

【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】令和1年10月17日(2019.10.17)

【公表番号】特表2018-535652(P2018-535652A)  
 【公表日】平成30年12月6日(2018.12.6)  
 【年通号数】公開・登録公報2018-047  
 【出願番号】特願2018-515549(P2018-515549)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6804 (2018.01)  
 C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)  
 C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/115 (2010.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6804 Z N A Z  
 C 1 2 Q 1/6869 Z  
 C 1 2 Q 1/6851 Z  
 G 0 1 N 33/53 D  
 C 1 2 N 15/115 Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年9月4日(2019.9.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞を特徴付ける方法であって、複数のベッセルのうち少なくとも1つの単一ベッセル中で反応を実行することを含み、前記反応が、第1のベッセルバーコード配列を含む第1のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分に付着させることを含み、前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、前記複数のベッセルのうちの前記少なくとも1つの単一ベッセル中で単離された単一の細胞によって発現される標的抗原に結合し、前記オリゴヌクレオチド部分は、抗原識別(AID)配列を含み、必要に応じて、前記標的抗原は細胞外抗原である、方法。

【請求項2】

前記単一の細胞が、単一の試料に由来する複数の細胞に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記AID配列が、前記標的抗原、または前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記親和性部分にバーコード化される、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記少なくとも1つの単一ベッセル中で前記単一の細胞が単離される前に、前記単一の細胞を含む複数の細胞を前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させることをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記複数のベッセルの任意の1つの単一ベッセルにおいて、前記第1のベッセルバーコ

ード化ポリヌクレオチドの前記第 1 のベッセルバーコード配列またはそのアンプリコンが、前記 1 つの単一ベッセルに固有である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記少なくとも 1 つの単一ベッセル中の前記単一の細胞を溶解させることと、第 2 のベッセルバーコード配列を含む第 2 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、前記単一の細胞由来の細胞ポリヌクレオチドに付着させることと、必要に応じて、前記第 1 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドおよび前記第 2 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを同時に付着させることとをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記第 1 または前記第 2 の親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分が、親和性分子バーコード ( A M B ) 配列、プライマー結合配列、融合配列、または定常配列の少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記方法は、前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分を、前記付着したベッセルバーコード化ポリヌクレオチド、その相補体、その増幅された産物、またはそれらの組合せと配列決定し、それによって、オリゴヌクレオチド配列読み取りを生成すること；および / または前記細胞ポリヌクレオチドを、前記付着したベッセルバーコード化ポリヌクレオチド、その相補体、その増幅された産物、またはそれらの組合せと配列決定し、それによって、細胞ポリヌクレオチド配列読み取りを生成することをさらに含む、請求項 6 または請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記方法は、オリゴヌクレオチド配列読み取りを細胞ポリヌクレオチド配列読み取りと、前記オリゴヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列を前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列と、前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別 ( A I D ) 配列を前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの親和性分子バーコード ( A M B ) 配列または細胞ポリヌクレオチド配列読み取りと比較すること；および / または、前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列または前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りの分子バーコード配列を分析することをさらに含み、前記方法は、必要に応じて、前記比較および / または分析に基づいて細胞の特徴を決定することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記オリゴヌクレオチド部分に付着した前記第 1 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの前記第 1 のベッセルバーコード配列と、前記細胞ポリヌクレオチドに付着した前記第 2 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの前記第 2 のベッセルバーコード配列とが同じである、および / または前記少なくとも 1 つの単一ベッセル中の同じ鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド由来である、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記少なくとも 1 つの単一ベッセルが、ウェル、エマルジョンまたは液滴である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

分子バーコード配列を含む分子バーコード化ポリヌクレオチドを前記細胞ポリヌクレオチドに付着させることをさらに含み、前記分子バーコード配列が、前記細胞ポリヌクレオチドおよび / またはそのアンプリコンにバーコード化される、請求項 6 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記第 1 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを前記オリゴヌクレオチド部分に付着させること、または前記第 2 のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを前記細胞ポリヌクレオチドに付着させることが、ライゲーション反応、酵素反応、ハイブリダイゼーシ

ジョン反応、伸長反応、または増幅反応を含む、請求項 6 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記単一の細胞の前記細胞外抗原が、免疫細胞、必要に応じて T 細胞または B 細胞に特異的な抗原またはそれによって発現される抗原である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記細胞外抗原が、CD154、CD4、CD8、CD137、CD40L、CD80、CD86、CD11c、CD25、CD69、CD44、CD125、CD2、CD3、CD5、CD14 および CD19 からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記親和性部分が、抗体もしくはその断片、ペプチド、タンパク質、アプタマー、小分子、薬物または細胞である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記親和性部分が、主要組織適合性複合体 (MHC) またはその機能的部分もしくは結合性部分、あるいは抗体もしくはキメラ抗原受容体 (CAR) に結合するペプチドのうちの一つを含む、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

複数のベッセルを含む、細胞を特徴付けるための組成物であって、前記複数のベッセルのうち少なくとも一つの単一ベッセルが、

(a) 複数の細胞を含む試料由来の単一の細胞；

(b) ベッセルバーコード配列を含むベッセルバーコード化ポリヌクレオチドまたはその相補体；および

(c) 親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、前記単一の細胞の標的抗原に結合する、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート  
を含み、

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドまたはその相補体が、前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分に付着し、そして、必要に応じて、前記単一の細胞が溶解されることを特徴とする、組成物。

**【請求項 19】**

親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを作製するためのキットであって、

(a) 第 1 の抗原識別 (AID) 配列および第 1 の親和性分子バーコード (AMB) 配列を含む第 1 のオリゴヌクレオチドを含む第 1 の容器であって、前記第 1 の AID 配列および前記第 1 の AMB 配列が既知の配列である、第 1 の容器；

(b) 第 2 の抗原識別 (AID) 配列および第 2 の親和性分子バーコード (AMB) 配列を含む第 2 のオリゴヌクレオチドを含む第 2 の容器であって、前記第 2 の AID 配列が既知の配列であり、前記第 1 の AID 配列とは異なり、前記第 2 の AMB 配列が既知の配列であり、前記第 1 の AMB 配列とは異なる、第 2 の容器；

(c) 前記第 1 のオリゴヌクレオチドを第 1 の親和性分子にコンジュゲートすることが可能な試薬、および / または、前記第 2 のオリゴヌクレオチドを第 2 の親和性分子にコンジュゲートすることが可能な試薬を含む、一つまたは複数のさらなる容器であって、

前記第 1 の親和性分子は、細胞の第 1 の細胞外タンパク質に結合するように構成されており、前記第 2 の親和性分子は、細胞の第 2 の細胞外タンパク質に結合するように構成されており、前記第 1 の細胞外タンパク質は、前記第 2 の細胞外タンパク質とは異なる、さらなる容器；ならびに

(d) 前記第 1 のオリゴヌクレオチドを前記第 1 の親和性分子にどのようにコンジュゲ

ートするか、および前記第2のオリゴヌクレオチドを前記第2の親和性分子にどのように  
コンジュゲートするかを記載する、指示書のセット  
を含む、キット。

**【請求項20】**

(e) 複数のベッセルパーコード化ポリヌクレオチドを含むさらなる容器であって、前  
記複数のベッセルパーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれのベッセルパーコード化ポリ  
ヌクレオチドは、固有のベッセルパーコード化配列を含む、容器；および

(f) 前記第1または第2の親和性分子にコンジュゲートされるときに、前記複数のベ  
ッセルパーコード化ポリヌクレオチドのベッセルパーコード化ポリヌクレオチドを、前記  
第1または第2のオリゴヌクレオチドに結合させる試薬および指示書のセット  
をさらに含む、請求項19に記載のキット。

**【手続補正2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0051

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【0051】**

本明細書に記載されている新規特徴は、特に添付の特許請求の範囲に示されている。本  
明細書に記載されている特徴および特徴の利点に関するより良好な理解は、本明細書に記  
載されている特徴の原理が利用されている説明例が示されている以下の詳細な記載および  
添付の図面を参照することにより得られ得る。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

(項目1)

複数のベッセルのうちの1つのベッセル中で反応を実行することを含む方法であって、  
前記反応が、ベッセルパーコード配列を含むベッセルパーコード化ポリヌクレオチドを、  
親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分に付着させること  
を含み、前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、前記複数のベッセルのうち  
の1つのベッセル中で細胞によって発現される標的抗原に結合する、方法。

(項目2)

前記細胞が、前記ベッセル内に含まれる単一の細胞である、項目1に記載の方法。

(項目3)

反応が、前記複数のベッセルのうちの2またはそれよりも多くのベッセル中で起こる、  
項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記ベッセルが、前記複数のベッセルの各ベッセルを構成する、項目1から3のいずれ  
か一項に記載の方法。

(項目5)

前記複数のベッセルが、2またはそれよりも多くの複数のベッセルを含む、項目1から  
4のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

各ベッセル中の前記細胞が、同じ試料由来である、項目4または5に記載の方法。

(項目7)

前記2またはそれよりも多くの複数のベッセルのうちの第1の複数のベッセルのうちの  
1つのベッセル中の前記細胞が、前記2またはそれよりも多くの複数のベッセルのうちの  
第2の複数のベッセルのうちの1つのベッセル中の前記細胞と同じ試料由来である、項目  
5に記載の方法。

(項目8)

前記オリゴヌクレオチド部分が、抗原識別配列(AID)を含む、項目1から7のい  
ずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記AIDが、前記標的抗原、または前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分にバーコード化される、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記抗原識別配列(AID)が既知の配列である、項目8または9に記載の方法。

(項目11)

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記ベッセル中の鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド由来である、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

配列情報を取得するために、前記オリゴヌクレオチドまたはそのアンプリコンを配列決定することをさらに含む、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記配列情報に基づいて、前記ベッセル中の前記細胞の特徴を決定することをさらに含む、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記配列情報が、前記抗原識別(AID)配列もしくはその相補体を含み、および/または前記AID配列を有する分子のコピー数を含む、項目12または13に記載の方法。

(項目15)

前記配列情報に基づいて、前記単一の細胞の特徴を決定することをさらに含む、項目12から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記特徴が表現型である、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記表現型が免疫表現型である、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを、単一の細胞を含む複数の細胞に接触させることをさらに含む、項目1から17のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記接触させることが、前記ベッセル中で前記単一の細胞が単離される前である、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記接触させることの後に、前記複数の細胞を洗浄することをさらに含む、項目18または19に記載の方法。

(項目21)

前記ベッセルが、標的抗原に結合していない親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含まない、項目1から20のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

前記ベッセル中の前記単一の細胞を単離することをさらに含む、項目1から21のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記単一の細胞が、前記単離することの前に前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合される、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記単一の細胞を溶解させることをさらに含む、項目1から23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記溶解させることが、前記ベッセル中で前記単一の細胞が単離された後である、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記複数の細胞が、複数のソーティングされていない細胞である、項目1から25のい

ずれか一項に記載の方法。

(項目 27)

前記複数のベッセルのうちの第1のベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドまたはそのアンプリコンの前記ベッセルバーコード配列が、前記複数のベッセルのうちの第2のベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドまたはそのアンプリコンの前記ベッセルバーコード配列とは異なる、項目1から26のいずれか一項に記載の方法。

(項目 28)

前記複数のベッセルのうちの単一のベッセル中の各ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドまたはそのアンプリコンの前記ベッセルバーコード配列が、同じベッセルバーコード配列を含む、項目1から27のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

前記複数のベッセルのうちの任意の単一のベッセル中の各ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドおよびそのアンプリコンの前記ベッセルバーコード配列が、前記複数のベッセルのうちの任意の他の単一のベッセル中の各ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドおよびそのアンプリコンの前記ベッセルバーコード配列に対して固有である、項目1から28のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

前記ベッセルバーコードを含むベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、前記細胞由来の細胞ポリヌクレオチドに付着させることをさらに含む、項目1から29のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチドに付着させることと、前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、前記単一の細胞由来の細胞ポリヌクレオチドに付着させることとが、同時に実行される、項目30に記載の方法。

(項目 32)

前記オリゴヌクレオチドまたはその相補体を増幅することをさらに含む、項目1から31のいずれか一項に記載の方法。

(項目 33)

前記細胞ポリヌクレオチドまたはその相補体を増幅することをさらに含む、項目30から32のいずれか一項に記載の方法。

(項目 34)

前記オリゴヌクレオチドまたはその相補体を増幅することと、前記細胞ポリヌクレオチドまたはその相補体を増幅することとが、同時に実行される、項目33に記載の方法。

(項目 35)

前記細胞ポリヌクレオチドの前記ベッセルバーコード配列と前記オリゴヌクレオチドの前記ベッセルバーコード配列とが同じである、項目30から34のいずれか一項に記載の方法。

(項目 36)

前記複数のベッセルのうちの2またはそれよりも多くのベッセルから、オリゴヌクレオチドまたはそのアンプリコンをプールすることをさらに含む、項目1から35のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

前記複数のベッセルのうちの2またはそれよりも多くのベッセルから、オリゴヌクレオチドまたはそのアンプリコンおよび細胞ポリヌクレオチドまたはそのアンプリコンをプールすることをさらに含む、項目36に記載の方法。

(項目 38)

前記プールすることが、配列決定することの前である、項目36または37に記載の方法。

(項目 39)

前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、複数の異なる親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む、項目 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの各親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、固有の抗原識別 ( A I D ) 配列を含む、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記オリゴヌクレオチドが、複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子のうちの単一の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子にバーコード化される親和性分子バーコード ( A M B ) 配列を含む、項目 1 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

前記複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の各親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、固有の親和性分子バーコード ( A M B ) 配列を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記オリゴヌクレオチドが、融合配列を含み、前記付着させることが、前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを前記融合配列に付着させることを含む、項目 1 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記オリゴヌクレオチドが、プライマー結合配列を含む、項目 1 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記オリゴヌクレオチドが、定常配列を含む、項目 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記オリゴヌクレオチド、その相補体、その増幅された産物、またはそれらの組合せを配列決定することであって、それによって、オリゴヌクレオチド配列読み取りを生成することをさらに含む、項目 1 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

1 つまたは複数の第 1 のオリゴヌクレオチド配列読み取りを、1 つまたは複数の第 2 のオリゴヌクレオチド配列読み取りと比較することをさらに含む、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りを分析することをさらに含む、項目 4 6 または 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列を分析することをさらに含む、項目 4 6 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別 ( A I D ) 配列を分析することをさらに含む、項目 4 6 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの親和性分子バーコード ( A M B ) 配列を分析することをさらに含む、項目 4 6 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記分析することが、1 もしくは複数のベッセルバーコード配列、1 もしくは複数の A I D 配列、1 もしくは複数の親和性分子バーコード ( A M B ) 配列、またはそれらの組合せの頻度を決定することを含む、項目 4 8 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記分析することが、比較することを含む、項目 4 8 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 4)

オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別 ( A I D ) 配列を、オリゴヌクレオチド配列読み取りの親和性分子バーコード ( A M B ) 配列と比較することをさらに含む、項目 4 6 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 5 )

前記細胞ポリヌクレオチド、その相補体、その増幅された産物、またはそれらの組合せを配列決定することであって、それによって、細胞ポリヌクレオチド配列読み取りを生成することをさらに含む、項目 3 0 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 6 )

オリゴヌクレオチド配列読み取りを、前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りと比較することをさらに含む、項目 5 5 に記載の方法。

( 項目 5 7 )

オリゴヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列を、前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列と比較することをさらに含む、項目 5 5 または 5 6 に記載の方法。

( 項目 5 8 )

前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りを比較することをさらに含む、項目 5 5 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 9 )

前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りのベッセルバーコード配列を分析することをさらに含む、項目 5 5 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 0 )

前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りの分子バーコード配列を分析することをさらに含む、項目 5 5 から 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 1 )

前記分析することまたは前記比較することに基づいて、細胞の特徴を決定することをさらに含む、項目 4 6 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 2 )

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りに基づいて、抗体または T C R を選択することをさらに含む、項目 4 6 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 3 )

前記細胞ポリヌクレオチド配列読み取りに基づいて、抗体または T C R を選択することを含む、項目 5 5 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 4 )

前記オリゴヌクレオチドに付着させた前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドと、前記細胞ポリヌクレオチドに付着させた前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドとが、前記ベッセル中の同じ鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド由来である、項目 1 から 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 5 )

前記オリゴヌクレオチドに付着させた前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの増幅産物である、項目 1 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 6 )

前記細胞ポリヌクレオチドに付着させた前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの増幅産物である、項目 6 4 または 6 5 に記載の方法。

( 項目 6 7 )

前記ベッセルが、固体支持体を含む、項目 1 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 8 )

前記ベッセルが、固体支持体を含まない、項目 1 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法

(項目69)

前記複数のベッセルの各ベッセルが、単一の細胞を含む、項目1から68のいずれか一項に記載の方法。

(項目70)

前記ベッセルが、ウェル、エマルジョンまたは液滴である、項目1から69のいずれか一項に記載の方法。

(項目71)

前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合していない、項目1から70のいずれか一項に記載の方法。

(項目72)

前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合している、項目1から70のいずれか一項に記載の方法。

(項目73)

複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドのうち1つの分子バーコード化ポリヌクレオチドの分子バーコード配列を、前記細胞ポリヌクレオチドに付着させることをさらに含み、前記分子バーコード配列が、単一の細胞ポリヌクレオチド分子およびそのアンプリコンにバーコード化される、項目1から72のいずれか一項に記載の方法。

(項目74)

前記付着させることが、前記ベッセルポリヌクレオチドを前記オリゴヌクレオチドにライゲーションすることを含む、項目1から73のいずれか一項に記載の方法。

(項目75)

前記付着させることが、酵素を用いて前記ベッセルポリヌクレオチドを前記オリゴヌクレオチドに付着させることを含む、項目1から74のいずれか一項に記載の方法。

(項目76)

前記付着させることが、前記ベッセルポリヌクレオチドを前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせることを含む、項目1から75のいずれか一項に記載の方法。

(項目77)

前記付着させることが、前記オリゴヌクレオチドを伸長させることをさらに含む、項目76に記載の方法。

(項目78)

前記付着させることが、鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを増幅することを含む、項目1から77のいずれか一項に記載の方法。

(項目79)

前記親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、前記単一の細胞の細胞外抗原に結合する、項目1から78のいずれか一項に記載の方法。

(項目80)

前記単一の細胞の前記細胞外抗原が、免疫細胞に特異的な抗原である、項目1から79のいずれか一項に記載の方法。

(項目81)

前記単一の細胞の前記細胞外抗原が、T細胞に特異的な抗原またはT細胞によって発現される抗原である、項目80に記載の方法。

(項目82)

前記細胞外抗原がCD4である、項目81に記載の方法。

(項目83)

前記細胞外抗原がCD8である、項目81に記載の方法。

(項目84)

前記細胞外抗原が、CD154、CD4、CD8、CD137、CD40L、CD80、CD86、CD11c、CD25、CD69、CD44、CD125、CD2、CD3、CD5、CD14およびCD19からなる群から選択される、項目81に記載の方法。

(項目85)

前記単一の細胞の前記細胞外抗原が、B細胞に特異的な抗原またはB細胞によって発現される抗原である、項目80に記載の方法。

(項目86)

前記細胞外抗原が免疫グロブリンである、項目85に記載の方法。

(項目87)

前記オリゴヌクレオチドが二本鎖である、項目1から86のいずれか一項に記載の方法。

(項目88)

前記オリゴヌクレオチドが一本鎖である、項目1から86のいずれか一項に記載の方法。

(項目89)

前記オリゴヌクレオチドがDNAである、項目1から88のいずれか一項に記載の方法。

(項目90)

前記オリゴヌクレオチドがRNAである、項目1から88のいずれか一項に記載の方法。

(項目91)

前記細胞ポリヌクレオチドが、可変領域配列を含む、項目1から90のいずれか一項に記載の方法。

(項目92)

可変領域配列を含むネイティブ鎖配列を対合させることをさらに含む、項目1から91のいずれか一項に記載の方法。

(項目93)

前記単一の細胞がT細胞である、項目1から84および87から92のいずれか一項に記載の方法。

(項目94)

前記単一の細胞がB細胞である、1から80および85から92のいずれか一項に記載の方法。

(項目95)

前記細胞ポリヌクレオチドがDNAである、項目30から94のいずれか一項に記載の方法。

(項目96)

前記細胞ポリヌクレオチドがRNAである、項目30から94のいずれか一項に記載の方法。

(項目97)

前記RNAがmRNAである、項目96に記載の方法。

(項目98)

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、抗体またはその断片である、項目1から97のいずれか一項に記載の方法。

(項目99)

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、ペプチドである、項目1から97のいずれか一項に記載の方法。

(項目100)

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、タンパク質である、項目1から97のいずれか一項に記載の方法。

(項目101)

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、アダプターである、項目1から97のいずれか一項に記載の方法。

(項目102)

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、小分子である、項目1

から 97 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 3 )

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、薬物である、項目 1 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 4 )

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、細胞である、項目 1 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 5 )

前記細胞が抗原提示細胞 ( A P C ) である、項目 1 0 4 に記載の方法。

( 項目 1 0 6 )

前記親和性オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分が、主要組織適合性複合体 ( M H C ) またはその機能的部分もしくは結合性部分を含む、項目 1 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 7 )

前記親和性部分が、前記 M H C の多量体、任意選択で、前記 M H C の四量体を含む、項目 1 0 6 に記載の方法。

( 項目 1 0 8 )

前記 M H C が可溶性形態である、項目 1 0 6 または 1 0 7 に記載の方法。

( 項目 1 0 9 )

前記 M H C が、前記 M H C の溝内で、ペプチドに結合しているか、そして / またはペプチドを含む、項目 1 0 6 から 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 1 0 )

前記ペプチドが合成ペプチドである、項目 1 0 9 に記載の方法。

( 項目 1 1 1 )

前記 M H C が、前記単一の細胞の T 細胞受容体 ( T C R ) に結合する、項目 1 0 6 から 1 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 1 2 )

前記親和性部分が、抗体もしくはキメラ抗原受容体 ( C A R ) に結合するペプチドを含み、および / または前記標的が、抗体もしくは C A R である、項目 1 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 1 3 )

前記親和性部分が、前記抗体もしくは前記キメラ抗原受容体によって特異的に認識される抗原もしくはエピトープであるかまたはそれを含み、そして / またはそれに特異的に結合する抗体、任意選択で、その抗原結合性部分に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を含む、項目 1 1 2 に記載の方法。

( 項目 1 1 4 )

複数のベッセルを含む組成物であって、前記複数のベッセルのうちの 1 つのベッセルが

( a ) 複数の細胞を含む試料由来の単一の細胞、および

( b ) ベッセルバーコード配列を含むベッセルバーコード化ポリヌクレオチド  
を含み、

前記ベッセルが、前記単一の細胞の標的抗原に結合する親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート、またはそれ由来のオリゴヌクレオチド部分をさらに含む、組成物。

( 項目 1 1 5 )

反応が、前記複数のベッセルのうちの 2 またはそれよりも多くのベッセル中で起こる、項目 1 1 4 に記載の組成物。

( 項目 1 1 6 )

前記ベッセルが、前記複数のベッセルの各ベッセルを構成する、項目 1 1 4 または 1 1 5 に記載の組成物。

( 項目 1 1 7 )

前記複数のベッセルが、2またはそれよりも多くの複数のベッセルを含む、項目114から116のいずれか一項に記載の組成物。

(項目118)

各ベッセル中の前記細胞が、同じ試料由来である、項目116または117に記載の組成物。

(項目119)

前記2またはそれよりも多くの複数のベッセルのうちの第1の複数のベッセルのうちの1つのベッセル中の前記細胞が、前記2またはそれよりも多くの複数のベッセルのうちの第2の複数のベッセルのうちの1つのベッセル中の前記細胞と同じ試料由来である、項目117に記載の組成物。

(項目120)

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドまたはその相補体が、前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記オリゴヌクレオチドに付着される、項目114から119のいずれか一項に記載の組成物。

(項目121)

前記単一の細胞が溶解される、項目114から120のいずれか一項に記載の組成物。

(項目122)

複数のベッセルを含む組成物であって、前記複数のベッセルのうちの1つのベッセルが

(a) 複数の細胞を含む試料由来の単一の溶解細胞、および

(b) 前記単一の溶解細胞の標的抗原に結合する親和性部分を含む親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲート、または前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分

を含み、

前記親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分が、ベッセルバーコード配列を含み、前記単一の溶解細胞由来の細胞ポリヌクレオチドが、同じベッセルバーコード配列を含む、組成物。

(項目123)

(a) 第1の抗原識別(AID)配列を含む第1のオリゴヌクレオチドを含む第1の容器であって、前記第1のAID配列が既知の配列である、第1の容器；

(b) 第2の抗原識別(AID)配列を含む第2のオリゴヌクレオチドを含む第2の容器であって、前記第2のAID配列が既知の配列であり、前記第1のAID配列とは異なる、第2の容器；

(c) 前記第1のオリゴヌクレオチドを第1の親和性分子にコンジュゲートすることが可能な試薬と、前記第2のオリゴヌクレオチドを第2の親和性分子にコンジュゲートすることが可能な試薬とを含む、1つまたは複数の第3の容器；

(d) 前記第1のオリゴヌクレオチドを前記第1の親和性分子にどのようにコンジュゲートするか、および前記第2のオリゴヌクレオチドを前記第2の親和性分子にどのようにコンジュゲートするかを記載する、指示書のセット

を含む、キット。

(項目124)

(a) 抗原識別(AID)配列を含むオリゴヌクレオチドを含む第1の容器であって、前記AID配列が既知の配列である、第1の容器；

(b) 前記オリゴヌクレオチドを親和性分子にコンジュゲートすることが可能な試薬を含む第2の容器；

(c) 複数のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを含む第3の容器；および

(d) 前記親和性分子にコンジュゲートされたときに、前記複数のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドのうちの1つのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを前記オリゴヌクレオチドにどのように付着させるかを記載する、指示書のセット

を含む、キット。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0419

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0419】

(実施例1)

T細胞集団中の単一Tリンパ球のイムノタイピング

本明細書に記載されているイムノフェノタイピング法を、ヒトTリンパ球におけるCD4およびCD8のmRNAならびに表面タンパク質発現の両方を分析することにより検証した。通常、成熟T細胞は、CD4サブタイプまたはCD8サブタイプのいずれかであると予想される。CD4サブタイプは、CD4 mRNAおよびCD4タンパク質を共に発現するはずであるが、CD8 mRNAまたはCD8タンパク質のいずれかを発現するはずである。CD8サブタイプは、CD8 mRNAおよびCD8タンパク質を共に発現するはずであるが、CD4 mRNAまたはCD4タンパク質のいずれかを発現するはずである。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0424

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0424】

(実施例3)

健常血液試料からのB細胞V<sub>H</sub>V<sub>L</sub>ペア対の大規模回収

最初に、本技術を開発し、対合能力およびスルーットを、陰性ビーズ濃縮により健常ボランティアの末梢血から単離された300万個のB細胞でアセスメントした。エマルジョンを6つの別々の画分に分割し、それらを並列で処理し、配列決定前に再混合しなかった。エマルジョンを、1液滴当たり0.2細胞になるように装填した。これは、占有液滴の約90%が単一細胞を含有するというポアソン期待値をもたらし、エマルジョン液滴観察と一致していた(図6A)。エマルジョン破壊および追加のライブラリー処理ステップを行った後、Illumina MiSeqを用いて、ペアエンド325+300bp配列決定を実施した。配列決定データを処理するため、液滴および分子バーコードを共に使用して、元々の各mRNA分子からPCR複製読み取りを収集し、各mRNAについてコンセンサスを決定して、少なくとも2つの読み取りから組み立てられたmRNA配列のみを維持した。フォワードおよびリバース読み取りを繋ぎ合わせて、5'UTR、完全V(D)J配列、およびアイソタイプ決定に十分な定常領域を含む全長産物を生成した。IMGT High-VQuestおよび/またはIgBLASTを用いて、再配置された免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に注釈を付けた。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0425

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0425】

得られたデータセットは、少なくとも1つの重鎖(V<sub>H</sub>)および1つの軽鎖(V<sub>L</sub>)mRNAと関連していた324,988個の液滴バーコードを含有し、重鎖クラスター分析で評価して229,869個の異なるV<sub>H</sub>クローン系列が存在していた。この生セットは、複数細胞ならびに単一細胞液滴に由来するデータを含むため、非一致の重鎖または軽鎖

V ( D ) J 配列に関連した液滴バーコードをフィルタリングして取り除くことにより、単一細胞液滴に由来するデータを濃縮した ( 図 6 B )。このことを実施することが可能であるのは、典型的な免疫レパートリーの多様性が高いためであり、2つのランダム細胞に由来する  $V_H$  または  $V_L$  mRNA がマッチングすることは、ほとんど全くないだろう。得られた濃縮データセットは、259, 368個の  $V_H V_L$  液滴バーコードを含み、182, 745個の  $V_H$  のクローン系列を含有していた。これは、現在までで最も高深度の対合した免疫レパートリーのサンプリングであることをほぼ間違いなく示す。クローン的に関連する細胞は、それらの  $V_H V_L$  対合が一貫しているはずであるため、クローン拡大の発生を識別することにより、 $V_H V_L$  対合の精度を直接的に評価した。1つよりも多くのエマルジョン画分で、クローン的に拡大した細胞であることが高い信頼性で観察された2, 604個の  $V_H$  クローンが識別された。これら  $V_H$  クローンと対合した  $V_L$  配列は、画分間の一貫性が非常に高く、96.1%の対合精度を示した。これにより、259, 368個の  $V_H V_L$  ペアのフィルタリングされたデータセット全体に高い信頼性が与えられた。交差画分  $V_H$  および  $V_L$  配列は、各画分にて異なる液滴および分子バーコードと関連することが常であり、したがってライブラリー交差汚染を示さなかった。一部のB細胞は複数の軽鎖を発現することが公知であるため、分析は、対合精度を過小評価する場合がある。259, 368個のフィルタリングされた  $V_H V_L$  液滴バーコードまたは「 $V_H V_L$  ペア」の75.0%は、IgMおよび/またはIgDを含有していた ( 図 6 C )。これは、未感作ナイーブB細胞は典型的にはIgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> 表現型であることを考慮すると、予想通り一緒に観察されることが多かった。より少ないがかなりの割合のIgA ( 18.3% ) およびIgG ( 6.6% )  $V_H V_L$  ペアも見出された。 $V_H$  アイソタイプは全て、約3:2の比率でIg またはIg のいずれかと対合した。182, 745個の  $V_H$  クローン系列中のクローン拡大を2つの方法でアセスメントした: クローンに関連する液滴バーコードの数; およびエマルジョン画分にわたるそのクローンの観察。複数の液滴バーコードでクローンが見られることは、クローン拡大を反映する場合もあり、または複数バーコード液滴を反映する場合もある。初期 = 1であったこと、つまり液滴内へのバーコードの分散がポアソン分散であったことを考慮すると、液滴の約37%で複数バーコード液滴が予想された。しかしながら、> 8つの液滴バーコードにより表わされるクローンは全て、間違いなく拡大性である可能性が高い ( 単一液滴中のポアソン確率は、< 10<sup>-6</sup> )。全体でクローンの6.0%が1つよりも多くの画分で見られたが、8つよりも多くの液滴バーコードで見られたクローン ( 全体で0.7% ) の場合、それらの99%は、1つよりも多くの画分で見られた。100個の最も高頻度のクローン ( 各々30 ~ 137個の液滴バーコード、図 6 D ) は全て、6つの画分の少なくとも5つで見られた。したがって、バーコード計数および独立した画分分析を組み合わせると、非増殖クローンの龐大なバックグラウンドの中から、希少な拡大系列を検出することが可能になる。しかしながら、最も多量の拡大したクローンでさえ、1000個に1個未満の細胞にしか存在していなかったことは注目すべきことであり、ヒト末梢免疫レパートリーの多様性が非常に高いことを例示している。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0426

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0426】

発現レベルの推定としての、ペア内の各  $V_H$  および  $V_L$  鎖の捕捉 mRNA の数 ( 図 6 E )。概して、1液滴バーコード当たり10個未満の重鎖 ( 平均2.0 ) および軽鎖 ( 平均4.0 ) mRNA が捕捉され、1細胞当たり、数ダース ~ 数百個の捕捉重鎖および軽鎖 mRNA を有する液滴バーコードの小集団が、ほとんど排他的にIgGおよびIgA発現細胞から観察された。興味深いことには、ペア内の  $V_H$  および  $V_L$  突然変異の程度は、各アイソタイプ ( 例えば、IgGの場合は、 $V_H$  対  $V_L$  ) 内、およびアイソタイプ間 ( 例えば

、I g G対I g M)の両方で、強い相関性を示した(図6 F)。さらに、I g GおよびI g A対はほとんど全てが、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>鎖の両方にかなりの突然変異を示したが、I g MおよびI g Dペアはほとんどが、V<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>突然変異をほとんど示さなかった。こうした結果は、B細胞活性化の機序と一致し、I g MおよびI g DからI g GまたはI g Aへのクラススイッチ、免疫グロブリン発現の増加、ならびに細胞の重鎖および軽鎖遺伝子座の両方に影響を及ぼす体細胞超変異に至る。高度に突然変異を起こしたV<sub>H</sub>鎖は、高度に突然変異を起こしたV<sub>L</sub>鎖と対合する傾向があるというこの観察に加えて、本方法は、休止ヒトB細胞レパートリーに由来する多数の全長のネイティブに対合したBCRを生成することが可能である。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0427

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0427】

(実施例4)

HIV長期非進行者からの公既知の低頻度V<sub>H</sub>V<sub>L</sub>対ペアの回収。

アッセイの対合感度および正確性のさらなる検証として、いくつかの希少な(10,000個の細胞中、<1個の細胞)ネイティブV<sub>H</sub>V<sub>L</sub>対合が既に既知である試料を処理した。HIV長期非進行患者から末梢B細胞を得た。この患者のメモリB細胞は、HIV中和活性を示す抗体が近年詳細に探索されている。350,000個のB細胞を処理して、合計38,620個のフィルタリングされたV<sub>H</sub>V<sub>L</sub>ペアを生成した。興味深いことには、この個体は、以前の健常試料(図7A)または典型的な健常末梢B細胞レパートリーよりも高い割合のI g Gを示した。このデータセットに由来するV<sub>H</sub>配列を、PGT121を含む、この個体に由来する全ての報告されている広域中和抗体(bNAb)と比較し、8つの類似または同一のV<sub>H</sub>配列を見出した。これは、bNAbのこのファミリーが循環B細胞の0.03%未満であることを示す。重要なことには、これら重鎖と対合した全ての軽鎖は、予想される同様に希少のbNAb系列のものであり、以前に報告されているように、同じI g - V3 - 21 / J3再配置および特徴的な3コドン挿入を示し、本発明者らの方法の正確性および感度が高いことが支持された。さらに、この個体に由来する、全ての既知の新らたに生成されたPGT121様V<sub>H</sub>V<sub>L</sub>ペアの系統樹(図7B)では、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ツリーは、鏡像様位置を占める対合したV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列と非常に類似したトポロジーを示しており、これは、系統発生史が共通していることを反映している可能性が高い。ここで発見されたバリエーションペアは、このルールに良好に当てはまる。興味深いことには、2つの発表されている抗体PGT122およびPGT123は、例外であると考えられ、これら2つの対合を支持するものは見出されなかったが、その代わりに、PGT122V<sub>H</sub>:PGT123V<sub>L</sub>様のおよびPGT123V<sub>H</sub>:PGT122V<sub>L</sub>様のペアが見出された。これは、元々の報告書では確認されていない対合を示している。8つの新規なPGT様V<sub>H</sub>V<sub>L</sub>ペアの完全なV(D)J領域をコードするDNAを合成し、抗体を完全I g Gとして発現させ、複数のHIV擬似系統を中和する能力を試験した(図7C)。抗体は良好に発現され、全てがウイルスに対する強力な中和活性を示し、関連する生物学的試料からネイティブに対合した機能性抗体バリエーションを迅速に生成する本発明者らの手法の有用性が実証された。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0428

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0428】

(実施例5)

### 腫瘍浸潤リンパ球に由来するB細胞およびT細胞受容体対ペア

対合した受容体をハイスループットで回収するためにエマルジョンバーコード付与が検証されたことを受けて、免疫受容体を、腫瘍から直接回収した。プロテアーゼで分離された切除卵巣腺癌試料を得、400,000個のソーティングされていない細胞をエマルジョンに入れた。別々の等量の試料をCD3/CD19染色することにより、かなりの数の浸潤性B(約5%)およびT細胞(約20%)が物質中に存在することが示唆された。エマルジョン中の単一細胞分散系は、いくつかの限定的な塊が視認されたとはいえ、精製細胞と類似しており、試料の細胞タイプが不均質であったことを考慮すると予想通りに液滴内の細胞サイズおよび形状に広範なばらつきがあった(図8A)。

#### 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0429

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0429】

T細胞受容体アルファおよびベータ鎖の定常領域を共に標的とするプライマーを、以前に使用されたBCRプライマーと共に使用し、配列決定およびストリンジентなフィルタリング後に、BCRまたはTCR産物にリンクする数千個の液滴バーコードを回収した。単一細胞精度をアセスメントするため、液滴バーコード内の4つの標的遺伝子座( $V_H$ 、 $V_L$ 、 $V_{\alpha}$ 、 $V_{\beta}$ )のあらゆる考え得る組合せを計数した(図8B)。1つよりも多くの標的鎖を有する液滴バーコードの大部分(97.9%)は、生物学的に予想されるBCR  $V_H + V_L$ またはTCR  $V_{\alpha} + V_{\beta}$ の対合を含有し、混合BCR-TCR組合せは2.1%しか含有されていなかった。産物のバーコード付与は、標的鎖に関して偏りがないため、この結果は、得られた6,056個のBCR  $V_H V_L$ および5,217個のTCR  $V_{\alpha} V_{\beta}$ ペアの信頼性を高度化することが可能である。BCRでは、他のアイソタイプと比較して、IgG(>80%)が著しく優勢であったが(図8C)、全てが存在した(IgE<0.05%のみ)ことが示された。カッパおよびラムダ軽鎖は、末梢血データセットと同様の比率で存在した。

#### 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0430

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0430】

末梢血と同様に、BCRアイソタイプと $V_H$ および $V_L$ 鎖の両方の突然変異レベルとの間に相関性が観察され、IgGおよびIgAペアは、IgDおよびIgMよりも大きな $V_H$ および $V_L$ 突然変異、ならびに各アイソタイプ内での $V_H$ および $V_L$ 間の突然変異の一般的相関性を示した(図8D)。興味深いことには、IgD、IgM、およびIgAペアは、腫瘍と末梢血データセットとの間で非常に類似した突然変異分布を示した。また、腫瘍IgG画分は、末梢血では観察されなかった、ほとんど突然変異していないかまたは全く突然変異していない配列をかなりの割合で含有していた。TCRの場合、およびIgDを含有するBCRの場合、1液滴バーコード当たり、末梢血のBCR結果と同様の数の捕捉mRNAが観察された(図8E、ほとんどが1液滴バーコード当たり<10)。極めて対照的だが、腫瘍由来のIgM、IgA、およびIgGペアは、10~100倍の平均発現レベル増加を示し、液滴バーコードの多くには数百または数千個の標的mRNAが捕捉された。その後、捕捉TIL-TCRおよびBCRレパートリーの多様性をアセスメントした(図8F)。5,217個の合計TCRペアの中で、2,423個の異なるTCRベータクローンが観察された。7つのクローンが、>1%の頻度で存在し、上位クローンは、全ての液滴バーコードの16.9%に相当した。6,056個の合計BCRペア中で、1,518個の異なる重鎖クローンが観察され、15個のクローンが>1%の頻度であった

が、>5%の頻度のものはなかった。これは、多様性が、健常末梢BCRレパートリーよりも実質的により制限されていることを表わしているが(0.06%を超える頻度で存在するクローンはなかった)、クラス転換し、突然変異を起こし、高度に発現されたクローンが、腫瘍試料中に非常に多く存在することは、TILを特徴付けるためには、高深度で高感度のサンプリング手法が必要であることを示す。本方法は、規定されたTIL集団を事前にソーティングまたは外因的活性化する必要なく、BおよびT細胞の両方から同時に、多数のTIL免疫受容体ペアを迅速に回収することを可能にする。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0431

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0431】

(実施例6)

追加の目的の表現型マーカーの捕捉

液滴バーコード付与による受容体鎖の対合は、潜在的に、免疫受容体の他に追加の標的の捕捉を可能にする。この可能性を調査するため、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>集団に入る健常T細胞を、磁気ビーズ濃縮により分離し、各タイプの20,000個の細胞を別々のエマルジョンに入れ、TCRアルファおよびベータ鎖を標的とするプライマーならびにCD4およびCD8のmRNAを用いて実験を行った。配列決定後、CD4<sup>+</sup>単離細胞に由来するTCR V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>(「TCRペア」)を含有する3,861個の液滴バーコードの47.0%は、CD4 mRNAに関連していたが、CD8 mRNAに関連したものは0.3%に過ぎなかった。反対に、CD8<sup>+</sup>単離細胞に由来する2,235個のTCRペアの50.6%が、CD8 mRNAにリンクしていたが、CD4 mRNAにリンクしていたものは0.6%に過ぎなかった。これは、以前の報告と同様に、細胞表現型を決定するためのmRNAに基づく手法は、高特異性だが、感度に制限があることを示す。対照的に、細胞表面受容体等のタンパク質は、通常、それらのコードmRNAよりも非常に大きな数(1細胞当たり1,000~100,000個)で存在し、検出がより容易である可能性が高いだけでなく、より直接的に細胞表現型と関連する可能性が高い。各細胞での標的タンパク質レベルを測定するため、特注オリゴヌクレオチドDNA標識を、抗ヒトCD4およびCD8抗体にコンジュゲートし、標識抗体を、30,000個の細胞をエマルジョンに入力する前に、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の未分離混合物と共にインキュベートした(図3A)。DNA標識は、抗体特異的配列タグだけでなく、分子バーコード、および増幅された液滴バーコードに相補的な配列を担持し、mRNAでの実施と同様に、エマルジョン液滴バーコード付与、および分子計数を可能にする。DNA標識、ならびにTCR、CD4、およびCD8 mRNAを、同時に標的とした。配列決定およびフィルタリング後、3,682個の液滴バーコードを、高い信頼性でTCR V<sub>H</sub>V<sub>L</sub>ペアであると識別した。以前の実験と一致して、TCRペアのおよそ半分(52%)を、mRNAに基づいてCD4またはCD8ステータスに帰属させることができた(図3B~3C)。しかしながら、液滴バーコードの95%超は、タンパク質ステータスに基づいてCD4またはCD8に帰属させることができ、1液滴当たりの平均分子計数は、CD4/8タンパク質(平均20.5)が、CD4/8 mRNA(平均1.0)よりもかなり高かった。mRNAおよびタンパク質決定が両方とも合致していたことを考慮すると、mRNAとタンパク質シグナルとの間の合致率は高く(図3D)、液滴の96.0%だった。一部の希少な例では、CD4およびCD8タンパク質の両方が検出された。これは、液滴が、2つまたはそれよりも多くの細胞を含有していた結果であると考えられた。エマルジョンバーコード付与により、単一細胞免疫受容体を、目的のmRNAおよびタンパク質マーカーと、全てハイスループットで直接的に関連付けることが初めて可能になった。抗PD-1および抗CTLA-4等の拡大された免疫腫瘍学的関連マーカーセットを用いて、この手法をTILに応用することは、保証されている。

|           |  |         |            |
|-----------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)   | <无法获取翻译>   |         |            |
| 公开(公告)号   | <a href="#">JP2018535652A5</a>   | 公开(公告)日 | 2019-10-17 |
| 申请号       | JP2018515549   | 申请日     | 2016-09-24 |
| [标]发明人    | ヴィニョーフランソワ<br>ブリッグスエードリアンランガム  |         |            |
| 发明人       | ヴィニョー, フランソワ<br>ブリッグス, エードリアン ランガム<br>ゴールドフレス, ステファン ジェイ.<br>ベルモント, ブライアン ジェイ.   |         |            |
| IPC分类号    | C12Q1/6804 C12Q1/6869 C12Q1/6851 G01N33/53 C12N15/115  |         |            |
| CPC分类号    | C12Q1/6804 C12Q1/6869 G01N33/56972 G01N2458/10 C12Q2563/159 C12Q2563/179 C12N15/1065<br>C12Q1/6881 C12Q2563/185 C12Q2600/158 G01N33/6872 G01N2333/7051 G01N2333/70514<br>G01N2333/70517 G01N2333/70539 |         |            |
| FI分类号     | C12Q1/6804.ZNA.Z C12Q1/6869.Z C12Q1/6851.Z G01N33/53.D C12N15/115.Z  |         |            |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/<br>/QR48 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QX02  |         |            |
| 代理人(译)    | 夏木森下<br>饭田TakashiSatoshi<br>石川大介<br>山本健作   |         |            |
| 优先权       | 62/232209 2015-09-24 US  |         |            |
| 其他公开文献    | JP2018535652A  |         |            |

#### 摘要(译)

本文提供了使用亲和寡核苷酸缀合物进行单细胞表征的方法和组合物。  
本文提供了使用四聚体-寡核苷酸缀合物进行单细胞表征的方法和组合物。