

(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2018-509155

(P2018-509155A)

(43) 公表日 平成30年4月5日(2018.4.5)

| | | |
|--------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/68 (2018.01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 4 B O 6 3 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 H O 4 5 |
| C O 7 K 14/705 (2006.01) | C O 7 K 14/705 | |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 D | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

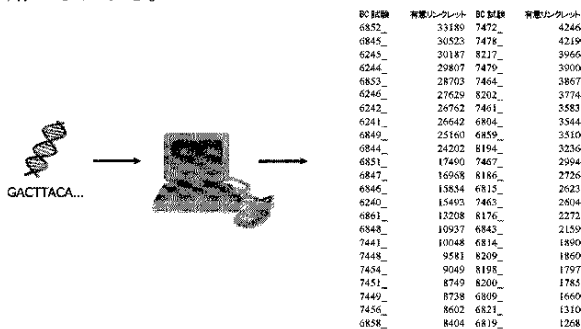
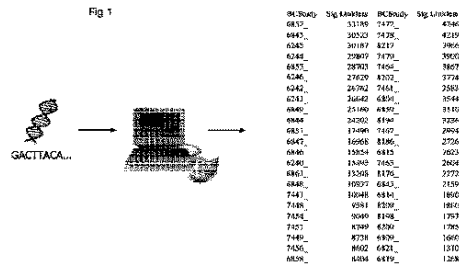
| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2017-547458 (P2017-547458) | (71) 出願人 | 517311482 アイレパトリー インコーポレイテッド アメリカ合衆国 35806 アラバマ州 ハンツビル ゲノム ウェイ 601 スイート 3005 |
| (86) (22) 出願日 | 平成28年3月9日 (2016.3.9) | (74) 代理人 | 100102978 弁理士 清水 初志 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年10月17日 (2017.10.17) | (74) 代理人 | 100102118 弁理士 春名 雅夫 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2016/021430 | (74) 代理人 | 100160923 弁理士 山口 裕孝 |
| (87) 国際公開番号 | W02016/144996 | (74) 代理人 | 100119507 弁理士 刑部 俊 |
| (87) 国際公開日 | 平成28年9月15日 (2016.9.15) | (74) 代理人 | 100142929 弁理士 井上 隆一 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/130,512 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年3月9日 (2015.3.9) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫レパトリーの疾患関連 CDR3 パターンを同定するための方法

(57) 【要約】

本開示は概して、免疫応答およびその結果として生じる免疫レパトリーに基づく診断テストを開発するための方法に関する。本開示の方法は、シグナルを増大させかつバックグラウンドを減少させて、疾患シグニチャーを作成するために用いることができる共有CDR3の同定を可能にする。本開示の方法は、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、および感染性疾患を含むがこれらに限定されないさまざまな疾患のための診断テストを開発するために用いられる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者群および対照群における複数の対象のそれぞれからサンプルを収集する工程であって、該患者群が、同じ疾患を有する対象を含み、かつ該対照群が、健常である対象を含む、工程；

2つの群のそれぞれにおける各対象の免疫レパトリーを増幅および配列決定して、該サンプル中に存在する各特有のCDR3配列を同定し、かつ各特有のCDR3配列の出現の頻度を決定する工程；

該対照群および該患者群のそれぞれにおける少なくとも2つの対象間で共有されるCDR3配列を同定する工程；

出現の頻度順に該CDR3配列を順位付けする工程；

各群からリンクレット(Linklet)を同定する工程；ならびに

統計的に有意な程度まで該患者群に関連するリンクレットを同定して、疾患シグニチャーを提供する工程

を含む、特定の疾患に対する診断テストを開発するための方法。

【請求項 2】

前記サンプルが血液である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが組織である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記対照群および前記患者群のそれぞれにおける少なくとも2つの対象間で共有される少なくとも約1,000個のCDR3配列が同定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

各群から少なくとも約 10^6 個のリンクレットが同定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記疾患シグニチャーに関連するリンクレットの最小数が診断数として確立され、これにより、少なくとも該最小数のリンクレットが対象の血液サンプルにおいて同定された場合にその対象が前記疾患を有するとして診断される、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記診断数が少なくとも約500である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

患者群および対照群において複数の対象のそれぞれから血液サンプルを収集する工程であって、該患者群が、同じ疾患を有する対象を含み、かつ該対照群が、健常として分類される対象を含む、工程；

2つの群のそれぞれにおける各対象の免疫レパトリーを増幅および配列決定して、該血液サンプル中に存在する各特有のCDR3配列を同定し、かつ各特有のCDR3配列の出現の頻度を決定する工程；

該対照群および該患者群のそれぞれにおける少なくとも2つの対象間で共有される少なくとも約1,000個のCDR3配列を同定する工程；

出現の頻度順に該少なくとも約1,000個のCDR3を順位付けする工程；

各群から少なくとも約 10^6 個のリンクレットを同定する工程；ならびに

統計的に有意な程度まで該患者群に関連するリンクレットを同定して、疾患シグニチャーを提供する工程

を含む、特定の疾患に対する診断テストを開発するための方法であって、

該疾患シグニチャーに関連するリンクレットの最小数が診断数として確立され、これにより、少なくとも該最小数のリンクレットが対象の血液サンプルにおいて同定された場合にその対象が該疾患を有するとして診断される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

関連出願の相互参照

本出願は、参照によって本明細書に組み入れられる「免疫レパートリーの疾患関連CDR3パターンを同定するための方法(Method for Identifying Disease-Associated CDR3 Patterns in an Immunorepertoire)」という名称を付けられ2015年3月9日に出願された米国特許仮出願第62/130,512号に対する優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、ヒトおよび/または動物の対象において疾患関連免疫レパートリーを識別するための方法、および疾患診断のためのおよび疾患過程の研究のためのそのような方法の使用のための方法に関する。

10

【背景技術】

【0003】

発明の背景

TおよびBリンパ球の多様な抗原受容体は、有限ではあるが多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメントのV(可変)、D(多様性)、J(連結)、およびC(定常)が、免疫グロブリンおよびT細胞受容体(TCR)の結合特異性および下流適用を決定する。V領域と名付けられた、受容体の再構成されたV(D)J部分は、エピトープ認識を担うことから、非常に興味深い。V(D)Jがアミノ酸配列に翻訳されると、V領域は、リーダー配列、フレームワーク(FR) 1、相補性決定領域1(CDR1)、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4、およびCドメインからなる複数の部分に細分される。

20

【0004】

CDR3は、複数の研究からこの領域が抗原特異性に関連することが示されていることから、特に興味深い。正常な対象と比べて、さまざまな疾患を有する患者は、その免疫レパートリーの量的および/または質的な変化を経験する場合がある。量的変化は免疫レパートリー多様性の増大および減少として現れる。質的变化は、TまたはB細胞における疾患特異的CDR3の配分の増大として提示される。

【0005】

免疫系は、がん、細菌感染、ウイルス感染、および真菌感染などの種々の状態に対する応答を展開する。さらに、一部の患者では、それは、身体の組織に対して有害な応答を実際に引き起こし、例えば、自己免疫疾患または移植片の拒絶をもたらす場合がある。これらの免疫応答の種類および程度は、的確にアクセスした場合、特定の疾患または望ましくない免疫応答の有無の最も重要かつ正確な指標の一つになる可能性がある。

30

【0006】

しかしながら、推定されるVDJ再構成、n付加、および α - β 鎖の組み合わせの数のために、ヒトは 10^{15} ~ 10^{25} 種類もの異なるT細胞を有すると予測される。特定の疾患について、量的に(上方もしくは下方制御を通じて)または質的に(獲得もしくは欠失を通じて)変化する疾患特異的CDR3が 10^3 個だけ存在すると仮定して、これらの状況におけるシグナル対ノイズ比は非常に弱い。したがって、通常の方法は、診断目的でこの情報を評価するのに現実的ではない。

【0007】

そのような免疫応答および結果として生じる免疫レパートリーに基づく免疫応答評価および診断テストの開発のための改良された方法が必要とされる。

40

【発明の概要】

【0008】

1つの態様において、本開示は、(a)患者群および対照群における複数の対象のそれぞれからサンプルを収集する工程であって、患者群が、同じ疾患を有する対象を含み、かつ対照群が、健常として分類される対象を含む、工程；(b)2つの群のそれぞれにおける各対象の免疫レパートリーを増幅および配列決定して、サンプル中に存在する各特有のCDR3配列を同定し、かつ、各特有のCDR3配列の出現の頻度を決定する工程；(c)対照群および患者群のそれぞれにおける少なくとも2つの対象間で共有されるCDR3配列を同定する工程；(d)

50

同定したCDR3配列を出現の頻度順に順位付けする工程；(e)各群からリンクレット(Linklet)を同定する工程；ならびに(f)統計的に有意な程度まで患者群に関連するリンクレットを同定して、疾患シグニチャーを提供する工程を含む、免疫レパートリーを用いて診断テストを開発するための方法に関する。

【0009】

ある特定の態様において、サンプルは末梢血である。他の態様において、サンプルは組織である。ある特定の態様において、1,000個より少ないCDR3配列を、少なくとも2つの対象間で共有されるとして同定する。他の態様において、少なくとも1,000個のCDR3配列を、少なくとも2つの対象間で共有されるとして同定する。ある特定の態様において、少なくとも約 10^6 個のリンクレットを各群から同定する。他の態様において、 10^6 個より少ない 10
リンクレットを各群から同定する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

本開示は、以下の図を参照してより良く理解することができる。

【図1】 開示の方法の基本概念を図示する模式図であり、ここで、免疫系細胞由来のポリヌクレオチド配列データは、配列を選別および計数し、頻度数によってそれらを順位付けし、p値および他の判断基準を生成するように設計されたソフトウェアを用いて加工され、「有意リンクレット (Significant Linklet)」と称されるリンクレットから診断シグニチャーを作製する。

【図2】 サンプル中に存在するクローンの数によるCDR3の順位付けを図示する表である。 20
典型的には、1つのサンプルからの配列決定結果は、400,000個もの数のCDR3を生じさせる。各CDR3は、増幅法(アームPCR)の半定量的な性質のために、リード数と関連しており、リード数はまた、クローンの相対的存在量を反映する。ソフトウェア分析はエラーを取り除いてCDR3を順位付けし、表に示すようなアウトプットファイルを生じさせる。

【図3】 血液サンプルから得られた配列においてリンクレットを検出する方法を図示する表である。CDR3配列を記録し、血液サンプル中に最高数で存在するCDR3配列のリストを提供する。それらのCDR3配列のうち、リンクレットは、指定したカットオフレベルより高いレベルで、同じサンプル内に存在するCDR3配列の対を表す。

【図4】 乳がん試験中に同定されたリンクレットの一部の代表的なリストである(2つの試験群において、つまり、乳がんと診断された対象の第1の群および健常対象と称される 30
対象の第2の群において検出されたリンクレット間の比較)。

【図5】 乳がん試験で検出されたパブリックリンクレット(Public Linklet)をそれらのp値に基づいて列挙している。例えば、上位に順位付けられたリンクレットは「ASSYSRGEEF」および「ASSLGRTHQPQH」のCDR3対であり、このリンクレットは98名の乳がん患者サンプルのうち32個で共有され、106名の対照サンプルのうち1人のみがそれを有していた。p値は0であった。p値<0.05を有するリンクレットのみが、乳がん診断シグニチャーを表す最終リストに含まれる。合計で101,902個の有意リンクレットを同定した。

【図6】 3つの群：対照、乳がん、およびCMV(サイトメガロウイルス)における対象の結果を図示する散布図である。受動者動作特性(ROC)曲線分析は、DSL600個のカットオフ値を示唆した。103名の乳がん患者のうち、98名は600個を上回る有意リンクレットを有し；11 40
0名の対照のうち、7名のみが600個を上回る有意リンクレットを有した。したがって、診断の感度および特異性はそれぞれ、95%および93%であった。188個の非乳がん患者サンプル(CMV試験に登録した患者由来)を、乳がん疾患シグニチャーに対して試験した場合に、3個のサンプルのみが600個を上回る有意リンクレットを有する偽陽性であり、98.4%の特異性をもたらした。

【発明を実施するための形態】

【0011】

詳細な説明

本開示は概して、免疫応答および結果として生じる免疫レパートリーに基づく診断テストを開発するための方法に関する。本開示の方法は、シグナルを増大させかつバックグラ 50

ウンドを低下させて、疾患シグニチャーを作成するために用いることができる共有CDR3の同定を可能にする。本開示の方法は、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、および感染性疾患を含むがこれらに限定されないさまざまな疾患のための診断テストを開発するために用いられうる。

【0012】

本明細書で用いられる「疾患」は、診断された疾患と、対象の健康に対して診断されたおよび未診断の他の破壊とを含む。

【0013】

本明細書で用いられる「健常」は、疾患の症状を現在示さないこと、および疾患と現在診断されていないことを意味する。

10

【0014】

本明細書で用いられる「免疫レパートリー」は、対象の機能的に多様なTおよびB細胞を含む。

【0015】

本明細書で用いられる「リンクレット」は、同じサンプル中に存在する特有のCDR3の対である。2人またはそれより多い人々が特定のリンクレットを共有している場合、それは「パブリックリンクレット」である。リンクレットが1つの対象においてのみ検出される場合、それは「プライベートリンクレット(Private Linklet)」である。パブリックリンクレットは、パブリックCDR3(すなわち、1つより多い対象において検出されるCDR3)に由来する。一般的に言えば、各対象のレパートリーは大部分が「プライベート(private)」であり、対象の免疫レパートリーのほんの数パーセントが共有CDR3である。したがって、パブリックリンクレットは、プライベートリンクレットよりもはるかに低レベルで存在し、その事実は疾患シグニチャーの同定をより困難なものにする。したがって、バックグラウンドを減少させて、1つまたは複数の疾患シグニチャーを構成する有意なCDR3レパートリーの同定を可能にする、アプローチを用いることが重要である。

20

【0016】

本明細書で用いられる「サンプル」は、血液および組織を含む。ある特定の態様において、血液は対象から収集された末梢血である。ある特定の態様において、組織は対象から得られた生検である。

【0017】

本明細書で用いられる「対象」はヒトまたは動物を意味する。

30

【0018】

ある特定の態様において、本開示の方法は、「ポジティブリンクレット(Positive Linklet)」の使用によってバックグラウンドを減少させる。2つのCDR3のAおよびBを配列決定すると、リード数によって表される量的情報も得られる。用いられる免疫レパートリー増幅法が半定量的(アームPCR)である場合、およびCDR3-AがCDR3-Bよりも高レベルでサンプルにおいて発現される場合、より多くの配列リード数がBについてよりもAについて得られる。そのようなシナリオにおいて、A-B対はポジティブリンクレットと称され、その一方で、B-A対はネガティブリンクレット(Negative Linklet)と称されうる。本開示の方法のある特定の態様において、ポジティブリンクレットのみがさらなる分析に用いられる。ポジティブリンクレットの使用は、実験上のノイズを除去するのを助けることから、診断シグナルを濃縮する。

40

【0019】

生物学的には、1つより多い抗原またはエピトープは、概して、特定の疾患に関連する。したがって、関連したTおよびB細胞受容体は、概して、クラスターとして患者のサンプル中に現れる。ポジティブリンクレット(およびネガティブリンクレット)によって提供される量的情報は、疾患特異的抗原発現プロファイルを反映しうる。

【0020】

実験操作は、生じたデータにさらなる「ノイズ」を導入する可能性がある。例えば、異なる対象由来の多くのサンプルを1回の配列決定ランにプールし、費用を削減することは

50

一般的に行われている(免疫レパートリーはバーコード付けされたプライマーを用いて別々に増幅される)。しかしながら、1つのサンプルにおいてCDR3が非常に優性である場合、それは配列決定チップ上に複数回現れる。そのような優性クローンが、間違っただバーコードが割り当てられ、同じランにおいて全ての他のサンプルによって「共有される」確率は1/8,000である。CDR3が基本の分析単位として用いられる場合、これらの「混入した」配列は、生物学的に共有されていると見なされ、診断シグナルとして用いられうる。不正確に割り当てられたCDR3は通常、非常に低い頻度で存在することから、リンクレットを使用するとこれらのノイズを除去することができ、それらが1つまたは複数のポジティブリンクレットの一部となる可能性は減少する(それらがネガティブリンクレットを形成するという可能性はより高い)。ポジティブリンクレットのみを考慮することによって、ノイズを除去することができる。また、上位に順位付けられたサンプル由来のCDR3のみを用いる場合(例えば、5,000位、または1,000~50,000位の上位に順位付けられたCDR3など)、それらの不正確に割り当てられたCDR3は通常、その低い頻度のために考慮されない。

10

【0021】

パブリックリンクレットのグループが、特定の疾患を共通して有する対象の群に高い程度まで関連することが見いだされると、それらのパブリックリンクレットは、疾患特異的リンクレット、すなわち「有意リンクレット」として処理されうる。したがって、特定の疾患に関連する有意リンクレットのグループは、「疾患シグニチャー」を構成することができる。したがって、対象のサンプルが、疾患シグニチャーによる統計的に有意な重複を有することが見いだされる場合、そのような疾患の診断を対象に対して行うことができる。

20

【0022】

本開示の方法は、(1)患者群および対照群に割り当てられた対象からサンプルを集める工程；(2)各サンプルについて免疫レパートリーを増幅および配列決定する工程；(3)各サンプルの免疫レパートリーから特有のCDR3配列を同定する工程；(4) 個体の(特有の)CDR3配列を免疫レパートリーにおいて検出した回数を記録し、それによって、優性なクローンを同定する(最も高い頻度の出現から最も低い頻度の出現への順にそれらを順位付けすることによって決定される)工程；(5)対象の免疫レパートリーを比較し、少なくとも2つの対象間で共有されるCDR3(「パブリックCDR3」)を同定する工程；(6)パブリックCDR3をそれらの出現の頻度に基づき順位付けする工程；(7)上位に順位付けられたCDR3からポジティブリンクレットのリストを作成する工程；(8)プライベートリンクレットを除去し、パブリックリンクレットを保持する工程；ならびに(9)標的疾患群の患者に関連するが対照群には関連しないパブリックリンクレットを同定する工程を含む。

30

【0023】

ある特定の態様において、少なくとも約100対象が各群に割り当てられる。ある特定の態様において、免疫レパートリーは(WO2009/124293に記載の)アームPCR法を用いて増幅される。ある特定の態様において、上位5,000クローンが優性として同定される。ある特定の態様において、ポジティブリンクレットのリストは上位に順位付けられた1,000~20,000個のCDR3を含む。ある特定の態様において、標的疾患群における患者に関連するが対照群には関連しないパブリックリンクレットの信頼値は $p < 0.05$ である。

40

【0024】

患者に関連する(疾患関連リンクレット、すなわちDSL)が対照群には関連しないパブリックリンクレットのリストは、「シグニチャーリンクレット」と称されるグループを構成する。ある特定の態様において、シグニチャーは、約100名の患者および同数の対象を分析することによって得られうる。次いで、カットオフ疾患シグニチャーリンクレット(DSL)値が決定される。不明サンプルは、配列決定し、続いてのDSLを計数することによって試験されうる。DSL数がカットオフを満たすまたはそれを上回る場合、特定の疾患について診断がなされる。

【0025】

例えば、分析用の配列データを得るある特定の態様において、対象(例えば、ヒトまた

50

は動物、疾患群または対照(健常)からの全血は、末梢血単核球、すなわちPBMCを抽出するためにFicoll(登録商標)で処理され、最高濃度のリンパ球を得る。リンパ球の各タイプは、番号付けられた、CDマーカーと称される特定の識別子、または分化マーカーのクラスターを有する。例えば、細胞障害性T細胞はCD8マーカーを有し、ヘルパーT細胞はCD4マーカーを有する。特異的抗CDマーカーで標識されている磁気ビーズを細胞懸濁物に添加することができる。カラムを磁場に適用した後に、ビーズに結合した細胞を捕捉しつつ、すなわち正の選択を行いつつ、他の細胞型は通過させる。フロースルー、すなわち負の選択をした細胞懸濁物は、下流の適用において他の細胞集団をさらに単離するために用いることができる。他の態様において、サンプルは組織であってもよく、該組織は、当技術分野において公知の方法を用いて、リンパ球を単離するように処理されうる。

10

【0026】

T細胞のある特定の集団内には亜集団が存在している(例えば、制御性T細胞はヘルパーT細胞の亜集団である)ことから、亜集団を分離する必要がある場合には、別の磁気ビーズが細胞に結合できるように、リリース試薬(release reagent)をCD4ビーズ結合細胞に添加し、ビーズをリリースすることができる。制御性T細胞の場合では、例えば、CD25+選択マイクロビーズが、細胞懸濁物に添加され、ヘルパーT細胞集団から制御性T細胞集団を抽出することができる。

【0027】

ポリヌクレオチド単離(RNAまたはDNA)は、当業者に公知の手段により実施することができる(例えば、Murray, BMC Res Notes. 2013 Nov 1;6:440を参照)。配列の増幅は、WO2009/124293(アームPCR)に記載の方法を用いて行ってもよく、該方法は、本開示の方法において優れた結果を達成するのに必要な感度および特異性を提供する。

20

【0028】

配列決定はまた、当技術分野において公知の方法を用いても実施されうる。決定しなければならない配列の数を考慮すると、例えば、Illuminaシーケンシングプライマーを使用するIlluminaの次世代シーケンシングなどのハイスループットシーケンシング法が概して用いられる。

【0029】

配列決定、特定の配列(個別のクローンを表す)が生じた回数の記録、出現の頻度に基づく順番でのクローンの順位付け、および本明細書に記載の他の分析についての結果として、多量のデータが生み出され、分析および操作されなければならない。これは、配列データ分析プログラムを用いて最も簡便かつ効率的に実施される。1つのそのようなプログラムはCDR3 Algebraであり、研究者のために選別、順位付け、およびペアリングを行う。p値の算出などの統計解析は、そのようなプログラムを用いても実施することができる。

30

【0030】

本開示の方法は、がん、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、および真菌感染を含むがこれらに限定されないさまざまな疾患のための診断テストの開発に適しており、それによって、関心対象の疾患の診断および研究のための有益なツールが研究者および臨床医にもたらされる。

【0031】

本開示の方法は、以下の非限定的な実施例の手段によってさらに説明されうる。

40

【実施例】

【0032】

全血からの末梢血単核球(PBMC)の単離

健常な対象(対照群)由来および以前に乳がんと診断された患者(患者群)由来の全血をPBS緩衝液で当初量の2~4×で希釈した。ヘパリンナトリウム中に収集した10 mLの全血を50 mLコニカルチューブに移し、緩衝液で35 mLの線まで希釈した。希釈した細胞懸濁物(35 mL)を、別の50 mLコニカルチューブ中で15 mLのFicoll-Paque(登録商標)上に注意深く層状にした。チューブを、ブレーキ無しでスイング型ローター中で20摂氏度にて30分間400×gで遠心分離した。

50

【0033】

PBS緩衝液と血漿とを含有する上層を注意深く吸引し、それを除去した。濁った単核球細胞層を真新しい50 mLコニカルチューブに注意深く移した。次いで、チューブを50 mLの印まで緩衝液で満たし、20摂氏度にて20分間300×gで遠心分離した。清澄な上清を取り除き、細胞ペレットを8 mLの緩衝液で再懸濁した。

【0034】

単離したPBMCからの単球の単離

血球計数器を用いて細胞を計数し、サンプルを室温にて10分間300×gで遠心分離した。上清を吸引により除去した。細胞を細胞10⁷個当たり80 μLの緩衝液で再懸濁した。

【0035】

細胞1×10⁷個当たり20マイクロリットルのCD14マイクロビーズを添加し、緩やかに上下にピペッティングすることにより混合を行った。マイクロビーズ/細胞混合物を4℃にて15分間インキュベートした。細胞を、細胞1×10⁷個当たり2 mLの緩衝液を添加することによって洗浄し、次いで、10分間300×gで遠心分離した。

10

【0036】

上清を、完全に吸引し、緩衝液で再懸濁した(500 μLの緩衝液中に10⁸個の細胞)。LS磁気カラムを磁石上に配置し、3 mLの緩衝液で洗浄した。フロースルー緩衝液を廃棄した。細胞懸濁物をカラムにアプライし、通過する未標識細胞を、標識した15 mLコニカルチューブ中に収集した。カラムを3 mLの緩衝液で3回洗浄し、カラムリザーバーが空になった場合にだけ新たな緩衝液を追加した。

20

【0037】

「単球」とラベル付けした新しい清浄な15 mLコニカルチューブをカラムの下に配置し、カラムを磁石から取り外した。緩衝液(5 mL)をカラム内にピペットで移し、磁氣的に標識した細胞を、カラム内にプランジャーを強く押し込むことによって直ちに流し出した。

【0038】

両方のチューブを10分間300×gで遠心分離し、上清を完全に吸引した。「単球」とラベル付けしたチューブについて、細胞を2 mLの緩衝液で再懸濁した。20 マイクロリットルを、細胞計数プロトコールで用いるためにピペットで取り出し、チューブを10分間300×gで遠心分離した。細胞を、500 μLのRNAprotect(登録商標)で再懸濁し、後のRNAの抽出のために4℃で保管した。「CD14-」とラベル付けしたチューブについて、細胞を細胞10⁷個

30

【0039】

RNA抽出

細胞を20℃にて3,000 rpmで3分間遠心分離し、上清を取り除き、チューブを指ではじくことによって細胞ペレットをゆるめた。BMEバッファー(350 μL)をサンプルに添加し、細胞ペレットをボルテックスによって完全に溶解させた。

【0040】

サンプルをQIAshredderカラムに移し、10,000 rpmで2分間遠心分離することによってホモジナイズした。カラムを廃棄し、フロースルーを保存した。エタノール(70%、350 μL)をフロースルーに添加し、サンプルをピペッティングによって混合した。サンプル(700 μL)をRNeasy(登録商標)スピнкаラムに移し、2 mL採取管内に設置した。サンプルを10,000 rpmで15秒間遠心分離した。フロースルーを廃棄した。700 μLより多いサンプルが存在する場合には、この工程を同じカラムを用いて繰り返した。

40

【0041】

700 μLのバッファーRW1をスピнкаラムに添加し、サンプルを10,000 rpmで15秒間遠心分離し、フロースルーを廃棄した。500 μLのバッファーRPEをスピнкаラムに添加し、サンプルを10,000 rpmで15秒間遠心分離し、フロースルーを廃棄した。

【0042】

500 μLのバッファーRPEをスピнкаラムに添加し、サンプルを10,000 rpmで2分間遠心分離した。スピнкаラムを新しい2 mL採取管内に設置し、10,000 rpmで1分間遠心分離し

50

、カラム膜を乾燥させた。スピнкаラムを新しい1.5 mL採取管内に設置した。25 μ LのRNaseフリー水を、単離した制御性T細胞を含有するサンプルを除く全てのサンプルに添加した。制御性T細胞に対して、20 μ LのRNaseフリー水を添加した。サンプルを室温で1分間静置させた。サンプルを10,000 rpmで1分間遠心分離し、カラムを破棄した。

【0043】

ポリメラーゼ連鎖反応を用いたCDR3配列の増幅

CDR3配列のPCR増幅を、WO2009/124293(Han)に開示のアームPCR法を用いて行った。概して、1.8のまたはそれを上回る260/280を有する最低100 ngのRNAまたはgDNA(選択した試薬系による)が、アームPCR免疫レパートリーライブラリーの最良の多様性を得るための出発物質として推奨される。初回のPCR時に、VおよびJ(またはC)遺伝子のそれぞれを標的とするネステッド遺伝子特異的プライマーを用いた。フォワードプライマー、F₀(フォワードアウト)およびF₁(フォワードイン)はV遺伝子を標的とした。リバースプライマーのR₀(リバースアウト)およびR₁(リバースイン)はJまたはC遺伝子のそれぞれを標的とした。F₁およびR₁プライマーはまた、ペアエンド配列決定向けのIllumina(登録商標)プラットフォーム(HiSeq, MiSeq、およびGAIIx)用の、シーケンシングアダプターBおよびAをそれぞれ含んだ。2回目のPCRは、共用(communal)(共通)プライマーBおよびAを用いて実行された。ゲル精製後、結果として生じる産物をIllumina(登録商標)プラットフォームによるハイスループット配列決定用に準備した。初回のPCRはPCR産物にバーコードおよびシーケンシングプライマーを導入した。

10

【0044】

増幅の対数期は2回目のPCRにおいて共用プライマーにより達成されたことから、標的免疫レパートリーは、さらなる増幅の偏りを導入することなく均等かつ半定量的に増幅された。

20

【0045】

乳がんシグニチャーの同定

乳がん患者由来の103個のサンプルおよび対照由来の110個のサンプルを含む、合計で213個のサンプルを収集した。213個のサンプルから合計で14,666,172個のCDR3を同定し、平均で各サンプルからCDR3 68,855個であった。213個のサンプルから8,301,648個の特有のCDR3を見いだした。プライベートなCDR3を除去した後に、213個のサンプルから合計98,076個のパブリック(すなわち、少なくとも2つの対象によって共有される)CDR3および優性(すなわち、各サンプルにおいて上位5,000個のCDR3内に順位付けされる)CDR3を、会社のウェブサイトを通じて入手可能なiRepertoire(Huntsville, Alabama USA)ソフトウェア(例えば、CDR3 Algebra)を用いて同定した。213個のサンプルから合計で287,198,206個のポジティブリンクレットを作成し、平均で各サンプルから1,003,236個のリンクレットであった。プライベートリンクレットを除去した後に、少なくとも1人の他人と共有されている16,921,605個のリンクレットが残った。各共有リンクレットについて、p値を得て、患者間で優先的に共有されるリンクレットを同定した。合計で117,069個のリンクレットをp<0.05を有する有意リンクレットとして同定し、疾患の「シグニチャー」を提供した。合計で6,171個のCDR3が117,069個の疾患シグニチャーリンクレットに寄与した。600個の有意リンクレットのカットオフ値を用いて、95%の乳がんが、93.6%の特異性で診断されうる。188個の非乳がんサンプルを試験した場合、3個のサンプルのみが偽陽性(600個を上回るDSLを有する)であり、98.4%の特異性をもたらした。

30

40

【0046】

本開示の方法は、シグナルを増大させかつバックグラウンドを減少させて、通常の方法を用いる他の方法では不可能な、疾患シグニチャーを作成するために用いることができる共有CDR3の同定を可能にする。結果として、本開示の方法は、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、および感染性疾患を含むがこれらに限定されないさまざまな疾患のための診断テストの開発を可能にするという利益を有する。

【0047】

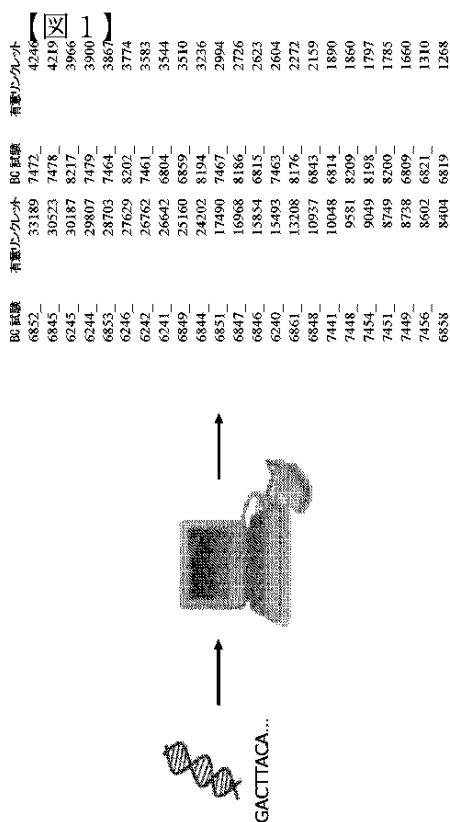
本出願は種々の刊行物を参照する。これらの刊行物の開示はその全体において、本願が

50

属する技術分野の状況をより詳しく説明するために、本明細書により参照によって本願に組み入れられる。記載された参照はまた、参照に依拠する文章において記述される範囲内に含まれる物質について、参照により本明細書に個別かつ具体的に組み入れられる。

【0048】

本明細書に記載の方法論およびその様々な態様は例示的なものである。本明細書に記載の方法論の他の様々な態様が可能である。



【図2】

| 順位 | CDR3 | リード数 |
|----|--------------------|-------|
| 1 | ASSEDRDQETQY | 40303 |
| 2 | ASSEAGSTNQPQH | 33353 |
| 3 | ATSRDRTSDSYNEQF | 16597 |
| 4 | ASSLFQGGSGKLF | 15063 |
| 5 | ASSSTGTARRLNTEAF | 14275 |
| 6 | ASTEPPNQRGVGETQY | 12193 |
| 7 | SARDGSGDADTQY | 11974 |
| 8 | ASSQDQVSNYGYT | 6939 |
| 9 | SASANPGGAGNTEAF | 6674 |
| 10 | ASSSGFNTEAF | 5633 |
| 11 | SARDRDTEAF | 5585 |
| 12 | ASSPSGGASDTQY | 5270 |
| 13 | ASSPAVDSGANVLT | 4954 |
| 14 | ASSFTGQVYNEQF | 4698 |
| 15 | ASSPPPEAF | 4693 |
| 16 | SASLSDKGNQPPQH | 4638 |
| 17 | ASSDLAETQY | 4482 |
| 18 | ASSLSSGFRPVETQY | 4265 |
| 19 | ASSLGGREQY | 4145 |
| 20 | ASRSRLEETQY | 3895 |
| 21 | ASSIWSITDTQY | 3774 |
| 22 | ASSLSAGVDITV | 3772 |
| 23 | SARDLSGGDTEAF | 3736 |
| 24 | SARQGDTEAF | 3702 |
| 25 | ASSEAPFNVRSSNQPPQH | 3660 |

【図3】

| 順位 | CDR3 | リード数 |
|----|------------------|-------|
| 1 | ASSEDRDQETQY | 40303 |
| 2 | ASSEAGSTNQPQH | 33353 |
| 3 | ATSRDRTSDSYNEQF | 16597 |
| 4 | ASSLFQGGSGKLF | 15063 |
| 5 | ASSSTGTARRLNTEAF | 14275 |

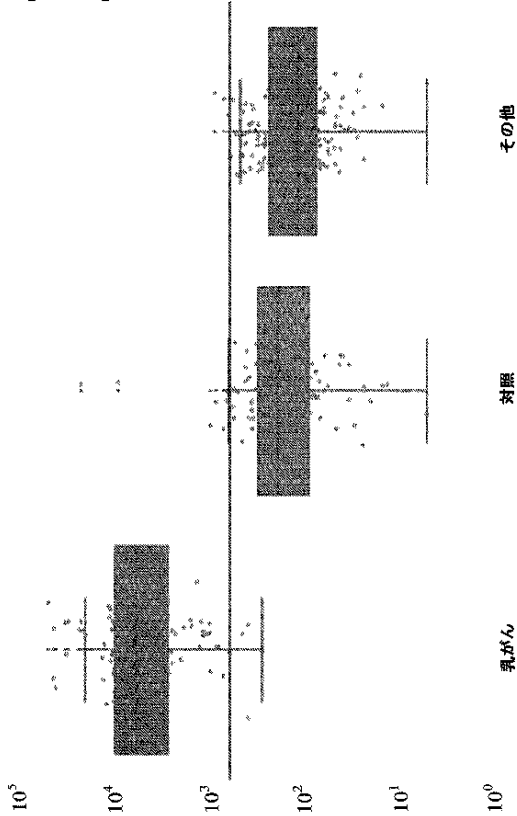
【図4】

| | c9968_C |
|-------------------------------------|---------|
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSDSSGSYNEQF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSPQGARTDTQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSDGASGNTIY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSSTSIEQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSLGGADTQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSLWGATEAF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSQTGGTEAF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYSIEQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYSPPSGIYNEQF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'SARAGQVNPQH') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSPTDTQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSSPVLNTEAF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYSGDEQF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSQDSSGANVLT') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSWRAGGTDITQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSQYSNQPQH') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYSRLYNEQF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASWAGGQPQH') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYTDYNEQF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYREGQPQH') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSLGRGRRTTEAF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSPRTSGSTGELF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSPGPNYEQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'SASRQGVNSPLH') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSTGGSGNQPQH') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSFRGGYEQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSEAGGTGELF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSDGSNTEAF') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'SAWDSSTDTQY') | 1 |
| ('ASSYGLAGYEQY', 'ASSYATNTEAF') | 1 |

【図5】

| | p値 |
|------------------------------------|---------|
| ('ASSYSGRGEF', 'ASSLGRTHQPQH') | 0.0477 |
| ('ASSLGSABQY', 'ASSLIGETQY') | 0.0477 |
| ('ATSHGGTQY', 'ASSLGGSPDTQY') | 0.0477 |
| ('ASSYSGRGEF', 'SARDLAGDRWNEQF') | 0.0477 |
| ('ASSLEAGNTEAF', 'ATROQDITQY') | 0.0477 |
| ('ASSLIGETQY', 'ASSLGRTHQPQH') | 0.0477 |
| ('ASNRQGSTTEAF', 'ASSYKTRRNEQF') | 0.0477 |
| ('ASSPISGANNEQF', 'ASTDNYGYT') | 0.0477 |
| ('ASSLSPDTQY', 'ASSLGGSPDTQY') | 0.0477 |
| ('ASSFQGTTEAF', 'ASSFGETQY') | 0.0477 |
| ('ASNRQGSTTEAF', 'ATSREANTEAF') | 0.0477 |
| ('ASSDYSNSPLH', 'ASSLIGETQY') | 0.0477 |
| ('ASCSDRAYNEQY', 'ASSQARSGGADTQY') | 0.0477 |
| ('ASSPRDYEQY', 'ASSLGRTHQPQH') | 0.0477 |
| ('ATSSGTSQY', 'ASSLIGDTQY') | 0.0477 |
| ('ASSLSPDTQY', 'ASSPRDYEQY') | 0.0477 |
| ('ASSYSGRGEF', 'ATSSGTSQY') | 0.0477 |
| ('ASSLGRLLNEQF', 'ASSLIGETQY') | 0.0477 |
| ('ASSMDIAEQY', 'ASSSTDTQY') | 0.0477 |
| ('ASSLGSABQY', 'ASSQSGAYNEQF') | 0.0477 |
| ('ASSYGRVTEAF', 'ASTOWTSLGEGF') | 0.0477 |
| ('ASCSDRAYNEQF', 'ASSSTDTQY') | 0.0477 |
| ('ASSLGGDNYGYT', 'ATSREANTEAF') | 0.0477 |
| ('ASSPISGANNEQF', 'ASGRMCKTQY') | 0.0477 |
| ('ASSLGSABQY', 'ASSLIGETQY') | 0.0477 |
| ('ATSSHGGTQY', 'ANGDRLYTEAF') | 0.0477 |
| ('ASCSDRAYNEQF', 'ASSLATSITQY') | 0.04793 |
| ('ATSSGTSQY', 'ASSFLETGMNEQY') | 0.04929 |
| ('ASTLGLQY', 'ASSPRDYEQY') | 0.04929 |
| ('ATSSTAGETQY', 'SARDLAGDRWNEQF') | 0.04929 |

【図6】



【国際調査報告】

PCT/US2016/021430 30.06.2016

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US2016/021430 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12Q 1/04; C12Q 1/68; C40B 30/02 (2016.01) CPC - C12Q 1/6869; C12Q 2549/119; C12Q 2561/113 (2016.05) 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) IPC(B) - C12Q 1/04; C12Q 1/68; C40B 30/02 (2016.01) CPC - C12Q 1/6869; C12Q 2549/119; C12Q 2561/113 (2016.05) | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/6.12; 506/8; 506/24 (keyword delimited) | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, PubMed, Google. Search terms used: assay blood sample CDR3 sequence amplify diagnose | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2014/124451 A1 (CB BIOTECHNOLOGIES INC et al) 14 August 2014 (14.08.2014) entire document | 1-8 |
| A | WO 2013/055789 A1 (ACCUGENOMICS, INC.) 18 April 2013 (18.04.2013) entire document | 1-8 |
| A | WO 2011/106738 A2 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER et al) 01 September 2011 (01.09.2011) entire document | 1-8 |
| A | ROBINSON, W. H. "Sequencing the functional antibody repertoire - diagnostic and therapeutic discovery," Nat Rev Rheumatol. 23 December 2014 (23.12.2014), Vol. 11, No. 3, Pgs. 171-182. entire document | 1-8 |
| P, A | YANG et al. "Distinct mechanisms define murine B cell lineage immunoglobulin heavy chain (IgH) repertoires," eLife, 30 September 2015 (30.09.2015), Vol. 4, Pgs. 1-32. entire document | 1-8 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 03 June 2016 | | Date of mailing of the international search report 30 JUN 2016 |
| Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | | Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

PCT/US2016/021430 30.06.2016**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2016/021430

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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, ST, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハン チーアン

アメリカ合衆国 3 5 8 0 2 アラバマ州 ハンツビル ドニゴール ドライブ サウスイースト
7 7 1 2

Fターム(参考) 4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR40 QR62

QR72 QS25 QS34

4H045 AA10 AA50 CA42 DA50 EA50

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】 第1部門第1区分
【発行日】 平成30年7月19日(2018.7.19)

【公表番号】 特表2018-509155(P2018-509155A)

【公表日】 平成30年4月5日(2018.4.5)

【年通号数】 公開・登録公報2018-013

【出願番号】 特願2017-547458(P2017-547458)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 14/705

G 0 1 N 33/53 D

【手続補正書】

【提出日】 平成30年6月6日(2018.6.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 配列表

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【配列表】

2018509155000001.app

| | | | |
|-----------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2018509155A5 | 公开(公告)日 | 2018-07-19 |
| 申请号 | JP2017547458 | 申请日 | 2016-03-09 |
| [标]发明人 | ハンチーアン | | |
| 发明人 | ハン チーアン | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 C12N15/09 C07K14/705 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/172 G01N33/6854 G16B20/00 C12Q1/04 C12Q1/68 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C07K14/705 G01N33/53.D | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS34 4H045/AA10 4H045/AA50 4H045/CA42 4H045/DA50 4H045/EA50 | | |
| 代理人(译) | 清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘 | | |
| 优先权 | 62/130512 2015-03-09 US | | |
| 其他公开文献 | JP2018509155A | | |

摘要(译)

本公开一般涉及用于产生免疫应答的方法和所得的基于免疫库的诊断测试。所公开的方法增加信号并减少背景以允许识别可用于产生疾病特征的共享CDR3。所公开的方法可用于开发各种疾病的诊断测试，包括但不限于癌症，自身免疫疾病，炎性疾病和传染病。