

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-536642

(P2015-536642A)

(43) 公表日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 74 頁)

(21) 出願番号 特願2015-534819 (P2015-534819)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月1日 (2013. 10. 1)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年5月21日 (2015. 5. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/062925
 (87) 国際公開番号 WO2014/055561
 (87) 国際公開日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)
 (31) 優先権主張番号 61/708, 534
 (32) 優先日 平成24年10月1日 (2012. 10. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514278577
 アダプティブ バイオテクノロジーズ コーポレーション
 アメリカ合衆国, ワシントン州 98102, シアトル, スイート 200, 155 1 イーストレイク アベニュー イースト
 (71) 出願人 500213834
 メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 適応免疫受容体多様性およびクローン性特性決定による免疫能力評価関連出願の相互参照

(57) 【要約】

対象からのリンパ系DNA含有試料中の、T細胞受容体(TCR)および/または免疫グロブリン(IG)ポリペプチドをコードする再配列されたDNA(および/またはその後転写されたRNA)配列を特定および定量することにより、対象の適応免疫系の免疫学的状態を決定するための方法が開示される。TCRおよび/またはIG配列多様性および配列分布は、免疫能力および免疫レパートリー評価を可能にし、試料中のT細胞またはB細胞クローン性およびクローン性増殖の程度を反映する。免疫治療に対する反応の可能性を含む免疫能力に基づいて患者集団を階層化するための方法もまた記載される。

【選択図】 図11A

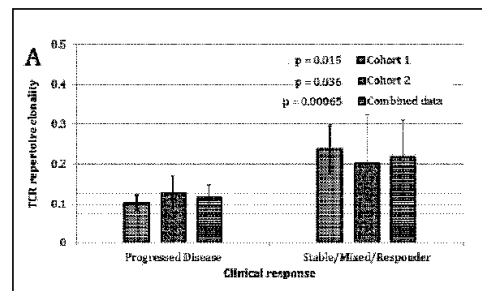


FIGURE 11A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試験対象の免疫学的状態を決定するための方法であって、

前記試験対象のリンパ系細胞からの核酸を含む 1 つ以上の試料から生成された核酸配列情報を得ることであって、前記核酸配列情報は、複数の一意の再配列された核酸配列に対する配列を含み、前記複数の一意の再配列された核酸配列のそれぞれは、A I R ポリペプチドをコードし、前記 1 つ以上の試料は、1 つ以上の時点で前記試験対象から得られる、核酸配列情報を得ることと、

前記 1 つ以上の試料に対して、前記核酸配列情報を使用することと、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数を決定することと、

前記試料中の一意の再配列された D N A 配列の総数を決定することと、

一意の再配列された D N A 配列の前記総数に基づいて、前記 1 つ以上の試料の A I R 配列多様性スコアを定量することと、

各一意の再配列された D N A 配列の発生頻度を、前記 1 つ以上の試料中の観察される再配列された配列の前記総数のパーセンテージとして計算することにより、前記 1 つ以上の試料の A I R 配列分布スコアを定量することと、

前記試験対象の前記 A I R 配列多様性スコアおよび前記 A I R 配列分布スコアに基づいて、前記試験対象の前記免疫学的状態を決定するための試験対象格付けスコアを決定することを含む方法。

10

【請求項 2】

前記 1 つ以上の試料の前記試験対象格付けスコアを、対照対象からの試料から得られた第 2 の組の対照対象格付けスコアと比較することと、

前記 1 つ以上の時点における前記試験対象の前記免疫学的状態を決定することとをさらに含み、前記試験対象格付けスコアと前記対照対象格付けスコアとの間の差が統計的に有意である場合、前記試験対象は、前記 1 つ以上の時点において前記対照対象の免疫学的状態と異なる免疫学的状態を有すると決定され、前記試験対象格付けスコアと前記対照対象格付けスコアとの間に統計的有意差がない場合、前記試験対象は、前記対照対象と同じ免疫学的状態を有すると決定される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記核酸は、ゲノム D N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記核酸は、c D N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸は、メッセンジャー R N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象の A I R 配列分布スコアを定量することが、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 50% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数を決定することと、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 50% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数が、所定の閾値以下である場合、A I R 配列分布スコアを低スコアとして特性決定することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記対象の A I R 配列分布スコアを定量することが、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 40% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数を決定することと、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 40% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数が、所定の閾値以下である場合、A I R 配列分布スコアを低スコアとして特性決定することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 8】

前記対象の A I R 配列分布スコアを定量することが、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 30% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数を決定することと、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 30% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数が、所定の閾値以下である場合、A I R 配列分布スコアを低スコアとして特性決定することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象の A I R 配列分布スコアを定量することが、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 20% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数を決定することと、

前記試料中の観察される再配列された配列の総数の 20% までの統合発生頻度を有する一意の再配列された A I R 配列の数が、所定の閾値以下である場合、A I R 配列分布スコアを低スコアとして特性決定することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 10】

A I R 配列分布スコアを定量することは、

前記試料中の残りの一意の再配列された配列のそれぞれの発生頻度と比較して、各時点において最高発生頻度を有する少なくとも 1 つの一意の再配列された配列を選択することと、

前記試験対象における、前記少なくとも 1 つの一意の再配列された配列の A I R 配列分布の経時的なプロファイルを決定することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 11】

一意の再配列された D N A 配列の総数の平均発生頻度よりも統計的に有意に高い各時点における発生頻度を有する、複数の最も豊富な一意の A I R 再配列された配列を選択することと、

前記試験対象における、前記最も豊富な一意の再配列された配列のそれぞれの A I R 配列分布の経時的なプロファイルを決定することとをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記 A I R 配列多様性スコアを定量することは、前記試料中の一意のクローンの総数を決定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記対照対象は、既知の免疫状態を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記対照対象は、健康な対象であり、欠陥のない免疫学的状態を有する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記対照対象は、欠陥のある免疫学的状態を有する、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記対照対象は、免疫治療に対する反応の既知の転帰を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

前記反応は、免疫治療に対する肯定的な反応である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記反応は、免疫治療に対する不良な反応である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記試験対象は、前記対照対象と比較して、免疫治療に対する反応の同じ転帰を有する

50

と予測される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記試験対象は、前記対照対象と比較して、免疫治療に対する反応の異なる転帰を有すると予測される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記対照対象は、幹細胞移植に対する反応の既知の転帰を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 22】

前記反応は、前記幹細胞移植に対する肯定的な反応である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記反応は、前記幹細胞移植に対する不良な反応である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記試験対象は、前記対照対象と比較して、前記幹細胞移植に対する反応の同じ転帰を有すると予測される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記試験対象は、前記対照対象と比較して、前記幹細胞移植に対する反応の異なる転帰を有すると予測される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

前記対照対象は、処置に対する反応の既知の転帰を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 27】

前記処置は、免疫治療抗体、サイトカイン、造血細胞移植、免疫抑制剤、またはワクチンを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 1 つ以上の試料は、前記試験対象から得られた固形組織試料を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 1 つ以上の試料は、前記試験対象から得られた血液試料を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 30】

低い A I R 配列多様性スコアおよび低い A I R 配列分布スコアは、低い試験対象格付けスコアとして特性決定され、前記試験対象における高い T C R クローン性を示す、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記低い試験対象格付けスコアは、前記試験対象における免疫治療に対する不良な反応を予測するものである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

高い A I R 配列多様性スコアおよび高い A I R 配列分布スコアは、高い試験対象格付けスコアとして特性決定され、低い T C R クローン性を示す、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記高い試験対象格付けスコアは、前記試験対象における免疫治療に対する肯定的な反応を予測するものである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記試験対象は、免疫治療で処置されている、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 35】

前記免疫治療は、免疫系の負の調節因子の阻害剤の投与を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記負の調節因子は、C T L A - 4 および P D - 1 からなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

前記負の調節因子は、C T L A - 4 である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記負の調節因子は、P D - 1 である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記阻害剤は、抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記阻害剤は、抗 P D - 1 抗体である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 1 つ以上の試料は、試験対象から得られた固形腫瘍試料を含む、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4 2】

高い A I R 配列多様性スコアおよび高い A I R 配列分布スコアは、低い試験対象格付けスコアとして特性決定され、前記試験対象における低い T C R クローン性を示す、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記低い試験対象格付けスコアは、免疫治療に対する不良な反応を予測するものである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

低い A I R 配列多様性スコアおよび低い A I R 配列分布スコアは、高い試験対象格付けスコアとして特性決定され、高い T C R クローン性を示す、請求項 4 1 に記載の方法。

20

【請求項 4 5】

前記高い試験対象格付けスコアは、前記対象における免疫治療に対する肯定的な反応を予測するものである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記試験対象は、免疫治療で処置されている、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記免疫治療は、免疫系の負の調節因子の阻害剤の投与を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記負の調節因子は、C T L A - 4 および P D - 1 からなる群から選択される、請求項 4 7 に記載の方法。

30

【請求項 4 9】

前記負の調節因子は、C T L A - 4 である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記負の調節因子は、P D - 1 である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記阻害剤は、抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記阻害剤は、抗 P D - 1 抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記免疫治療処置後に得られた試料における残りのクローンの組の平均発生頻度と統計的に有意に異なる発生頻度を有する少なくとも 1 つのクローンのクローン性増殖により示される、前記試験対象の免疫治療処置の副作用を決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 4】

前記残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位 5 0 % 以内にある発生頻度を有するクローンを含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位 4 0 % 以内にある発生頻度を有するクローンを含む、請求項 5 4 に記載の方法。

50

【請求項 5 6】

前記残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位 30% 以内にある発生頻度を有するクローンを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位 20% 以内にある発生頻度を有するクローンを含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位 10% 以内にある発生頻度を有するクローンを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記少なくとも 1 つのクローンは、それぞれ前記試料における発生頻度の上位 4 分の 1 以内にある発生頻度を有するクローンと統計的に有意に異なる発生頻度を有する、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記少なくとも 1 つのクローンの前記クローン性増殖は、前記免疫治療処置に対する前記試験対象の不良な反応を示す、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 1】

(1) 複数の A I R V 断片オリゴヌクレオチドプライマー、および (2) 複数の A I R J 断片オリゴヌクレオチドプライマーまたは複数の A I R C 断片オリゴヌクレオチドプライマーのいずれかを使用した、多重ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイにおいて、試験対象のリンパ系細胞を含む前記試料の少なくとも 1 つから得られた核酸配列を増幅することをさらに含む、請求項 1 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記複数の A I R V 断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物 A I R V 領域ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各 A I R V 断片オリゴヌクレオチドプライマーは、少なくとも 1 つの機能的 A I R コード遺伝子断片に相補的である、少なくとも 15 の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、前記複数の A I R V 断片オリゴヌクレオチドプライマーは、前記試料中に存在する実質的に全ての機能的 A I R V コード遺伝子断片に特異的にハイブリダイズし、

前記複数の J 断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物 A I R J 領域ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各 J 断片プライマーは、少なくとも 1 つの機能的 A I R

J コード遺伝子断片に相補的である、少なくとも 15 の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、前記複数の J 断片プライマーは、前記試料中に存在する実質的に全ての機能的 A I R J コード遺伝子断片に特異的にハイブリダイズし、

前記複数の C 断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物 A I R C 領域ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各 C 断片プライマーは、少なくとも 1 つの機能的 A I R

C コード遺伝子断片に相補的である、少なくとも 15 の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、前記複数の C 断片プライマーは、前記試料中に存在する実質的に全ての機能的 A I R C コードまたは遺伝子断片に特異的にハイブリダイズし、

(1) 前記複数の A I R V 断片オリゴヌクレオチドプライマー、ならびに (2) 前記複数の A I R J 断片オリゴヌクレオチドプライマーおよび前記複数の A I R C 断片オリゴヌクレオチドプライマーのいずれかは、前記試料中の適応免疫細胞の集団から複数の増幅された再配列 DNA 分子を生成するために、前記試料中の実質的に全ての再配列された A I R C D R 3 コード領域の前記多重 PCR における増幅を促進することができ、前記複数の増幅された再配列 DNA 分子は、前記少なくとも 1 つの試料における前記 A I R C D R 3 コード領域の完全な多様性を定量するのに十分である、請求項 6 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

各機能的 A I R Vコード遺伝子断片は、V遺伝子組み換えシグナル配列 (R S S) を含み、各機能的 A I R Jコード遺伝子断片は、J遺伝子 R S S を含み、各増幅された再配列 D N A 分子は、(i) 少なくとも 1 0、2 0、3 0 または 4 0 の連続ヌクレオチドの前記 A I R Vコード遺伝子断片のセンス鎖であって、前記少なくとも 1 0、2 0、3 0 または 4 0 の連続ヌクレオチドは、前記 V 遺伝子 R S S に対して 5 ' に位置する、センス鎖と、(i i) 少なくとも 1 0、2 0 または 3 0 の連続ヌクレオチドの前記 A I R Jコード遺伝子断片のセンス鎖であって、前記少なくとも 1 0、2 0 または 3 0 の連続ヌクレオチドは、前記 J 遺伝子 R S S に対して 3 ' に位置する、センス鎖とを含む、請求項 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 6 4】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、1 5 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、1 0 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、6 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、5 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 6 に記載の方法。

20

【請求項 6 8】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、4 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、3 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、2 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 6 9 に記載の方法。

30

【請求項 7 1】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、1 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記複数の増幅された再配列 D N A 分子における各増幅された再配列 D N A 分子は、5 0 ~ 6 0 0 ヌクレオチドの間の長さである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記試料中の他の一意の再配列された配列と比較して、統計的に有意により高い発生頻度を有する前記試料の 1 つにおける、一意の再配列された配列の組を選択することをさらに含む、請求項 1 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 4】

前記高い発生頻度は、所定の閾値パーセンテージにより決定される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記組における一意の再配列された配列の前記選択された数は、所定の数により決定される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記高頻度の一意の再配列された配列の 1 つが、持続的または一時的であるかどうかを、前記組から決定することをさらに含む、持続的な一意の再配列された配列は、その後の

50

期間にわたり前記試験対象から得られる2つ以上の試料にわたって存在し、一時的な一意の再配列された配列は、前記対象から1つの時点において得られる1つだけの試料中に存在する、請求項73に記載の方法。

【請求項77】

前記試験対象の前記2つ以上の試料中の1つ以上の持続的な一意の再配列された配列の存在に基づいて、前記対象に対する免疫治療の経過を決定することをさらに含み、持続的な一意の再配列された配列の前記存在は、前記対象が健康な免疫状態を有する増加した可能性を示す、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

前記対象における前記1つ以上の持続的な一意の再配列された配列の前記存在は、前記対象による免疫治療処置に対する肯定的な反応を予測するものである、請求項77に記載の方法。

10

【請求項79】

前記試験対象の前記1つ以上の試料における1つ以上の一時的な一意の再配列された配列の存在に基づいて、前記対象に対する免疫治療の経過を決定することをさらに含み、前記1つ以上の一時的な一意の再配列された配列の前記存在は、前記対象が欠陥のある免疫状態を有する増加した可能性を示す、請求項76に記載の方法。

【請求項80】

前記対象における前記1つ以上の持続的な一意の再配列された配列の前記存在は、前記対象による免疫治療処置に対する不良な反応を予測するものである、請求項79に記載の方法。

20

【請求項81】

前記1つ以上の試料において低い試験対象格付けスコアを有する試験対象を、より高い格付けスコアを有する第2の対象と比較して、免疫治療に対する反応のより低い相対的可能性を有するものとして分類することと、

免疫治療に対する反応の相対的可能性に従って、試験対象の患者集団を階層化することとをさらに含む、請求項1から80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項82】

前記試験対象格付けスコアを決定することは、数学モデルに基づいて、前記試料の1つからの前記核酸配列を配列決定することにより前記試験対象の全AIRレパートリー多様性を外挿することと、前記全AIRレパートリー多様性から試験対象格付けスコアを決定することとを含む、請求項1から81のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項83】

前記数学モデルは、未発見種モデルである、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

前記試験対象格付けスコアを決定することは、シャノンエントロピースコアおよびクローン性スコアを計算することと、前記シャノンエントロピースコアおよび前記クローン性スコアに基づいて、試験対象格付けスコアを決定することとを含む、請求項1から81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

前記クローン性スコアは、シャノンエントロピースコアの変換である、請求項84に記載の方法。

40

【請求項86】

前記適応免疫受容体(AIR)ポリペプチドは、哺乳動物AIRポリペプチドであり、T細胞受容体ガンマ(TCRG)ポリペプチド、T細胞受容体ベータ(TCRB)ポリペプチド、T細胞受容体アルファ(TCRA)ポリペプチド、T細胞受容体デルタ(TCRD)ポリペプチド、免疫グロブリン重鎖(IGH)ポリペプチド、および免疫グロブリン軽鎖(IGL)ポリペプチドから選択される、請求項1から81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

50

前記 I G H ポリペプチドは、I g M、I g A ポリペプチド、I g G ポリペプチド、I g D ポリペプチドおよび I g E ポリペプチドから選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記 I G L ポリペプチドは、I G L - ラムダポリペプチドおよび I G L - カッパポリペプチドから選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記哺乳動物 A I R ポリペプチドは、ヒト A I R ポリペプチドである、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記哺乳動物 A I R ポリペプチドは、非ヒト霊長類 A I R ポリペプチド、げっ歯類 A I R ポリペプチド、イヌ A I R ポリペプチド、ネコ A I R ポリペプチドおよび有蹄動物 A I R ポリペプチドから選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

10

【請求項 9 1】

前記試験対象は、悪性状態を有する、または有する疑いのある対象、造血細胞移植を受けた対象、固形臓器移植を受けた対象、および微生物感染を有する対象から選択される、請求項 1 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記悪性状態は、血液悪性腫瘍、黒色腫、肉腫およびがん腫から選択される、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記悪性状態は、悪性黒色腫、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、腎細胞がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がんおよび前立腺がんから選択される、請求項 9 1 に記載の方法。

20

【請求項 9 4】

前記造血細胞移植は、臍帯血移植、自家造血細胞移植、同種造血細胞移植、および骨髄移植から選択される、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記造血細胞移植は、自家 T 細胞移植を含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記複数の時点は、免疫治療中またはその後の時点を含む、請求項 1 から 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

前記複数の時点は、免疫治療の前の時点を含む、請求項 1 から 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記試験対象の前記免疫学的状態の決定に基づいて、免疫治療を受けている前記試験対象の処置を管理することをさらに含む、請求項 1 から 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記免疫治療は、免疫治療抗体、サイトカイン、造血細胞移植、免疫抑制剤、およびワクチンから選択される免疫治療薬剤による処置を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記免疫治療は、免疫反応の負の調節因子の阻害剤による処置を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 1】

免疫反応の前記負の調節因子は、C T L A 4 / C D 1 5 2、L A G 3 / C D 2 2 3、および P D - 1 / C D 2 7 9 から選択される、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

免疫反応の前記負の調節因子は、C T L A - 4 / C D 1 5 2 であり、免疫反応の前記負の調節因子の前記阻害剤は、抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記抗 C T L A - 4 抗体は、イピリムマブおよびトレメリムマブから選択される、請求

50

項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

免疫反応の前記負の調節因子は、PD - 1 / CD 2 7 9 であり、免疫反応の前記負の調節因子の前記阻害剤は、抗 PD - 1 抗体である、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記免疫治療は、免疫反応の増強物質を標的化する薬剤による処置を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

免疫反応の前記増強物質は、4 1 B B / CD 1 3 7、OX 4 0 / CD 1 3 4 および CD 4 0 から選択される、請求項 1 0 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 0 7】

前記免疫治療は、炎症経路の阻害剤による炎症状態または自己免疫疾患の処置を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記炎症状態または前記自己免疫疾患は、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、および若年性特発性関節炎から選択される、請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記炎症経路は、腫瘍壊死因子アルファ (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN)、インターロイキン - 1 (IL - 1)、インターロイキン - 6 (IL - 6)、インターロイキン - 8 (IL - 8) の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 0 7 に記載の方法。

20

【請求項 1 1 0】

前記炎症経路は、TNF を含み、前記炎症経路の前記阻害剤は、TNF に特異的に結合する薬剤である、請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

TNF に特異的に結合する前記薬剤は、抗 TNF 抗体および人工可溶性 TNF 受容体から選択される、請求項 1 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記抗 TNF 抗体は、アダリムマブおよびインフリキシマブから選択され、前記人工可溶性 TNF 受容体は、エタネルセプトである、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

試験対象の免疫学的状態を決定するためのコンピュータ実装方法であって、
様々な時点において複数の試料から得られた対照対象のデータを保存することであって、前記データは、各試料に対して、前記試料中の複数の一意の再配列された核酸配列の核酸配列情報、前記試料の AIR 配列多様性スコア、前記試料中の各一意の再配列された核酸配列の発生頻度、および前記対象の決定された免疫学的状態を含む、保存することと、

30

プロセッサにより、前記対照対象の前記データに基づいて、試験対象の免疫学的状態を評価するための規則を決定することと、

免疫治療前および免疫治療後の様々な時点において得られた複数の試料に関する試験対象のデータを入力することであって、前記データは、各試料に対して、前記試料中の複数の一意の再配列された核酸配列の核酸配列情報、前記試料の AIR 配列多様性スコア、および前記試料中の各一意の再配列された核酸配列の発生頻度を含む、入力することと、

40

前記試験対象の免疫学的状態の決定を受信することを含む方法。

【請求項 1 1 4】

前記試験対象の免疫治療に対する予測される反応を決定することをさらに含む、請求項 [0 0 1 8 6] に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記対照対象の前記データは、免疫治療処置前の時点において前記対照対象から得られた核酸配列情報を含む、請求項 1 1 3 に記載の方法。

50

【請求項 116】

前記対照対象の前記データは、免疫治療処置後の時点において前記対照対象から得られた核酸配列情報を含む、請求項 113 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、参照によりその全開示が全ての目的において本明細書に組み込まれる、2012年10月1日出願された米国仮出願第61/708,534号の利益を主張する。政府権益に関する記述

【0002】

本発明は、国立衛生研究所の国立心臓、血液および肺研究所 (National Heart, Blood and Lung Institute) により与えられた助成金番号 RHL106868A のもと、政府の援助を受けて行われた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

本開示は、概して、特定の再配列された T 細胞受容体 (TCR) または免疫グロブリン (IG もしくは Ig) コード遺伝子配列を有する適応免疫細胞の多様性および発生頻度 (例えば、クローン性増殖) の極めて高感度のハイスループット DNA 配列ベース定量による、患者の適応免疫系の免疫能力の評価に関する。患者または患者集団の免疫学的状態に関する情報を使用して、例えば、個人を特性決定する、または、免疫反応を組み込む能力もしくは免疫治療に反応する可能性もしくは前記治療に対する反応における免疫媒介副作用を発生する可能性に関して、患者集団を階層化する、または別様に、臨床的免疫治療管理の経過の情報を与える。

関連技術の説明

【0004】

適応免疫系は、リンパ系の造血細胞により発現され、また宿主における非自己分子から自己分子を区別することができる抗原特異的認識タンパク質である、適応免疫受容体を使用して、外来物質に起因し得る感染および他の病理学的イベントから高等動物を保護する。これらのリンパ球は、宿主の循環および組織中に見出すことができ、リンパ節高内皮細胞静脈からの、ならびに感染、炎症、組織損傷および他の臨床的傷害部位における溢出を含む、血液とリンパ管との間の再循環が説明されている。(例えば、Stein et al., 2005 Immunol. 116:1-12、DeNucci et al., 2009 Crit. Rev. Immunol. 29:87-109、Marelli-Berg et al., 2010 Immunol. 130:158、Ward et al., 2009 Biochem. J. 418:13、Gonzalez et al., 2011 Ann. Rev. Immunol. 29:215、Kehrl et al., 2009 Curr. Top. Microb. Immunol. 334:107、Steinmetz et al., 2009 Front. Biosci. (Schol. Ed.) 1:13 を参照されたい。)

【0005】

したがって、宿主生物全体にわたるリンパ球による移動の動的性質は、宿主免疫状態の変化の関数としての、組織の間のリンパ球の質的な (例えば、クローン発現適応免疫受容体 (免疫グロブリンまたは T 細胞受容体)、T 細胞対 B 細胞、T ヘルパー (T_h) 細胞対 T 調節 (T_{reg}) 細胞、エフェクター T 細胞対記憶 T 細胞の抗原特異性等)、および量的な分布の変化に反映される。

【0006】

適応免疫系は、多くの潜在的病原体を認識するための十分な多様性を有する T 細胞および B 細胞抗原受容体のレパートリーを生成するために、いくつかの戦略を使用する。B リンパ球は、成熟して、重 (H) 鎖および軽 (L) 鎖ポリペプチドのヘテロ二量体として生

10

20

30

40

50

じる抗体（免疫グロブリン、I g）を発現し、一方Tリンパ球は、ヘテロ二量体T細胞受容体（TCR）を発現する。様々ながんまたは感染性微生物に関連した多くの抗原を認識するT細胞の能力は、（アルファ）鎖および（ベータ）鎖、または（ガンマ）および（デルタ）鎖を含むヘテロ二量体である、そのT細胞抗原受容体（TCR）により付与される。これらの鎖を構成するタンパク質は、TCRの驚異的な多様性を生成するための独特の機構を使用するDNAによりコードされる。このマルチサブユニット免疫認識受容体は、CD3複合体に関連し、抗原提示細胞（APC）の表面上の主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）クラスIおよびIIタンパク質により提示されるペプチドに結合する。APC上の抗原ペプチドへのTCRの結合は、T細胞とAPCとの間の接触点での免疫学的シナプスにおいて生じるT細胞活性化の中心的イベントである。

10

【0007】

各TCRペプチドは、可変相補性決定領域（CDR）、ならびにフレームワーク領域（FR）および定常領域を含有する。T細胞の配列多様性は、概して、および鎖可変ドメインの第3の相補性決定領域（CDR3）ループのアミノ酸配列により決定され、この多様性は、それぞれ、鎖遺伝子座における可変（V）、多様性（D）、および連結（J）遺伝子断片の間、ならびに鎖遺伝子座における類似VおよびJ遺伝子断片の間の組み換えの結果である。TCRおよび鎖遺伝子座における複数のそのような遺伝子断片の存在は、多数の異なるCDR3配列がコードされるのを可能にする。CDR3配列多様性はTCR遺伝子再配列のプロセス中の、V-D、D-J、およびV-J連結点におけるヌクレオチドの欠失およびテンプレート依存的付加により、さら

20

【0008】

TCRは、自然免疫系と密接に相互作用する受容体をコードするという点で、TCRから区別される。TCRは、発達の早期に発現され、特殊な解剖学的分布を有し、独特の病原体および小分子特異性を有し、また広範な自然および適応細胞間相互作用を有する。TCR細胞の制限されたサブセットは、出生前に口、皮膚、消化管、膈、および肺に存在するため、TCRVおよびJ断片発現の偏ったパターンは、個体発生の早期に確立される。したがって、成人組織における多様なTCRレパートリーは、病原体および毒性分子に対する環境暴露による刺激後の、広範な周皮的増殖の結果である。

30

【0009】

B細胞により発現されるI gは、H₂L₂構造を形成する2つの重鎖（H鎖）および2つの軽鎖（L鎖）の4つのポリペプチド鎖からなるタンパク質である。HおよびL鎖の各対は、V_LおよびV_H領域からなる超可変ドメイン、ならびに定常ドメインを含有する。I gのH鎖は、μ、δ、ε、およびγのいくつかの種類がある。個体内のI gの多様性は、主に、超可変ドメインにより決定される。TCRと同様に、H鎖のVドメインは、V_H、D_H、およびJ_H遺伝子断片の組み合わせ連結により形成される。超可変ドメイン配列多様性は、I g遺伝子再配列のプロセス中の、V_H-D_H、D_H-J_H、およびV_H-J_H連結点におけるヌクレオチドの欠失およびテンプレート依存的付加により、さらに増加される。この点で、免疫能力は、I gの多様性に反映される。

40

【0010】

そのような細胞における、適応免疫受容体の生産的発現を誘導する機能的再配列I gおよびTCRコード化遺伝子の存在に基づく、適応免疫細胞の定量的特性決定は、血液、リンパ液または他の生体液等の、適応免疫細胞が多数容易に単離され得る生体試料を使用して達成されている。これらの試料において、適応免疫細胞は、懸濁流体中の粒子として生じる。例えば、米国特許第2010/0330571号を参照されたく、また、例えば、Murphy, Janeways Immunobiology (8th Ed.), 2011 Garland Science, NY, Appendix I, pp. 717-762も参照されたい。

【0011】

適応免疫系は、がん細胞の認識、および腫瘍を排除するための免疫反応の生成の確保に

50

において役割を担うことが示唆されている(例えば、Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.), 2011 Garland Science, NY, pp. 682-697、Pandolfi et al., 2011 Clin. Dev. Immunol. Article ID894704、Draghiciu et al., 2011 Clin. Dev. Immunol. Article ID439053を参照されたい)。異なるがん細胞により提示される抗原プロファイル間の変動性、および異なる個体の抗腫瘍免疫反応の確実性における変動性は、一般にがん免疫治療と呼ばれる多くの広く異なる臨床的アプローチをもたらす、これによって、この文脈において、抗腫瘍免疫を促進することにより、適応免疫反応を誘発、動員、向上または別様に強化するための取り組みがなされている。

10

【0012】

そのような免疫治療アプローチは、非がん細胞特異的となり得、また放射線および化学治療等の強い細胞障害性の投与計画を伴い得る従来のがん治療の好ましい代替法である。がん免疫治療は、時折、化学治療および/または放射線治療を受けている患者にも施されるが、化学治療および放射線は分裂細胞に対して特に細胞傷害性であり、一方免疫細胞増殖は多くの免疫反応の基本的特徴となり得るため、そのようなアプローチは、適応免疫系に非生産的に影響し得、したがって、効果的な治療計画に達する上で困難を伴い得る。

【0013】

したがって、がんに関連して、および、例えば、微生物感染の処置における、造血細胞移植または固形臓器移植の場合において、効果的な免疫治療計画を設計するために(例えば、移植片の免疫拒絶を検出および適切に処置するために)、ならびに、ワクチンに対する反応を最適化するために、患者の免疫学的状態の詳細な理解を有することが望ましい。ここで説明される実施形態は、これらの必要性に対応し、他の関連した利点を提供する。

20

【発明の概要】

【0014】

本発明のある特定の実施形態によれば、試験対象の免疫学的状態を決定するための方法であって、前記試験対象のリンパ系細胞からの核酸を含む1つ以上の試料から生成された核酸配列情報を得ることであって、前記核酸配列情報は、複数の一意の再配列された核酸配列に対する配列を含み、前記複数の一意の再配列された核酸配列のそれぞれは、AIRポリペプチドをコードし、前記1つ以上の試料は、1つ以上の時点で前記試験対象から得られる、核酸配列情報を得ることと、前記1つ以上の試料に対して、前記核酸配列情報を使用することと、前記試料中の観察される再配列された配列の総数を決定することと、前記試料中の一意の再配列されたDNA配列の総数を決定することと、一意の再配列されたDNA配列の前記総数に基づいて、前記1つ以上の試料のAIR配列多様性スコアを定量することと、各一意の再配列されたDNA配列の発生頻度を、前記1つ以上の試料中の観察される再配列された配列の前記総数のパーセンテージとして計算することにより、前記1つ以上の試料のAIR配列分布スコアを定量することと、前記試験対象の前記AIR配列多様性スコアおよび前記AIR配列分布スコアに基づいて、前記試験対象の前記免疫学的状態を決定するための試験対象格付けスコアを決定することを含む方法が提供される。

30

40

【0015】

いくつかの実施形態において、方法は、前記1つ以上の試料の前記試験対象格付けスコアを、対照対象からの試料から得られた第2の組の対照対象格付けスコアと比較することと、前記1つ以上の時点における前記試験対象の前記免疫学的状態を決定することとをさらに含み、前記試験対象格付けスコアと前記対照対象格付けスコアとの間の差が統計的に有意である場合、前記試験対象は、前記1つ以上の時点において前記対照対象の免疫学的状態と異なる免疫学的状態を有すると決定され、前記試験対象格付けスコアと前記対照対象格付けスコアとの間に統計的有意差がない場合、前記試験対象は、前記対照対象と同じ免疫学的状態を有すると決定される。

【0016】

50

ある特定の実施形態において、核酸は、ゲノムDNAを含む。他の実施形態において、核酸は、cDNAを含む。いくつかの実施形態において、核酸は、メッセンジャーRNAを含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、本発明の方法はまた、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の50%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数を決定することと、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の50%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数が、所定の閾値以下である場合、AIR配列分布スコアを低スコアとして特性決定することとを含む、前記対象のAIR配列分布スコアを定量するためのステップを含む。

10

【0018】

一実施形態において、方法は、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の40%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数を決定することと、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の40%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数が、所定の閾値以下である場合、AIR配列分布スコアを低スコアとして特性決定することとを含む、前記対象のAIR配列分布スコアを定量することを含む。

【0019】

別の実施形態において、方法は、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の30%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数を決定することと、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の30%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数が、所定の閾値以下である場合、AIR配列分布スコアを低スコアとして特性決定することとを含む、前記対象のAIR配列分布スコアを定量することを含む。

20

【0020】

さらに別の実施形態において、方法は、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の20%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数を決定することと、前記試料中の観察される再配列された配列の総数の20%までの統合発生頻度を有する一意の再配列されたAIR配列の数が、所定の閾値以下である場合、AIR配列分布スコアを低スコアとして特性決定することとを含む、前記対象のAIR配列分布スコアを定量することを含む。

30

【0021】

他の実施形態において、方法は、前記試料中の残りの一意の再配列された配列のそれぞれの発生頻度と比較して、各時点において最高発生頻度を有する少なくとも1つの一意の再配列された配列を選択することと、前記試験対象における、前記少なくとも1つの一意の再配列された配列のAIR配列分布の経時的なプロファイルを決することとを含む、AIR配列分布スコアを定量することを含む。

【0022】

別の実施形態において、方法は、一意の再配列されたDNA配列の総数の平均発生頻度よりも統計的に有意に高い各時点における発生頻度を有する、複数の最も豊富な一意のAIR再配列された配列を選択することと、前記試験対象における、前記最も豊富な一意の再配列された配列のそれぞれのAIR配列分布の経時的なプロファイルを決することとを含む。

40

【0023】

さらに別の実施形態において、方法は、前記試料中の一意のクローンの総数を決定することを含む、前記AIR配列多様性スコアを定量することを含む。

【0024】

ある特定の実施形態において、対照対象は、既知の免疫学的状態を有する。一実施形態において、対照対象は、健康な対象であり、欠陥のない免疫学的状態を有する。別の実施形態において、対照対象は、欠陥のある免疫学的状態を有する。

50

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、対照対象は、免疫治療に対する反応の既知の転帰を有する。一実施形態において、反応は、免疫治療に対する肯定的な反応である。一実施形態において、反応は、免疫治療に対する不良な反応である。

【 0 0 2 6 】

別の実施形態において、試験対象は、対照対象と比較して、免疫治療に対する反応の同じ転帰を有すると予測される。さらに別の実施形態において、試験対象は、対照対象と比較して、免疫治療に対する反応の異なる転帰を有すると予測される。

【 0 0 2 7 】

ある特定の実施形態において、対照対象は、幹細胞移植に対する反応の既知の転帰を有する。一実施形態において、反応は、幹細胞移植に対する肯定的な反応であってもよい。別の実施形態において、反応は、幹細胞移植に対する不良な反応である。さらに別の実施形態において、試験対象は、対照対象と比較して、幹細胞移植に対する反応の同じ転帰を有すると予測される。他の実施形態において、試験対象は、対照対象と比較して、幹細胞移植に対する反応の異なる転帰を有すると予測される。

10

【 0 0 2 8 】

ある特定の態様において、対照対象は、処置に対する反応の既知の転帰を有する。いくつかの態様において、処置は、免疫治療抗体、サイトカイン、造血細胞移植、免疫抑制剤、またはワクチンを含む。

【 0 0 2 9 】

他の態様において、1つ以上の試料は、試験対象から得られた固形組織試料を含む。

20

【 0 0 3 0 】

一態様において、1つ以上の試料は、試験対象から得られた血液試料を含む。ある特定の実施形態において、1つ以上の試料が血液試料を含む場合、低いA I R配列多様性スコアおよび低いA I R配列分布スコアは、低い試験対象格付けスコアとして特性決定され、前記試験対象における高いT C Rクローン性を示す。他の実施形態において、低い試験対象格付けスコアは、前記試験対象における免疫治療に対する不良な反応を予測するものである。別の実施形態において、高いA I R配列多様性スコアおよび高いA I R配列分布スコアは、高い試験対象格付けスコアとして特性決定され、低いT C Rクローン性を示す。他の実施形態において、高い試験対象格付けスコアは、前記試験対象における免疫治療に対する肯定的な反応を予測するものである。

30

【 0 0 3 1 】

他の実施形態において、試験対象は、免疫治療で処置されている。いくつかの実施形態において、免疫治療は、免疫系の負の調節因子の阻害剤の投与を含む。一実施形態において、負の調節因子は、C T L A - 4およびP D - 1からなる群から選択される。別の実施形態において、負の調節因子は、C T L A - 4である。さらに別の実施形態において、負の調節因子は、P D - 1である。ある特定の態様において、阻害剤は、抗C T L A - 4抗体である。別の態様において、阻害剤は、抗P D - 1抗体である。

【 0 0 3 2 】

さらに他の態様において、1つ以上の試料は、試験対象から得られた固形腫瘍試料を含む。いくつかの実施形態において、固形腫瘍試料中、高いA I R配列多様性スコアおよび高いA I R配列分布スコアは、低い試験対象格付けスコアとして特性決定され、前記試験対象における低いT C Rクローン性を示す。

40

【 0 0 3 3 】

一実施形態において、固形腫瘍試料中、低い試験対象格付けスコアは、免疫治療に対する不良な反応を予測するものである。別の実施形態において、低いA I R配列多様性スコアおよび低いA I R配列分布スコアは、高い試験対象格付けスコアとして特性決定され、高いT C Rクローン性を示す。一実施形態において、高い試験対象格付けスコアは、前記対象における免疫治療に対する肯定的な反応を予測するものである。

【 0 0 3 4 】

50

別の実施形態において、試験対象は、免疫治療で処置されている。一実施形態において、免疫治療は、免疫系の負の調節因子の阻害剤の投与を含む。いくつかの態様において、負の調節因子は、CTLA-4およびPD-1からなる群から選択される。一実施形態において、負の調節因子は、CTLA-4であってもよい。別の実施形態において、負の調節因子は、PD-1であってもよい。他の実施形態において、阻害剤は、抗CTLA-4抗体である。さらに他の実施形態において、阻害剤は、抗PD-1抗体である。

【0035】

方法はまた、前記免疫治療処置後に得られた試料における残りのクローンの組の平均発生頻度と統計的に有意に異なる発生頻度を有する少なくとも1つのクローンのクローン性増殖により示される、前記試験対象の免疫治療処置の副作用を決定することを含む。一実施形態において、残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位50%以内にある発生頻度を有するクローンを含む。別の実施形態において、残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位40%以内にある発生頻度を有するクローンを含む。さらに別の実施形態において、残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位30%以内にある発生頻度を有するクローンを含む。他の実施形態において、残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位20%以内にある発生頻度を有するクローンを含む。一実施形態において、残りのクローンの組は、それぞれ前記試料中の全クローンの上位10%以内にある発生頻度を有するクローンを含む。一態様において、少なくとも1つのクローンは、それぞれ前記試料における発生頻度の上位4分の1以内にある発生頻度を有するクローンと統計的に有意に異なる発生頻度を有する。他の態様において、前記少なくとも1つのクローンのクローン性増殖は、前記免疫治療処置に対する前記試験対象の不良な反応を示す。

10

20

【0036】

ある特定の態様において、方法はまた、(1)複数のAIR V断片オリゴヌクレオチドプライマー、および(2)複数のAIR J断片オリゴヌクレオチドプライマーまたは複数のAIR C断片オリゴヌクレオチドプライマーのいずれかを使用した、多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイにおいて、試験対象のリンパ系細胞を含む前記試料の少なくとも1つから得られた核酸配列を増幅することを含む。

【0037】

いくつかの実施形態において、複数のAIR V断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物AIR V領域ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各AIR V断片オリゴヌクレオチドプライマーは、少なくとも1つの機能的AIRコード遺伝子断片に相補的である、少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、前記複数のAIR V断片オリゴヌクレオチドプライマーは、前記試料中に存在する実質的に全ての機能的AIR Vコード遺伝子断片に特異的にハイブリダイズする。一実施形態において、複数のJ断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物AIR J領域ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各J断片プライマーは、少なくとも1つの機能的AIR Jコード遺伝子断片に相補的である、少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、前記複数のJ断片プライマーは、前記試料中に存在する実質的に全ての機能的AIR Jコード遺伝子断片に特異的にハイブリダイズする。別の実施形態において、複数のC断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物AIR C領域ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各C断片プライマーは、少なくとも1つの機能的AIR Cコード遺伝子断片に相補的である、少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、前記複数のC断片プライマーは、前記試料中に存在する実質的に全ての機能的AIR Cコードまたは遺伝子断片に特異的にハイブリダイズする。

30

40

【0038】

ある特定の態様において、複数のAIR V断片オリゴヌクレオチドプライマー、なら

50

びに(2)前記複数のAIR J断片オリゴヌクレオチドプライマーおよび前記複数のAIR C断片オリゴヌクレオチドプライマーのいずれかは、前記試料中の適応免疫細胞の集団から複数の増幅された再配列DNA分子を生成するために、前記試料中の実質的に全ての再配列されたAIR CDR3コード領域の前記多重PCRにおける増幅を促進することができ、前記複数の増幅された再配列DNA分子は、前記少なくとも1つの試料における前記AIR CDR3コード領域の完全な多様性を定量するのに十分である。

【0039】

いくつかの実施形態において、各機能的AIR Vコード遺伝子断片は、V遺伝子組み換えシグナル配列(RSS)を含み、各機能的AIR Jコード遺伝子断片は、J遺伝子RSSを含み、各増幅された再配列DNA分子は、(i)少なくとも10、20、30または40の連続ヌクレオチドの前記AIR Vコード遺伝子断片のセンス鎖であって、前記少なくとも10、20、30または40の連続ヌクレオチドは、前記V遺伝子RSSに対して5'に位置する、センス鎖と、(ii)少なくとも10、20または30の連続ヌクレオチドの前記AIR Jコード遺伝子断片のセンス鎖であって、前記少なくとも10、20または30の連続ヌクレオチドは、前記J遺伝子RSSに対して3'に位置する、センス鎖とを含む。一実施形態において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、1500ヌクレオチド未満の長さである。別の実施形態において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、1000ヌクレオチド未満の長さである。さらに別の実施形態において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、600ヌクレオチド未満の長さである。他の実施形態において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、500ヌクレオチド未満の長さである。一態様において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、400ヌクレオチド未満の長さである。別の態様において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、300ヌクレオチド未満の長さである。さらに別の態様において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、200ヌクレオチド未満の長さである。いくつかの実施形態において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、100ヌクレオチド未満の長さである。好ましい実施形態において、前記複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子は、500~600ヌクレオチドの間の長さである。

【0040】

いくつかの態様において、方法は、前記試料中の他の一意の再配列された配列と比較して、統計的に有意により高い発生頻度を有する前記試料の1つにおける、一意の再配列された配列の組を選択することを含む。ある特定の態様において、高い発生頻度は、所定の閾値パーセンテージにより決定される。一態様において、前記組における一意の再配列された配列の選択された数は、所定の数により決定される。他の実施形態において、方法は、前記高頻度の一意の再配列された配列の1つが、持続的または一時的であるかどうかを、前記組から決定することを含み、持続的な一意の再配列された配列は、その後の期間にわたり前記試験対象から得られる2つ以上の試料にわたって存在し、一時的な一意の再配列された配列は、前記対象から1つの時点において得られる1つだけの試料中に存在する。

【0041】

方法はまた、前記試験対象の前記2つ以上の試料中の1つ以上の持続的な一意の再配列された配列の存在に基づいて、前記対象に対する免疫治療の経過を決定することを含み、持続的な一意の再配列された配列の前記存在は、前記対象が健康な免疫状態を有する増加した可能性を示す。いくつかの実施形態において、前記対象における前記1つ以上の持続的な一意の再配列された配列の存在は、前記対象による免疫治療処置に対する肯定的な反応を予測するものである。本発明の方法は、前記試験対象の前記1つ以上の試料における1つ以上の一時的な一意の再配列された配列の存在に基づいて、前記対象に対する免疫治

10

20

30

40

50

療の経過を決定することを含み、前記1つ以上の一時的な一意の再配列された配列の前記存在は、前記対象が欠陥のある免疫状態を有する増加した可能性を示す。別の実施形態において、前記対象における前記1つ以上の持続的な一意の再配列された配列の存在は、前記対象による免疫治療処置に対する不良な反応を予測するものである。

【0042】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、前記1つ以上の試料において低い試験対象格付けスコアを有する試験対象を、より高い格付けスコアを有する第2の対象と比較して、免疫治療に対する反応のより低い相対的可能性を有するものとして分類するステップと、免疫治療に対する反応の相対的可能性に従って、試験対象の患者集団を階層化するステップとを提供する。方法は、数学モデルに基づいて、前記試料の1つからの前記核酸配列を配列決定することにより前記試験対象の全AIRレパートリー多様性を外挿することと、前記全AIRレパートリー多様性から試験対象格付けスコアを決定することとを含む。前記試験対象格付けスコアを決定することを含む。一実施形態において、数学モデルは、未発見種モデルである。

10

【0043】

別の実施形態において、前記試験対象格付けスコアを決定することは、シャノンエントロピースコアおよびクローン性スコアを計算することと、前記シャノンエントロピースコアおよび前記クローン性スコアに基づいて、試験対象格付けスコアを決定することを含む。一実施形態において、クローン性スコアは、シャノンエントロピースコアの変換である。

20

【0044】

本発明の他の態様において、適応免疫受容体(AIR)ポリペプチドは、哺乳動物AIRポリペプチドであり、T細胞受容体ガンマ(TCRG)ポリペプチド、T細胞受容体ベータ(TCRB)ポリペプチド、T細胞受容体アルファ(TCRA)ポリペプチド、T細胞受容体デルタ(TCRD)ポリペプチド、免疫グロブリン重鎖(IGH)ポリペプチド、および免疫グロブリン軽鎖(IGL)ポリペプチドから選択される。いくつかの実施形態において、IGHポリペプチドは、IgM、IgAポリペプチド、IgGポリペプチド、IgDポリペプチドおよびIgEポリペプチドから選択される。IGLポリペプチドは、IGL-ラムダポリペプチドおよびIGL-カッパポリペプチドから選択され得る。一実施形態において、哺乳動物AIRポリペプチドは、ヒトAIRポリペプチドである。別の実施形態において、哺乳動物AIRポリペプチドは、非ヒト霊長類AIRポリペプチド、げっ歯類AIRポリペプチド、イヌAIRポリペプチド、ネコAIRポリペプチドおよび有蹄動物AIRポリペプチドから選択される。

30

【0045】

ある特定の実施形態において、試験対象は、悪性状態を有する、または有する疑いのある対象、造血細胞移植を受けた対象、固形臓器移植を受けた対象、および微生物感染を有する対象から選択される。いくつかの実施形態において、悪性状態は、血液悪性腫瘍、黒色腫、肉腫およびがん腫から選択される。悪性状態は、悪性黒色腫、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、腎細胞がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がんおよび前立腺がんから選択される。

40

【0046】

他の実施形態において、造血細胞移植は、臍帯血移植、自家造血細胞移植、同種造血細胞移植、および骨髄移植から選択される。一実施形態において、造血細胞移植は、自家T細胞移植を含む。

【0047】

他の態様において、複数の時点は、免疫治療中またはその後の時点を含む。別の態様において、複数の時点は、免疫治療の前の時点を含む。

【0048】

他の実施形態において、方法は、前記試験対象の前記免疫学的状態の決定に基づいて、免疫治療を受けている前記試験対象の処置を管理するステップを含む。一実施形態におい

50

て、免疫治療は、免疫治療抗体、サイトカイン、造血細胞移植、免疫抑制剤、およびワクチンから選択される免疫治療薬剤による処置を含む。

【0049】

別の実施形態において、免疫治療は、免疫反応の負の調節因子の阻害剤による処置を含む。いくつかの態様において、免疫反応の負の調節因子は、CTLA4 / CD152、LAG3 / CD223、およびPD-1 / CD279から選択される。一実施形態において、負の調節因子は、CTLA-4 / CD152であってもよく、免疫反応の前記負の調節因子の前記阻害剤は、抗CTLA-4抗体であってもよい。別の実施形態において、抗CTLA-4抗体は、イピリムマブおよびトレメリムマブから選択される。いくつかの実施形態において、免疫反応の負の調節因子は、PD-1 / CD279であり、免疫反応の負の調節因子の前記阻害剤は、抗PD-1抗体である。別の実施形態において、免疫治療は、免疫反応の増強物質を標的化する薬剤による処置を含む。さらに別の実施形態において、免疫反応の増強物質は、41BB / CD137、OX40 / CD134およびCD40から選択される。

10

【0050】

他の実施形態において、免疫治療は、炎症経路の阻害剤による炎症状態または自己免疫疾患の処置を含む。ある特定の実施形態において、炎症状態または前記自己免疫疾患は、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、および若年性特発性関節炎から選択される。一実施形態において、炎症経路は、腫瘍壊死因子アルファ(TNF)、インターフェロンガンマ(IFN)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-8(IL-8)の少なくとも1つを含む。他の実施形態において、炎症経路は、TNFを含み、炎症経路の前記阻害剤は、TNFに特異的に結合する薬剤である。別の実施形態において、TNFに特異的に結合する薬剤は、抗TNF抗体および人工可溶性TNF受容体から選択される。一実施形態において、抗TNF抗体は、アダリムマブおよびインフリキシマブから選択され、前記人工可溶性TNF受容体は、エタネルセプトである。

20

【0051】

他の実施形態において、試験対象の免疫学的状態を決定するためのコンピュータ実装方法であって、様々な時点において複数の試料から得られた対照対象のデータを保存することであって、前記データは、各試料に対して、前記試料中の複数の一意の再配列された核酸配列の核酸配列情報、前記試料のAIR配列多様性スコア、前記試料中の各一意の再配列された核酸配列の発生頻度、および前記対象の決定された免疫学的状態を含む、保存することと、プロセッサにより、前記対照対象の前記データに基づいて、試験対象の免疫学的状態を評価するための規則を決定することと、免疫治療前および免疫治療後の様々な時点において得られた複数の試料に関する試験対象のデータを入力することであって、前記データは、各試料に対して、前記試料中の複数の一意の再配列された核酸配列の核酸配列情報、前記試料のAIR配列多様性スコア、および前記試料中の各一意の再配列された核酸配列の発生頻度を含む、入力することと、前記試験対象の免疫学的状態の決定を受信することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、前記試験対象の免疫治療に対する予測される反応を決定することを含む。一実施形態において、前記対照対象のデータは、免疫治療処置前の時点において前記対照対象から得られた核酸配列情報を含む。別の実施形態において、前記対照対象のデータは、免疫治療処置後の時点において前記対照対象から得られた核酸配列情報を含む。

30

40

【0052】

本明細書に記載の本発明の実施形態のこれらの態様および他の態様は、以下の発明を実施するための形態および添付の図面を参照すれば明らかとなる。本明細書において参照される、および/または出願データシートにおいて列挙される、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許文献は全て、参照することにより、それぞれが個々に組み込まれるのと同様に、それらの全体が本明細書に組み込まれる。本発明の態様および実施形態は、様々な特許、出願および出版物の概念を使用してさら

50

なる実施形態を提供するために、必要に応じて修正され得る。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】骨髄破壊的処置後の経時的に残ったTCRクローンを示すグラフである。幹細胞移植後に残留したクローンにより示される各患者のレパートリーの割合に対する値の範囲が示されている。下位4分の1は、ゼロまでの範囲であった。残留クローンの割合は、移植前に（任意のレベルで）観察されたクローンに対応する全TCR配列決定リードの割合として計算された。値は、これらの患者のTCRレパートリーにおける移植前クローンのある程度の持続を示した。

【図2】健康な対照と比較した、移植から28、56、100および180日後の初期免疫再構成中に患者において観察される一時的TCRクローンの数を示すグラフである。各試料において、頻度による上位10のTCRクローンのそれぞれは、持続的（後の時点で同じ患者において再び観察される）または一時的（同じ患者からはその後の試料においていかなるレベルでも再び観察されない）のいずれかとして分類された。一時的クローンの数は、患者の間で極めて変動性であり、0から9の範囲であったが、一時的クローンの中央の数値は時間と共に減少した。4つの健康な対照もまた分析したが、一時的TCRクローンの数は、0から2の範囲であり、中央値は0であった。

【図3】造血幹細胞移植後の全ての患者にわたりTCRレパートリーサイズで示された、幹細胞移植後のTCRレパートリー再構成を示すグラフである。試料は、移植前、および移植後の5つの時点（28、56、100、180および365日目）で採取された。各患者に対するTCRレパートリーサイズは、TCR再配列のハイスループット配列決定を使用して推定され、推定TCRレパートリーサイズの幾何平均が示されている。移植後、患者は、緩やかな回復を始める前に、移植後56日でその最小値に達する大いに低減されたTCRレパートリーを有していた。

【図4】最終的な非再発死亡率（NRM）を有する、および有さない、全ての患者に対するTCR再配列のハイスループット配列決定に基づく推定TCRレパートリーサイズの比較を示すグラフである。TCRレパートリーサイズ値は、両方の集団に対して四分位数として示されている。有意性は、片側マン-ホイットニーU検定を使用して評価された。続いて非再発死亡率に見舞われた患者は、移植から56および100日後に有意に低い推定レパートリーサイズを有していた。

【図5】CD3+カウントおよび推定TCRレパートリーサイズの比較を示すグラフである。CD3+カウント（細胞の数/mL）を、両方のメトリクスが利用可能である28、56および100日目からの全ての生存患者からの試料に対して、推定TCRレパートリーサイズと比較した。CD3+カウントとレパートリーサイズとの間に弱い相関があり（ $r = 0.06$ ）、配列決定により得られたTCR多様性の下限に対する推定により、循環T細胞の全密度とは独立した情報が明らかとなったことを示している。

【図6】血液試料におけるTCRレパートリークローン性を示すグラフである。血液試料において、低いTCRレパートリークローン性は、免疫治療（イピリムマブ（抗CTLA-4 mAb）による処置）反応者状態の予測因子であり、高いTCRレパートリークローン性は、免疫治療非反応者状態の予測因子であった。

【図7】腫瘍組織試料からのTCRコードDNAの定量的配列決定からの結果を示すグラフである。結果は、免疫治療（AT）前に得られた腫瘍試料において検出されたTCRクローン性のレベルと比較した、免疫治療（イピリムマブ（抗CTLA-4 mAb）による処置）（DT）を施した後に得られた固形腫瘍組織試料中に存在するリンパ球におけるTCRクローン性の増加を示している。

【図8】免疫治療（イピリムマブ（抗CTLA-4 mAb）による処置）前および免疫治療後に得られた血液試料中および固形腫瘍試料中の、個々のTCRクローン集団の経時的な相対的提示における動力学を示すグラフである。時点A、B、およびCは、血液試料から採取された時点である。時点Aは、免疫治療前であり、時点BおよびCは、免疫治療計画開始後の2つの時点である。時点AT、BT、CTは、対化腫瘍試料である（ATは

10

20

30

40

50

免疫治療前であり、時点B TおよびC Tは、免疫治療計画開始後の2つの時点である)。矢印は、治療後に優位性が増加した単一クローンを示し、時点C Tにおいてレパートリーの10%を占めた。時点AおよびBにおいて血液中でそれぞれTCR配列の7~9%を占めた2つのクローン(X1およびX2)は、その後、相対的存在度において有意に低下し、一方、血液中では始めは非常に低い頻度を有していたいくつかのT細胞受容体配列は、時点Cまでに有意に増加した。時点Aにおける腫瘍試料中の3つの最も多数のクローンは、後の時点において決定されるように、その後の相対的提示において有意に減少した。

【図9】免疫治療(イピリムマブ(抗CTLA-4 mAb)による処置)の開始前(時点A)ならびに開始後(時点BおよびC)に得られた末梢血液試料において決定されたTCR配列多様性および分布エントロピーを示し、治療前(時点A)ならびに治療後(時点BおよびC)における、経時的な個々のTCRクローン提示の動力学を示すグラフである。矢印は、治療後に優位性が増加した単一クローンを示し、時点Cにおいてレパートリーの10%超を占めた。

【図10A】抗PD-1抗体による免疫治療前、治療中および治療後の、末期転移黒色腫患者から得られた黒色腫損傷からの組織試料からのTCRレパートリークローン性の測定値を示すグラフである。TCRレパートリークローン性の平均および標準偏差(各試料中に存在する一意のTCR配列の数を考慮することにより範囲(0~1)に正規化されたTCR配列分布エントロピーに基づく修正されたメトリクス)が、免疫治療に対する反応に従い示されている。試験した12名の患者のうち、8名が処置に反応し(疾患の安定化または部分的反応)、一方4名は反応しなかった(疾患の進行)。TCRレパートリークローン性は、反応しなかった4名の患者と比較して、反応した8名の患者においてより高かった(両側の対応のないt検定により $p = 0.015$)。

【図10B】12名の末期転移黒色腫患者のコホートから得られた黒色腫損傷の組織試料から得られた、免疫治療に対する反応に従うT細胞浸潤の平均および標準偏差(2倍体ゲノム当たりのT細胞受容体再配列として測定)を示すグラフである。両側の対応のないt検定により測定すると、Tリンパ球浸潤のレベルは、反応しなかった4名の患者と比較して、反応した8名の患者においてより高かった(両側の対応のないt検定により $p = 0.056$)。免疫治療は、抗PD-1抗体による処置であった。

【図11A】TCRレパートリークローン性、ならびにコホート1(12名の患者)、コホート2(13名の患者)、および組み合わせられたコホート(黒色腫損傷の組織試料から得られた)における免疫治療に対する反応の測定値を示すグラフである。免疫治療は、抗PD-1抗体による処置であった。TCRレパートリークローン性の平均および標準偏差(各試料中に存在する一意のTCR配列の数を考慮することにより範囲(0~1)に正規化されたTCR配列分布エントロピーに基づく修正されたメトリクス)が、コホート1(無地の四角)、コホート2(斜線縞模様の四角)および組み合わせられたデータ(水平線縞模様の四角)における免疫治療に対する反応に従い示されている。TCR配列分布クローン性は、反応しなかった患者と比較して、反応した患者においてより高かった(両側の対応のないt検定により、組み合わせられたデータにおいて $p = 0.00065$)。

【図11B】コホート1(無地の四角)、コホート2(斜線縞模様の四角)および組み合わせられたデータ(水平線縞模様の四角)における免疫治療に対する反応に従うT細胞浸潤の平均および標準偏差(2倍体ゲノム当たりのT細胞受容体再配列として測定)を示すグラフである。T細胞は、黒色腫損傷の組織試料から得られた。免疫治療は、抗PD-1抗体による処置であった。Tリンパ球浸潤のレベルは、反応しなかった患者と比較して、反応した患者においてより高かった(両側の対応のないt検定により、組み合わせられたデータにおいて $p = 0.0015$)。

【図11C】T細胞浸潤およびTCRレパートリークローン性のレベルに関する、各患者のランク(全25名の患者のうちランクの降順で)の比較を示すグラフである。T細胞は、黒色腫損傷の組織試料から得られた。免疫治療は、抗PD-1抗体による処置であった。反応者(菱形)と比較して、非反応者(丸)は、低いTCRレパートリークローン性および低レベルの浸潤Tリンパ球への傾向を同時に示す。

10

20

30

40

50

【図 1 2】本発明の一実施形態によるコンピュータの例を示すハイレベルブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【0054】

1. 概要

本発明は、ある特定の実施形態において、および本明細書に記載のように、例えば個人の適応免疫系の免疫能力を評価することができる適応免疫細胞（例えば、T細胞またはB細胞）クローン性を定性的に（例えば、T細胞受容体または免疫グロブリン配列多様性により）、および定量的に（例えば、TCRまたはIG配列分布により）特性決定することにより、対象または複数の対象の免疫学的状態を決定するための予想外にも有利な方法を提供する。したがって、本実施形態は、個人の免疫能力を評価するため、および免疫系状態に従い集団を階層化するための新規な方法を提供し、個人におけるリンパ系細胞により発現されたTCRおよび/またはIGの配列多様性、ならびに個人におけるT細胞および/またはB細胞クローン性の相対的程度の両方の決定は、様々な臨床状況において、免疫関連副作用の発生の可能性を含む予後診断、診断、および転帰に関連する。

10

【0055】

本実施形態は、初めて、(i) TCRおよびIGレパートリー多様性、ならびに(ii) TCRおよびIGレパートリー分布のDNA配列レベルでの特性決定により、免疫能力の高分解能の大規模ハイスループット評価を可能とする。本発明は、リンパ系細胞DNAを含有する試料中に存在し得る、実質的に全ての可能なTCRおよびIG遺伝子再配列の配列の定量的決定のための組成物および方法を含む。

20

【0056】

ある特定の実施形態において、対象からのリンパ系細胞DNA（ゲノムDNA、cDNA、または代替としてメッセンジャーRNA）を含有する試料が、特定のTCRまたはIG鎖をコードする実質的に全ての可能なDNA再配列を増幅することができるように特別設計されたプライマーセットを使用した多重PCR増幅のためのテンプレートとして使用される。多重PCR増幅産物は、迅速なハイスループット高品質定量DNA配列決定に適している。試料中の構造的TCRまたはIGレパートリー多様性は、DNA配列情報から複数の一意の再配列されたDNA配列を特定し、またそれから試料中の一意の配列の総数を決定することにより決定される。

30

【0057】

所望により、既知の推定または外挿法を使用して、配列情報から、患者の全適応免疫系におけるレパートリー多様性を決定することができる。各一意の配列の相対的分布を定量するために、本明細書に記載され、当業者により実践される定量的配列決定方法はまた、一意の配列の総数のうちのそれぞれの特定の一意に再配列されたDNA配列の発生頻度の決定を可能とする。ある特定の実施形態において、リンパ系細胞DNAおよび/またはRNAが抽出されてPCRテンプレートを提供し得るリンパ系細胞の源として、血液試料を得ることができる。

【0058】

これらの、および関連した方法は、本明細書に記載のような様々な用途が見出される。例えば、本明細書に記載の方法は、それぞれの個々の対象の適応免疫系内の適応免疫受容体(AIR)レパートリーの多様性および分布を定量するために使用される。本明細書に記載の方法はまた、患者の免疫能力状態、または免疫治療に対して反応する、もしくは免疫関連副作用を発生する個人の相対的可能性に従って、患者集団を階層化するために使用される。AIR配列多様性（例えば、試料中の特定のAIRポリペプチドをコードする全ての再配列されたDNAに対して特徴的なヌクレオチド配列情報を得ることにより特定される、異なる一意のAIRコード配列の数）およびAIR配列分布（例えば、各一意の再配列されたAIRコードDNA配列の発生頻度）の定量は、有利にも、臨床的に有用な情報により、前例のない正確性をもって定義されるTまたはB細胞クローン性の関連付けを可能とする。

40

50

【 0 0 5 9 】

限定されない理論によれば、この配列分布は、患者からの各試料中のT細胞またはB細胞クローン性の程度（例えば、提示の量的程度、または相対的存在度）を表し得るこの分布パラメータを処理するためのいくつかの既知のコンピュータツールのいずれかを使用して、分布値（例えば、各一意の配列の発生頻度）および多様性値（例えば、異なる一意の配列の総数）を生成することができる。分布および多様性値を格付けステップにおいて使用して、個々の試料を格付けし、それらを対照試料および/または互いと比較することができる。

【 0 0 6 0 】

本明細書に記載のように、血液悪性腫瘍を処置するために臍帯血移植を受けている患者において、臍帯血移植後の患者における比較的低い程度のTCRレパートリー多様性は、感染に対する感受性、および感染を除去する免疫機能不全の相対的可能性の予測因子であることが示された（例えば、不良な反応）。一方、血液悪性腫瘍を処置するための臍帯血移植後のヒト患者における比較的高い程度のTCRレパートリー多様性は、感染への抵抗性および免疫能力、すなわち、感染を除去する免疫学的能力の相対的可能性の予測因子であることが示された。

10

【 0 0 6 1 】

免疫反応の負の調節因子の阻害剤（例えば、抗CTLA4抗体）による免疫治療前および治療後の患者から得られた血液試料において、患者の血液における高いTCR配列多様性および低いクローン性は、肯定的な臨床転帰と関連していた。一方、低いTCR配列多様性（高いクローン性）およびTCR配列分布のより低いエントロピーを特徴とするTCRレパートリーは、欠陥のある適応免疫能力に起因するより不良な臨床転帰と関連していた。

20

【 0 0 6 2 】

免疫反応の負の調節因子の阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）による免疫治療前および治療後の患者から得られた固形腫瘍試料において、高レベルの浸潤T細胞の存在および高いクローン性（すなわち、腫瘍へのT細胞移動および腫瘍内のクローン性増殖の証拠）は、免疫治療に対する肯定的な反応と関連していた。対照的に、固形腫瘍における最小限の浸潤T細胞レパートリーおよび低いクローン性（すなわち、腫瘍内の制限された非特異的なT細胞反応の証拠）は、処置に対する反応の不良と関連していた。

30

【 0 0 6 3 】

ここで開示される実施形態は、所与の時点における患者の免疫能力をプロファイリングすることにより、例えば予後診断もしくは診断としての、または治療戦略の情報を与えるための、および他の目的のための広範な用途が見出される。

【 0 0 6 4 】

2. 定義

特許請求の範囲および明細書において使用される用語は、別段に指定されない限り、以下に記載のように定義される。

【 0 0 6 5 】

本明細書において使用される場合、適応免疫受容体(AIR)は、哺乳動物細胞において見出される、T細胞受容体(TCR)または免疫グロブリン(Ig)受容体等の免疫細胞受容体を指す。

40

【 0 0 6 6 】

本明細書において使用される場合、「プライマー」という用語は、好適な条件下でDNA合成の起点として機能することができるオリゴヌクレオチドを指す。そのような条件は、核酸と相補的なプライマー伸長産物の合成が、適切な緩衝液中および適切な温度における4つの異なるヌクレオシド三リン酸および伸長のための薬剤（例えば、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素）の存在下で誘導されるものを含む。

【 0 0 6 7 】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、パーセント「同一性」という

50

用語は、後述の配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTPおよびBLASTNもしくは当業者に利用可能な他のアルゴリズム）を使用して、または目視検査により測定されるように、最大対応について比較および整列されるときに、同一である特定のパーセンテージのヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。用途に依存して、パーセント「同一性」は、比較されている配列の領域、例えば、機能ドメインにわたり存在してもよく、または、代替として、比較される2つの配列の全長にわたり存在してもよい。

【0068】

配列比較のために、典型的には、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列（複数可）のパーセント配列同一性を計算する。

10

【0069】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所的相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似法の検索により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)により、または目視検査 (Ausubel et al., 下記参照)により行うことができる。

20

【0070】

パーセント配列同一性および配列類似性の決定に好適なアルゴリズムの一例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)に記載のBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationウェブサイト (www.ncbi.nlm.nih.gov)を通して公的に入手可能である。

30

【0071】

「十分な量」という用語は、所望の効果を生成するために十分な量、例えば、細胞における免疫反応を調整するために十分な量を意味する。

【0072】

「治療上効果的な量」という用語は、疾患の症状を改善するのに効果的な量である。治療上効果的な量は、予防が治療であるとみなされ得る場合、「予防的に効果的な量」となり得る。

【0073】

具体的な定義がなされない限り、本明細書に記載の分子生物学、分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品および薬化学に関連して使用される命名法、ならびにその実験室手順および技術は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用される。組み換え技術、分子生物学的、微生物学的、化学的合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、および送達、ならびに患者の処置に、標準的技術を使用することができる。

40

【0074】

文脈上別の意味が必要とされない限り、本明細書および特許請求の範囲全体にわたり、「含む (comprise)」という用語およびその変化形、例えば「含む (comprises)」および「含む (comprising)」は、限定されない包含的意味で、すなわち、「~を含むがこれらに限定されない」として解釈されるべきである。「~から

50

なる」とは、「～からなる」という語句の後に来るものを含み、典型的にはそれに限定されることを意味する。「本質的に～からなる」とは、その語句の後に列挙された任意の要素を含み、その列挙された要素に関して本開示において指定された活動または作用に干渉または寄与しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「本質的に～からなる」という語句は、列挙された要素が必要または必須であるが、他の要素は必要ではなく、それらが、列挙された要素の活動または作用に影響するか否かに依存して存在し得る、または存在し得ないことを示す。

【0075】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈上別の意味が明確に示されない限り、複数形の指示対象を含む。本明細書において使用される場合、具体的実施形態において、「約」または「近似的に」という用語は、数値の前に置かれた場合、その値プラスまたはマイナス5%、6%、7%、8%または9%等の範囲を示す。他の実施形態において、「約」または「近似的に」という用語は、数値の前に置かれた場合、その値プラスまたはマイナス10%、11%、12%、13%または14%等の範囲を示す。さらに他の実施形態において、「約」または「近似的に」という用語は、数値の前に置かれた場合、その値プラスまたはマイナス15%、16%、17%、18%、19%または20%等の範囲を示す。

10

【0076】

本明細書全体にわたる「一実施形態」または「実施形態」または「態様」の言及は、実施形態に関連して記載される特定の機能、構造または特徴が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体の様々な箇所での「一実施形態における」または「実施形態における」という語句の出現は、必ずしも全て同じ実施形態を言及しているわけではない。さらに、特定の機能、構造、または特徴が、1つ以上の実施形態において任意の好適な様式で組み合わせられてもよい。

20

【0077】

3. 定量法

対象の免疫能力を定量および評価するために、様々な方法を使用することができる。いくつかの実施形態において、免疫能力は、対象の適応免疫受容体(AIR)配列多様性およびAIR配列分布を測定することにより評価される。

30

A. 適応免疫受容体(AIR)配列多様性

【0078】

試料中のリンパ系細胞における一意の再配列されたTCRまたはIGコードDNA配列の多様性は、対象からの試料中の異なるTまたはB細胞クローンの数を反映する。配列多様性は、例えば試料中での直接計数または加重計数により、特定サイズの試料中のクローンの数として決定され得る。試料は、例えば、血液試料または組織試料(固形腫瘍試料)であってもよい。代替として、対象における異なるクローンの数は、副次標本中のクローンの数に基づいて推定されてもよい。別の実施形態において、多様性のために全てのT細胞または全てのB細胞の0.01%超を占めるクローンのみを計数する等、任意カットオフ値を割り当てて異なる「効果的」クローンの数を推定することができる。加重または外挿多様性決定のための他のモデル、例えばエントロピーモデル、「未発見種モデル」(例えば、Efron et al., 1976 Biometrika 63:435、Fisher et al., 1943 J. Anim. Ecol. 12:42を参照されたい)、または当該技術分野に精通した者に知られるような他の好適なモデルが、ある特定の関連した実施形態における使用に企図される。

40

【0079】

いくつかの実施形態において、AIR多様性は、特定の試料中の全AIR観察配列の定量的配列決定により測定され得る。再配列された適応免疫受容体遺伝子配列の定量的配列決定および適応免疫受容体クローン型決定のための組成物および方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Robins et al., 2009 Blood

50

114, 4099, Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64, Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001, Sherwood et al., 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61, U.S.A.N. 13/217, 126, U.S.A.N. 12/794, 507, 国際公開第WO/2010/151416号、国際公開第WO/2011/106738号(PCT/US2011/026373)、国際公開第WO2012/027503号(PCT/US2011/049012)、U.S.A.N. 61/550, 311, およびU.S.A.N. 61/569, 118に記載されている。それらの文献中、PCR増幅オリゴヌクレオチドプライマーおよび配列決定プライマーの配列、PCR増幅産物の配列決定、配列決定データの処理、ならびに適応免疫受容体多様性の測定値の使用に関する詳細もまた見出すことができ、それらの全ては、本明細書に記載の方法に従う使用に採用され得る。

10

【0080】

いくつかの実施形態において、Raw HiSeq (商標)等の配列決定プログラムを使用して配列データを前処理し、各リードの一次配列におけるエラーを除去し、配列データを圧縮することができる。最近傍アルゴリズムを使用して、密接に関連した配列をマージすることによりデータを一意の配列に折り畳み、PCRおよび配列決定のエラーの両方を除去することができる。

【0081】

本明細書に記載のようなTCRまたはIGの定量的配列決定により、試料に多様性スコアまたは格付けを割り当てることができる。いくつかの実施形態において、試料中の観察される再配列されたAIR配列の総数と比較してレポーター中の一意の再配列されたAIR配列の数が少数である場合、多様性スコアまたは格付けは低いものとして決定され得る。試料中の観察される再配列されたAIR配列の総数と比較してレポーター中の一意の再配列されたAIR配列の数が多数である場合、多様性スコアまたは格付けはより高いものとして決定され得る。低い、または高い多様性スコアまたは格付けの決定は、当業者により決定され得るような所定の閾値または統計的有意性の計算に基づいてもよい。例えば、多様性スコアまたは格付けを「低」として分類するための所定の閾値は、いくつかの実施形態において、対象集団の血液試料から得られたものより高くない(統計的有意性をもって)スコアであってもよく、集団は、免疫治療的介入に対する反応において不良な転帰を経験すると決定される集団であってもよい。他の実施形態において、所定の閾値は、試料からの再配列されたAIR配列から決定される多様性または格付けスコアの上位または最高50%、25%、10%または5%の計算に基づいて決定される。

20

30

【0082】

相対的なスケールとして、格付けシステムは、試料サイズ、多様性定量的方法(例えば、直接的配列決定、または外挿、「隠された種」によるか否か等)、試料が得られる患者集団の臨床兆候および症状等を含むがこれらに限定されない、いくつかの因子を考慮して変更または調節されてもよい。例えば、ある特定の限定されない例において、患者集団のメンバーは、相対的多様性および/または分布格付けに基づいて分類されてもよく、ある特定の実施形態において、集団の任意のセグメンテーションが実践されてもよい。ある特定の実施形態において、患者集団は、(i)四分位数、五分位数、十分位数等による配列多様性もしくは分布の程度に従って、または(ii)クローン性の相関因子として、配列の総数の50、40、30、20または10パーセントにおける相対的AIR配列多様性および分布エントロピーを格付けすることにより、または(iii)一連の時点のそれぞれにおける、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20の最も豊富な一意のAIR配列を選択することにより、階層化され得る。分類は、免疫能力を評価することができるパラメータの組を提供する。

40

【0083】

50

また上述のように、これらの配列多様性計算を使用して、造血幹細胞移植を受けた患者から得られた血液試料中において、より高いAIR配列多様性スコアが、感染を除去する能力等の好ましい臨床転帰のより高い可能性と相関することが決定された。抗PD-1抗体による免疫治療を受けている患者から得られた固形腫瘍試料においては、高レベルのT細胞浸潤および低い浸潤T細胞レパートリー多様性が、免疫治療に対する肯定的な反応と関連していた。

【0084】

当業者に知られているように、AIR配列多様性を計算するための他の既知の方法が使用されてもよい。例えば、参照によりその全体が組み込まれる以下の研究は、種存在度データから多様性指数を推定する現在の理論および実践を要約するとともに、多様性指数測定

10

のいくつかの一般的な実施形態の詳細な例を示している。Anne E. Magurran and Brian J. McGill. 2011. Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment. New York: Oxford University Pressを参照されたい。多様性スコア格付けを計算するために適用可能な遺伝的多様性推定のための方法の他の例は、James F. Crow and Motoo Kimura. 2009. An Introduction to Population Genetics Theory. Blackburn Pressに見出すことができる。

B. 適応免疫受容体(AIR)配列分布

【0085】

いくつかの実施形態において、AIR配列分布を使用して、対象の免疫学的状態(例えば、免疫能力)を決定および評価することができる。TCRまたはIG配列分布等のAIR配列分布は、試料中の異なるT細胞またはB細胞クローンの数、例えば、同一のTCRまたはIGを発現する細胞の数の間の変動を指す。例えば、AIR配列分布は、各一意の再配列されたAIRコードDNA配列の発生頻度を、観察される再配列されたAIRコードDNA配列の総数のパーセンテージとして定量することにより決定され得る。AIR配列の定量された分布を、任意選択でAIR配列多様性と共に使用して、免疫学的状態を決定するためのここで企図されるある特定の実施形態に従って、対象の免疫能力を格付けまたはランク付けすることができる。

20

【0086】

いくつかの実施形態において、AIR配列分布は、これらに限定されないが、以下の方法により決定され得る:(i)ある時間間隔にわたり、対象における少なくとも1~20の最も豊富な一意の再配列された(クローン)AIR配列を特定および定量すること、または(ii)対象からの試料中の観察される再配列された配列の総数の所与のパーセンテージ(例えば、10、20、30、40もしくは50%まで)を占めるために必要な一意の再配列された(クローン)AIR配列を特定およびその数を定量すること。他の計算を追加的または代替的に使用して、対象からの試料のAIR配列分布を決定し、既知の免疫学的状態を有する対照または別の試料と比較して試料を格付けするために、配列分布値を特定の試料に割り当てることができる。これらには、例えば、エントロピー(すなわち、試料セット内の要素の数の対数で除すことにより[0~1]の範囲に正規化され得る、典型的に情報理論において定義されるようなシャノンエントロピー)の決定、または、分布の1つ以上のモード(例えば、平均、歪み、尖度等)を決定するための他の既知の方法の使用が含まれ得る。本発明の方法は、以前は不可能であった精度での配列分布およびクローン性の決定を可能にし、様々な予後診断、診断、処方、および他の能力を可能にする。

30

40

C. 免疫学的状態の決定

【0087】

ある特定の実施形態によれば、試験対象の免疫学的状態を決定するための方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、試験対象の免疫学的状態を特定、定量、格付け、比較、および分類するためのステップを含む。

50

【0088】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の時点のそれぞれにおいて試験対象から得られたリンパ系細胞DNAを含有する1つ以上の試料中の適応免疫受容体(AIR)ポリペプチドをコードする複数の一意の再配列されたDNA配列のそれぞれに対してDNA配列情報を特定すること、および、1つまたは複数の時点のそれぞれにおいて試験対象内のDNA配列をコードする一意の再配列されたAIRポリペプチドの総数を決定して、対象におけるAIR配列多様性を定量することは、上述のように、ならびに参照により本明細書に組み込まれる、Robins et al., 2009 Blood 114, 4099、Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64、Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001、Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61、U.S.A.N. 13/217,126、U.S.A.N. 12/794,507、国際公開第WO/2010/151416号、国際公開第WO/2011/106738号(PCT/US2011/026373)、国際公開第WO2012/027503号(PCT/US2011/049012)、U.S.A.N. 61/550,311、およびU.S.A.N. 61/569,118に記載のように行うことができる。これらの参考文献は、PCR増幅オリゴヌクレオチドプライマーおよび配列決定プライマーの配列、PCR増幅産物の配列決定、配列決定データの処理、ならびに適応免疫受容体多様性の測定値の使用に関する説明を提供する。

10

20

【0089】

前記1つまたは複数の時点のそれぞれにおいて、試験対象における一意の再配列されたAIRポリペプチドコードDNA配列の総数を決定した後、各一意の再配列されたDNA配列の発生頻度が、観察される再配列されたAIRポリペプチドコードDNA配列の総数のパーセンテージとして定量され得る。例えば、実際の配列データのカウンタからAIR配列多様性値が決定される場合、その値を使用してAIR配列分布を決定することができる。別の例において、例えば対象の完全適応免疫系への副次標本の外挿により、または「未発見種モデル」を使用して、または任意の他の推定法により、AIR配列多様性データが推定される場合、分布の特性を捕らえるための広く知られている方法のいずれも使用することができる。

30

1. 対象からの試料の免疫学的状態の格付け

【0090】

各試料のAIR配列多様性およびAIR配列分布値を使用して、試料の免疫学的状態を格付けすることができる。多種多様な単純な加重および/または精密化格付けシステムのいずれをも使用することができるが、使用される多様性および分布推定法に依存し得る。好ましくは、およびある特定の限定されない実施形態において、所定の閾値に対して少数の一意の再配列された配列が、観察される再配列された配列の総数の50%以下の統合発生頻度を有する試験対象の試料に、低い格付けが割り当てられる。より高い試験対象格付けは、所定の閾値に対してより多数の一意の再配列された配列が、観察される再配列された配列の総数の50%以下の発生頻度を有する試料に割り当てられる。換言すれば、格付けは、1つまたはいくつかの優勢なクローンまたはオリゴクローン性が存在する場合のように、より少数の異なるクローンが、観察される再配列された配列の総数の50パーセントを占める場合により低い。同様であるが関連した実施形態において、より低い試験対象格付けは、より少数の一意の再配列された配列が、観察される再配列された配列の総数の40、30、20または10パーセント以下の統合発生頻度を有する試料に割り当てられ、より高い試験対象格付けは、より多数の一意の再配列された配列が、それぞれ、試料中の観察される再配列された配列の総数の40、30、20または10パーセント以下の統合発生頻度を有する試料に割り当てられる。

40

【0091】

いくつかの実施形態において、割り当てられた格付けは、次いで、既知の免疫学的状態

50

を有する第2の対象から得られた対照リンパ系細胞DNA試料から生成された対照対象格付けと比較され得る。ある特定の実施形態において、第2の対象は、当業者により定義されるような欠陥を有する既知の免疫学的状態を有する。他の実施形態において、第2の対象は、当該技術分野において確立された基準（例えば、Rich et al., Clinical Immunology: Principles and Practice, 3rd Ed., Mosby, St. Louis）に従う、欠陥を有さない既知の免疫学的状態を有する健康な対照個体であってもよい。いくつかの実施形態において、試験対象は、試験対象格付けが対照対象格付けよりも統計的に有意に低い前記時点のそれぞれにおいて、欠陥のある免疫学的状態を有するものとして分類され得、したがってそれにより試験対象の免疫学的状態が決定される。本明細書において言及される場合、「対照対象」は、それぞれ関連する臨床表現型を共有する対照対象の集団を指し得る。

10

【0092】

例えば、ある特定の好ましい実施形態において、試験対象からの試料のTCRまたはIG配列多様性スコアが、統計的有意性をもって、対照対象からの試料のものよりも2標準偏差分低い場合（前記対照対象は、欠陥のない免疫学的状態または健康な免疫状態を有することが既知である）、試験対象は、欠陥のある免疫学的状態および/または不健康な免疫状態を有すると分類される。同様に、ある特定の好ましい実施形態において、試験対象からの試料のTCRまたはIG配列分布（エントロピー）スコアが、統計的有意性をもって、対照対象からの試料のものよりも2標準偏差分低い場合（前記対照対象は、欠陥のない免疫学的状態または健康な免疫状態を有することが既知である）、試験対象は、欠陥のある免疫学的状態および/または不健康な免疫状態を有するとみなすことができる。次いで、状態の分類化は、診断、予後診断および/または処置戦略の情報を与えることができる。

20

【0093】

例えば、限定されない例として、ワクチンに対して免疫学的に反応し得るかどうかを予測することを目的として高齢患者が免疫学的にプロファイルされ得るように、加齢に関連した適応免疫系機能の低下が、本明細書に記載の方法により検出され得る。別の限定されない例として、予防的抗感染（例えば、抗生物質、抗ウイルス剤等）および/または免疫抑制治療（例えば、移植片対宿主病（GVHD）を処置するため）が、不変の治療計画に基づく代わりに、各患者の適応免疫系状態に基づいて調節され得るように、造血細胞移植受容者は、移植された細胞により適応免疫性が再構成されたかどうか、またはいつ再構成されたかを決定するために、移植後に定期的に試験され得る。別の限定されない例として、固形臓器移植受容者（例えば、移植肝臓、肺、腎臓、膵臓、腸、心臓、または皮膚の全てまたは一部の受容者）の免疫レパートリーおよび免疫能力は、宿主適応免疫系が移植片拒絶に関与し得るかどうかが、およびどの程度関与し得るかを決定するために、定期的に試験され得る。そのような試験結果から、臨床医学者は、必要に応じて免疫抑制治療を調節して、例えば、拒絶を軽減する、または過剰な免疫抑制治療の潜在的に有害な副作用を低減もしくは回避することができる。

30

【0094】

さらに別の限定されない例において、免疫能力は、どの患者が免疫治療に肯定的に反応し得る可能性があるか、およびどの患者がその可能性がないかを予測するために、がん患者等の候補免疫治療受容者において本明細書に記載のように評価され得る。

40

【0095】

また、本明細書のいずれかの箇所に記載のように、本開示の方法を使用して、TCR（TCRB）レパートリーが比較的高いTCR配列多様性およびTCR配列分布の高いクローン性（すなわち、腫瘍へのT細胞移動および腫瘍内でのクローン性増殖の証拠）を示した患者から得られた腫瘍組織試料が、適応免疫機構の負の調節因子を阻害するように設計された免疫治療（例えば、抗PD-1抗体）から利益を得る可能性がより高いことが示された。そのような患者は、免疫治療に対し有益に反応し、本発明の方法により検出されるような腫瘍組織内の確実な免疫反応に起因し得るより良好な臨床転帰を有していた（図1

50

0、図11)。したがって、PD-1試験において、反応者は非反応者よりもはるかに多くの浸潤T細胞を有する(すなわち、より多くの全浸潤T細胞が存在する)が、それらのT細胞は、極めて不均一に分布する(すなわち、高いクローン性)ことが確定された。

【0096】

異なる試験において、非反応者対象のサブセット内で、免疫治療(抗CTLA-4抗体による)が最初に施された後まもなくして、TCRB配列多様性および配列分布エントロピーの両方に低下が見られることがさらに観察されたが、これは、本発明の方法により測定され得る免疫治療に対する反応の差を示している(図8、図9)。

2. 増幅およびプライマー

【0097】

本明細書に記載の方法のこれらの、および関連した実施形態によれば、方法は、(1)複数のAIR V断片オリゴヌクレオチドプライマー、および(2)複数のAIR J断片オリゴヌクレオチドプライマーまたは複数のAIR C断片オリゴヌクレオチドプライマーのいずれかを使用した多重PCRにおいて、試料から抽出または生成されたDNAを増幅することを含む。これらのプライマーもまた、Robins et al., 2009 Blood 114, 4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64、Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001、Sherwood et al., 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61、U.S.A.N. 13/217, 126、U.S.A.N. 12/794, 507、国際公開第WO/2010/151416号、国際公開第WO/2011/106738号(PCT/US2011/026373)、国際公開第WO2012/027503号(PCT/US2011/049012)、U.S.A.N. 61/550, 311、およびU.S.A.N. 61/569, 118に記載されている。複数のV断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物AIR V領域ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各V断片プライマーは、少なくとも1つの機能的AIRコード遺伝子断片に相補的である、少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、複数のV断片プライマーは、試料中に存在する実質的に全ての機能的AIR Vコード遺伝子断片に特異的にハイブリダイズする。複数のJ断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物AIR J領域ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各J断片プライマーは、少なくとも1つの機能的AIR Jコード遺伝子断片に相補的である、少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、複数のJ断片プライマーは、試料中に存在する実質的に全ての機能的AIR Jコードまたは遺伝子断片に特異的にハイブリダイズする。さらに、複数のC断片オリゴヌクレオチドプライマーは、それぞれ独立して、哺乳動物AIR C領域ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることができ、各C断片プライマーは、少なくとも1つの機能的AIR Cコード遺伝子断片に相補的である、少なくとも15の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、複数のC断片プライマーは、試料中に存在する実質的に全ての機能的AIR Cコードまたは遺伝子断片に特異的にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、V断片およびJまたはC断片プライマーは、試料中の適応免疫細胞の集団から前記複数の増幅された再配列DNA分子を生成するために、試料中の実質的に全ての再配列されたAIR CDR3コード領域の前記多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)における増幅を促進することができ、前記複数の増幅された再配列DNA分子は、T細胞の集団におけるAIR CDR3コード領域の多様性を定量するのに十分である。代替として、方法は、単純に、試料中に存在する異なるクローンの絶対的および/または相対的数に関して試料を特性決定するのに十分な、上述の増幅されたDNA配列データの配列分析を含んでもよい。本明細書において使用される場合、機能的AIRコード遺伝子断片は、リンパ系細胞のDNAにおける再配列を受け、また、例え

10

20

30

40

50

ば、好ましい実施形態において偽遺伝子を含む再配列が含まれないように、およびフレーム外または時期尚早に停止された A I R ポリペプチドをもたらす再配列ではないように、生産的に発現する T C R または I G コード遺伝子断片を指す。

【 0 0 9 8 】

増幅の方法、配列決定およびプライマーは、本明細書においてさらに詳細に議論される。

3 . 患者集団の階層化

【 0 0 9 9 】

本明細書において開示されるある特定の関連した実施形態によれば、免疫治療に対する反応の相対的可能性に従い患者集団を階層化するための方法であって、

10

【 0 1 0 0 】

(a) 候補免疫治療受容者である複数の患者のそれぞれからのリンパ系細胞核酸を含有する少なくとも 1 つの試料 (例えば、固形腫瘍試料) において、適応免疫受容体 (A I R) ポリペプチドをコードする複数の一意の再配列された核酸配列のそれぞれの核酸配列情報を特定し、それから、各患者における一意の再配列された A I R ポリペプチドコード核酸配列の総数を決定して、対象における A I R 配列多様性を定量するステップと、

【 0 1 0 1 】

(b) 複数の患者のそれぞれにおいて、(a) において特定された各一意の再配列された核酸配列の発生頻度を、観察される再配列された A I R ポリペプチドコード核酸配列の総数のパーセンテージとして定量し、対象における A I R 配列分布を決定するステップと

20

【 0 1 0 2 】

(c) (a) からの患者における一意の再配列された配列の総数に従い、および (b) からの患者における各一意の再配列された配列の発生頻度に従い、複数の患者のそれぞれを格付けし、シャノンエントロピー (各一意の再配列された A I R の頻度の分布から計算され、一意の再配列された A I R の数の対数で除すことにより [0 ~ 1] の範囲に正規化される) が高い (すなわち、特異的クローン性増殖をほとんど有さない A I R レポートリーを示す) 患者には、より低いクローン性格付けを与え、シャノンエントロピー (各一意の再配列された A I R の頻度の分布から計算され、一意の再配列された A I R の数の対数で除すことにより [0 ~ 1] の範囲に正規化される) が低い (すなわち、広範な特異的クローン性増殖を有する A I R レポートリーを示す) 患者には、より高いクローン性格付けを与えるステップと、

30

【 0 1 0 3 】

(d) より低いクローン性格付け (固形腫瘍試料から測定されるように) を有する患者を、より高いクローン性格付けを有する患者よりも低い免疫治療に対する反応の相対的可能性を有するものとして分類し、それにより、免疫治療に対する反応の相対的可能性に従い患者集団を階層化するステップとを含む方法が提供される。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの試料は、固形腫瘍試料である。

【 0 1 0 4 】

これらの方法ステップの実践においては、本明細書のいずれかの箇所に記載のものと同様の組成物および方法が使用される。

40

4 . 処置を管理するための免疫学的状態の決定

【 0 1 0 5 】

ある特定の他の関連した実施形態によれば、免疫治療を受けている試験対象の処置を管理するために免疫学的状態を決定するための方法であって、

【 0 1 0 6 】

(a) 免疫治療前の 1 つまたは複数の時点のそれぞれにおいて、および免疫治療中またはその後の 1 つまたは複数の時点のそれぞれにおいて試験対象から得られたリンパ系細胞 D N A を含有する 1 つ以上の試料において、適応免疫受容体 (A I R) ポリペプチドをコードする複数の一意の再配列された核酸配列のそれぞれの核酸配列情報を特定し、それか

50

ら、前記1つまたは複数の時点のそれぞれでの試験対象における一意の再配列されたA I Rポリペプチドコード核酸配列の総数を決定して、対象におけるA I R配列多様性を定量するステップと、

【0107】

(b) 1つ以上の試料のそれぞれにおいて、(a)において特定された各一意の再配列された核酸配列の発生頻度を、前記1つまたは複数の時点のそれぞれでの試験対象における一意の再配列されたA I Rポリペプチドコード核酸配列の総数のパーセンテージとして定量し、前記1つまたは複数の時点のそれぞれでの対象におけるA I R配列分布を決定するステップと、

【0108】

(c) (a)において決定された一意の再配列された配列の総数に従い、および(b)において定量された各一意の再配列された配列の発生頻度に従い、1つ以上の試料のそれぞれを格付けし、A I R頻度分布を使用して前記1つまたは複数の時点のそれぞれでの対象における一意のA I R配列の総数を外挿し、試験対象における経時的なA I R配列多様性のプロファイルを得るステップと、(d)外挿された全A I R配列多様性に基づいて、対象に変更された免疫治療工程を割り当てるステップであって、高い外挿された全A I R配列多様性は、対象が健康な免疫状態を有し、感染の除去に成功し得るであろう可能性の増加を示し、低い外挿された全A I R配列多様性は、対象が不健康な免疫状態を有し、感染の除去に成功し得ないであろう可能性の増加を示すステップとを含む方法が提供される。

【0109】

これらの方法ステップの実践においては、本明細書のいずれかの箇所に記載のものと同様の組成物および方法が使用される。

4. 免疫治療および免疫能力

【0110】

免疫能力は、有益にも、効果的な免疫反応、例えば特定の腫瘍または病原体(例えば、感染性細菌、ウイルス、真菌または他の微生物もしくは疾患を引き起こす物質)が根絶または中和されるような、腫瘍または病原体に対する免疫反応を備える個人の適応免疫系の能力または可能性を含むものとして理解され得る。本開示のある特定の実施形態によれば、免疫能力を評価するための方法が記載され、この方法は、個人が免疫治療に対して臨床的に有益な様式で反応する可能性を予測し得る。

【0111】

したがって、本明細書のいずれかの箇所でも説明されるように、免疫応答性適応免疫系、例えば臨床基準により疾患または免疫障害の存在のいかなるリスクも有さないことが既知である臨床的に健康な正常個人、または個人の集団の免疫応答性適応免疫系は、対象の血液から得られた試料における比較的高程度のA I R配列多様性およびA I R配列分布の高いエントロピーを特徴とする。逆に、非免疫応答性適応免疫系(例えば、免疫反応を備える適応免疫系の比較的低い能力)は、本明細書において、対象の血液から得られた試料における比較的低いA I R配列多様性およびA I R配列分布の低いエントロピーを特徴とすることが示される。A I R配列多様性およびA I R配列分布のエントロピーは、本明細書において、経時的に動的であることが示され、年齢の増加、疾患への感受性の増加、ワクチンもしくは他の免疫治療に対して確実に反応する可能性の低下、および/または他の臨床的に関連する基準と相関して経時的に低下する傾向を有し得る。

【0112】

いくつかの実施形態において、免疫反応の負の調節因子の阻害剤による免疫治療前または治療後の患者から得られた固形腫瘍試料において、高レベルの浸潤T細胞および高いクローン性は、免疫治療に対する肯定的反応に関連していた。対照的に、固形腫瘍における低レベルの浸潤T細胞および低いクローン性は、処置に対する反応の不全に関連していた。

【0113】

免疫治療は、適応免疫系の1つ以上の細胞の活性レベルが改変される(例えば、統計的に有意な様式で上方調節または下方調節される)様々な介入のいずれをも含み得る。例えば、介入は、好ましい実施形態において抗原特異的免疫反応である適応免疫反応を誘発、動員、向上または別様に強化することを含み得る。ある特定の実施形態において、免疫治療は、適応免疫系細胞を認識してそのような細胞の免疫活性を改変する、1種以上の特異的抗体の投与を含み得る。他の免疫治療アプローチは、直接的または間接的に同様に免疫細胞活性を改変するサイトカイン;腫瘍関連抗原に対して抗原特異的免疫反応等の適応免疫反応を惹起するワクチン;骨髄移植、臍帯血移植、および自家T細胞移植を含む自家造血細胞移植を含む、造血細胞移植(例えば、Blume and Thomas, 2000 Biol. Blood Marrow Transpl. 6(1):1-12);適

10

応免疫反応の負の調節因子の阻害剤、例えばCTLA4/CD152の阻害剤(例えば、イピリムマブ、トレメリムマブ;Callahan et al., 2010 Sem. Oncol. 37:473)、LAG3/CD223の阻害剤(Huard et al., 1996 Eur. J. Immunol. 26:1180、Baixeras et al., 1992 J. Exp. Med. 176:327、Hannier et al., 1998 J. Immunol. 161:4058、Huard et al., 1994 Eur. J. Immunol. 24:3216);ならびに、いくつかの場合において免疫抑制剤を含む他の免疫治療薬剤(例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, (12th Ed., Brunton

20

et al., Eds., McGraw Hill, NY, 2011, pages 909-1099; 1891-1990、Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.), 2011 Garland Science, NY, pp. 669-716)の使用を含む。

【0114】

したがって、ある特定の実施形態において、免疫治療は、免疫治療薬剤、例えば免疫治療抗体、サイトカイン、造血細胞移植、免疫抑制剤、またはワクチンによる処置を含み得る。ある特定の実施形態において、免疫治療は、免疫反応の負の調節因子の阻害剤による処置を含む。免疫反応の負の調節因子は、CTLA4/CD152、LAG3/CD223、およびPD-1/CD279の1つ以上であってもよい。例えば、免疫反応の負の調節因子は、CTLA-4/CD152であってもよく、免疫反応の負の調節因子の阻害剤は、抗CTLA-4抗体、例えばイピリムマブ(例えば、Lyseng-Williamson et al., 2012 Am. J. Clin. Dermatol. 13:349、Jeter et al., 2012 Clin. Med. Insights Oncol. 6:275、Waitz et al., 2012 Canc. Res. 72:430)またはトレメリムマブ(例えば、Callahan et al., 2010 Sem. Oncol. 37:473、Ascieto et al., 2011 J. Transl. Med. 9:196、Calabro et al., 2010 Sem. Oncol. 37:460、Ribas, 2010 Sem. Oncol. 37:450)である。ある特定の実施形態において、免疫反応の負の調節

30

因子は、PD-1/CD279であってもよく、免疫反応の負の調節因子の阻害剤は、抗PD-1抗体である。ある特定の実施形態において、免疫治療は、免疫反応の増強物質を標的化する薬剤による処置を含み得る。免疫反応の増強物質は、41BB/CD137(Kwon et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:1963)、OX40/CD134(GenBank Acc. No. AJ277151)またはCD40(Banchereau et al., 1994 Ann. Rev. Immunol. 12:881)であってもよい。

【0115】

ある特定の他の実施形態において、免疫治療は、炎症経路の阻害剤による炎症状態または自己免疫疾患の処置を含み得る。企図される炎症状態または前記自己免疫疾患は、関節

40

50

リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、および若年性特発性関節炎を含む。炎症機構は、広範囲に特性決定されており（例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, (12th Ed., Brunton et al., Eds., McGraw Hill, NY, 2011, pages 909-1099; 1891-1990, Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.), 2011 Garland Science, NY)、これらの、および関連した実施形態において、炎症経路は、腫瘍壊死因子アルファ（TNF）、インターフェロンガンマ（IFN）、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-8（IL-8）の少なくとも1つを含む。例えば、TNFを含む炎症経路の場合、TNFに特異的に結合する炎症経路の阻害剤、例えば抗TNF抗体（例えば、アダリムマブ、インフリキシマブ）および人工可溶性TNF受容体（例えば、エタネルセプト）が知られている。

10

A. 免疫治療のための例示的標的

【0116】

免疫調整薬による処置または処置計画の前に患者の適応免疫系の免疫能力（血液における多様性、または固形腫瘍の場合には腫瘍組織におけるクローン性として定義される）を定量する能力は、処置に対する反応を予測し、全生存率に関連する。

【0117】

免疫カスケードにおいて、がんおよび他の治療領域に対する処置の可能性のあるものとして標的化され得る多くの標的が存在する。いくつかは、T細胞の表面上に発現し、免疫反応の負の調節因子であり、いくつかは、抗原提示細胞の表面上に発現し、免疫カスケードを上方調節すると考えられる。以下は、臨床において（抗CTLA、イピリムマブ）、または進行中の臨床試験において使用される、または使用されている免疫治療における例示的標的であり、現在、患者における成功した早期データを報告した後に、複数の製薬業者により使用されている。これらの標的、およびその阻害剤または調節因子は、本明細書に記載の発明の方法に従い、免疫治療または処置対策において使用され得る。

20

【0118】

抗CTLA. T細胞の表面上の2つのタンパク質、すなわちCD28および細胞傷害性T-リンパ球抗原4（CTLA-4）は、免疫活性化および耐受性の調節において重要な役割を果たす。CD28は、免疫反応の早期段階において肯定的な調整シグナルを提供し、一方CTLA-4シグナル伝達は、特に強いT細胞反応中に、T細胞活性化を阻害する。抗CTLA-4モノクローナル抗体治療を使用したCTLA-4遮断は、阻害シグナルの抑制が抗腫瘍T細胞反応の生成をもたらすため、非常に魅力的である。臨床および臨床前データの両方が、CTLA-4遮断がCD4+およびCD8+エフェクター細胞の直接的活性化をもたらすことを示しており、抗CTLA-4モノクローナル抗体治療は、多くのがん、特に黒色腫における有望性を示している。Oncologist. 2008; 13 Suppl 4: 2-9. doi: 10.1634/theoncologist.13-S4-2. (i) Yervoy、またはイピリムマブ（Bristol Myers Squibb (BMS)）および(ii)トレメリムマブ（Medimmune）の2つの抗CTLA4化合物がある。

30

40

【0119】

PD-1. 細胞死1（PD-1）およびそのリガンド、PD-L1およびPD-L2は、T細胞活性化、耐受性、および免疫病理学の間バランスを調節する阻害シグナルを伝達する。外来および自己抗原に対する免疫反応は、病原体および腫瘍を除去しながらも自己抗原に対する耐受性を維持するために、特定のバランスの取れた反応を必要とする。T細胞耐受性の誘発および維持にはPD-1が必要であり、非造血細胞上のそのリガンドPD-L1は、エフェクターT細胞反応を制限し、免疫媒介組織損傷から組織を保護することができる。PD-1:PD-L経路はまた、微生物および腫瘍により侵害されており、微生物または腫瘍免疫性が減衰され、慢性的感染および腫瘍生存が促進される。PD

50

- L1に対する追加的結合パートナーとしてのB7-1の特定は、PD-L1とB7-1との間の阻害的双方向性相互作用の発見と共に、B7:CD28ファミリーがT細胞活性化および耐容性を調節する新たな様式を明らかにしている。Annu Rev Immunol. 2008; 26: 677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331。Merck (MK-3475)、またはラムプロリズマブ; BMS (MBS-936558)、またはニボルマブ; Medimmune (MED14736); Glaxo (AMP-224); Genentech (MPDL3280A)の、開発中の少なくとも5つのPD-1化合物が知られている。

【0120】

4-1BB. TNF受容体スーパーファミリーのメンバーである4-1BB (CD137)は、活性化誘発性T細胞共刺激分子である。4-1BBを介したシグナル伝達は、生存遺伝子を上方調節し、細胞分裂を促進し、サイトカイン産生を誘発し、T細胞における活性誘発性細胞死を防止する。4-1BB経路の重要性は、がんを含む多くの疾患において強調されている。ますます多くの証拠が、抗4-1BBモノクローナル抗体が強い抗腫瘍特性を有することを示しており、これは一方で、その強力なCD8+T細胞活性化、IFN- γ 産生、および細胞溶解マーカー誘発能力の結果である。さらに、抗4-1BBと他の抗がん剤、例えば放射線との併用療法は、非免疫原性または低免疫原性腫瘍に対する確実な腫瘍退行能力を有する。Mol Cancer Ther; 11(5); 1062-70, 2012 AACR。4-1BB化合物の2つの例が、Pfizer (PF-05082566)およびBMS (BMS-663513)により開発されている。

【0121】

CD40. CD40 (CD154)は、抗原提示細胞上に見られる共刺激タンパク質であり、その活性化に必要である。T_H細胞上のCD154 (CD40L)のCD40への結合は、抗原提示細胞を活性化し、様々な下流効果を誘発する。この遺伝子によりコードされるタンパク質受容体は、TNF-受容体スーパーファミリーのメンバーである。この受容体は、T細胞依存的免疫グロブリンクラス切り替え、記憶B細胞発生、および胚中心形成を含む、多種多様な免疫および炎症反応を媒介する上で不可欠であることが判明している。Entrez Gene: CD40分子、TNF受容体スーパーファミリーメンバー5; En.wikipedia.org/wiki/CD40_(protein)。例示的なCD40化合物は、Seattle Genetics/Genentech (ダセツズマブ)およびNovartis (ルカツムマブ)により開発されたものを含むが、これらに限定されない。

【0122】

LAG-3. LAG-3 (CD223)は、活性化T細胞 (Huard et al. Immunogenetics 39: 213-217, 1994)、NK細胞 (Triebel et al. J Exp Med 171: 1393-1405, 1990)、B細胞 (Kisielow et al. Eur J Immunol 35: 2081-2088, 2005)、および形質細胞様樹状細胞 (Workman et al. J Immunol 182: 1885-1891, 2009)上に発現し、これらのリンパ球サブセットの機能において重要であるが完全には理解されていない役割を果たす、細胞表面分子である。さらに、LAG-3とその主要なリガンド、クラスII MHCとの間の相互作用は、樹状細胞機能の調整において役割を果たすと考えられている (Andreae et al. J Immunol 168: 3874-3880, 2002)。最近の臨床前試験では、CD8 T細胞枯渇におけるLAG-3の役割が実証されており (Blackburn et al. Nat Immunol 10: 29-37, 2009)、LAG-3 Ig融合タンパク質を使用したLAG-3/クラスII相互作用の遮断が、がん患者における多くの臨床試験において評価されている。Curr Top Microbiol Immunol. 2011; 34

10

20

30

40

50

4 : 2 6 9 - 7 8 . d o i : 1 0 . 1 0 0 7 / 8 2 _ 2 0 1 0 _ 1 1 4 。 L A G - 3
は、BMS等の企業により、標的として開発されている。

【 0 1 2 3 】

免疫カスケードに沿った標的の幅。免疫調整はまた、（特異的標的に対する）化合物ファミリーにより、免疫グロブリンファミリーまたはTNFファミリーのメンバーに分類され得る。Nature Reviews Drug Discovery 12, 130 - 146 (February 2013) (doi:10.1038/nrd3877) を参照されたい。この分類は、これらの標的が該当し得る、および免疫能力の尺度が等しく関連し得るがん以外の治療カテゴリーの幅を強調するのに有用である。

免疫治療の標的の例示的リスト

【表 1】

名称	会社	生物製剤の種類	経路	役割	適応症	試験の段階
免疫グロブリンファミリー						
トレメリムマブ	Medimmune/ AstraZeneca	CTLA4- 特異的 ヒト IgG2	CTLA4- B7.1, CTLA4- B7.2, B7H2	T細胞プ ライミン グおよび 活性化	固形腫瘍	II
ガリキシマブ	Cancer and Leukemia Group B (CALGB)/ Biogen Idec	B7.1 特 異的キ メラ IgG1	B7.1	B細胞増 殖	リンパ腫	II
BMS-936558	Bristol-Myers Squibb/ Medarex	PD1 特 異的ヒ ト IgG4	PD1-B7H1, PD1-B7DC	T細胞活 性化お よび耐 容性	複数のが ん; HCV	III
CT-011	CureTech	PD1 特 異的ヒ ト化 IgG1	PD1-B7H1, PD1-B7DC	T細胞活 性化お よび耐 容性	進行性固 形腫瘍; HCV	II
MK-3475	Merck/Schering- Plough	PD1 特 異的ヒ ト化 IgG1	PD1-B7H1, PD1-B7DC	T細胞活 性化お よび耐 容性	進行性ま たは転 移性固 形腫瘍	I
AMP224	Amplimmune/ GlaxoSmithKline	B7DC および ヒト IgG1 融 合タン パク質	PD1-B7H1, PD1-B7DC	T細胞活 性化お よび耐 容性	複数のが ん	I
BMS-936559	Bristol-Myers Squibb/ Medarex	B7H1 特異的 ヒト IgG4	PD1-B7H1	T細胞活 性化お よび耐 容性	進行性再 発 固形腫瘍	I
MPDL3280A	Genentech/ Roche	B7H1 特異的 組み換 えヒト IgG1	PD1-B7H1	T細胞活 性化お よび耐 容性	固形腫瘍	I
MEDI4736	Medimmune/ AstraZeneca	B7H1 特異的 組み換 えヒト IgG1	PD1-B7H1	T細胞活 性化お よび耐 容性	固形腫瘍	I
MEDI-570	Medimmune/ AstraZeneca	ICOS 特 異的ヒ ト IgG	ICOS- B7H2	T細胞依 存性 B 細胞 反応	SLE	I
AMG 557	Amgen	B7H2 特異的	ICOS, CD28,	T細胞依 存性 B 細胞	SLE、乾 癬	I

10

20

30

40

		ヒト IgG	CTLA4	反応		
MGA271	Macrogenics	B7H3 特異的 ADCC 促進ヒ ト化 IgG1	B7H3	T細胞活性 化および 耐容性	固形腫瘍	I
IMP321	Immutep	LAG3 および ヒト IgG1 融 合タン パク質	LAG3- MHCII	DC 成熟化 および T 細胞活性 化	複数のがん	I/II
TNF ファミリー						
BMS-663513	Bristol-Myers Squibb/ Medarex	CD137 特異的 ヒト IgG4	CD137	T細胞活性 化	固形腫瘍	I/II
PF-05082566	Pfizer	CD137 特異的 ヒト IgG	CD137	T細胞活性 化	リンパ腫	I
CDX-1127	Celldex	CD27 特異的 ヒト IgG1	CD27	T細胞活性 化	複数のがん	I
抗 OX40	Providence Health & Services	OX40 特異的 マウス IgG	OX40	CD4 T 細 胞活性化	前立腺がん	II
huMAb OX40L	Genentech/ Roche	OX40L 特異的 ヒト IgG1	OX40- OX40L	CD4 T 細 胞活性化	喘息	II
TRX518	GITR Inc.	GITR 特異的 ヒト IgG1	GITR- GITRL	T細胞活性 化	固形腫瘍	I
アタシセプト	ZymoGenetics/ EMD Serono	TACI および ヒト IgG1 融 合タン パク質	TACI、 BCMA お よび BAFFR	B細胞活性 化および 抗体産生	SLE、関節 リウマチ、 多発性硬化 症および視 神経炎	II/III
CP-870,893	Pfizer	CD40 特異的 ヒト IgG1	CD40	APC 活性 化および B細胞成熟 化	複数のがん	I

10

20

30

40

ルカツムマブ	Novartis	CD40 特異的 ヒト IgG1	CD40	APC 活性 化および B 細胞成熟 化	リンパ腫お よび白血病	I/II
ダセツズマブ	Seattle Genetics	CD40 特異的 ヒト化 IgG1	CD40	APC 活性 化および B 細胞成熟 化	リンパ腫お よび多発性 骨髄腫	II
ADCC、抗体依存性細胞媒介細胞障害性;APC、抗原提示細胞;B7H1、B7 ホモログ 1;BAFFR、B 細胞活性化因子受容体;BCMA、B 細胞成熟化抗原;CTLA4、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4;DC、樹状細胞;GITR、グルコシルチコイド誘導 TNFR 関連タンパク質;GITRL、GITR リガンド;HCV、C 型肝炎ウイルス;ICOS、誘導性共刺激因子;IgG1、免疫グロブリン G1;LAG3、リンパ球活性化遺伝子 3;MHCII、主要組織適合性遺伝子複合体クラス II;OX40L、OX40 リガンド;PD1、プログラム細胞死タンパク質 1;SLE、全身性紅斑性狼瘡;TAC1、膜貫通活性化因子および CAML 相互作用因子;TNF、腫瘍壊死因子。						

10

【 0 1 2 4 】

Nature Reviews Drug Discovery 12, 130 - 146 (February 2013) (doi:10.1038/nrd3877)。

【 0 1 2 5 】

試料および対象。試験生体試料を得ることができる対象または生物学的源は、ヒトもしくは非ヒト動物、または、トランスジェニックもしくはクローン化もしくは組織工学的に作製された（幹細胞の使用によるものを含む）生物であってもよい。本発明のある特定の好ましい実施形態において、対象または生物学的源は、がんもしくは別の悪性状態、または自己免疫疾患、または炎症状態、または細菌、ウイルス、真菌もしくは他の微生物感染を有することが既知であってもよく、またはそれらを有する、もしくは有するリスクがある疑いがあってもよく、あるいは、対象または生物学的源は、固形臓器移植受容者（例えば、移植肝臓、肺、腎臓、膵臓、腸、心臓、または皮膚の全てまたは一部の受容者）であってもよい。いくつかの実施形態において、対象または生物学的源は、造血細胞移植受容者（例えば、骨髄移植、臍帯血移植、自家 T 細胞移植等の受容者）であってもよい。本発明のある特定の実施形態において、対象または生物学的源は、そのような疾患のリスクまたは存在を有さないことが既知であってもよい。試験生体試料は、1つまたは複数の時点で、例えば、対象または生物学的源に処置または治療（例えば、免疫治療）を施す前の1つまたは複数の時点で、および対照または生物学的源に処置または治療（例えば、免疫治療）を施している間またはその後の1つまたは複数の時点で、対象または生物学的源から得られてもよい。

20

30

【 0 1 2 6 】

ある特定の好ましい実施形態は、ヒト対象である対象または生物学的源、例えば、当該技術分野において認められている臨床診断基準、例えば米国国立がん研究所（Bethesda、MD、USA）の基準、または DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology (2008, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York)、Pizzo and Poplack, Principles and Practice of Pediatric Oncology (Fourth edition, 2001, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York)、Vogelstein and Kinzler, The Genetic Basis of Human Cancer (Second edition, 2002, McGraw Hill Professional, New York)、Dancey et al. (2009 Semin. Oncol. 36 Suppl. 3: S46) に記載のような基準に従い、がんを有する、またはがんを発症もしくは獲得するリス

40

50

クがあると診断された患者を企図する。ある特定の実施形態は、そのような基準により、がんを有する、発症する、または獲得するリスクを有さないことが既知であるヒト対象を企図する。ある特定の発明の実施形態に従い企図される悪性状態の例は、黒色腫、肉腫、およびがん腫等の固形腫瘍を含み得る。その他の悪性状態の例は、悪性黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、腎細胞がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がんおよび前立腺がんを含み得る。

【0127】

ある特定の他の実施形態は、非ヒト対象または生物学的源、例えば非ヒト霊長類、例えばマカク、チンパンジー、ゴリラ、ミドリザル、オランウータン、ヒヒ、または他の非ヒト霊長類を企図し、当該技術分野において固形腫瘍および/または他のがんの前臨床モデルを含む前臨床モデルとして知られていてもよいそのような非ヒト対象を含む。ある特定の他の実施形態は、哺乳動物である非ヒト対象、例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ヤギ、スナネズミ、ハムスター、モルモットまたは他の哺乳動物を企図し、多くのそのような哺乳動物は、当該技術分野においてリンパ系造血器悪性腫瘍および/または他のがんを含むある特定の疾患または障害の前臨床モデルとして知られている対象であってもよい(例えば、Li et al., 2011 Dis. Model. Mech. 4:311、von Euler et al., 2011 Vet. Comp. Oncol. 9:1、Goldstein et al., 2010 Expert Rev. Hematol. 3:301、Diamond et al., 2009 J. Bone Min. Res. 24:1150、Macor et al., 2008 Curr. Pharm. Des. 14:2023、Talmadge et al., 2007 Am. J. Pathol. 170:793、Kerbel, 2003 Canc. Biol. Therap. 2(4 Suppl 1):S134、Man et al., 2007 Canc. Met. Rev. 26:737、Cespedes et al., 2006 Clin. Transl. Oncol. 8:318)。実施形態の範囲は限定されることを意図しないが、対象または生物学的源が、非哺乳動物脊椎動物、例えば、別の高等脊椎動物、もしくは鳥類、両生類もしくは爬虫類種、または別の対象もしくは生物学的源であってもよい他の実施形態もまた企図される。

【0128】

本明細書の別の箇所にも記載されるように、これらの、および他のがんの種類に対して、当該技術分野において認められている臨床診断基準、例えば米国国立がん研究所(Bethesda, MD, USA)により公表されている基準、またはDeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology (2008, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York)、Pizzo and Poplack, Principles and Practice of Pediatric Oncology (Fourth edition, 2001, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York)、およびVogelstein and Kinzler, The Genetic Basis of Human Cancer (Second edition, 2002, McGraw Hill Professional, New York)に記載のような基準が確立されている。特定のがんの分類および特性決定の他の限定されない例は、例えば、Ignatiadis et al. (2008 Pathobiol. 75:104); Kunz (2008 Curr. Drug Discov. Technol. 5:9)、およびAuman et al. (2008 Drug Metab. Rev. 40:303)に記載されている。

【0129】

生体試料は、対象または生物学的源から、血液試料、生検標本、固形腫瘍標本等の切除

腫瘍標本、組織外植片、器官培養物、生体液または任意の他の組織もしくは細胞調製物を得ることにより提供され得る。したがって、B細胞およびT細胞は、生体試料から、例えば、骨髄、胸腺、リンパ腺、リンパ節、末梢組織および血液を含む様々な組織および生体液試料から、ならびに腫瘍組織（例えば、腫瘍浸潤リンパ球）からも得ることができるが、末梢血が最も容易に利用可能である。任意の末梢組織がBおよびT細胞の存在について採取され得、したがって、本明細書に記載の方法における使用に企図される。適応免疫細胞を得ることができる組織および生体液は、皮膚、上皮組織、結腸、脾臓、粘膜分泌物、口腔粘膜、腸粘膜、膣粘膜もしくは膣分泌物、頸部組織、神経節、唾液、脳脊髄液（CSF）、骨髄、臍帯血、血清、漿液、血漿、リンパ液、尿、腹水、胸膜液、心膜液、腹膜液、腹腔液、培養培地、調整培養培地、または洗浄液を含むが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、適応免疫細胞（例えば、T細胞およびB細胞等のリンパ系の造血細胞）は、アフレーシス試料から単離され得る。末梢血試料は、瀉血により対象から得ることができる。末梢血単核球（PBMC）は、当業者に知られている技術により、例えば、Ficoll-Hypaque（登録商標）密度勾配分離により単離される。ある特定の実施形態において、全PBMCが分析に使用される。

10

【0130】

ある特定の関連した実施形態において、主にリンパ球（例えば、TおよびB細胞）を含む、または主にT細胞または主にB細胞を含む調製物が、確立された当該技術分野において認められた方法に従って、本明細書において提供されるような生体試料としての使用のために調製されてもよい。他の関連した実施形態において、TまたはB細胞の特定の亜集団が、本明細書に記載の方法を使用した分析前に単離されてもよい。TおよびB細胞の異なる亜集団を単離するための様々な方法および市販のキットは、当該技術分野において知られており、サブセット選択免疫磁性ビーズ分離または様々な既知のTおよびB細胞表面マーカーのいずれかの1つ以上に特異的な抗体を使用したフロー免疫サイトメトリー細胞分類を含むが、これらに限定されない。例示的なマーカーは、CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD20、CD25、CD28、CD45RO、CD45RA、CD54、CD62、CD62L、CDw137（41BB）、CD154、GITR、FoxP3、CD54、およびCD28の1つまたは組み合わせを含むが、これらに限定されない。例えば、当業者に知られているように、CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD20、CD45RA、およびCD45RO等の細胞表面マーカーを使用して、T、B、および単球系ならびに亜集団をフローサイトメトリーにおいて決定することができる。同様に、前方光散乱、側方散乱、および/または細胞表面マーカー、例えばCD25、CD62L、CD54、CD137、CD154を使用して、細胞の活性状態および機能的特性を決定することができる。

20

30

【0131】

本明細書に記載の方法のいくつかにおいて有用な例示的組み合わせは、CD8⁺CD45RO⁺（記憶細胞傷害性T細胞）、CD4⁺CD45RO⁺（記憶Tヘルパー）、CD8⁺CD45RO⁻（CD8⁺CD62L⁺CD45RA⁺（ナイーブ様細胞毒性T細胞）；CD4⁺CD25⁺CD62L^{hi}GITR⁺FoxP3⁺（調節性T細胞）を含み得る。免疫磁性細胞分離またはフロー免疫サイトメトリー細胞分類における使用のための例示的な抗体は、蛍光標識抗ヒト抗体、例えば、CD4 FITC（クローンM-T466、Miltenyi Biotec）、CD8 PE（クローンRPA-T8、BD Biosciences）、CD45RO ECD（クローンUCHL-1、Beckman Coulter）、およびCD45RO APC（クローンUCHL-1、BD Biosciences）を含む。抗体の適切な組み合わせを用いて全PBMCの染色を行い、続いて細胞を洗浄してから分析を行うことができる。リンパ球サブセットは、蛍光活性化細胞分類（FACS）により、例えば、BD FACSAria III（登録商標）細胞分類システム（BD Biosciences）により、およびFlowJo（登録商標）ソフトウェア（TreeStar Inc.）による結果の分析により、またさらに、表面またはビーズに固定された特異的抗体を含む概念的に同様の方法により単離さ

40

50

れ得る。

【0132】

核酸抽出のために、当該技術分野において知られた方法および/または市販のキットを使用して、例えば、Q I A a m p (登録商標) DNA b l o o d M i n i K i t (Q I A G E N (登録商標))を使用することにより、全ゲノムDNAを細胞から抽出することができる。単一1倍体ゲノムの近似的質量は、3 pgである。好ましくは、少なくとも25,000から250,000の細胞、例えば少なくとも50,000から125,000の細胞、または少なくとも75,000から150,000の細胞、または少なくとも100,000から200,000の細胞、すなわち、2倍体TまたはB細胞からの約0.15から1.5 μg、または例えば0.6から1.2 μgのDNAが、分析に使用される。急性T細胞リンパ芽球性白血病(T-ALL)等のリンパ系血液悪性腫瘍を有する患者から試料が得られた場合、試料中に存在するTまたはB細胞の数は、顕著に変動し得る。源として正常な健康ヒト成人から得られた末梢血単核細胞(PBMC)を使用すると、T細胞の数は変動し得、全細胞の約30%であると推定され得、B細胞の数は変動し得、PBMC調製物中の全細胞の約5~15%であると推定され得る。

5. 適応免疫受容体(AIR)

【0133】

天然TCRは、シグナル伝達を媒介するCD3複合体の不変タンパク質と関連する免疫グロブリンスーパーファミリーのヘテロ二量体細胞表面タンパク質である。TCRは、および形態で存在し、これらは構造的に類似しているが、極めて異なる解剖学的位置およびおそらくは機能を有する。TCRに結合するMHCクラスIおよびクラスIIリガンドはまた、免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質であるが、抗原提示に特化しており、それらがAPC細胞表面に短鎖ペプチド断片の多様なアレイを提示することを可能とする極めて多形のペプチド結合部位を有する。

【0134】

天然ヘテロ二量体およびTCRの細胞外部分は、2つのポリペプチドからなり、そのそれぞれは、膜近位定常ドメイン、および膜遠位可変ドメインを有する。定常および可変ドメインのそれぞれは、鎖内ジスルフィド結合を含む。可変ドメインは、抗体の相補性決定領域(CDR)に類似した極めて多形のループを含有する。TCRのCDR3は、MHCにより提示されたペプチドと相互作用し、TCRのCDR1および2は、ペプチドおよびMHCと相互作用する。TCR配列の多様性は、結合した可変(V)、多様性(D)、連結(J)、および定常遺伝子の体細胞再配列により生成される。

【0135】

IgおよびTCR遺伝子座は、多くの異なる可変(V)、多様性(D)、および連結(J)遺伝子断片を含有し、これらは、初期リンパ系分化中の再配列プロセスに供される。IgおよびTCR V、DおよびJ遺伝子断片配列は、当該技術分野において知られており、GENBANK等の公共データベースにおいて利用可能である。

【0136】

V-D-J再配列は、リコンビナーゼ酵素複合体により媒介され、RAG1およびRAG2タンパク質は、DNAを認識してそれをV遺伝子断片の下流側、D遺伝子断片の両側、およびJ遺伝子断片の上流側に位置する組み換えシグナル配列(RSS)で切断することにより、重要な役割を果たす。不適切なRSSは、再配列を低減またはさらに完全に防止する。組み換えシグナル配列(RSS)は、12+/-1bp(「12-シグナル」)または23+/-1bp(「23-シグナル」)のいずれかのスペーサにより隔てられた、2つの保存配列(七量体、5'-CACAGTG-3'、および九量体、5'-ACAACAACC-3')からなる。いくつかのヌクレオチド位置が、七量体の1位および2位のCAジヌクレオチドを含む組み換えに重要であると特定されており、七量体の3位のCはまた、九量体の5位、6位、7位のAヌクレオチドと共に極めて好ましいことが示されている。(Ramsden et al. 1994 Nuc l. Ac. Res. 22: 1785、Akamatsu et al. 1994 J. Immunol. 1

10

20

30

40

50

53:4520、Hesse et al. 1989 Genes Dev. 3:1053)。他のヌクレオチドの突然変異は、最小限または一貫性のない効果を有する。より変動性ではあるが、スペーサもまた組み換えに影響し、単一ヌクレオチド置換は、組み換え効率に大きく影響することが示されている (Fanning et al. 1996 Cell. Immunol. Immunopath. 79:1, Larijani et al. 1999 Nucl. Ac. Res. 27:2304、Nadel et al. 1998 J. Immunol. 161:6068、Nadel et al., 1998 J. Exp. Med. 187:1495)。大きく異なる組み換え効率を有するRSSポリヌクレオチド配列を特定するための基準が説明されている (Ramsden et al. 1994 Nucl. Ac. Res. 22:1785、Akamatsu et al. 1994 J. Immunol. 153:4520、Hesse et al. 1989 Genes Dev. 3:1053、およびLee et al., 2003 PLoS 1(1):E1)。

10

【0137】

再配列プロセスは、一般に、Ig重鎖(IgH)、TCRベータ(TCRB)、およびTCRデルタ(TCRD)遺伝子の場合、DからJの再配列から開始してVからD-Jの再配列が続き、またIgカッパ(IgK)、Igラムダ(IgL)、TCRアルファ(TCRA)、およびTCRガンマ(TCRG)遺伝子の場合、直接的なVからJの再配列が関連する。再配列遺伝子断片の間の配列は、一般に、TCR切断円(TREC)またはB細胞受容体切断円(BREC)とも呼ばれる円形切断産物の形態で削除される。

20

【0138】

V、D、およびJ遺伝子断片の多くの異なる組合せが、いわゆるコンビナトリアルレパートリーを表し、これは、Ig分子の場合約 2×10^6 、TCRの場合約 3×10^6 、およびTCR分子の場合約 5×10^3 であると推定される。V、D、およびJ遺伝子断片の連結部位において、ヌクレオチドの削除およびランダム挿入が再配列プロセス中に生じ、極めて多様性の連結領域をもたらし、これは、 $> 10^{12}$ であると推定されるIgおよびTCR分子の全レパートリーに大きく寄与する。

【0139】

成熟Bリンパ球は、Ig分子の親和性成熟をもたらすプロセスである体細胞超変異を介して、濾胞中心において抗原認識後にそのIgレパートリーをさらに拡張する。体細胞超変異プロセスは、IgHおよびIg軽鎖遺伝子のV-(D-)Jエクソンに集中し、単一ヌクレオチド突然変異に、時にはまたヌクレオチドの挿入または削除に関連する。体細胞突然変異Ig遺伝子はまた、濾胞または濾胞後の源の成熟B細胞悪性腫瘍において見出される。

30

6. 増幅プライマーおよび多重PCR

【0140】

本明細書に記載のある特定の好ましい実施形態において、V断片およびJ断片プライマーは、試験生体試料における再配列されたTCRまたはIg CDR3コードDNA領域を増幅するために、PCR反応において使用され得、各機能的TCRまたはIg Vコード遺伝子断片は、V遺伝子組み換えシグナル配列(RSS)を含み、各機能的TCRまたはIg Jコード遺伝子断片は、J遺伝子RSSを含む。これらの、および関連した実施形態において、各増幅された再配列DNA分子は、(i)少なくとも約10、20、30もしくは40の連続ヌクレオチドのTCRもしくはIg Vコード遺伝子断片のセンス鎖を含んでもよく、少なくとも約10、20、30もしくは40の連続ヌクレオチドは、V遺伝子RSSに対して5'に位置し、および/または、各増幅された再配列DNA分子は、(ii)少なくとも約10、20または30の連続ヌクレオチドのTCRもしくはIg Jコード遺伝子断片のセンス鎖を含んでもよく、少なくとも約10、20または30の連続ヌクレオチドは、J遺伝子RSSに対して3'に位置する。ある特定の好ましい実施形態において、各増幅されたTCRまたはIg CDR3コード領域は、600ヌクレオチド未満の長さの増幅された再配列DNA分子内に存在する。理論に束縛されることを望

40

50

まないが、CDR3コードV-J連結領域を増幅するためのこれらの設計機能は、実質的に全ての機能的TCRまたはIg Vコード遺伝子断片に対するV断片プライマーハイブリダイゼーションを可能とし、また、実質的に全ての機能的TCRまたはIg Jコード断片へのJ断片プライマーハイブリダイゼーションを可能とし、また、本明細書に記載のハイスループット配列決定(HTS)プラットフォームによる配列決定に適したCDR3コード領域を増幅を可能とする一方で、全ての可能なV-D-JおよびV-Jの組み合わせを特定するための十分な配列情報を含む。

7. 多重定量PCR

【0141】

本明細書に記載のように、およびRobins et al., 2009 Blood 114, 4099、Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64、Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001、Sherwood et al., 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61、U.S.A.N. 13/217, 126、U.S.A.N. 12/794, 507、国際公開第WO/2010/151416号、国際公開第WO/2011/106738号(PCT/US2011/026373)、国際公開第WO2012/027503号(PCT/US2011/049012)、U.S.A.N. 61/550, 311、およびU.S.A.N. 61/569, 118を考慮して、ある特定の好ましい実施形態によれば、本発明は、V断片に特異的にハイブリダイズする順方向プライマーのセット、およびJ断片に特異的にハイブリダイズする逆方向プライマーのセットを使用した多重PCR法を含み、多重PCR反応は、TまたはB細胞の所与の集団内の全ての可能なVJ(およびVDJ)の組み合わせを増幅を可能とする。

【0142】

DNAまたはRNAは、当該技術分野における標準的方法または市販のキットを使用して、血液もしくはリンパ液の試料、またはリンパ系細胞を含有することが既知である対象からの他の試料等の試料中の細胞から抽出されてもよい。いくつかの実施形態において、ゲノムDNAが使用される。他の実施形態において、cDNAは、細胞から得られたmRNAから転写され、次いで多重PCRに使用される。

【0143】

多重PCRシステムは、ゲノムDNAから、好ましくはCDR3領域から再配列された適応免疫細胞受容体遺伝子座を増幅するために使用され得る。ある特定の実施形態において、CDR3領域は、TCR、TCR、TCRもしくはTCR CDR3領域から、または同様にIgHもしくはIgL(ラムダもしくはカッパ)遺伝子座から増幅される。試料中のT細胞(TCRの場合)またはB細胞(Igの場合)の集団から複数の増幅された再配列DNA分子を生成するために、そのような受容体の所与のクラス(例えば、TCR、TCR、IgH等)に関して、試料中の実質的に全ての生産的に再配列された適応免疫受容体CDR3コード領域の多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において増幅を促進することができる複数のV断片およびJ断片プライマーを含む組成物が提供される。好ましくは、ある特定の実施形態において、プライマーは、複数の増幅された再配列DNA分子における各増幅された再配列DNA分子が600ヌクレオチド未満の長さであり、それにより非再配列適応免疫受容体遺伝子座から増幅生成物を除外するように設計される。

【0144】

ヒトゲノムにおいて、現在、約70のTCR V および約61のJ 遺伝子断片、約52のTCR V、約2のD および約13のJ 遺伝子断片、約9のTCR V および約5のJ 遺伝子断片、ならびに約46の免疫グロブリン重鎖(IgH) V_H、約23のD_H および約6のJ_H 遺伝子断片があると考えられている。したがって、これらの遺伝子座のゲノム配列が、それらのそれぞれの特異的分子プローブが容易に生成され得るよ

うに知られている場合、限定されない理論に従い、本発明の組成物および方法は、これらの既知の容易に検出可能な適応免疫受容体 V、D および J 領域コード遺伝子断片の実質的に全て（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99%）に関連すると考えられる。

【0145】

T C R および I g 遺伝子は、体細胞突然変異を介して何百万もの異なるタンパク質を生成し得る。この多様性生成機構のために、これらの遺伝子の超可変相補性決定領域（C D R）は、数百万ものリガンドと相互作用し得る配列をコードすることができ、これらの領域は、タンパク質の同種リガンドの結合を示すシグナルを細胞に伝達し得る定常領域に結合する。適応免疫系は、多くの潜在的病原体を認識するための十分な多様性を有する T 細胞および B 細胞抗原受容体のレパートリーを生成するために、いくつかの戦略を使用する。M H C 分子により提示されるペプチド抗原を主に認識する および T 細胞において、この受容体多様性のほとんどは、T 細胞受容体（T C R） および 鎖（または および 鎖）の第 3 の相補性決定領域（C D R 3）内に含有される。

10

【0146】

アッセイ技術は、高度多重 P C R 反応を提供するために、プライマーの 2 つのプールを使用する。まず、「順方向」プール（例えば、限定ではなく例示として、本明細書に記載の V 断片オリゴヌクレオチドプライマーは、ある特定の好ましい実施形態において、一般的に使用される P C R 用語に従い、J 断片オリゴヌクレオチドプライマーが「逆方向」プライマーとして使用される場合、「順方向」プライマーとして使用され得るが、当業者には、ある特定の他の実施形態において、J 断片プライマーが、V 断片「逆方向」プライマーと共に使用される場合、「順方向」プライマーとみなされ得ることが理解される）は、それぞれの T C R または I g 遺伝子座における各 V 領域コード断片（「V 断片」）に特異的である（例えば、その一意の配列領域に相補的なヌクレオチド配列を有する）オリゴヌクレオチドプライマーを含む。ある特定の実施形態において、多くの V 断片を同時に捕捉し、それにより多重 P C R において必要とされるプライマーの数を低減するために、高度に保存された領域を標的化するプライマーが使用される。同様に、ある特定の実施形態において、「逆方向」プールプライマーは、連結（「J」）断片における保存配列にアニールする。

20

【0147】

各プライマーは、ヒトゲノムデータベースにおける既知の J 領域コード遺伝子断片の中での配列差に基づいて各 J 断片を一義的に特定するために、またさらに J 断片特異的プライマーが再配列決定のためにアニールし得る配列部分を含むために、十分な長さの配列部分を含むそれぞれの増幅された D N A 断片が得られるように設計され得る。V および J 断片特異的プライマーのこの設計は、個人における適応免疫受容体遺伝子レパートリーに存在する体細胞再配列の大部分の直接的観察を可能にする。この特徴は、一方で、（i）関心ある特定の疾患、障害、状態または他の兆候（例えば、がん、自己免疫疾患、炎症性障害または他の状態）を有する個人における T C R および / または I g レパートリーの、（i i）そのような疾患、障害状態または兆候を有さない対照対象の T C R および / または I g レパートリーとの迅速な比較を可能とする。

30

40

【0148】

いくつかの実施形態において、本明細書において使用される場合、「遺伝子」という用語は、T C R または I g ポリペプチド（例えば、C D R 3 含有ポリペプチド）の全てまたは一部等のポリペプチド鎖の生成に関与する D N A の断片を指し、コード領域「リーダーおよびトレーラー」の前および後の領域、ならびに、個々のコード断片（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含み、また調節要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー結合部位等）を含んでもよく、また本明細書に記載のような組み換えシグナル配列（R S S）を含んでもよい。

【0149】

本明細書においてポリヌクレオチドとも呼ばれ、またオリゴヌクレオチドを含む本実施

50

形態の核酸は、RNAの形態またはDNAの形態であってもよく、このDNAはcDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含む。DNAは、二本鎖または一本鎖であってもよく、一本鎖である場合、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。本実施形態による使用のためのTCRまたは免疫グロブリンまたはその領域（例えば、V領域、D断片、J領域、C領域等）をコードするコード配列は、任意の所与のTCRまたは免疫グロブリン遺伝子領域またはポリペプチドドメイン（例えば、V領域ドメイン、CDR3ドメイン等）の当該技術分野において知られたコード配列と同一であってもよく、または、遺伝子コードの冗長性または縮重の結果、同じTCRまたは免疫グロブリン領域またはポリペプチドをコードする、異なるコード配列であってもよい。

【0150】

一実施形態において、本開示は、複数のV断片プライマーおよび複数のJ断片プライマーを提供し、複数のV断片プライマーおよび複数のJ断片プライマーは、再配列された免疫受容体遺伝子座のVおよびJ断片の実質的に全ての組み合わせを増幅する。いくつかの実施形態において、方法は、リンパ系細胞における再配列されたAIR配列の実質的に全ての増幅を提供し、試料中の少なくとも 10^6 、 10^5 、 10^4 、または 10^3 の一意的再配列されたAIR配列のTCRまたはIGレパトリーの多様性を定量することができる。「実質的に全ての組み合わせ」は、再配列された免疫受容体遺伝子座のVおよびJ断片の全ての組み合わせの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上を指す。ある特定の実施形態において、複数のV断片プライマーおよび複数のJ断片プライマーは、再配列された免疫受容体遺伝子座のVおよびJ断片の組み合わせの全てを増幅する。

【0151】

一般に、多重PCRシステムは、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25の、またある特定の実施形態において、少なくとも26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、または39の、また他の実施形態において、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、65、70、75、80、85、またはそれ以上の順方向プライマーを使用することができ、各順方向プライマーは、1つ以上のV領域セグメントに対応する配列に特異的にハイブリダイズする、またはそれと相補的である。また、多重PCRシステムは、少なくとも3、4、5、6、または7の、またある特定の実施形態において、8、9、10、11、12または13の逆方向プライマーを使用し、各逆方向プライマーは、1つ以上のJ領域断片に対応する配列に特異的にハイブリダイズする、またはそれと相補的である。レパトリーにおけるTCRおよびIG配列の完全多様性を増幅するために、VおよびJ断片プライマーの様々な組み合わせを使用することができる。TCRおよびIG配列の増幅のためのプライマーオリゴヌクレオチド配列を含む、多重PCRシステムに関する詳細については、例えば、それぞれ参照によりその全体が組み込まれる、Robins et al., 2009 Blood 114, 4099、Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64、Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001、Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61、U.S.A.N. 13/217,126、U.S.A.N. 12/794,507、国際公開第WO/2010/151416号、国際公開第WO/2011/106738号(PCT/US2011/026373)、国際公開第WO2012/027503号(PCT/US2011/049012)、U.S.A.N. 61/550,311、およびU.S.A.N. 61/569,118に記載されている。

【0152】

ヌクレオチド塩基相補性により標的核酸に特異的にハイブリダイズまたはアニールすることができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、中程度から高いストリンジ

10

20

30

40

50

エンシー条件下でそれを行うことができる。例示を目的として、標的核酸配列の特異的 PCR 増幅のための好適な中程度から高いストリンジェンシー条件は、25 から 80 PCR サイクルの間であり、各サイクルは、変性ステップ（例えば、約 95 超で約 10 ~ 30 秒 (s)、アニールステップ（例えば、約 60 ~ 68 で約 10 ~ 30 s）、および伸長ステップ（例えば、約 60 ~ 72 で約 10 ~ 60 s）からなり、任意選択で、ある特定の実施形態によれば、アニールおよび伸長ステップは、2 ステップ PCR を提供するために組み合わせられる。当業者により認識されるように、プライマーのアニールおよび増幅の特異性を増加させるために、PCR 反応において他の PCR 試薬を添加する、または変更する、例えばマグネシウム濃度を改変する、任意選択で DMSO を添加する、および / または、ブロックされたプライマー、修飾されたヌクレオチド、ペプチド - 核酸等を使用することができる。

10

【0153】

ある特定の実施形態において、核酸ハイブリダイゼーション技術を使用して、本明細書に記載のプライマーのハイブリダイゼーション特異性を評価することができる。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学の技術分野において周知である。例示を目的として、本明細書に記載のようなポリヌクレオチドの他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するための好適な中程度にストリンジェントな条件は、5 x SSC、0.5 % SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) の溶液中での事前洗浄、5 x SSC による 50 ~ 60 で一晩のハイブリダイゼーション、続いて、0.1 % SDS を含有する 2 x、0.5 x および 0.2 x SSC のそれぞれによる 65 で 20 分間の 2 回の洗浄を含む。当業者には、例えばハイブリダイゼーション溶液の塩含量、および / またはハイブリダイゼーションが行われる温度を改変することにより、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが容易に操作され得ることが理解される。例えば、別の実施形態において、好適な高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、上述のものを含むが、但し、ハイブリダイゼーションの温度は、例えば、60 ~ 65、または 65 ~ 70 に増加される。

20

【0154】

ある特定の実施形態において、プライマーは、イントロン / エクソン境界を交差しないように設計される。順方向プライマーは、ある特定の実施形態において、これらのプライマーの間の配列の保存を最大化するように、V 断片間の比較的強い配列保存の領域内の V 断片にアニールする。したがって、これにより、各プライマーのアニール特性の差の可能性が最小限化され、V プライマーと J プライマーとの間の増幅領域は、使用された特定の V 遺伝子断片を特定するための十分な TCR または Ig V 配列情報を含むようになる。一実施形態において、J 断片プライマーは、J 断片の保存された要素にハイブリダイズし、同様のアニール強度を有する。1 つの具体的実施形態において、J 断片プライマーは、同じ保存されたフレームワーク領域モチーフにアニールする。

30

【0155】

オリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68 : 90 - 99 のホスホトリエステル法、Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68 : 109 - 151 のホスホジエステル法、Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22 : 1859 - 1862 のジエチルホスホロアミダイト法、および米国特許第 4,458,066 号の固体支持体法等の方法による直接的化学合成を含む、任意の好適な方法により調製され得る。オリゴヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドのコンジュゲートの合成法に関する検討は、参照により本明細書に組み込まれる、Goodchild, 1990, Bioco njugate Chemistry 1 (3) : 165 - 187 に記載されている。

40

【0156】

プライマーは、好ましくは、一本鎖 DNA である。プライマーの適切な長さは、プライマーの使用目的に依存するが、典型的には、6 から 50 ヌクレオチド、またはある特定の

50

実施形態においては15～35ヌクレオチドの範囲である。短鎖プライマー分子は、一般に、テンプレートと十分に安定なハイブリッド複合体を形成するために、より低い温度を必要とする。プライマーは、テンプレート核酸の正確な配列を反映する必要はないが、テンプレートとハイブリダイズするのに十分相補的でなければならない。所与の標的配列の増幅のための好適なプライマーの設計は、当該技術分野において周知であり、本明細書において引用される文献において説明されている。

【0157】

本明細書に記載のように、プライマーは、プライマーの検出または固定化を可能とするが、DNA合成の起点として機能するというプライマーの基本的特性を改変しない追加的特徴を組み込むことができる。例えば、プライマーは、標的核酸にハイブリダイズしないが、増幅産物のクローン化、検出、または配列決定を容易化する追加的核酸配列を、5'末端に含有してもよい。ハイブリダイズするのに十分テンプレートに相補的であるプライマーの領域は、本明細書において、ハイブリダイズ領域と呼ばれる。

10

【0158】

本明細書において使用されるように、プライマーが、十分ストリンジェントな条件下で増幅反応に使用される際に、主に標的核酸にハイブリダイズする場合、プライマーは標的配列に「特異的」である。典型的には、プライマー-標的二本鎖安定性が、プライマーと試料中に見られる任意の他の配列との間に形成される二本鎖の安定性よりも大きい場合、プライマーは、標的配列に特異的である。当業者には、塩条件ならびにプライマーの塩基組成およびミスマッチの場所等の様々な因子が、プライマーの特異性に影響すること、また多くの場合、プライマー特異性の日常的な実験による確認が必要であることが認識される。プライマーが標的配列のみと安定な二本鎖を形成し得るハイブリダイゼーション条件が選択され得る。したがって、好適にストリンジェントな増幅条件下で標的的特異的プライマーを使用することにより、標的プライマー結合部位を含有するそれらの標的配列の選択的増幅が可能となる。

20

【0159】

具体的実施形態において、本明細書に記載の方法における使用のためのプライマーは、標的VまたはJ断片の連続核酸配列と同じ配列を有する、またはそれと実質的に相補的である、少なくとも約15ヌクレオチドの長さの核酸を含む、またはその核酸からなる。標的VまたはJ断片の連続配列と同じ配列を有する、またはそれと実質的に相補的である、より長いプライマー、例えば、約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、45、または50ヌクレオチドの長さのプライマーもまた、ある特定の実施形態において使用される。プライマーにおいて、標的VまたはJ断片に対する相補性を保持しながら、標的配列に対する様々なミスマッチ(1、2、3、またはそれ以上)が企図され得る。上述のプライマーの全ての中間的長さが、本明細書における使用に企図される。当業者に認識されるように、プライマーは、加えられた追加的配列(例えば、標的VまたはJ断片と同じまたは相補的となり得ないヌクレオチド)、例えば制限酵素認識部位、配列決定のためのアダプタ配列、バーコード配列等を有し得る(例えば、本明細書および配列リストに記載のプライマー配列)。したがって、プライマーの長さは、特定の用途または必要性に依存して、より長くてもよく、例えば55、56、57、58、59、60、65、70、75、もしくは80ヌクレオチドの長さまたはそれ以上であってもよい。例えば、一実施形態において、順方向および逆方向プライマーは、共に、5'末端において、DNA配列決定核酸配列と適合性のユニバーサル順方向プライマー配列で修飾されている。

30

40

【0160】

オリゴヌクレオチドプライマーと高度の配列同一性を共有し得る、適応免疫受容体V断片またはJ断片オリゴヌクレオチドプライマー変異体もまた、ある特定の実施形態における使用に企図される。したがって、これらの、および関連した実施形態において、適応免疫受容体V断片またはJ断片オリゴヌクレオチドプライマー変異体は、本明細書に開示さ

50

れる適応免疫受容体V断片またはJ断片オリゴヌクレオチドプライマー配列に対する実質的な同一性を有し得、例えば、そのようなオリゴヌクレオチドプライマー変異体は、本明細書に記載の方法（例えば、標準的パラメータを使用したBLAST分析）を使用して、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプライマー配列等の参照ポリヌクレオチド配列と比較して、少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%、またはそれ以上の配列同一性を有し得る。当業者には、これらの値が、適応免疫受容体断片コードポリヌクレオチドにアニールするオリゴヌクレオチドプライマー変異体の対応する能力を決定するために、コドン変性、リーディングフレーム位置等を考慮することにより、適切に調節され得ることが認識される。典型的には、オリゴヌクレオチドプライマー変異体は、好ましくは変異体オリゴヌクレオチドのアニール能力が、本明細書において具体的に記載される適応免疫受容体V断片またはJ断片オリゴヌクレオチドプライマー配列のアニール能力に比べて実質的に消失しないように、1つ以上の置換、付加、削除および/または挿入を含有する。本明細書のいずれかの箇所にも記載のように、好ましい実施形態において、適応免疫受容体V断片およびJ断片オリゴヌクレオチドプライマーは、CDR3のコード領域を含む再配列されたTCRまたはIGH配列を増幅することができるように設計される。

10

【0161】

本明細書において企図されるある特定の実施形態によれば、本開示の多重PCR法における使用のためのプライマーは、非TまたはB細胞配列の非特異的プライミングを防止するために、機能的にブロックされてもよい。例えば、プライマーは、米国特許出願公開第US2010/0167353号に記載のような化学修飾によりブロックされてもよい。本明細書に開示されるある特定の実施形態によれば、本多重PCR反応におけるそのようなブロックされたプライマーの使用は、DNA複製（すなわち、プライマー伸長）がブロックされる不活性な構成、およびDNA複製が進行する活性化構成を有し得るプライマーを含む。プライマーの不活性構成は、プライマーが一本鎖である場合、またはプライマーが関心のある標的DNA配列に特異的にハイブリダイズするが、プライマーの3'末端もしくはその近くに結合した化学部分によりプライマー伸長がブロックされたままである場合に存在する。

20

【0162】

プライマーの活性化構成は、プライマーが関心のある標的核酸配列にハイブリダイズし、その後RNase Hまたは別の切断剤が作用して3'ブロック基を除去し、それにより酵素（例えば、DNAポリメラーゼ）が増幅反応においてプライマー伸長を触媒し得る場合に存在する。理論に束縛されることを望まないが、そのようなプライマーのハイブリダイゼーションの反応速度論は、二次反応と類似しており、したがって、混合物中のT細胞またはB細胞遺伝子配列濃度の関数であると考えられる。ブロックされたプライマーは、プライマー伸長が進行し得る前に、標的へのハイブリダイゼーションに続く切断を必要とすることにより、非特異的反応を最小限化する。プライマーが、所望の標的配列に関連するが、塩基対形成ミスマッチをもたらす1つ以上の非相補的ヌクレオチドを有することにより異なる配列に誤ってハイブリダイズした場合は、特に切断部位またはその近くに存在するミスマッチがある場合、プライマーの切断が阻害される。増幅の忠実度を改善するためのこの戦略は、そのような場所での誤ったプライミングの頻度を低減し、それにより反応の特異性を増加させる。当業者により認識されるように、反応条件、特にRNase Hの濃度、ならびに各サイクルにおいてハイブリダイゼーションおよび伸長が行われる時間は、その本当の標的配列に正しくハイブリダイズした場合のプライマーの極めて効率的な切断と、プライマーおよび不完全にアニールされ得るテンプレート配列の間のミスマッチがある場合のプライマーの不良な切断との間の切断効率の差を最大化するように最適化され得る。

30

40

【0163】

参照により全体が組み込まれる米国特許出願公開第US2010/0167353号に

50

記載のように、伸長を防止するためにオリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）の3'末端またはその近くに配置され得るいくつかのブロック基が、当該技術分野において知られている。プライマーまたは他のオリゴヌクレオチドは、例えば、3'デオキシリボヌクレオチド残基（例えば、コルジセピン）、2', 3'-ジデオキシリボヌクレオチド残基、非ヌクレオチド結合またはアルカン-ジオール修飾（米国特許第5,554,516号）の付加により、DNA合成の開始を防止または阻害するために3'末端ヌクレオチドで修飾されてもよい。プライマー伸長を阻害またはブロックするために使用され得るアルカンジオール修飾はまた、Wilk et al., (1990 Nucleic Acids Res. 18 (8): 2065)、およびArnold et al. (米国特許第6,031,091号)により説明されている。好適なブロック基の追加的な例は、3'ヒドロキシル置換（例えば、3-ヒドロキシプロピル等のアルコールとの3'-ホスフェート、3'-トリホスフェートまたは3'-ホスフェートジエステル）、2', 3'-環式ホスフェート、末端RNA塩基の2'ヒドロキシル置換（例えば、ホスフェートまたは立体的にかさ高い基、例えばトリイソプロピルシリル(TIPS)またはtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)を含む。オリゴヌクレオチドの3'端で置換されたTIPSおよびTBDMS等の2'-アルキルシリル基は、参照により本明細書に組み込まれる、Laikhter et al., 米国特許出願第11/686,894号により説明されている。かさ高い置換基はまた、プライマー伸長をブロックするために、オリゴヌクレオチドの3'末端残基の基部に組み込まれてもよい。

10

【0164】

20

ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、プライマー伸長を阻害するために使用されるブロック基の上流側（例えば、5'）に位置する切断ドメインを含んでもよい。例として、切断ドメインは、RNase H切断ドメインであってもよく、または、切断ドメインは、単一RNA残基を含むRNase H2切断ドメインであってもよく、または、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の代替のヌクレオチドによるRNA塩基の置換を含んでもよい。追加の例示的な切断ドメインは、参照によりその全体が組み込まれる米国特許出願公開第US2010/0167353号に記載されている。

【0165】

したがって、多重PCRシステムは、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、45、50、55、60、65、70、75、80、85、またはそれ以上の順方向プライマー（各順方向プライマーは、単一の機能的TCRもしくはIg V断片、または機能的TCRもしくはIg V断片の小ファミリー、例えば、TCR V断片（または例えば配列リストに記載のTCRプライマーを参照されたい）に相補的である）、および、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上の逆方向プライマー（それぞれ、TCRまたはIg J断片、例えばTCR J断片（例えば、配列リストを参照されたい）に特異的である）を使用してもよい。別の実施形態において、多重PCR反応は、それぞれ1つ以上の機能的TCR V断片に特異的である4つの順方向プライマー、およびそれぞれ1つ以上のTCR J断片に特異的である4つの逆方向プライマーを使用してもよい。別の実施形態において、多重PCR反応は、それぞれ1つ以上の機能的V断片に特異的である84の順方向プライマー、およびそれぞれ1つ以上のJ断片に特異的である6つの逆方向プライマーを使用してもよい。したがって、VおよびJプライマーの様々な組み合わせを、多重PCR反応において使用することができる。

30

40

【0166】

いくつかの実施形態において、VおよびJ断片プライマーは、多重PCR反応から複数の単位複製配列を生成するために使用される。ある特定の実施形態において、単位複製配列は、10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、140

50

0、1500から1600ヌクレオチドの長さのサイズ範囲である。好ましい実施形態において、単位複製配列は、50～600ヌクレオチドの長さのサイズを有する。

【0167】

限定されない理論によれば、これらの実施形態は、適応免疫細胞（例えば、TまたはBリンパ球）がその適応免疫受容体コード（例えば、TCRまたはIg）遺伝子を再配列したら、その子孫細胞は同じ適応免疫受容体コード遺伝子再配列を有し、したがって、その中における、本明細書で開示されるようなVおよびJ特異的オリゴヌクレオチドプライマーの特定の対の組み合わせにより増幅され得る再配列された（例えば、CDR3コード）VおよびJ遺伝子断片の存在により一意に特定され得るクローン集団を生じるといふ、当該技術分野における現在の理解（上でも説明されている）を利用している。

10

【0168】

本発明のある特定の実施形態の実践は、異なるように具体的に指定されない限り、当業者の技術の範囲内である、微生物学、分子生物学、生化学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学および免疫学技術における従来の方法を使用し、例示を目的として以下でそのいくつか言及される。そのような技術は、文献中に十分に説明されている。例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001)、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008)、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience、Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. 1 & 2 (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985)、Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY)、Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK、Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992)、Guthrie and Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991)、Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, Ed., 1984)、Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)、Animal Cell Culture (R. Freshney, Ed., 1986)、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)、Next-Generation Genome Sequencing (Janitz, 2008 Wiley-VCH)、PCR Protocols (Me

20

30

40

50

thods in Molecular Biology) (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press)、Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)、the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.)、Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)、Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)、Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986)、Riott, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988)、Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002)、Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006)、Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I I: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006)、Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kursad Turksen Ed., 2006)、Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008)、Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001)、Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008)を参照されたい。

8. コンピュータシステム

【0169】

図12は、一実施形態による、分子検体の分析に使用するためのコンピュータ1200の一例を示すハイレベルブロック図である。チップセット1204に連結された少なくとも1つのプロセッサ1202が示されている。チップセット1204は、メモリコントローラハブ1220と、入力/出力(I/O)コントローラハブ1222とを含む。メモリ1206およびグラフィックスアダプタ1212は、メモリコントローラハブ1220に連結され、ディスプレイデバイス1218は、グラフィックスアダプタ1212に連結される。記憶デバイス1208、キーボード1210、ポインティングデバイス1214、

およびネットワークアダプタ 1216 は、I/O コントローラハブ 122 に連結される。コンピュータ 1200 の他の実施形態は、異なるアーキテクチャを有する。例えば、いくつかの実施形態において、メモリ 1206 は、プロセッサ 1202 に直接連結される。

【0170】

記憶デバイス 1208 は、ハードドライブ、コンパクトディスクリードオンリーメモリ (CD-ROM)、DVD、または固体メモリデバイス等の、非一時的なコンピュータ読み出し可能な記憶媒体である。メモリ 1206 は、プロセッサ 1202 によって使用される命令およびデータを保持する。ポインティングデバイス 1214 は、コンピュータシステム 1200 にデータを入力するために、キーボード 1210 と組み合わせて使用される。グラフィックスアダプタ 1212 は、画像および他の情報をディスプレイデバイス 1218 上に表示する。いくつかの実施形態において、ディスプレイデバイス 1218 は、ユーザによる入力および選択を受容するためのタッチスクリーン機能を含む。ネットワークアダプタ 1216 は、コンピュータシステム 1200 をネットワークに連結する。コンピュータ 1020 のいくつかの実施形態は、図 12 に示されるものとは異なる、および/または他のコンポーネントを有する。例えば、サーバーは、複数のブレードサーバーで形成され、ディスプレイデバイス、キーボード、および他のコンポーネントを有さなくてもよい。

10

【0171】

コンピュータ 1200 は、本明細書で説明される機能を提供するためのコンピュータプログラムモジュールを実行するように適合される。本明細書において使用される場合、「モジュール」という用語は、指定された機能を提供するために使用されるコンピュータプログラム命令および他の論理を指す。したがって、モジュールは、ハードウェア、ファームウェア、および/またはソフトウェアに実装することができる。一実施形態において、実行可能なコンピュータプログラム命令で形成されるプログラムモジュールは、記憶デバイス 1208 上に記憶され、メモリ 1206 内にロードされ、プロセッサ 1202 により実行される。

20

【0172】

いくつかの実施形態において、コンピュータ 1200 は、試験対象の免疫反応を予測するための機械学習アルゴリズムを実行するように設計される。システム 1200 は、ソフトウェアが試験対象の免疫学的状態を決定するためのコンピュータ実装方法の動作を実行することを可能にする。

30

【0173】

いくつかの実施形態において、コンピュータ実装方法は、様々な時点において複数の試料から得られた対照対象のデータを保存するステップであって、前記データは、各試料に対して、前記試料中の複数の一意の再配列された核酸配列の核酸配列情報、前記試料の AIR 配列多様性スコア、前記試料中の各一意の再配列された核酸配列の発生頻度、および前記対象の決定された免疫学的状態を含むステップを含む。

【0174】

コンピュータ実装方法は、プロセッサにより、前記対照対象の前記データに基づいて、試験対象の免疫学的状態を評価するための規則を決定するステップと、免疫治療前および免疫治療後の様々な時点において得られた複数の試料に関する試験対象のデータを入力するステップであって、前記データは、各試料に対して、前記試料中の複数の一意の再配列された核酸配列の核酸配列情報、前記試料の AIR 配列多様性スコア、および前記試料中の各一意の再配列された核酸配列の発生頻度を含むステップと、前記試験対象の免疫学的状態の決定を受信するステップとを含む。

40

【0175】

コンピュータ実装方法は、前記試験対象の免疫治療に対する予測される反応を決定することを含む。一実施形態において、前記対照対象のデータは、免疫治療処置前の時点において前記対照対象から得られた核酸配列情報を含む。別の実施形態において、前記対照対象のデータは、免疫治療処置後の時点において前記対照対象から得られた核酸配列情報を

50

含む。

【0176】

(第1実施形態)

実施例1：感染による死亡率の予測因子としての臍帯血移植後のT細胞受容体多様性

本実施例は、高リスクの血液悪性腫瘍を有する34名の患者が骨髄除去され、次いでダブル臍帯血(CB)単位で移植された臨床試験を説明する。移植後0、28、56、100、180、および360日目に血液試料を回収した。各時点において、ImmunoSeq(商標)ハイスループットT細胞受容体(TCR)配列決定アッセイ(Adaptive Biotechnologies Corp., Seattle, WA)を全ての使用に適用した。T細胞クローン性増殖および何十万ものT細胞クローンの収縮が経時的に追跡され、TCRレパートリー多様性が直接的に測定されるように、ImmunoSeq(商標)データを使用して、前例のない深さで適応免疫系をアッセイした。クローンを追跡する能力を使用して、適応免疫系再構成は激しく振動することが示され、ほぼ完全に新しいレパートリーがCB移植後少なくとも毎月出現した。以前の採血からの最大クローンは、数週間以内に検出可能レベル未満に下降し、健康な患者における最も高いクローンはその後の時点において全て観察されたわけではないが、最高頻度クローンを維持した対照データとは対照的であった。また、本明細書において、ハイスループット配列決定の臨床的応用として、T細胞レパートリーの多様性が免疫能力の尺度であることの実証が説明される。34名の患者のうち、6名の患者は、感染症を原因として100日目から360日目の間に死亡した。56日目および100日目の両方において、これらの6名の患者のそれぞれのT細胞レパートリーの多様性は、残りの患者の平均よりもはるかに低かった(P値=0.015)。移植後2ヶ月までに、TCR多様性は、感染による死亡のリスクを正確に予測した。

10

20

【0177】

造血細胞移植(HCT)を受けている患者は、調整計画から生じる長期間の汎血球減少症および免疫調節異常に続発する感染性合併症による、早期移植後疾患率および死亡率のリスクが増加する。臍帯血移植(CBT)受容者は、早期移植関連死亡率のさらにより高いリスクを有すると考えられ、実際に、最近の研究では、マッチおよびミスマッチ非関連ドナー受容者と比較して、非再発死亡率(NRM)がダブルCBT(dCBT)受容者において最も高いことが示されている。また、いくつかの研究では、CBT後の免疫再構成が、従来ドナー幹細胞源(PBおよびBM)と比べて大幅に遅延され、この患者集団における致命的な感染合併症のリスクの増加にさらに寄与し、また結果として、CBT受容者は、移植後1年目における日和見感染(OI)のより高い発生率を有することが示されている[6~8]。さらに複雑としている問題は、適応免疫系の再構成を適正に測定することができるアッセイの不足であり、これによって、他の多くの寄与する変数(例えば、年齢、HLAマッチ、投薬計画の強度、移植片対宿主病(GVHD)の予防および処置のための併用免疫抑制治療)の設定における、CBT転帰に対する遅延免疫の役割に直接取り組むことが困難となっている。本実施例は、HCTを受けている患者において機能的免疫再構成をより正確に測定し、したがって感染性合併症による死亡の最終的なリスクを決定する能力を実証しており、これは、特にGVHDの予防および処置のための免疫抑制治療の状況において、このリスクの低減を目指した直接的な医学的意思決定に肯定的に影響する。

30

40

【0178】

健康な成人の血液において、個々のT細胞は、主に、何百万もの異なるTCRの1つを発現し、クローンは、同じTCRを発現するT細胞の組である^{1,2}。TCRレパートリーの多様性は、外来病原体に対する十分な保護に必要であることが知られている。これは、原発性または後天性免疫不全疾患(例えば、SCIDS、CVID、およびHIV)を有する高齢の、ならびに造血細胞移植後のヒトにおいて明らかであり、TCR多様性の喪失は、これらの患者において観察される感染症による罹患率および死亡率の増加に關与している。

50

【0179】

ヒトの体内における多数の異なるT細胞クローンに起因して、TCRレポーターの多様性の推定は、一般に、間接的に、および低い感度で外挿されるのみであった。したがって、従来の多様性の推定は、臨床上の意思決定において、または、例えば免疫能力のレベルに関連した感染性合併症に対する患者のリスクの指針としての細胞適応免疫系の健康の評価において、または、免疫能力のレベル自体の決定において不十分である。以前のアプローチのこれらの欠点に対応するために、細胞適応免疫系の健康の直接的評価において使用するためのT細胞レポーターの多様性の直接的決定を可能とする、単一試料から数百万ものTCRを配列決定するためのハイスループット方法の適用が、本明細書において説明されている。この情報は、後天的または先天的な免疫抑制の状況における臨床的意思決定の指針を提供する。

10

【0180】

本明細書において説明されるように、T細胞レポーター多様性は、骨髄破壊的CBT後の免疫再構成の直接的測定を提供する。TCR多様性は、CBT受容者において、移植から28、56、および100日後の時点で測定され、非再発死亡率(NRM)を予測するものであることが示された。さらに、免疫再構成の動力学をより良く理解するために、定量的TCR配列多様性および分布データが各時点において得られ、何十万ものT細胞クローンの増殖および収縮を同時に追跡するために使用された。

【0181】

方法

20

【0182】

試験デザイン。骨髄破壊的単一またはダブルCBTを受けている患者が、この(予め収集されたデータの)レトロスペクティブ分析に適合する。全ての患者は、試験の施設内倫理委員会により承認された試験への参加に対する署名入りの同意書を提出した。

【0183】

患者、処置計画および移植後の支持療法。45歳以下の年齢の血液悪性腫瘍を有する患者が、好適なHLAマッチ関連または非関連ドナーを有さない場合、骨髄破壊的CBTを受けた。患者の基礎疾患は、以前に説明された基準[17]に基づいて、標準またはハイリスクとして分類された。患者は、施設の優先性基準により決定されるように、単一またはダブルCB移植を受けた。全てのCB単位は、HLA-AおよびHLA-Bの中間的分解能レベル、およびHLA-DRB1の対立遺伝子レベル(高分解能)でHLA分類され、また全てのCB単位は、6HLA遺伝子座の4以上で受容者にマッチする必要があった。TCR分析用に移植前血液試料が保存されていない、または28日目以前に死亡した患者は除外した。

30

【0184】

骨髄破壊的調整は、シクロホスファミド(Cy)(全120mg/kg)、4日間にわたる多分割全身照射(TBI)(全部で13.2Gy)、およびフルダラビン(Flu)(全75mg/m²)、またはトレオスルファン(Treo)(全42gm/m²)、Flu(全150mg/m²)、および単回の2Gy TBIからなっていた。全ての患者は、-3日目に開始するシクロスポリン-A(CSA)およびミコフェノール酸モフェチル(MMF)によるGVHD免疫学的予防を受けた。全ての患者は、経過観察中に標準的な予防的抗菌剤および抗真菌剤を受け[18]、移植後最低100日間、施設に留まった。患者は、少なくとも週1回、臨床評価および経過観察のために診察された。臓器病変の段階に基づく標準的基準を使用して、急性GVHDが等級付けされ、急性GVHDグレード0~IVと分類された[16]。

40

【0185】

ImmunoSeq(商標)アッセイおよび移植後免疫再構成の評価末梢血単核細胞(PBMC)から抽出されたゲノムDNAからのTCR(TCRB)のハイスループット配列決定のためのImmunoSeq(商標)アッセイを使用した免疫回復のレトロスペクティブ分析のために、移植後28、56、80~100、180日目、ならびに1年お

50

よび2年目、さらに移植前に、末梢血を採取した。試験に参加した生存患者における各時点からの約250,000のPBM Cから、TCR 遺伝子のCDR3領域の配列決定を行った。TCR CDR3領域は、IMGTコラボレーション³に従い定義され、V 遺伝子断片の3部分によりコードされた第2の保存システインで開始し、J 遺伝子断片の5部分によりコードされた保存フェニルアラニンで終了する。これらのコドンの間のヌクレオチドの数が長さを規定し、したがってCDR3領域のフレームを規定した。TCR CDR3領域は、以前に説明されたプロトコル(Robins et al., 2009 Blood 114, 4099、Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64、Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001、Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61、U.S.A.N. 13/217,126、U.S.A.N. 12/794,507、国際公開第WO/2010/151416号、国際公開第WO/2011/106738号(PCT/US2011/026373)、国際公開第WO2012/027503号(PCT/US2011/049012)を使用して、増幅および配列決定された。簡潔に説明すると、それぞれTCR V 断片に特異的な52の順方向プライマー、およびそれぞれTCR J 断片に特異的な13の逆方向プライマーを使用して、全ての可能な再配列されたゲノムTCR 配列を増幅するために、多重PCR法が使用された。長さ60bpの配列リードは、Illumina HiSeq(商標)System(Illumina, Inc., San Diego, CA)を使用して得られた。Raw HiSeq(商標)配列データを前処理して、各リードの一次配列におけるエラーを除去し、データを圧縮した。最近傍アルゴリズムを使用して、密接に関連した配列をマージすることによりデータを一意の配列に折り畳み、PCRおよび配列決定のエラーの両方を除去した。

【0186】

統計的考察。試料サイズの制限に起因して(56日目以降の6つのNRMを含む34名の患者)、標準的Cox比例ハザードモデルは、情報を提供しなかった。試料サイズを考慮して、骨髄破壊的単一またはダブルCBTを受けている患者からの血液試料において、56日目(または100日目)における患者のT細胞レパートリーのより低い多様性は、NRMによる死亡を予測するものであるという仮説を確実に試験するために、試験を強化した。患者間のTCRレパートリーサイズの分布は、十分に特性決定されなかったため、片側ノンパラメトリックマン-ホイットニーU検定を使用して、最終的にNRMに罹患した患者がより低い値のTCRレパートリー多様性を有するかどうかを決定した。多変数モデルにおいて全ての可能な交絡因子を評価することはできなかったが、それぞれの可能な交絡因子を別個に分析した。バイナリデータに対しては両側のフィッシャーの正確確率検定を使用し、連続データに対しては両側マン-ホイットニーU検定を使用した。

【0187】

結果

【0188】

試験コホート患者(N=34)およびドナーの特性は、表2に概説される。患者は、高リスク血液悪性腫瘍、原発性急性リンパ芽球性または骨髄芽球性白血病(N=26)の処置のために移植を受けたが、12名の患者はCR1、および14名はCR2以上であった。表2は、患者の人口統計、診断、および臨床経過を要約している。全ての患者に対する処置計画は、移植後の最初の56日間は同様であった。34名の患者のうち、31名はGVHDを有し、そのうち6名がグレードIII~IVであり、したがって、全ての患者がコルチコステロイドで予防的に処置された。

分析に含まれる34名の患者のコホート特性

【表 2】

患者の年齢、平均年齢 (範囲)	27 (1~58)
経過観察、平均日数 (範囲)	369 (34~1657)
Kg での患者の平均体重 (範囲)	75.3 (22.5~114.4)
疾患、数 (%)	
AML	16 (47)
ALL	10 (29)
MDS/MPD	6 (18)
その他	2 (6)
微小残存病変 (MRD)	17 (50)
移植の種類、数 (%)	
FLU/CY/TBI 1320 cGy †	24 (71)
TREO/FLU/TBI 200 cGy ††	10 (29)
GVHD 予防、数 (%)	
シクロスポリン/ミコフェノール酸塩	34 (100)
受容者の CMV 血清状態、数 (%)	
陽性	22 (64)
陰性	12 (36)
HLA 格差、数 (%) §	
4/6	20 (60)
5/6	11 (31)
6/6	3 (9)
患者当たりの注入した CB 単位の数	
1	2 (6)
2	32 (94)
急性 GVHD	
グレード II 以下	25 (73)
グレード III~IV	6 (18)

10

20

【0189】

表 2 中、ALL = 急性リンパ性白血病、AML = 急性骨髄性白血病、MDS / MPD = 骨髄異形成 / 骨髄増殖性疾患、FLU = フルダラビン、CY = シトキサン、TBI = 全身照射、TREO = トレオスルファン、GVHD = 移植片対宿主病、CMV = サイトメガロウイルス、CB = 臍帯血、CR = 完全寛解、MRD = 微小残存病変である。† = フルダラビン $75 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、シトキサン $120 \text{ mg} / \text{kg}$ 、TBI 1320 cGy 。†† = トレオスルファン $42 \text{ gm} / \text{m}^2$ 、フルダラビン $150 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、TBI 200 cGy 。§ = HLA マッチングは、2 単位の最低 HLA マッチを反映する。

30

【0190】

試料採取。本試験に含まれる全ての患者は、移植前、ならびに移植後 + 28、56、80 ~ 100、180 日目、および生存した者に対しては 1 年後に採血された。各血液からの百万を超える PBMC のアリコート、ImmunoSeq (商標) アッセイを使用した TCR DNA の大規模配列決定のために、Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA) に送付した。試料間の直接比較を可能とするために、一定量の DNA を ImmunoSeq (商標) アッセイに入力した。さらに、T、B および NK 細胞のパーセントおよび絶対数、ならびに免疫グロブリンレベルを、各試料に対して評価した。

40

【0191】

細胞適応免疫系の免疫再構成の動力学。TCR 遺伝子の膨大な数の潜在的再配列を考慮して、各クローンは事実上一意の TCR 配列を有することが示唆された。これらの配列は、それぞれの固定された時点でのクローン分布の特性を決定することに加え、クローン性増殖および収縮が経時的に追跡され得るような、各クローンの分子識別子であった。

【0192】

50

処置前レパートリーとの重複。 T C R 配列を分子タグとして使用して、何十万もの T 細胞クローンを時間にわたり追跡した。34名の患者の全てが、移植前に骨髄破壊的手順を受けたため、処置前レパートリーの非常に限定されたサブセットが、骨髄破壊後に持続すると推定された。驚くべきことに、骨髄破壊的処置後に残ったクローンの割合は幅広く変動し、34名の患者のうち3名において、180日目における T C R レパートリーの 10%以上が、処置前（宿主）免疫系から得られた。

【0193】

しかしながら、ほとんどの患者において、事前に存在するクローンは、移植後にほとんど、または全く残留しなかった。図1は、患者および時点にわたる移植後に持ち越された T C R レパートリーの割合を示す。移植後に持続する移植前クローンの割合は、移植後の各時点で観察された移植前クローンの割合の間の強い相関により明らかなるように経時的に安定しており（例えば、28日目および100日目における残留物の割合の間で $r = 0.9$ ）、ほとんどの患者において約 0.001 であり、平均して 1000 のうち約 1 つの T 細胞が、移植前に観察されたクローンの一部であることを示していた。Immunoseq（商標）ハイスループット T C R 配列決定アッセイを使用したクローンの分析は、以前の方法により測定されるようなマイクロキメリズムとは異なる結果をもたらした。T C R 再配列のプロセスは、DNA レベルでの実質的なクローン同一性が、生存宿主 T 細胞の非存在下で偶然観察され得る可能性を低下させた。したがって、これらの結果は、Immunoseq（商標）高品質 T C R 配列決定法が、以前はいかなる宿主 T 細胞も保有しないと考えられていた一部の患者において、マイクロキメリズムを検出したことを示した。

10

20

【0194】

移植後のクローンの追跡。 再構成適応免疫系の経時的安定性を評価するために、早期時点において見出された T C R クローンの持続性を、後の試料において調査した。移植後 28、56、100、180、および 365 日目で試料が採取および配列決定された患者のみを使用して、上位 10 の T C R クローンを、28、56、100 および 180 日の時点での各患者における頻度により決定し、これらのクローンのそれぞれの配列を、持続的または一時的なものとして分類した。後の時点において（任意の頻度で）観察された上位 10 の T C R クローンは、持続的であるとみなされ、同じ患者からの試料において二度と観察されなかったクローンは、一時的であるとみなされた。

30

【0195】

図2は、移植後の各時点での、上位 10 における一時的 T C R クローンの平均数を示す。移植後 28 および 56 日目において、動的で極めて不安定な T C R レパートリーが観察され、初期試料において高頻度で存在した多くの T C R クローンは、その後再び観察されることはなかった。移植後 100 日目以降、このパターンは消失し始め、患者の T C R レパートリーはより安定化した。このパターンが極めて異常であることを確認するために、同じ期間にわたり、4名の健康な対照対象から P B M C 試料を配列決定した。上位 10 の一時的 T C R クローンの平均数は、これらの健康対照に対して各時点において 0 であり、移植後の一時的 T C R クローンの高い発生率が、異常に不安定な T C R レパートリーを示すという仮定が確認された。以前には、幹細胞移植後の T 細胞において高い割合のアポトーシス広がったことが示されている。⁴ ここで、このアポトーシスプロセスが、クローンを構成する T 細胞に関して無作為ではないが、クローン全体の急速な増殖および収縮として生じることが示された。

40

【0196】

移植後の T 細胞クローン多様性の変化。 未発見種分析 (Robins et al., 2009 Blood 114, 4099) を使用して全血における多様性の下限を推定するために、T 細胞クローンの分布を使用した。多様性の推定は、各時点に対して計算された。

【0197】

図3は、このコホートにおける、移植後 1 年目の間の T C R レパートリーにより測定されるような免疫再構成の概要を示す。多様性メトリクスの幾何平均が各時点において示さ

50

れ、再構成の一般的経過を示している。骨髓破壊的調整計画は、移植前の値からのTCR多様性の大幅な低下をもたらした。多様性は、移植前の値から28日目まで低下したが、これは、ほとんどの患者における生着までの平均時間に近かった（生着時間は、7から45日の範囲であり、平均は24であった）。患者のこのコホートにおいて、TCR多様性は、移植後56日でその最低値に達し、それから移植後1年までに、TCRレパトリー多様性の実質的增加まで徐々に回復し始めた。しかしながら、この回復にもかかわらず、患者TCRレパトリーは、1年間の試験の終わりまでに、健康なレパトリーよりもまだはるかに低い多様性を有していた。

【0198】

TCR多様性の観察される変化のいくつかは、絶対的T細胞カウントの変動により説明され得る。極端には、患者が非常に少ないT細胞を有する場合、そのような患者のTCR多様性は制限された。56日目において、患者の一部は、非常に低いCD3カウントを有し、したがって、低い多様性を有していた。しかしながら、多様性と絶対的CD3カウントとの間の相関は、残りのコホートにおいては弱かった（ $r = 0.05$ 、図5）。例えば、このコホートにおいて、極めてオリゴクローン性のTCRレパトリー（少数の極めて増殖したクローン）に伴って、より高い絶対的CD3カウントを有するが多様性をほとんど有さない患者が存在した。

【0199】

感染による死亡の予測因子としてのTCR多様性。本試験における34名の患者のうち、15名は、移植後1年目に死亡した。これらの患者のうち6名における唯一の死因は疾患の再発であり、残りの9名の患者においては、死亡は主に感染を原因とした。移植後の感染性合併症は、予想外または珍しいことではなかった。しかしながら、本開示の前には、移植後にどの患者が致死的な感染症により死亡する増加したリスクを有するかを評価するための強力な予測値を有する具体的測定法がなかった。そのような予測能力は、幹細胞移植後の患者の医学的管理を変更し得る。したがって、TCR多様性のこの直接的測定法を、感染症と闘う適応免疫系の能力の情報を提供する予測因子としてのその可能性について分析した。移植後の早期時点（56日目および100日目）におけるT細胞レパトリーの多様性は、確かに、再発以外の原因による死亡の強力な予測因子であった。移植前のT細胞多様性の測定は、予測値への傾向を示したが、このコホートにおいて統計的有意性に達しなかった。また、28日目のデータは、おそらくはこの時点でのTCRレパトリー多様性が、注入前に分化した移植片からのT細胞により支配的であった可能性があり、したがって本当の免疫再構成を反映しなかったことに起因して、有意な予測値を有していない。しかしながら、100日目以降に最終的に再発以外の原因で死亡した患者は、早くも移植後56日目に大幅に低減されたTCR多様性を示した（図4を参照されたい）。NRM（再発以外による死亡）により死亡した患者からのデータは、測定された各時点においてTCR多様性のより低い推定を一貫してもたらしたが、この関係は、患者の免疫再構成が生着後に本格的に開始した56日目においてのみ、統計的有意性に到達した（片側マン-ホイットニーU検定を使用して計算、 $p = 0.0153$ ）。引き続いてNRMにより死亡した患者のTCR多様性における大きな差異は、移植後100日目も持続した（ $p = 0.0153$ ）。56日目には生存していたが、最終的には感染症を原因として死亡した6名の患者のうち5名は、180日を通して生存し、これは、28日から56日の間の高リスク状態の臨床的特定が、予防的な臨床的介入のための十分な時間を可能とすることを示していることに注目すべきである。

【0200】

感染症による死亡の予測因子としての他の因子。移植後の免疫回復は、多くの因子により影響され、最も有意には、GVHDの予防および処置のための免疫抑制治療（IST）の使用、特にステロイドの使用により影響される。感染のリスクの予測におけるTCR多様性の直接的測定の実用性を決定するために、ISTによる処置の差および全絶対的CD3カウントを中心として、可能な交絡因子の役割を評価した。処置後平均23日目にGVHDを発症した27名の患者がいた。これらの患者を、まずプレドニゾンで処置した。

10

20

30

40

50

【0201】

TCR多様性測定の臨床転帰との相関における別の主要な交絡因子は、全CD3+細胞の回復であった。TCR多様性の臨床転帰との相関は、それが末梢血中の全T細胞の計数により得られた結果を単純に反復する場合、実用性が限られる。絶対的CD3+細胞/μlにより測定されるようなT細胞回復の反応速度を、TCR多様性の測定と同時に末梢血において測定した。図5は、絶対的CD3+カウントが、推定TCRレパートリー多様性と非常に弱く相関したことを示し、これらの2つのメトリクスが、本質的に独立していたことを示している。実質的に低下した絶対的T細胞カウントは、必然的に、低い多様性を有するTCRレパートリーの決定をもたらすため、この相関は、ほとんどの場合、絶対的CD3+細胞カウントの下限近くの試料により引き起こされた。しかしながら、それにもかかわらず、より高い絶対的CD3+カウントにおいては、オリゴクローン性T細胞集団は非常に低いTCR多様性を有し、したがって日和見病原体に対する保護を提供しなかった可能性が依然としてあった。

10

【0202】

表3は、移植後56日目および100日目からのデータを使用して、TCR多様性メトリクスと共にCD3+カウントを分析した際に得られた結果を要約している。表3中、各試料には、両方のメトリクスに対して高い（平均以上の）群または低い（平均未満の）群が割り当てられ、各カテゴリーに含まれるNRMによる最終的な死亡数が比較された（56日目まで生存した6名の中から）。さらに、表3は、NRMにより死亡する患者がより低い値の絶対的CD3+カウントまたはTCR多様性を有する傾向があったという仮説の、マン-ホイットニーU検定の片側p値の結果を示している。TCR多様性メトリクスは、早くも移植後56日目には臨床転帰の予測因子であったが、一方絶対的CD3+カウントは、その時点では情報を提供しなかった。さらに、移植後100日目では、多様性は、CD3+カウントよりも有意に臨床転帰に相関した。再発のみにより死亡した6名の患者のレパートリーもまた分析した。絶対的CD3+カウントもTCRレパートリー多様性も、このコホートにおける再発による死亡を予測しなかった。

20

移植後56日目および100日目における、CD3+（全T細胞）カウントおよび推定TCRレパートリーサイズの比較。

【表3】

非再発死亡率、CD3+カウント対TCRレパートリーサイズ			
CD3+細胞/cm ³	高	低	p値
移植後56日目	3/15	3/14	0.139
移植後100日目	1/15	5/14	0.021
推定TCRレパートリーサイズ	高	低	p値
移植後56日目	1/15	5/14	0.015
移植後100日目	1/15	5/14	0.015

30

【0203】

各メトリクスの数は、高い（平均以上の）カテゴリーまたは低い（平均未満の）カテゴリーに含まれる非再発死亡の数（n=6）を表す。右側には、片側マン-ホイットニーU検定のp値が示されている。全T細胞カウントは、移植後56日目では臨床転帰を予測せず、移植後100日目では、推定TCRレパートリーサイズよりも弱い臨床転帰の予測因子であった。

40

【0204】

GVHD処置および全CD3+カウントに加えて、TCR多様性測定の臨床転帰との相関はまた、任意の数の他の変数により引き起こされた可能性がある。表3は、56日目まで生存したが、最終的に再発以外の原因により死亡した6名の患者の、56日目において生存していた25名の他の患者に対する比較を示す。TCR多様性メトリクスと同様の様

50

式で、これらの群の間でいくつかのメトリクスを評価した（カテゴリーデータに対してはフィッシャーの正確確率検定を使用し、連続データに対してはマン-ホイットニー-U検定を使用した）。いずれも、このコホートにおいて統計的有意性に到達せず、多くはNRMと全く関連しないようであった。6名のNRM患者は、他の患者よりも幾分高齢であり（ $p = 0.051$ ）、これは、媒介として機能するTCR多様性を有する、または有さない、NRMとの弱い相関を示し得る。これらの結果は、TCRレパトリー多様性が非再発死亡率の統計的に有意な予測因子であるこのコホートにおいて、非再発死亡率が、我々が試験した他の変数のいずれによっても容易に予測され得なかったことを示している。

【0205】

本試験は、有害な臨床転帰、特に骨髄破壊的臍帯血移植を受けている患者における感染性合併症の増加したリスクに関連する、免疫再構成の直接的なTCR配列ベースの尺度を使用した。CBTの受容者は、造血および免疫回復の遅延の増加したリスクを有し、これらの患者の全生存率の改善は、好中球および免疫系回復の反応速度を向上させ得る戦略に依存していた。造血回復の直接的尺度は、単純であり、完全血球カウントを得ることにより十分確立されている。しかしながら、特に、T細胞数と対照的に、T細胞機能に関する免疫系回復の直接的な尺度は、本開示以前にはなかった。したがって、GVHDの予防および処置のための医薬品に関して、標準治療がある。しかしながら、全ての患者が等しく移植後に合併症を発症するリスクを有するわけではなく、全ての患者が等しく医学的介入に反応するわけではない。ImmunoSeq（商標）アッセイを使用した本明細書に記載のような免疫回復の新規な測定は、患者が感染によるNRMのより高いリスクを有すると特定された場合、抗菌的予防に関してだけでなくISTの管理に関して、個々の患者の医学的管理の調整を可能にする。このリスクの直接的な尺度は、医学的管理を劇的に変化させる。

10

20

【0206】

ここで、34名の患者のコホートにおいて、ハイスループットT細胞受容体配列決定を使用した免疫再構成の測定と非再発死亡率との間に有意な相関が実証された。循環T細胞におけるTCR再配列の低い多様性により測定されるような免疫再構成の遅延が、患者を感染性疾患による合併症の高いリスクにさらすという理解は、この結果と一致している。これらの結果は、CD3+細胞カウントにより、または小コホートにおいて測定されたいくつかの他の変数のいずれかにより自明には再現され得ない。この結果は、全T細胞内コンパートメントを分析することにより得られたが、免疫再構成の反応速度論および臨床的意義は、T細胞サブセット間（例えば、CD4+対CD8+T細胞）で異なることが知られている⁵。したがって、HTSを使用したT細胞サブセットの再構成の調査は、追加的な洞察を提供し得る。

30

【0207】

この結果は、高いTCR多様性が、骨髄破壊的臍帯血移植を受けている患者から採取された血液試料においてより良好な転帰と関連することを示した。したがって、TCR多様性は、将来の感染性合併症のリスクに基づいて、移植後すぐに患者を階層化するための極めて有用な尺度である。したがって、患者が移植後2ヶ月から3ヶ月までにTCR多様性の閾値に達しなかった場合、その患者は、耐容可能なようにISTをより速く中止することから恩恵を受けることができ、および/または、抗菌予防によってより積極的に処置され得、および/または、免疫再構成が十分なレベルに到達するまでより長期間観察下に維持され得る。本試験において、低下したTCR多様性は、数ヶ月非再発死亡に先行することを考慮して、この目安は、そのような予防的対策のための十分な時間を可能とするはずである。しかしながら、高リスク患者の特定に加えて、ここで説明される免疫再構成の確実な測定は、各患者に対し同じ期間の投薬計画を施すのではなく、患者が予防的処置を中止するのに十分な免疫再構成を達成した時期を決定するのに助けることができる。

40

【0208】

（第2実施形態）

実施例2：免疫治療反応者の予測因子としてのT細胞受容体レパトリー分布

50

免疫治療の開始前および開始後にCTLA-4阻害剤またはPD-1阻害剤を受容する候補であるがん患者から得られた血液および固形腫瘍試料において、T細胞受容体多様性および分布を上述のように決定した。各免疫治療薬剤の効能は、標準的な腫瘍学的臨床基準（対象を反応者または非反応者として分類する）により独立して評価され、各患者の適応免疫系の免疫治療に有益に反応する相対的能力は、免疫治療前のTCRレパートリーの分布の修正されたエントロピー計算により予測されることが示された。

【0209】

免疫治療（抗CTLA-4 mAb）の開始前、反応者は、非反応者に比べて、血液および腫瘍試料中に存在するリンパ球における比較的より高いTCR配列多様性、およびより平坦なTCR分布プロファイルとして観察されるより高いTCR配列分布エントロピーを示した。

10

【0210】

図6に示されるように、血液試料からのTCRコードDNAの定量的配列決定の結果は、より高いTCR配列多様性およびより高いTCR配列分布エントロピーを示す低いTCRレパートリークローン性が、免疫治療（抗-CTLA-4 mAb）反応者状態の予測因子であったことを示している。図6はまた、より低いTCR配列多様性およびより低いTCR配列分布エントロピーを示す高いTCRレパートリークローン性が、免疫治療非反応者状態の予測因子であったことを示している。

【0211】

図7は、腫瘍組織試料からのTCRコードDNAの定量的配列決定からの結果を示す。図7は、免疫治療（AT）前に得られた腫瘍試料において検出されたTCRクローン性のレベルと比較した、免疫治療（抗CTLA-4 mAb）（DT）を施した後に得られた固形腫瘍組織試料中に存在するリンパ球におけるTCRクローン性の増加を示している。試料は、反応者対象から得られた。図7は、免疫治療処置が、対象のT細胞レパートリーに顕著な影響を与えたことを示している。

20

【0212】

図8において、個々のTCRクローン提示の動力学が、免疫治療（イピリムマブ（抗CTLA-4 mAb）による処置）前および免疫治療後に得られた血液試料および腫瘍試料において、時間の関数として調査されている。時点A、B、およびCは、血液試料から採取された時点である。時点Aは、免疫治療前であり、時点BおよびCは、免疫治療計画開始後の2つの時点である。時点AT、BT、CTは、対化腫瘍試料である（ATは免疫治療前であり、時点BTおよびCTは、免疫治療計画開始後の2つの時点である）。データ点の各線は、単一クローンに従う。時点CTにおける矢印は、治療前はその相対的存在度において顕著ではなかったが、治療後に腫瘍試料において相対的頻度が増加し、時点CTにおいてレパートリーの10%を占めた単一クローンを示す。時点AおよびBにおいて血液中ですべてのTCR配列の7~9%を占めた2つのクローン（X1およびX2）は、その後、相対的存在度において有意に低下し、一方、血液中ですべては非常に低い頻度を有していたいくつかのT細胞受容体配列は、時点Cまでに有意に増加した。時点Aにおける腫瘍試料中の3つの最も多数のクローンは、後の時点において決定されるように、その後の相対的提示において有意に減少した。

30

40

【0213】

図6~8で使用されたのと同じ免疫治療薬剤を使用した別個の試験において、TCR配列多様性および分布エントロピーを、免疫治療の開始前（時点A）ならびに開始後（時点BおよびC）に得られた血液試料において決定した。結果は、経時的な個々のTCRクローン提示の動力学を示す図9に要約される。矢印は、免疫治療前は高度に提示されなかったが、治療後に有意性が増加し、時点Cにおいてレパートリーの10%超を占めた単一クローンを示す。

【0214】

図8および9において示されるように、免疫治療の副作用は、単一またはいくつかのクローンの発生頻度が、レパートリーにおける他のクローンの発生頻度よりも統計的に有意

50

に高くなるような、対象の血液中の単一またはいくつかのクローンの増殖となり得る。いくつかの実施形態において、単一クローンの発生頻度は、所定の閾値よりも高く、例えばレパトリーにおけるクローンの発生頻度の上位4分の1より高く決定される。図8および9において、免疫治療処置後のレパトリーの10%超を占める単一クローンは、統計的に有意に異なり、対象による不良な反応の指標である。例えば、免疫治療前の発生頻度における1%未満のクローン頻度、およびレパトリーにおける発生頻度の1%超までの頻度のスパイクは、対象における不良な転帰の指標である。これは、単一クローンの増殖（高いクローン性）およびレパトリーの低い多様性の状況を与え、不良な反応および転帰をもたらす。単一またはいくつかのクローンがレパトリーと比較して統計的に有意により高い発生頻度を示す状況においては、免疫反応（例えば炎症等）を低下させるための

10

【0215】

（第3実施形態）

実施例3：免疫治療反応の予測因子としてのT細胞受容体クローン性。

別の例において、免疫治療（抗PD-1抗体による処置）を受けている末期転移黒色腫患者において、TCRB遺伝子座のハイスループット配列決定を使用して試験を行い、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）のレパトリーを特性決定した。この試験の目標は、処置前腫瘍生検の（TCRB配列決定による）免疫学的プロファイリングを使用して、ハイスループット配列決定による腫瘍内T細胞レパトリーの特性決定が、臨床的転帰（すなわち、薬物反応）を予測するのに十分であるかどうかを決定することであった。

20

【0216】

免疫治療の開始前にPD-1阻害剤（ラムプロリズマブ）を受容する候補である転移黒色腫患者から得られた固形腫瘍試料において、T細胞受容体多様性および分布を決定した。PD-1（プログラム細胞死タンパク質1）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである1型膜タンパク質であり、B細胞分化において役割を果たすと考えられている。

【0217】

免疫治療処置の効力は、標準的な腫瘍学的臨床基準により独立して評価された。対象は次のように特性決定された：反応者（患者腫瘍負荷の低減を示す「部分的反応」および腫瘍負荷の低下のない進行の喪失を示す「安定な疾患」に分類される）または非反応者（継続的な疾患の進行）。免疫治療に対して有益に反応する各患者の適応免疫系の相対的能力は、免疫治療前のTCRレパトリーの分布の修正されたエントロピー計算により予測されることが示された。

30

【0218】

修正されたエントロピー計算（「クローン性」）が使用され、各腫瘍試料において観察された一意のTCR再配列の数を考慮することにより、その腫瘍試料のTCR配列分布エントロピーが範囲（0～1）に正規化され、高い正規化エントロピーが低いクローン性となるように、またその逆となるように反転された。免疫治療の開始前、免疫治療に反応する患者は、非反応者に比べて、腫瘍生検試料中に存在するリンパ球において比較的より高いTCR配列分布クローン性を示した。

40

【0219】

簡潔に説明すると、悪性病変生検からの凍結組織試料が、抗PD-1抗体（転移黒色腫に罹患した患者に対し免疫治療薬剤として投与される）の投与前の12名の患者に対して調製された。組織試料（黒色腫病変からの生検）はまた、抗PD-1免疫治療中および治療後に採取された。その後、ゲノムDNAがこれらの組織試料から抽出された。ハイスループットTCRB配列決定のためのImmunoSEQプラットフォームを使用して、各試料におけるTILのレパトリーを特性決定し、（1）腫瘍内リンパ球浸潤の程度、および（2）腫瘍内リンパ球レパトリーのクローン構造を決定した。

【0220】

50

試験した12名の患者のうち、8名が処置に反応し（疾患の安定化または部分的反応）、一方4名は反応しなかった（疾患の進行）。凍結腫瘍組織生検からのTCRコードDNAの定量的配列決定の結果は、図10Aに示される。

【0221】

図10Aは、少数の高度増殖T細胞クローンにより特徴付けられるTCRレパートリーを示す、高い腫瘍内TCRレパートリークローン性（低いAIR配列多様性）が、この12名の患者のコホートのレトロスペクティブ試験における免疫治療反応者状態の統計的に優位な予測因子であったことを示している。TCRレパートリークローン性の平均および標準偏差（各試料中に存在する一意のTCR配列の数を考慮することにより範囲（0～1）に正規化されたTCR配列分布エントロピーに基づく修正されたメトリクス）が、免疫治療に対する反応に従い示されている。TCR配列分布クローン性は、反応しなかった4名の患者と比較して、反応した8名の患者において有意により高かった（両側の対応のないt検定により $p = 0.015$ ）。

10

【0222】

図10Bにおいて、T細胞浸潤が12名の患者のコホートにおいて評価された。T細胞浸潤の平均および標準偏差（2倍体ゲノム当たりのT細胞受容体再配列として測定される）は、免疫治療に対する反応に従い示されている。Tリンパ球浸潤のレベルは、反応しなかった4名の患者と比較して、反応した8名の患者においてより高かった（両側の対応のないt検定により $p = 0.056$ ）。

20

【0223】

第1のコホート（処置前および処置後腫瘍生検のない12名の患者）からのデータは、処置前腫瘍生検からの2つの因子（低レベルのT細胞浸潤および極めて多様性の浸潤T細胞レパートリー）が、処置に反応しないこと（すなわち、安定または改善している疾患状態とは対照的に進行すること、図10A、10B）に関連することを示唆していた。

【0224】

第2の試験において、13名の追加的患者の確認コホートが評価され、処置前腫瘍生検のみが配列決定された。図11Aにおいて、TCRレパートリークローン性および免疫治療への反応が、コホート1、2、および組み合わせられたコホートに対して評価された。TCRレパートリークローン性の平均および標準偏差（各試料中に存在する一意のTCR配列の数を考慮することにより範囲（0～1）に正規化されたTCR配列分布エントロピーに基づく修正されたメトリクス）が、コホート1（無地の四角）、コホート2（斜線縞模様の四角）および組み合わせられたデータ（水平線縞模様の四角）における免疫治療に対する反応に従い示されている。TCR配列分布クローン性は、反応しなかった患者と比較して、反応した患者においてより高かった（両側の対応のないt検定により、組み合わせられたデータにおいて $p = 0.00065$ ）。

30

【0225】

図11Bにおいて、T細胞浸潤は、患者群において評価された。コホート1（無地の四角）、コホート2（斜線縞模様の四角）および組み合わせられたデータ（水平線縞模様の四角）における免疫治療に対する反応に従い、T細胞浸潤の平均および標準偏差（2倍体ゲノム当たりのT細胞受容体再配列として測定）が示されている。Tリンパ球浸潤のレベルは、反応しなかった患者と比較して、反応した患者においてより高かった（両側の対応のないt検定により、組み合わせられたデータにおいて $p = 0.0015$ ）。

40

【0226】

図11Cは、T細胞浸潤およびTCRレパートリークローン性のレベルに関する、（全25名の患者のうちの）各患者のランクの比較を示す。反応者（菱形）と比較して、非反応者（丸）は、低いTCRレパートリークローン性および低レベルの浸潤Tリンパ球への傾向を同時に示す。

【0227】

13名の患者の第2のコホートからのデータは、12名の患者のコホートからの最初のデータと完璧に近い一致を見せた（図11A～C）。しかしながら、これらのデータは共

50

に、免疫治療前の黒色腫生検におけるT細胞浸潤物の配列決定の結果が、免疫治療に対する患者の反応に極めて相関しており、患者毎に免疫治療の効果を予測するための潜在的バイオマーカーを提供することを示している。

【0228】

上述の様々な実施形態は、組み合わせられてさらなる実施形態を提供し得る。本明細書において参照される、および/または出願データシートにおいて列挙される、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許文献は全て、参照することによりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。実施形態の態様は、様々な特許、出願および出版物の概念を使用してさらなる実施形態を提供するために、必要に応じて修正され得る。これらの、および他の変更は、上で詳述された説明に照らして実施形態に対し行うことができる。

10

【0229】

一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を本明細書および特許請求の範囲において開示される特定の実施形態に制限するものとして解釈されるべきではなく、そのような特許請求の範囲の対象となる全範囲の均等物と共に、全ての可能な実施形態を含むものとして解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示により限定されない。

参考文献

20

1. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:2265-2275.

2. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment related-mortality and survival. *Blood* 2001;100:1611-1618.

30

3. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97:2962-2971.

4. Grewal SS, Barker JN, Wagner JE, et al. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003;101:4233-4244.

40

5. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:2276-2285.

6. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host-disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transp

50

- lantation. Blood 2000;96:2703-2711.
7. Barker JN, Hough RE, van Burik JA, et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11:362-37.
8. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soud eyns H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in paediatric umbilical cord blood transplantation. J Leukocyte Biol. Prepublished on March 2nd, 2011. 10
9. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. Blood. 2007;110(8):3064-3070.
10. Cornetta K, Laughlin M, Carter S, et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2005;11:149-160. 20
11. Long GD, Laughlin M, Madan B, et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2003;9:772-780.
12. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. Clinical immunology. 2008;127:286-297. 30
13. Sauter C, Abboud M, Barker JN, et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2011;17:1460-71.
14. Guerin-El Khourouj V, Dalle JH, Pedron B, et al. Quantitative and Qualitative CD4 T Cell Immune Responses Related to Adenovirus DNAemia in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17:476-85. 40
15. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN-CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SC 50

T. Bone Marrow Transplant. Prepublished on January 1, 2011.

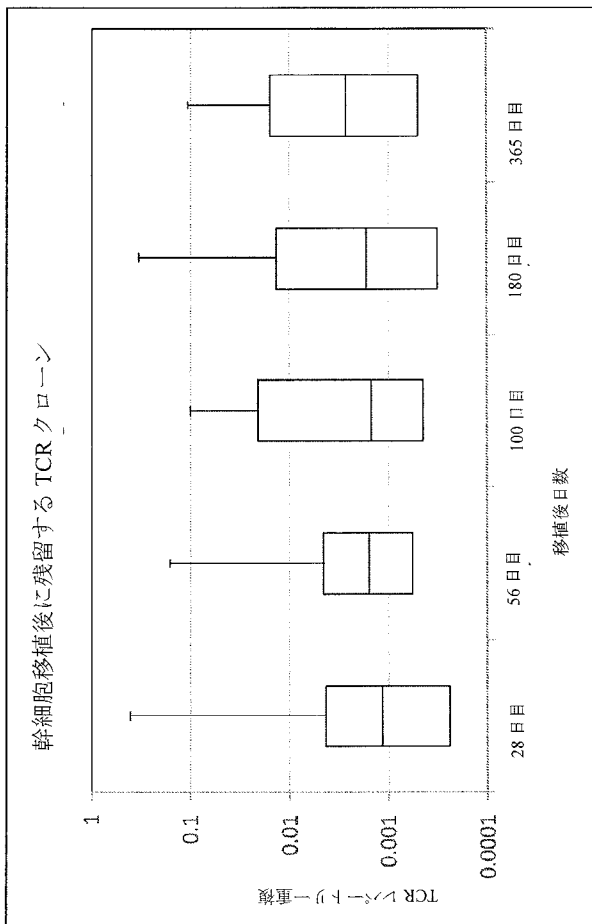
16. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. Blood 1999;94:1465-1470.

17. Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M, et al. Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. Blood 2009;113:2888-2894.

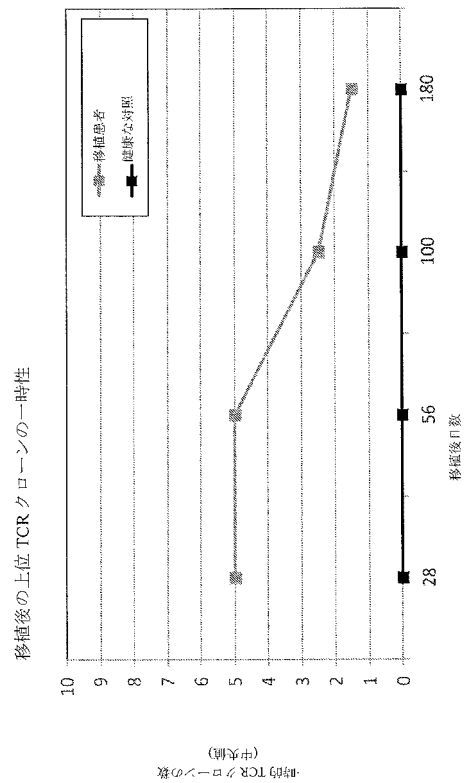
18. Nakamae H, Kirby KA, Sandmaier BM, et al. Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15:694-703.

10

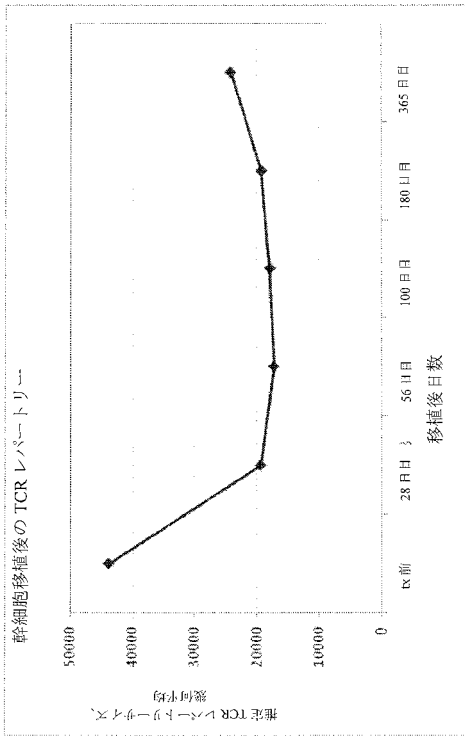
【図1】



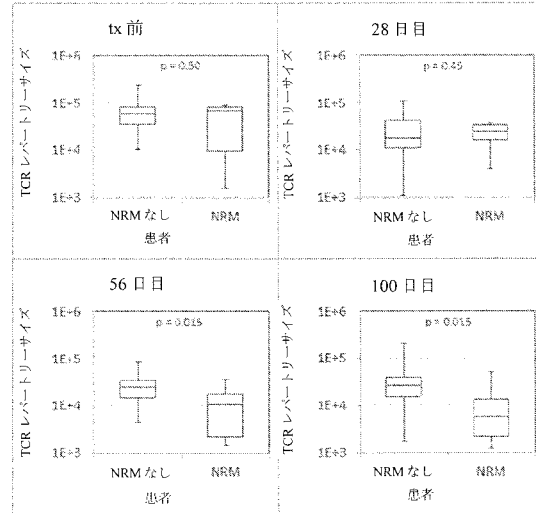
【図2】



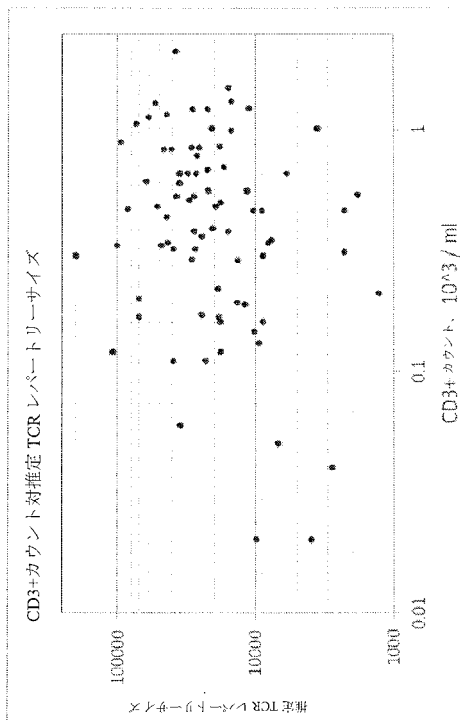
【 図 3 】



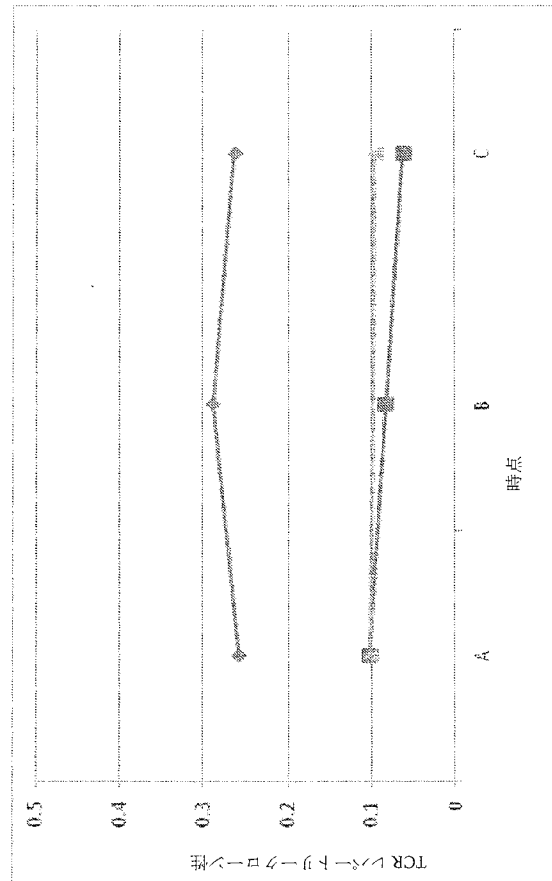
【 図 4 】



【 図 5 】

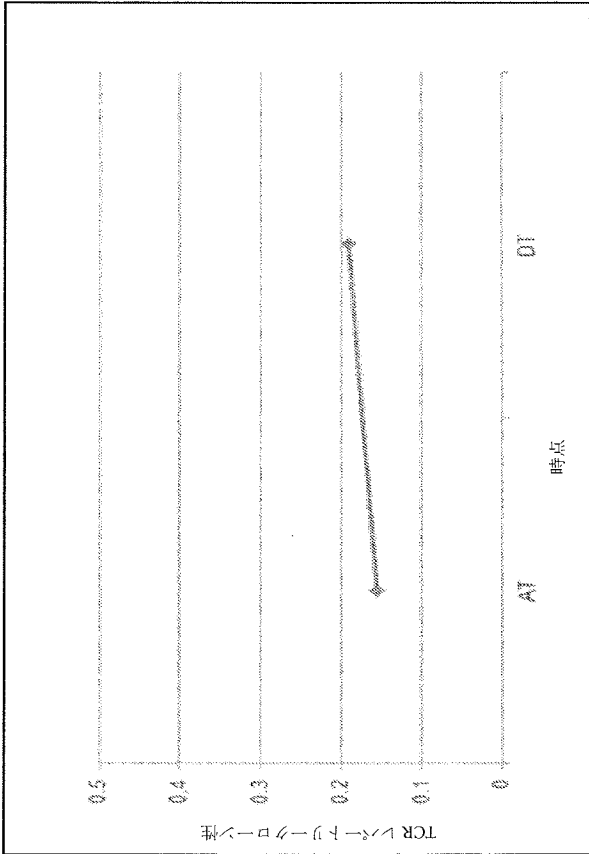


【 図 6 】

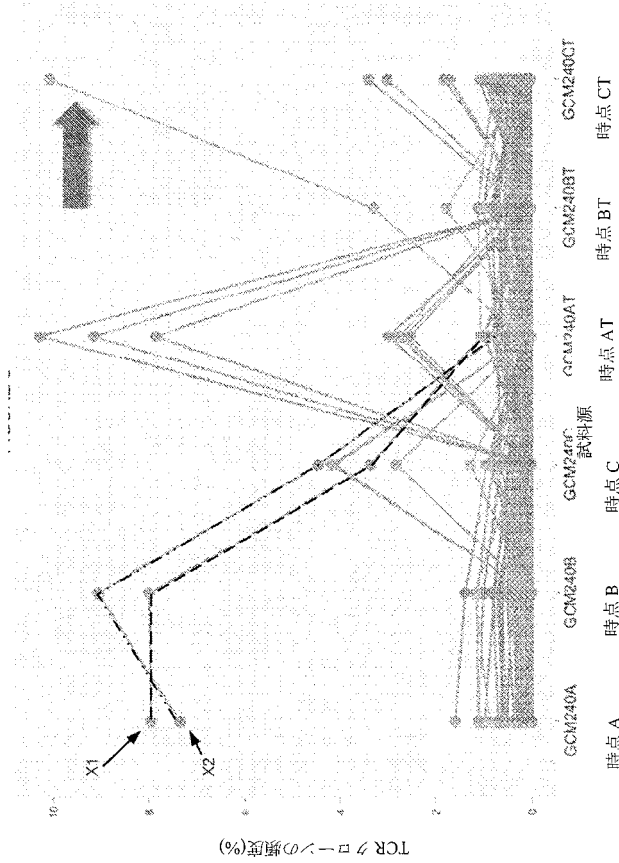


◆ = 非反応者
 ▲ = 反応者

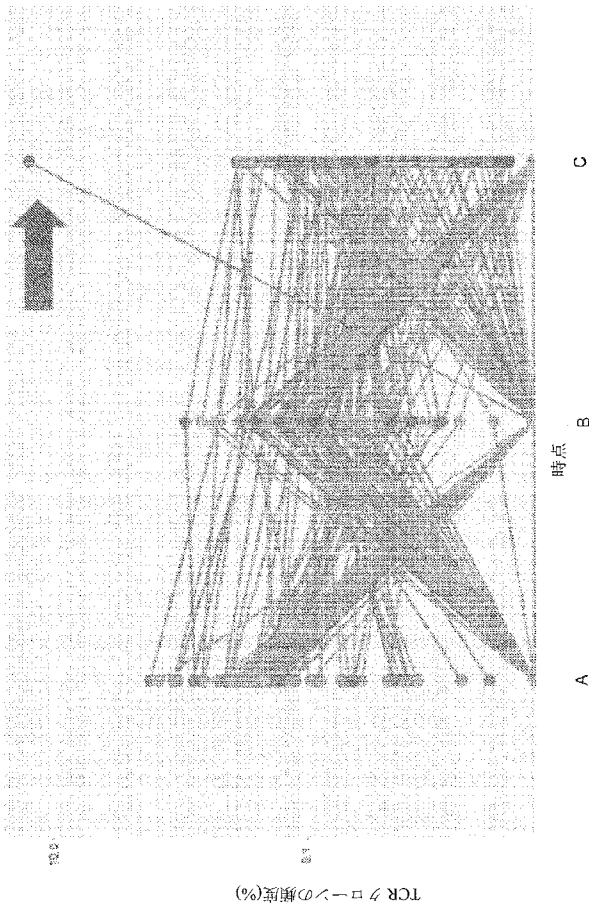
【 図 7 】



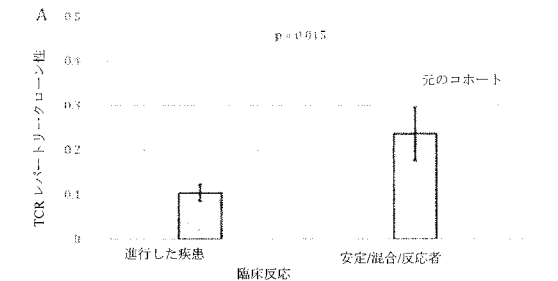
【 図 8 】



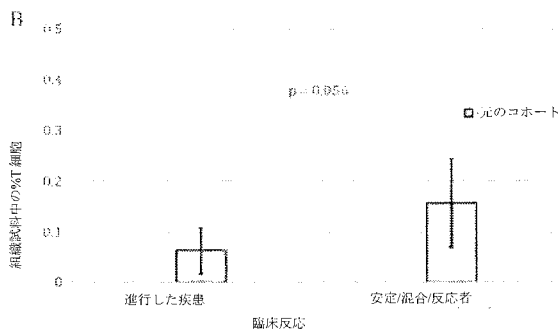
【 図 9 】



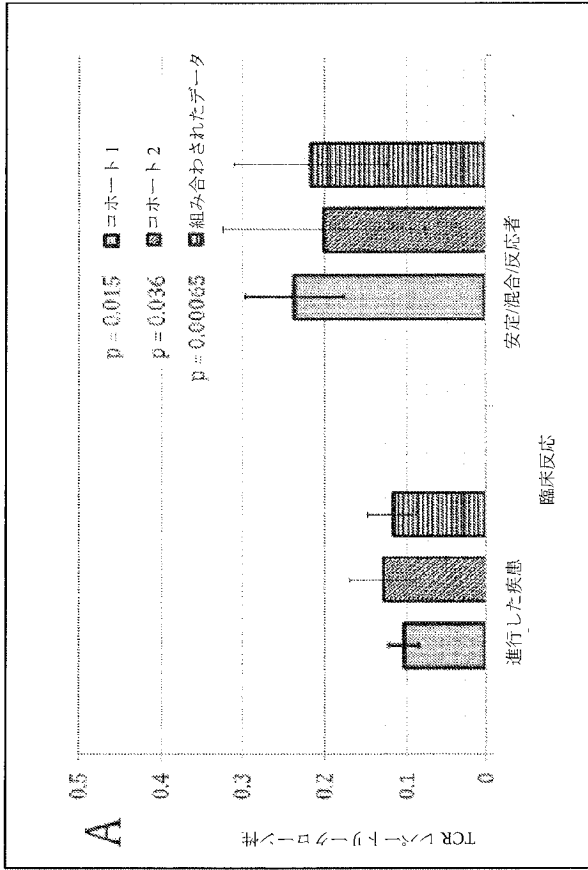
【 図 10 A 】



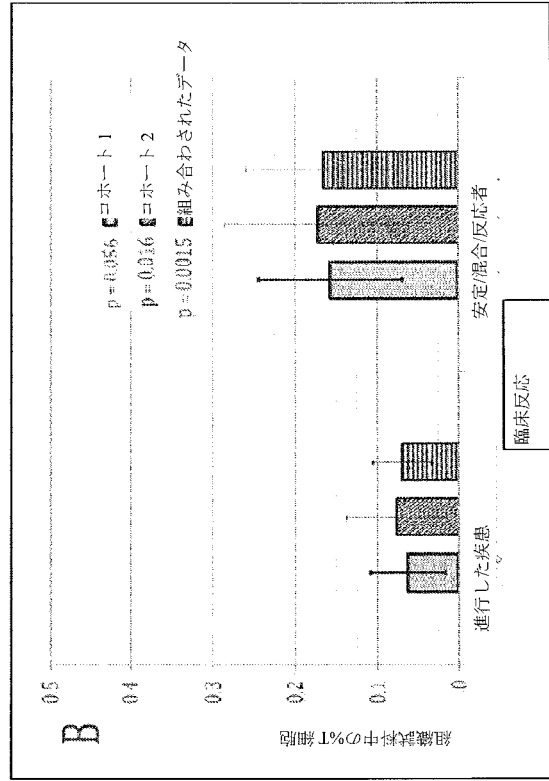
【 図 10 B 】



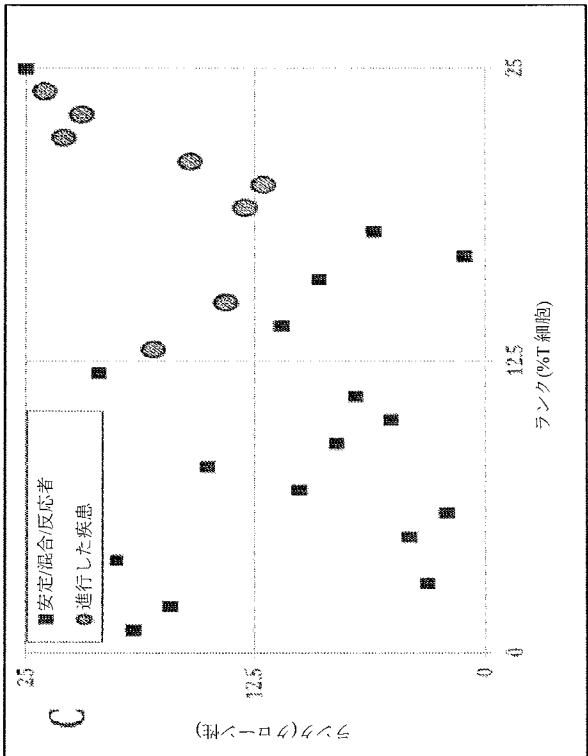
【図11A】



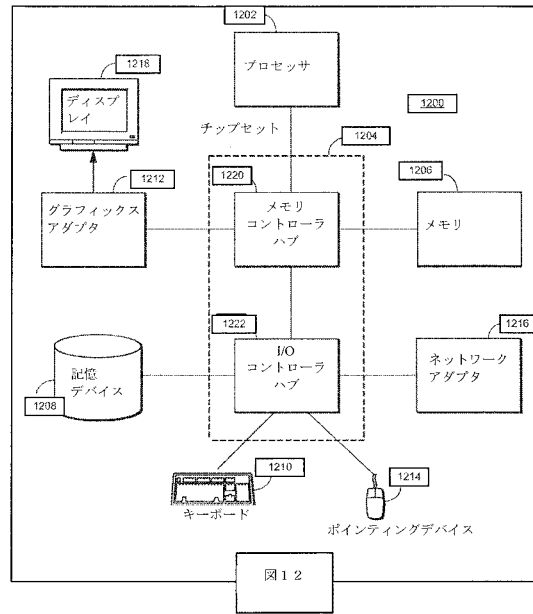
【図11B】



【図11C】



【図12】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/062925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2013/086450 A1 (ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES CORP [US]) 13 June 2013 (2013-06-13) the whole document -----	1-116
X,P	WO 2013/059725 A1 (ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES CORP [US]; HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]) 25 April 2013 (2013-04-25) the whole document -----	1-116
X	WO 2012/027503 A2 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; LIVINGSTON ROBERT J [US]; CARLSON CHR) 1 March 2012 (2012-03-01) the whole document ----- -/--	1-34, 60-79
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 November 2013		Date of mailing of the international search report 25/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bots, Jürgen

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/062925

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/106738 A2 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; WARREN EDUS H [US]; CARLSON CHRISTOPH) 1 September 2011 (2011-09-01) the whole document -----	1-116
X	WO 2010/151416 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; ROBINS HARLAN S [US]; WARREN EDUS H []) 29 December 2010 (2010-12-29) the whole document -----	1-116
X	H. S. ROBINS ET AL: "Comprehensive assessment of T-cell receptor α -chain diversity in T cells", BLOOD, vol. 114, no. 19, 5 November 2009 (2009-11-05), pages 4099-4107, XP055074444, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-04-217604 the whole document -----	1-116
X	K. LARIMORE ET AL: "Shaping of Human Germline IgH Repertoires Revealed by Deep Sequencing", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 189, no. 6, 15 September 2012 (2012-09-15), pages 3221-3230, XP055074451, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1201303 the whole document -----	1-116

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/062925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013086450 A1	13-06-2013	US 2013253842 A1 WO 2013086450 A1	26-09-2013 13-06-2013
WO 2013059725 A1	25-04-2013	US 2013288237 A1 WO 2013059725 A1	31-10-2013 25-04-2013
WO 2012027503 A2	01-03-2012	US 2012058902 A1 WO 2012027503 A2	08-03-2012 01-03-2012
WO 2011106738 A2	01-09-2011	NONE	
WO 2010151416 A1	29-12-2010	AU 2010263172 A1 CA 2765949 A1 CN 102459643 A EP 2446052 A1 JP 2012531202 A KR 20120044941 A RU 2012101828 A SG 176691 A1 US 2010330571 A1 WO 2010151416 A1	19-01-2012 29-12-2010 16-05-2012 02-05-2012 10-12-2012 08-05-2012 27-07-2013 30-01-2012 30-12-2010 29-12-2010

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ロビンズ, ハーラン

アメリカ合衆国, ワシントン州 98102, シアトル, スイート 200, 1551 イースト
レイク アベニュー イースト, アダプティブ バイオテクノロジーズ コーポレーション内

(72)発明者 ルービンシュタイン, ジュリー

アメリカ合衆国, ワシントン州 98102, シアトル, スイート 200, 1551 イースト
レイク アベニュー イースト, アダプティブ バイオテクノロジーズ コーポレーション内

(72)発明者 エマーソン, ライアン

アメリカ合衆国, ワシントン州 98102, シアトル, スイート 200, 1551 イースト
レイク アベニュー イースト, アダプティブ バイオテクノロジーズ コーポレーション内

(72)発明者 ユアン, ジアング

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10065, ニューヨーク, 1275 ヨーク アベニュー,
メモリアル スローン ケッターリング キャンサー センター内

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA01 CA04 CA09 CA12 HA12

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS25

QS34 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015536642A5	公开(公告)日	2016-11-24
申请号	JP2015534819	申请日	2013-10-01
[标]申请(专利权)人(译)	适应生物技术公司 纪念斯隆-凯特琳癌症中心		
申请(专利权)人(译)	自适应生物技术公司 纪念斯隆 - 凯特琳癌症中心		
[标]发明人	ロビズハーラン ルービンシュタインジュリー エマーソンライアン ユアンジアンダ		
发明人	ロビズ,ハーラン ルービンシュタイン,ジュリー エマーソン,ライアン ユアン,ジアンダ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6851 C12Q1/6883 G16B5/00 G16B30/00 C12Q2537/143 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 C12Q2600/16		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063 /QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	61/708534 2012-10-01 US		
其他公开文献	JP2015536642A JP6449160B2		

摘要(译)

鉴定包含来自受试者淋巴DNA的样品中编码T细胞受体 (TCR) 和/或免疫球蛋白 (IG) 多肽的重排DNA (和/或随后转录的RNA) 序列 并且通过定量, 公开了一种用于确定受试者的适应性免疫系统的免疫状态的方法。 TCR和/或IG序列的多样性和序列分布可评估免疫能力和免疫组成, 反映了样品中T细胞或B细胞克隆的程度和克隆扩增。 还描述了基于免疫能力 (包括对免疫治疗的潜在反应) 对患者人群进行分层的方法。 [选择图]图11A