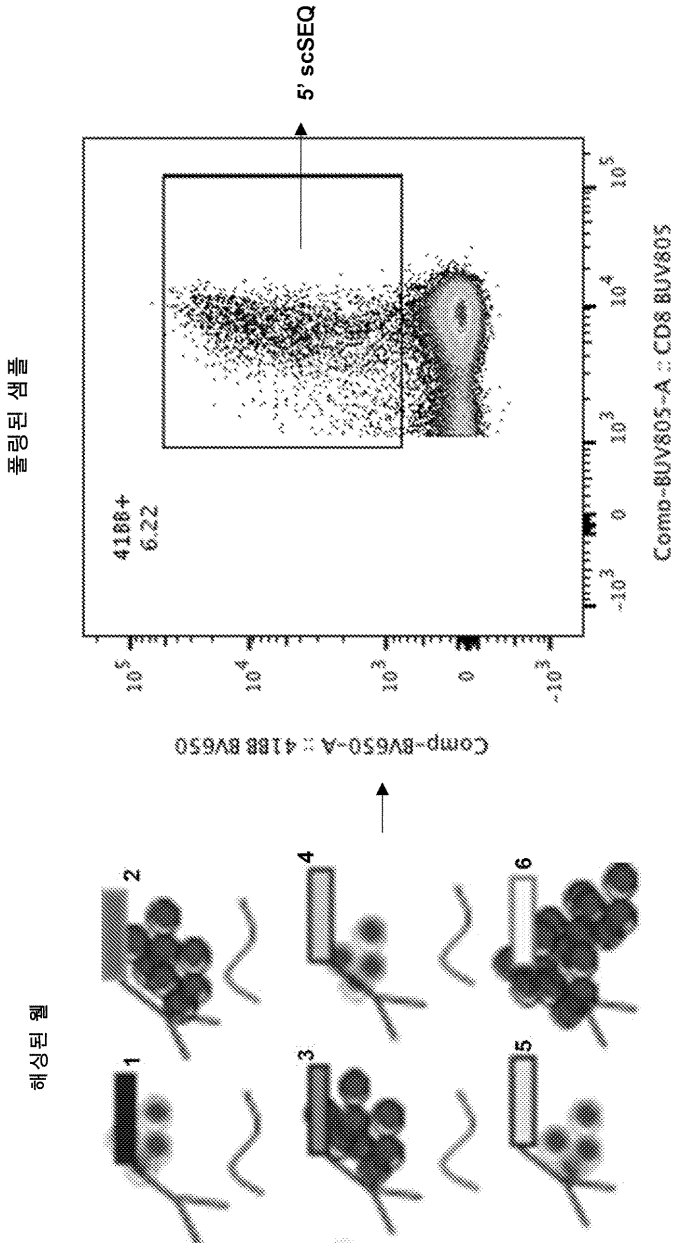
도면4a


IFNg (SFC/2x10^5)
80
60
40
20
0
EBV YVL-9
hCMV pp65
EBV LMP2A
EBV BMLF1
인플루엔자 M

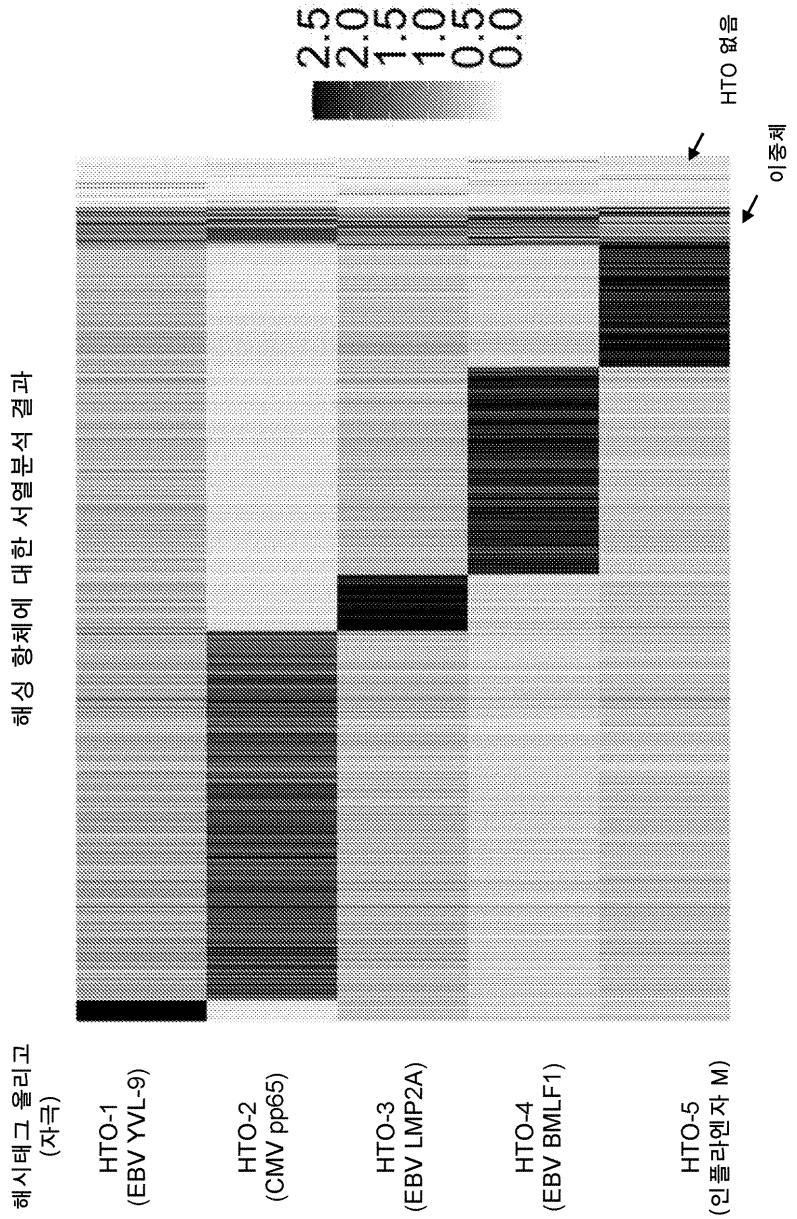
도면4b


DMSO – 0.25%
EBV YVL-9 – 1.27%
hCMV pp65 – 26.2%
EBV LMP2A – 3.21%
EBV BMFL1 – 9.67%
인플루엔자 M – 5.2%
4-1BB
CD8
10^5
10^4
10^3
0
-10^3
10^-3

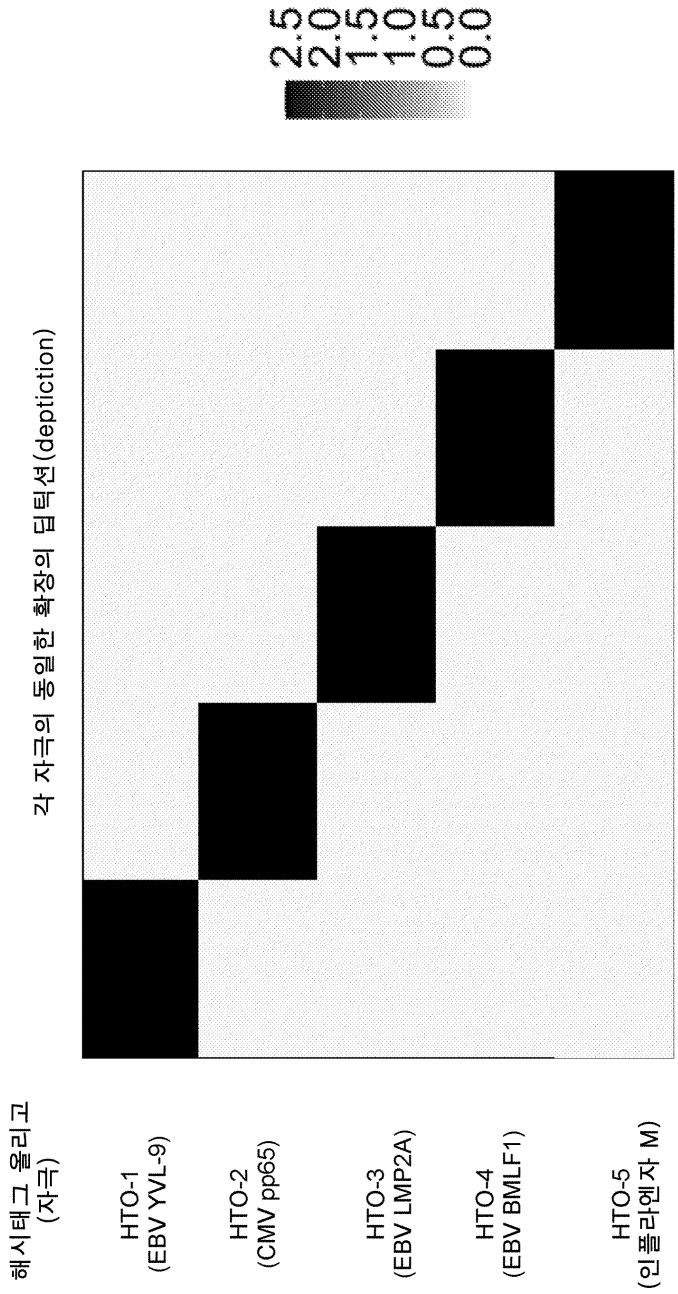
도면5


5' scSEQ
풀링된 샘플
41BB+
6.22
Como-BUV805-A :: CD8 BUV805
Comp-BV650-A :: 41BB BV650
해싱된 웰
1
2
3
4
5
6

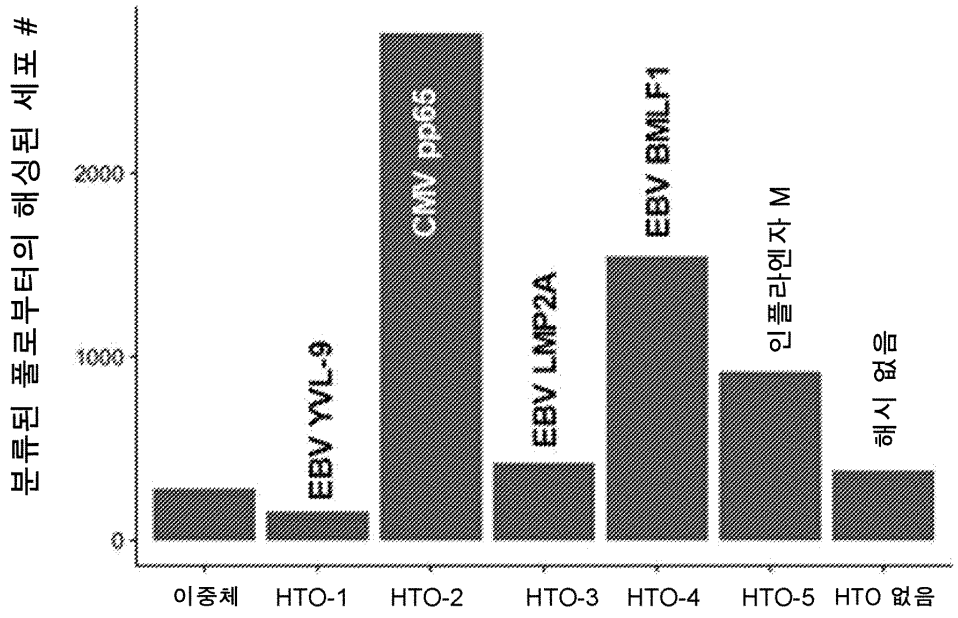
도면6a


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
HTO 없음
이중체
해싱 항체에 대한 서열분석 결과
해시태그 올리고 (자극)
HTO-1 (EBV YVL-9)
HTO-2 (CMV pp65)
HTO-3 (EBV LMP2A)
HTO-4 (EBV BMLF1)
HTO-5 (인플라엔자 M)

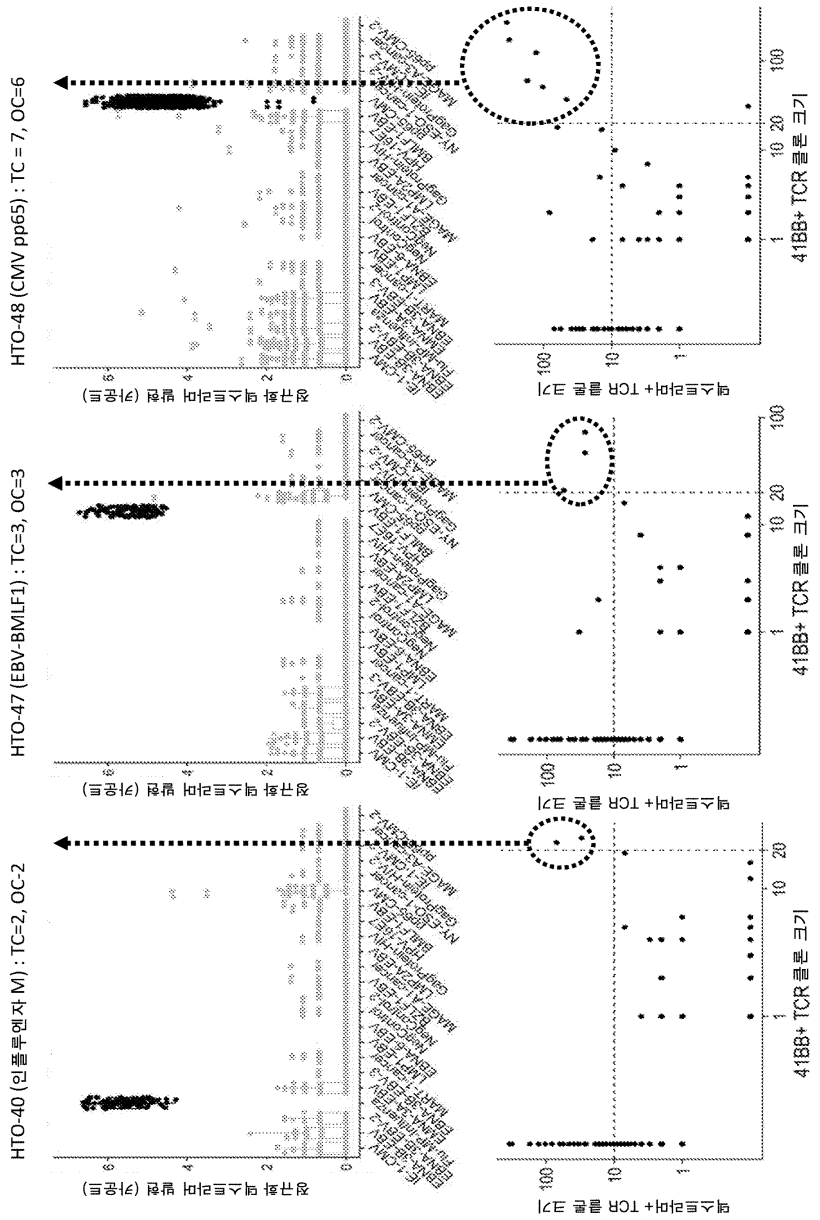
도면6b


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
각 자극의 동일한 확장의 딥틱션(deptiction)
해시태그 올리고 (자극)
HTO-1 (EBV YVL-9)
HTO-2 (CMV pp65)
HTO-3 (EBV LMP2A)
HTO-4 (EBV BMLF1)
HTO-5 (인플라엔자 M)

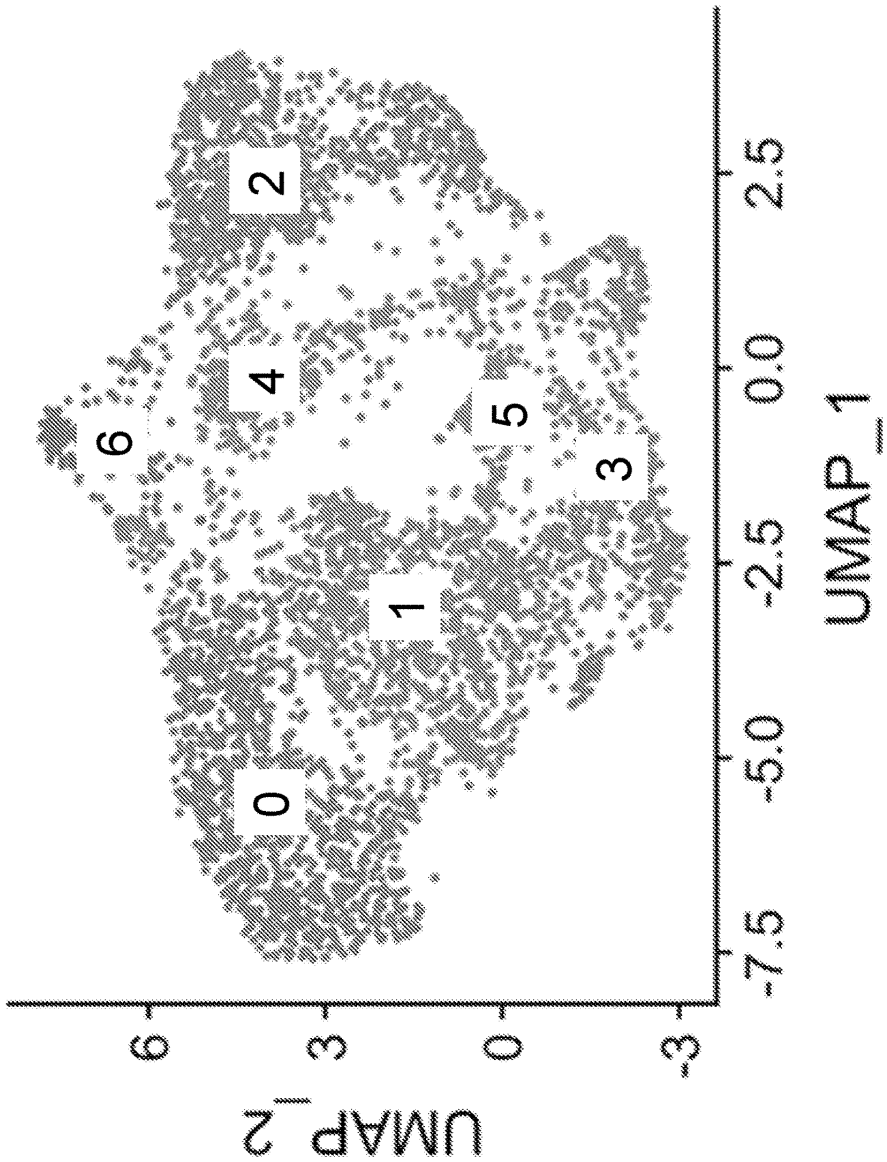
도면6c


분류된 폴로부터의 해싱된 세포 #
2000
1000
0
EBV YVL-9
CMV pp65
EBV LMP2A
EBV BMLF1
인플라엔자 M
해시 없음
이중체
HTO-1
HTO-2
HTO-3
HTO-4
HTO-5
HTO 없음

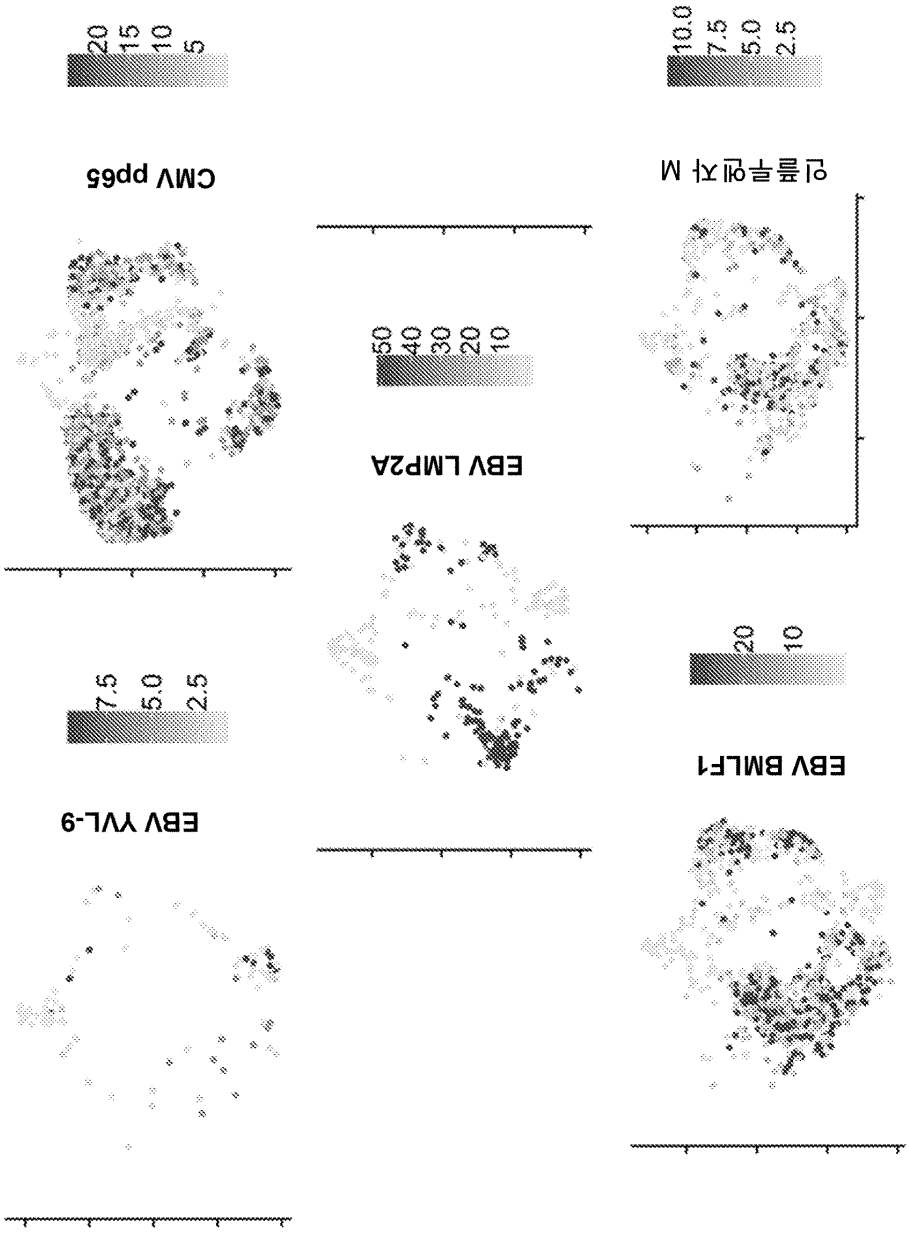
도면6d


HTO-40 (인플루엔자 M) : TC=2, OC-2
HTO-47 (EBV-BMLF1) : TC=3, OC=3
HTO-48 (CMV pp65) : TC = 7, OC=6
정규화 넥스트라머 발현 (카운트)
넥스트라머+ TCR 클론 크기
41BB+ TCR 클론 크기

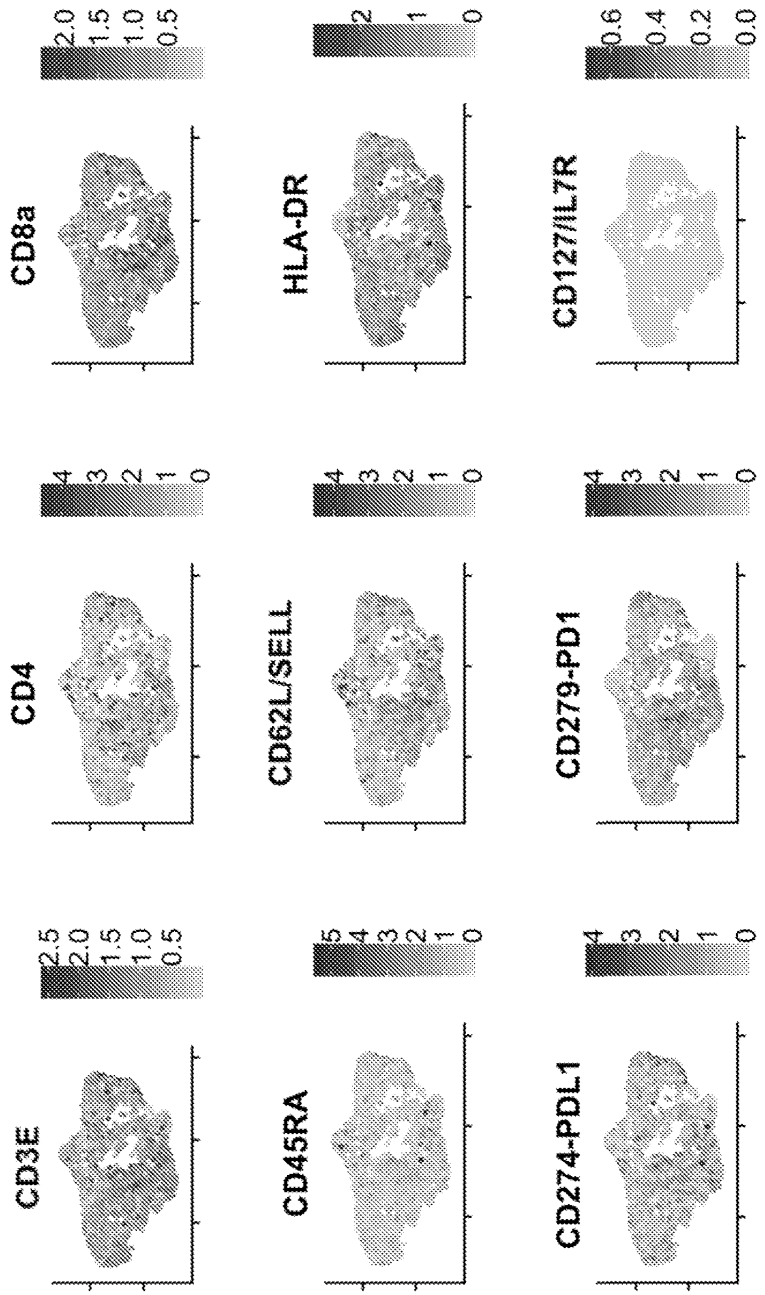
도면7a



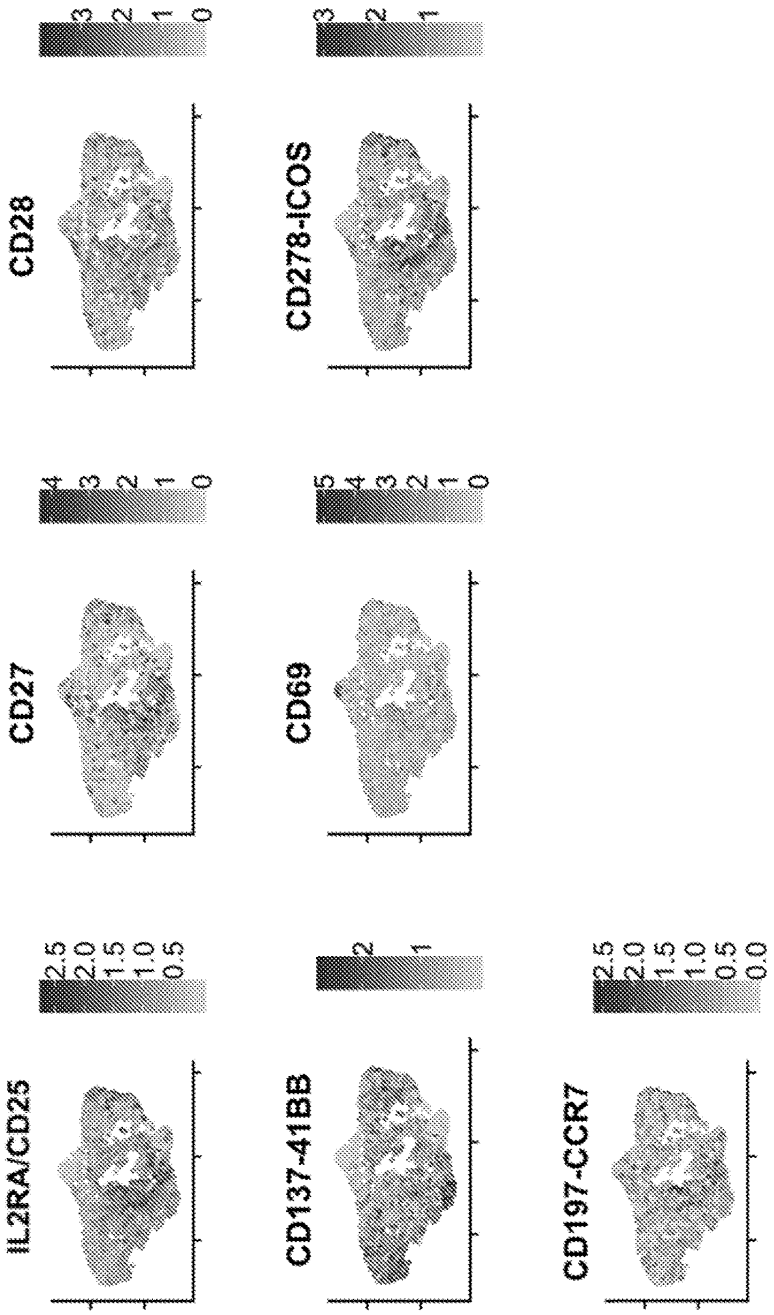
도면7b


인플루엔자 M
10.0
7.5
5.0
2.5
EBV BMLF1
20
10
EBV LMP2A
50
40
30
20
10
CMV pp65
20
15
10
5
EBV YVL-9
7.5
5.0
2.5

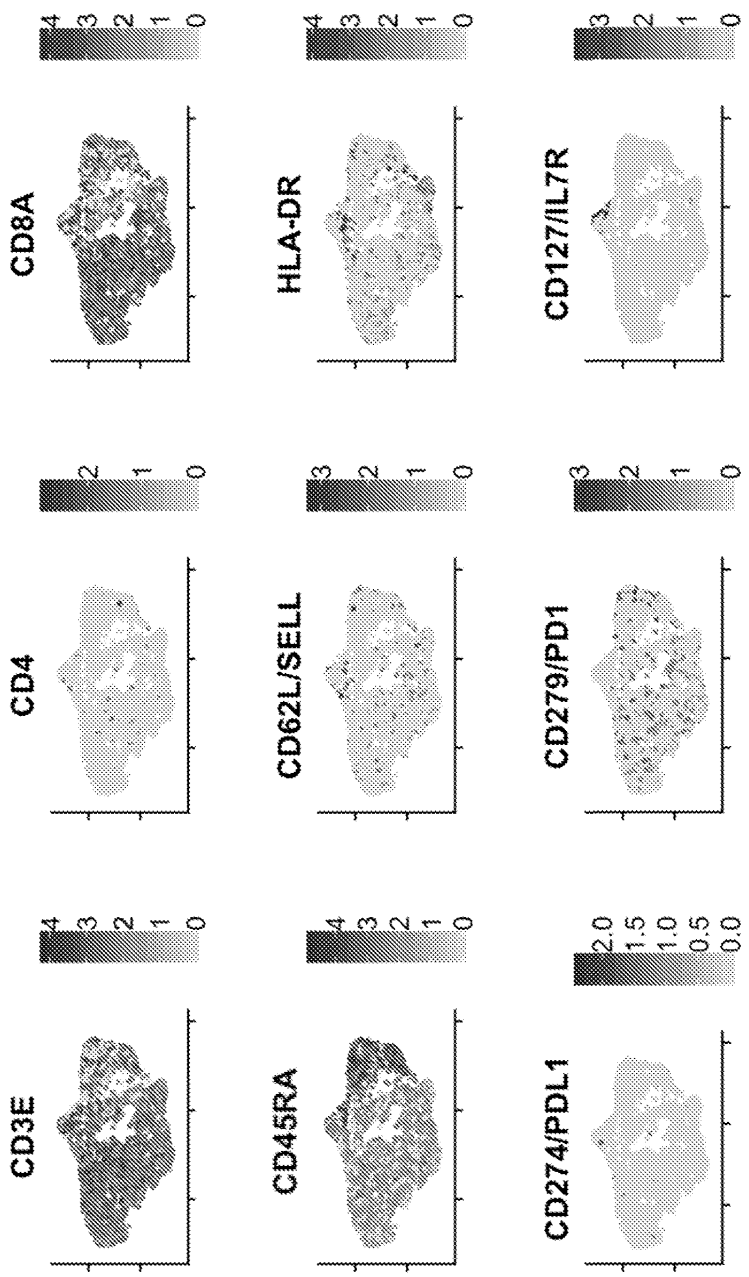
도면8aa


CD8a
2.0
1.5
1.0
0.5
HLA-DR
2
1
0
CD127/IL7R
0.6
0.4
0.2
0.0
CD4
4
3
2
1
0
CD62L/SELL
4
3
2
1
0
CD279-PD1
4
3
2
1
0
CD3E
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
CD45RA
5
4
3
2
1
0
CD274-PDL1
4
3
2
1
0

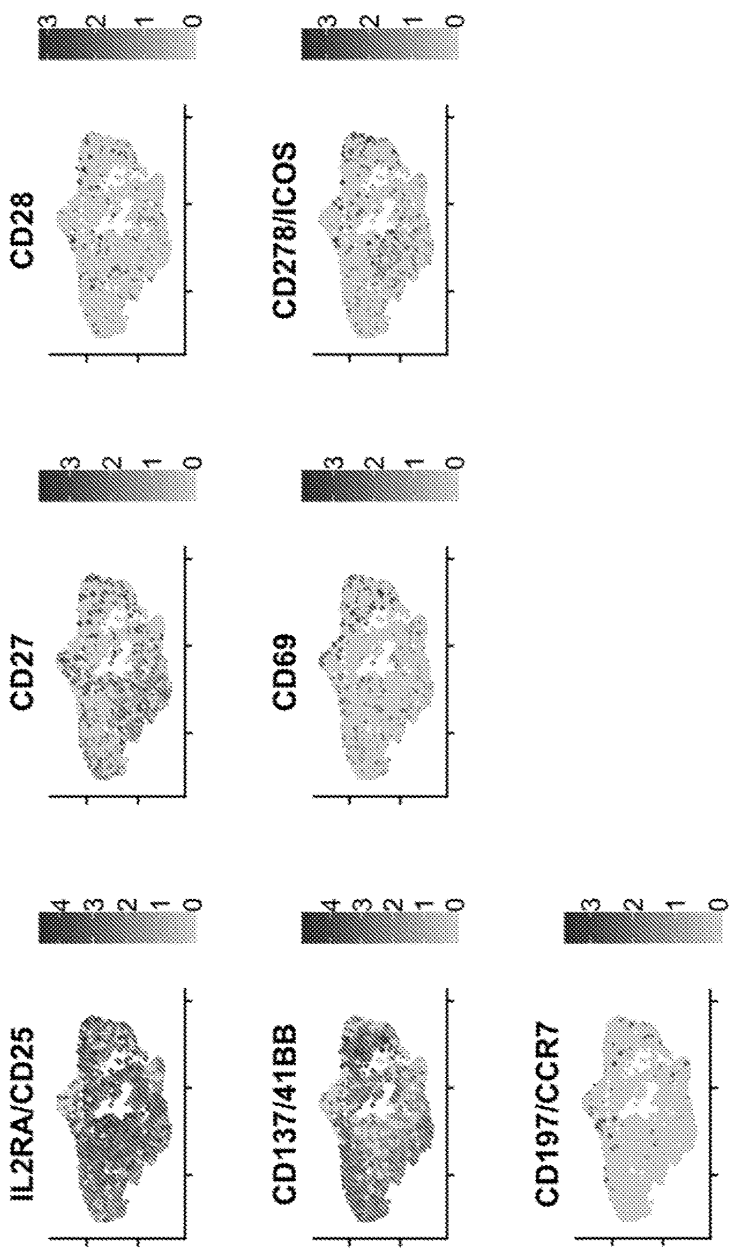
도면8ab



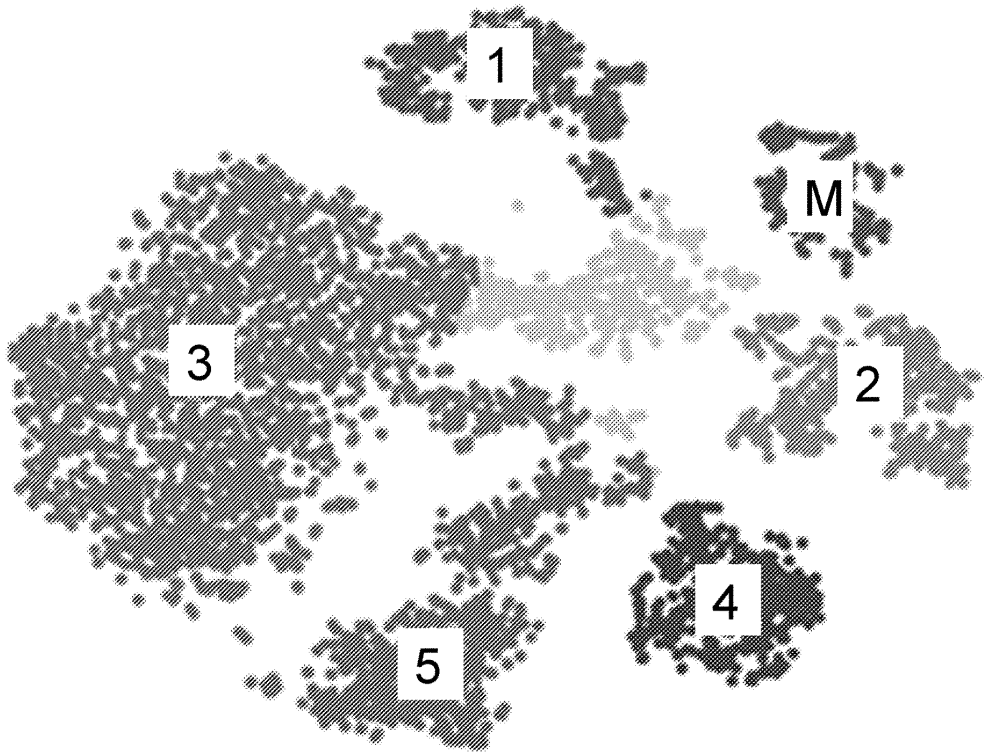
도면8ba


CD8A
CD4
HLA-DR
CD127/IL7R
CD3E
CD62L/SELL
CD279/PD1
CD45RA
CD274/PDL1

도면8bb



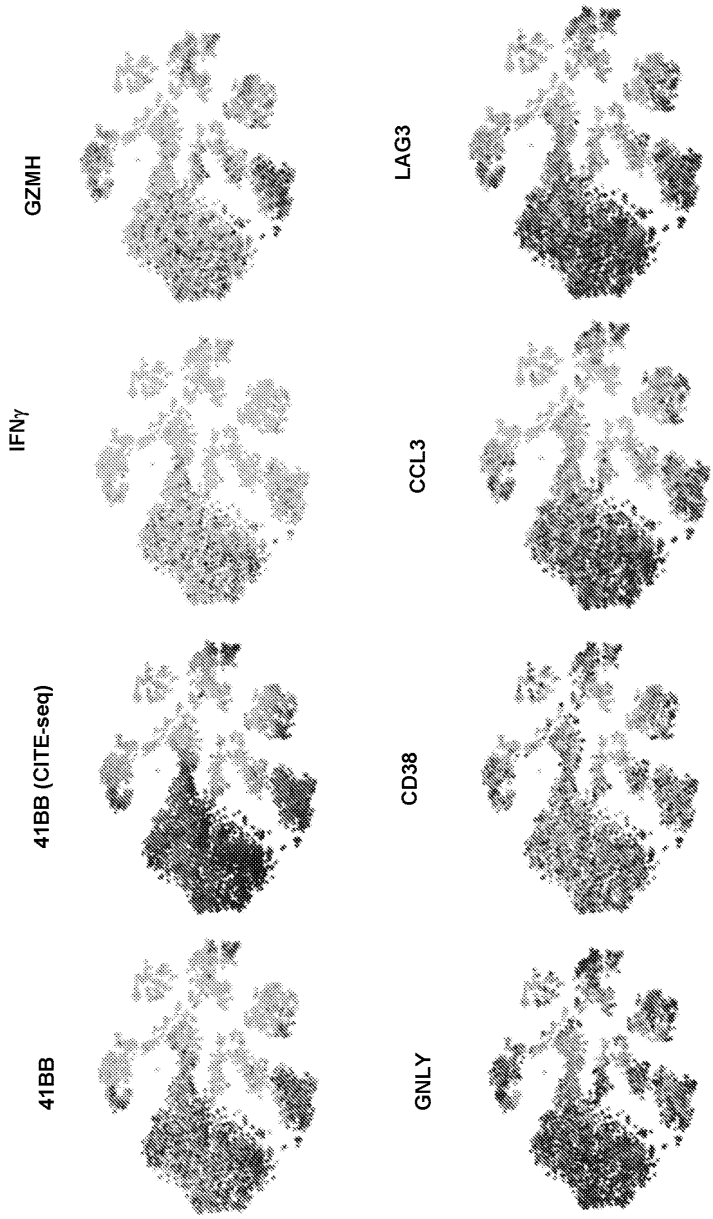
도면9a



도면9b



도면9c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Deering, Raquel

Dhanik, Ankur

Pourpe, Stephane

<120> HIGH-THROUGHPUT METHOD TO SCREEN COGNATE T CELL AND EPITOPE REACTIVITIES IN PRIMARY HUMAN CELLS

<130> 10669

<150> 62/910,379

<151> 2019-10-03

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Ala Gly Gly Gly Ser Gly Asn Thr Gly Lys Leu Ile Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Ala Ser Ser Val Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Ala Gly Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Ala Ser Ser Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Cys Val Val Trp Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Ala Ser Ser Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Ala Gly Gly Gly Ser Ser Asn Thr Gly Lys Leu Ile Phe

1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Cys Ala Ser Ser Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Cys Ala Met Arg Gly Ser Pro Gly Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Thr

1 5 10 15

Phe

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Cys Ala Ser Ser Glu Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Cys Ala Tyr Met Thr Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Ile

1 5 10 15

Phe

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Cys Ala Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Cys Ala Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe

1 5 10 15

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Cys Ala Ser Ser Val Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MP147 for short R1

<400> 17

Ala Cys Ala Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala

1 5 10 15

Cys Gly Ala Cys Gly Cys

20

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MP120 for human TRAC

<400> 18

Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Ala Cys Thr Thr Gly Thr Cys Ala

1 5 10 15

Cys Thr Gly Gly Ala

20

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MP121 for human TRBC

<400> 19

ctctgcttct gatggctcaa aca 23

<210> 20

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MP128 nested R2 plush human TRAC

<400> 20

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctgcaggg tcagggttct ggata 55

<210> 21

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

MP129 nested R2 plus human TRBC

<400> 21

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctgcaggg tcagggttct ggata 55