

【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28年6月23日 (2016.6.23)

【公開番号】特開2015-144617(P2015-144617A)

【公開日】平成27年8月13日 (2015.8.13)

【年通号数】公開・登録公報2015-051

【出願番号】特願2015-94509(P2015-94509)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 N 5/0781 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

G 0 1 N 33/84 (2006.01)

G 0 1 N 33/58 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 Q 1/04 Z N A

C 1 2 N 5/00 2 0 2 K

C 1 2 N 5/00 2 0 2 L

G 0 1 N 33/84 Z

G 0 1 N 33/58 Z

G 0 1 N 33/53 N

【誤訳訂正書】

【提出日】平成28年5月6日 (2016.5.6)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロウェルアレイを用いて単一細胞の細胞傷害性を評価する方法であって、該方法は、

単一のエフェクター細胞と少なくとも 1 個の標的細胞を含むマイクロウェルにおいて標的細胞の溶解をモニタリングする工程；および

活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターを同時にプロファイリングする工程

を包含し、

該モニタリングする工程が、該単一のエフェクター細胞による該標的細胞の溶解を、蛍光指示薬を用いて検出する工程を含み、

該プロファイリングする工程が、該マイクロウェルを基材と接触させる工程を含み、

該基材の表面上に、該活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターに結合する作用物質が含まれる、方法。

【請求項 2】

前記モニタリングする工程が、

前記エフェクター細胞による前記標的細胞の溶解を促す条件下で、前記少なくとも 1 個の標的細胞と前記単一のエフェクター細胞を培養すること

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

さらに、

少なくとも 1 個の前記マイクロウェルから前記単一のエフェクター細胞を回収する工程を包含する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記モニタリングが、経時的に標的細胞の蛍光の喪失を検出することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

さらに、

前記回収された単一のエフェクター細胞を培養して、該回収された単一のエフェクター細胞のクローン増幅を得ること

を包含する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

さらに、

前記回収された単一のエフェクター細胞における 1 種または複数種の遺伝子の配列または発現を特徴付けること

を包含する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記単一のエフェクター細胞と前記標的細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記プロファイリングが、さらに、

該基材の表面上で、該活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターに結合する作用物質の位置を決定する工程

を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記単一のエフェクター細胞が細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターが、1 個または複数個のサイトカインを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記標的細胞が HIV 感染細胞である、請求項 1、2、3 または 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記マイクロウェルの深さが 100  $\mu\text{m}$  未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的細胞と前記単一のエフェクター細胞の両方を標識するために色素が用いられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

さらに、

ソフトウェアを用いて、死滅が起こった場所を認識し、そして、そのマイクロウェルをマイクロマニピュレーターのために位置付けること

を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

分泌された可溶性メディエーターが同時にプロファイリングされる、請求項 1、2 または 9 に記載の方法。

【請求項 16】

分泌された可溶性メディエーターが同時にプロファイリングされる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

前記活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターが 1 個または複数個のサイト

カインを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 18】

前記標的細胞および前記単一のエフェクター細胞を含む前記マイクロウェルが、前記基材と物理的に接触するよう保持されており、そして、該基材が、前記作用物質で予め機能付与され、前記活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターを捕獲するスライドガラスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記標的細胞および前記単一のエフェクター細胞を含む前記マイクロウェルが、前記基材と物理的に接触するよう保持されており、そして、該基材が、前記作用物質で予め機能付与され、前記活性化マーカーまたは分泌された可溶性メディエーターを捕獲するスライドガラスである、請求項 15 に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0004

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0004】

一つの局面において、マイクロウェルアレイは、エフェクター細胞の産物を特異的に検出する少なくとも1種の作用物質で前処理されている基材と接触させられ、続いて、作用物質が検出される。作用物質は、抗体、サイトカイン、または溶解の可溶性メディエーターである。好ましくは、サイトカインはTNF- またはIFN- である。任意で、溶解の可溶性メディエーターはグランザイムB (GzB) またはパーフォリンである。本発明の方法は、任意で、CD69によりエフェクター細胞を標識する工程をさらに含む。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0005

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0005】

本発明は、マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のB細胞の懸濁液を提供する工程であって、該対象がHIVに感染しているかまたはHIVに感染していると疑われ、かつ該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一細胞を含有する工程；該マイクロウェルアレイを基材と接触させる工程であって、該基材が少なくとも1種のB細胞検出物質で前処理されている工程；および該物質を検出し、それによって抗体応答を特徴付ける工程により、対象における該抗体応答を特徴付けるための方法も提供する。好ましくは、B細胞検出物質は、gp120におけるエピトープに特異的な抗体である。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0006

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0006】

一つの局面において、本発明の方法は、マイクロウェルアレイを、少なくとも1種の第1

のB細胞検出物質で前処理されている第2の基材と接触させる工程をさらに含む。任意で、第1のB細胞検出物質は、HIVgp120に対する抗体である。好ましくは、抗体はHIVgp120のC末端に対するものである。一つの局面において、マイクロウェルアレイ中のB細胞により産生された抗体のアイソタイプが判定される。HIVと反応性である抗体を発現するB細胞は、任意で、単離される。別の局面において、抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、単離されかつ増幅される。B細胞は、任意で、細胞における抗体の産生を刺激した作用物質に曝露される。好ましくは、作用物質はCD40Lまたは抗BCR抗体である。別の局面において、B細胞はCD40Lおよび抗BCR抗体に曝露される。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0007

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0007】

本発明は、マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のB細胞の懸濁液を提供する工程であって、該対象がHIVに感染しているかまたはHIVに感染していると疑われ、かつ該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一細胞を有する工程；該マイクロウェルアレイを第1の基材と接触させる工程であって、該基材が、該少なくとも1個のマイクロウェル中のB細胞により産生された抗体で前処理されている工程；該基材を第1の標識されたHIVビリオンおよび第2の標識されたHIVビリオンと接触させる工程；ならびに該第1の標識されたビリオンおよび該第2の標識されたビリオンが該マイクロウェル中の同一細胞により産生された抗体に結合するかどうかを判定する工程により、複数のHIV単離物に対するB細胞の交差反応性を特徴付ける方法も提供する。任意で、第1の標識されたビリオンおよび第2の標識されたビリオンに特異的に結合する抗体を産生するB細胞が回収される。一つの局面において、回収されたB細胞は培養される。好ましくは、ビリオンのうちの少なくとも一方が標識される。あるいは、第1のビリオンおよび第2のビリオンは、別個に標識される、即ち、異なる検出可能マーカーにより標識される。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0008

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0008】

本発明は、CTL (CD8<sup>+</sup>)、NK細胞 (CD16<sup>+</sup>)、NKT細胞 (CD1d<sup>+</sup>、V<sub>24</sub><sup>+</sup>)、または T 細胞 (V<sub>9</sub><sup>+</sup>、V<sub>2</sub><sup>+</sup>) からなる群より選択されるエフェクター細胞の集団を提供する工程であって、マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した該エフェクター細胞が、対象から得られ、該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一のエフェクター細胞を有し、エフェクター細胞の該集団が、同族の標的細胞集団とともに同時にロード (co-load) される工程；該エフェクター細胞を可視化する工程；該エフェクター細胞の細胞傷害性を査定する工程；該マイクロウェルアレイを第1の基材と接触させる工程であって、該基材が、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- $\alpha$ 、およびIFN- $\gamma$  のうちの1種または複数種を特異的に検出する作用物質で前処理されている工程；ならびに該マイクロウェル中の該エフェクター細胞が1種または複数種の該作用物質に結合するかどうかを判定する工程により、対象におけるHIV感染に応答性であるエフェクター細胞についての機能プロファイルを作製する方法も提供する。一つ

の局面において、細胞傷害性は、カルセインAMの放出を検出することにより査定される。任意で、細胞は、1種または複数種の特異的表面マーカータンパク質について標識される。好ましくは、表面マーカータンパク質は、CD62L、CXCR3、CCR4、またはCCR7である。別の局面において、エフェクター細胞は、1個または複数個のマイクロウエルから回収される。任意で、回収された細胞は、回収された細胞のクローン増幅を得るために培養される。回収された細胞における1種または複数種の遺伝子の発現が、任意で、特徴付けられる。回収される細胞は、好ましくは、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞（CTL）、ナチュラルキラー（NK）細胞、NKT細胞、または T細胞である。別の局面において、対象は、感染の急性期にあるか、高活性抗レトロウイルス剤療法（highly active antiretroviral therapy）（HAART）対象であるか、またはエリートコントローラー（elite controller）である。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0009

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0009】

本発明は、マイクロウエルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウエルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のNK細胞の懸濁液を提供する工程であって、該対象がHIVに感染しているかまたはHIVに感染していると疑われ、かつ該マイクロウエルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウエルが、沈着した単一細胞を有する工程；および該マイクロウエルアレイを基材と接触させる工程であって、該基材が少なくとも1種のNK細胞検出物質で前処理されている工程；および該物質を検出し、それによって、該NK細胞を検出し、かつ自然免疫応答を査定する工程により、HIV感染を有する対象における自然免疫応答を査定する方法も提供する。一つの局面において、NK細胞を、NKp46-Cy3、CD107a-Alexa647、および/またはCD69-Alexa488を用いて検出する。NK細胞検出物質はNK細胞を検出する。細胞は、任意で、成形可能スラブ上に沈着させる前に同時培養される。好ましくは、細胞はIL-12およびIL-18と同時培養される。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0010

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0010】

本発明は、マイクロウエルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウエルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のNK細胞および標的細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウエルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウエルが単一のエフェクター細胞を有する工程；該NK細胞によって該標的細胞を溶解させる条件下で、該懸濁液を培養する工程；エフェクター細胞による標的細胞の溶解を検出する工程；ならびに該エフェクター細胞を同定し、それによって、NK細胞の集団におけるクローン多様性を査定する工程により、該NK細胞の集団におけるクローン多様性を査定する方法も提供する。一つの局面において、標的細胞を溶解するエフェクター細胞が、回収され、かつ任意で培養される。別の局面において、標的細胞を溶解したNK細胞が回収される。任意で、NK細胞および標的細胞は、マイクロウエル中に細胞を沈着させる前に混合される。あるいは、NK細胞および標的細胞は、マイクロウエル中に細胞を沈着させた後に混合される。一つの局面において、標的細胞の溶解は、標識された細胞の蛍光における変化をモニタリングすることにより判定される。さらに別の局面において、標的細胞を溶解したNK細胞が単離され、NK細胞上のキラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）遺伝子が検出される。マイクロウエルアレ

イは、任意で、基材と接触させられ、該基材は、NK細胞の産物を特異的に検出することができる少なくとも1種の作用物質で前処理され；かつ作用物質を検出する。作用物質は、抗体、サイトカイン、または溶解の可溶性メディエーターである。好ましくは、サイトカインはTNF- またはIFN- である。

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 1】

本発明は、拡大されたHIV感染CD4+T細胞、活性化されたNK細胞、およびB細胞、ならびに標的細胞を含む細胞の懸濁液を提供する工程であって、該懸濁液が、マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着し、かつ該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一のT細胞を有する工程；B細胞により産生された抗体をT細胞の表面に結合させる条件下で、細胞を培養する工程；B細胞、NK細胞、および溶解されたT細胞を含有しているウェルを同定する工程；ならびにB細胞またはNK細胞を同定する工程により、NK細胞およびB細胞の集団における多様性を査定する方法も提供する。一つの局面において、NK細胞はIL-2により活性化される。別の局面において、B細胞はCD40Lまたは抗BCRにより活性化される。さらに別の局面において、B細胞はCD40Lおよび抗BCR抗体により活性化される。NK細胞はIL-2により活性化される。B細胞はCD40Lまたは抗BCR抗体により活性化される。任意で、B細胞またはNK細胞はウェルから回収され；B細胞の一つまたは複数の特性が特徴付けられる。別の局面において、B細胞における抗体遺伝子が特徴付けられる。B細胞における抗体をコードする遺伝子のVDJ領域が、任意で、分析される。マイクロウェルアレイは、任意で、B細胞により産生された抗体を基材に付着させる条件下で基材と接触させられる。別の局面において、基材はHIV感染細胞由来の溶解物と接触させられ、HIV溶解物または抗IgG3抗体に結合する抗体を産生するB細胞を有するウェルが同定される。好ましくは、HIV溶解物または抗IgG3抗体に結合する抗体を産生するB細胞を有するウェルが同定される。

【誤訳訂正 10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 3】

[本発明1001]

以下の工程を含む、対象におけるCD4+HIV感染細胞を溶解することができるCD8+細胞を同定する方法：

マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能(moldable)スラブ上に沈着した、対象由来のエフェクターCD8+細胞および標的細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが、単一のエフェクター細胞を有する工程；

該CD8+細胞によって該標的細胞を溶解させる条件下で、該懸濁液を培養する工程；

該エフェクター細胞による該標的細胞の溶解を検出する工程；ならびに

CD4+HIV感染細胞を溶解することができるCD8+細胞を同定する工程。

[本発明1002]

前記標的細胞を溶解するエフェクター細胞を回収する工程をさらに含む、本発明1001の

方法。

[本発明1003]

前記標的細胞を溶解したエフェクター細胞を培養する工程をさらに含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記エフェクター細胞および前記標的細胞が、前記マイクロウェル中に細胞を沈着させる前に混合される、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記エフェクター細胞および前記標的細胞が、前記マイクロウェル中に細胞を沈着させた後に混合される、本発明1001の方法。

[本発明1006]

溶解が、標識された細胞の蛍光における変化をモニタリングすることによって検出される、本発明1001の方法。

[本発明1007]

溶解が、前記標的細胞の細胞内カルシウムレベルにおける変化をモニタリングすることにより検出される、本発明1001の方法。

[本発明1008]

前記カルシウムが、カルシウム感受性蛍光色素により検出される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記色素がFura2AM (Invitrogen) である、本発明1008の方法。

[本発明1010]

以下の工程をさらに含む、本発明1001の方法：

前記マイクロウェルアレイを基材と接触させる工程であって、該基材が、前記エフェクター細胞の産物を特異的に検出することができる少なくとも1種の作用物質で前処理されている工程；および

該作用物質を検出する工程。

[本発明1011]

前記作用物質が、抗体、サイトカイン、または溶解の可溶性メディエーターである、本発明1010の方法。

[本発明1012]

前記作用物質がサイトカインである、本発明1010の方法。

[本発明1013]

前記サイトカインがTNF- またはIFN- である、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記作用物質が溶解の可溶性メディエーターである、本発明1008の方法。

[本発明1015]

前記溶解の可溶性メディエーターがグランザイムB (GzB) またはパーフォリンである、本発明1014の方法。

[本発明1016]

CD69によりエフェクター細胞を標識する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1017]

以下の工程を含む、対象における抗体応答を特徴付ける方法：

マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のB細胞の懸濁液を提供する工程であって、該対象が、HIVに感染しているかまたはHIVに感染していると疑われ、かつ該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一の細胞を有する工程；

該マイクロウェルアレイを基材と接触させる工程であって、該基材が少なくとも1種のB細胞検出物質で前処理されている工程；および

該物質を検出し、それによって、該抗体応答を特徴付ける工程。

[本発明1018]

前記B細胞検出物質が、gp120におけるエピトープに特異的な抗体である、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記マイクロウェルアレイを、少なくとも1種の第1のB細胞検出物質で前処理されている第2の基材と接触させる工程をさらに含む、本発明1017の方法。

[本発明1020]

前記第1のB細胞検出物質が、HIVgp120に対する抗体である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記抗体が、HIVgp120のC末端に対するものである、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記マイクロウェルアレイ中の前記B細胞により産生された抗体のアイソタイプを判定する工程をさらに含む、本発明1017の方法。

[本発明1023]

HIVと反応性である抗体を発現するB細胞を単離する工程をさらに含む、本発明1017の方法。

[本発明1024]

前記抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を増幅および単離する工程をさらに含む、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記B細胞が、該細胞における抗体の産生を刺激した作用物質に曝露される、本発明1017の方法。

[本発明1026]

前記作用物質がCD40Lまたは抗BCR抗体である、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記B細胞がCD40Lおよび抗BCR抗体に曝露される、本発明1025の方法。

[本発明1028]

以下の工程を含む、複数のHIV単離物に対するB細胞の交差反応性を特徴付けるための方法：

マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のB細胞の懸濁液を提供する工程であって、該対象が、HIVに感染しているかまたはHIVに感染していると疑われ、かつ該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが、単一の細胞を有する工程；

該マイクロウェルアレイを第1の基材と接触させる工程であって、該基材が、該少なくとも1個のマイクロウェル中の該B細胞により産生された抗体で前処理されている工程；

該基材を第1の標識されたHIVビリオンおよび第2の標識されたHIVビリオンと接触させる工程；ならびに

該第1の標識されたビリオンおよび該第2の標識されたビリオンが該マイクロウェル中の同一細胞により産生された抗体に結合するかどうかを判定する工程。

[本発明1029]

前記第1の標識されたビリオンおよび前記第2の標識されたビリオンに特異的に結合する抗体を産生するB細胞を回収する工程をさらに含む、本発明1028の方法。

[本発明1030]

回収された前記B細胞を培養する工程をさらに含む、本発明1029の方法。

[本発明1031]

前記ビリオンの少なくとも一方が標識される、本発明1017の方法。

[本発明1032]

前記第1のビリオンおよび前記第2のビリオンが別個に標識される、本発明1021の方法。

[本発明1033]

以下の工程を含む、対象におけるHIV感染に応答性であるエフェクター細胞についての機能プロファイルを作製する方法：



CTL (CD8<sup>+</sup>)、NK細胞 (CD16<sup>+</sup>)、NKT細胞 (CD1d<sup>+</sup>、V 24<sup>+</sup>)、または T細胞 (V 9<sup>+</sup>、V 2<sup>+</sup>) からなる群より選択されるエフェクター細胞の集団を提供する工程であって、マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した該エフェクター細胞が、対象から得られ、該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一のエフェクター細胞を有し、エフェクター細胞の該集団が同族の標的細胞集団と同時にロード (co-load) される工程；

該エフェクター細胞を可視化する工程；

該エフェクター細胞の細胞傷害性を査定する工程；

該マイクロウェルアレイを第1の基材と接触させる工程であって、該基材が、IL-2、IL-4、IL-10、TNF-、およびIFN- のうちの1種または複数種を特異的に検出する作用物質で前処理されている工程；ならびに

該マイクロウェル中の該エフェクター細胞が1種または複数種の該作用物質に結合するかどうかを判定する工程。

[本発明1034]

細胞傷害性が、カルセインAMの放出を検出することにより査定される、本発明1033の方法。

[本発明1035]

前記細胞を1種または複数種の特異的表面マーカータンパク質について標識する工程をさらに含む、本発明1033の方法。

[本発明1036]

表面マーカータンパク質が、CD62L、CXCR3、CCR4、またはCCR7である、本発明1035の方法。

[本発明1037]

1個または複数個のマイクロウェルからエフェクター細胞を回収する工程をさらに含む、本発明1033の方法。

[本発明1038]

回収された細胞のクローン増幅を得るため、該回収された細胞を培養する工程をさらに含む、本発明1037の方法。

[本発明1039]

前記回収された細胞における1種または複数種の遺伝子の発現を特徴付ける工程をさらに含む、本発明1037の方法。

[本発明1040]

前記細胞が、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞 (CTL)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT細胞、または T細胞である、本発明1033の方法。

[本発明1041]

前記対象が、感染の急性期にあるか、高活性抗レトロウイルス剤療法 (highly active antiretroviral therapy) (HAART) 対象であるか、またはエリートコントローラー (elite controller) である、本発明1033の方法。

[本発明1042]

以下の工程を含む、HIV感染を有する対象における自然免疫応答を査定する方法：

マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のNK細胞の懸濁液を提供する工程であって、該対象が、HIVに感染しているかまたはHIVに感染していると疑われ、かつ該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが、沈着した単一の細胞を有する工程；および

該マイクロウェルアレイを基材と接触させる工程であって、該基材が少なくとも1種のNK細胞検出物質で前処理されている工程；および

該物質を検出し、それによって、該自然免疫応答を査定する工程。

[本発明1043]

前記NK細胞が、NKp46-Cy3、CD107a-Alexa647、および / またはCD69-Alexa488を用いて検出される、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記細胞が、前記成形可能スラブ上に沈着させる前に同時培養される、本発明1032の方法。

[本発明1045]

前記細胞がIL-12およびIL-18と同時培養される、本発明1044の方法。

[本発明1046]

前記NK細胞検出物質がNK細胞を検出する、本発明1045の方法。

[本発明1047]

以下の工程を含む、NK細胞の集団におけるクローン多様性を査定する方法：

マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着した、対象由来のNK細胞および標的細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一のエフェクター細胞を有する工程；

該NK細胞によって該標的細胞を溶解させる条件下で、該懸濁液を培養する工程；

該エフェクター細胞による該標的細胞の溶解を検出する工程；および

該エフェクター細胞を同定し、それによって、NK細胞の該集団におけるクローン多様性を査定する工程。

[本発明1048]

前記標的細胞を溶解するエフェクター細胞を回収する工程をさらに含む、本発明1047の方法。

[本発明1049]

回収された前記細胞を培養する工程をさらに含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記標的細胞を溶解したNK細胞を培養する工程をさらに含む、本発明1047の方法。

[本発明1051]

前記NK細胞および前記標的細胞が、前記マイクロウェル中に細胞を沈着させる前に混合される、本発明1047の方法。

[本発明1052]

前記NK細胞および前記標的細胞が、前記マイクロウェル中に細胞を沈着させた後に混合される、本発明1047の方法。

[本発明1053]

標的細胞の溶解が、標識された細胞の蛍光における変化をモニタリングすることにより判定される、本発明1047の方法。

[本発明1054]

以下の工程をさらに含む、本発明1047の方法：

前記マイクロウェルアレイを基材と接触させる工程であって、該基材が、前記NK細胞の産物を特異的に検出することができる少なくとも1種の作用物質で前処理されている工程；および

該作用物質を検出する工程。

[本発明1055]

前記作用物質が、抗体、サイトカイン、または溶解の可溶性メディエーターである、本発明1055の方法。

[本発明1056]

前記サイトカインが、TNF- またはIFN- である、本発明1055の方法。

[本発明1057]

以下の工程を提供する、NK細胞およびB細胞の集団における多様性を査定する方法：

拡大されたHIV感染CD4+T細胞、活性化されたNK細胞、およびB細胞、ならびに標的細胞を含む細胞の懸濁液を提供する工程であって、該懸濁液が、マイクロウェルアレイ中に少なくとも1個のマイクロウェルを備える成形可能スラブ上に沈着し、該マイクロウェルアレイ中の少なくとも1個のマイクロウェルが単一のT細胞を有する工程；

B細胞により産生された抗体をT細胞の表面に結合させる条件下で、細胞を培養する工程；

B細胞、NK細胞、および溶解されたT細胞を含有しているウェルを同定する工程；ならびに

B細胞またはNK細胞を同定する工程。

[本発明1058]

前記NK細胞がIL-2により活性化される、本発明1057の方法。

[本発明1059]

前記B細胞がCD40Lまたは抗BCRにより活性化される、本発明1057の方法。

[本発明1060]

B細胞がCD40Lおよび抗BCR抗体により活性化される、本発明1057の方法。

[本発明1061]

前記NK細胞がIL-2により活性化される、本発明1057の方法。

[本発明1062]

前記B細胞がCD40Lまたは抗BCR抗体により活性化される、本発明1057の方法。

[本発明1063]

以下の工程をさらに含む、本発明1057の方法：

前記ウェルからB細胞またはNK細胞を回収する工程；および

該B細胞の一つまたは複数の特性を特徴付ける工程。

[本発明1064]

前記B細胞における抗体遺伝子を特徴付ける工程を含む、本発明1063の方法。

[本発明1065]

前記B細胞における抗体をコードする遺伝子のVDJ領域を分析する工程を含む、本発明1064の方法。

[本発明1066]

前記B細胞により産生された抗体を基材に付着させる条件下で、前記マイクロウェルアレイを該基材と接触させる工程を含む、本発明1057の方法。

[本発明1067]

以下の工程を含む、本発明1057の方法：

前記基材をHIV感染細胞由来の溶解物と接触させる工程、および

該HIV溶解物または抗IgG3抗体に結合する抗体を産生するB細胞を有するウェルを同定する工程。

[本発明1068]

前記HIV溶解物または前記抗IgG3抗体に結合する抗体を産生するB細胞を有するウェルを同定する工程を含む、本発明1067の方法。

本発明のその他の特色および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明白になるであろう。

#### 【誤訳訂正 1 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 7

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 7】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス感染を含む感染に対する対象の免疫応答を特徴付けるための方法および組成物を提供する。マイクロアレイおよびスラブは、PCT/US2006/036282 (WO/2007/035633として公開) およびUSSN61/057,371に記載されたものを含む、当技術分野において公知の方法を使用して構築され得る。これらの出願の両方の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本明細書において使用される場合、「成形可

能スラブ」とは、基材に接して置かれた場合に、少なくとも一つの次元で、曲がるか、移動するか、またはゆがむことができる装置をさす。例えば、ある種の配置において、成形可能スラブには、成形可能スラブが基材に接して置かれた場合、実質的に液密性の封が、成形可能スラブと基材との間に形成され、成形可能スラブにおける液体の流出または漏洩が遅延するかまたは防止される材料、例えば、エラストマー材料が含まれ得る。

【誤訳訂正 1 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 4 6

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 4 6】

個体におけるbNAbs産生B細胞間のクローン多様性

マイクロエンレーピングは、gp120反応性の循環B細胞の頻度、それらの抗体のアイソタイプの分布、およびそれらの中和能を定量化するために、単一細胞由来の抗体のマイクロアレイをプリントするために開発された技術である。スクリーニングアッセイ法は、まず、スライドガラスの表面上に、gp120のc末端（D73-324）に特異的な抗体を固定化し、次いで、組換えgp120（Progenics）を沈着させることにより、gp120反応性の抗体を強調するよう構成される。血清中にbNAbsの高い力価を有するHIV+個体由来のB細胞を、抗体産生を誘導するためにCD40L/抗BCRにより刺激する。細胞をマイクロウェルのアレイ中に沈着させ、gp120によりコーティングされたスライド上に抗体のマイクロアレイの二つの複写物をプリントするために使用する。第2のアレイをプリントする前に、細胞由来の抗体を捕獲するために使用される基材に、可溶性のCD4またはb12（既知の中和能を有するモノクローナル抗体）のいずれかを添加する。第1のマイクロアレイ上のgp120には結合するが、第2のアレイ上のCD4によりブロッキングされたgp120には結合し得ない抗体は、HIVを中和する可能性が高い（図7）。存在するアイソタイプの多様性をスコア化するため、マイクロアレイを、蛍光性のアイソタイプ特異的な二次抗体の混合物（IgG1、IgG3、IgG4、IgA、IgM）により標識する。マイクロアレイ上の関心対象の抗体を、対応するマイクロウェルにマッピングし、自動顕微操作（AvisoCellCelector）により細胞を取得する。重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の可変領域を、単一細胞RT-PCR（Wang, X. W. and Stollar, B. D. Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR. J Immunol Methods 244, 217-225 (2000)）により増幅しかつ配列決定する。配列の比較によって、優性生殖系列遺伝子および体細胞変異を通して、密接に関連するクローンが関連づけられる。抗体を組換え発現させ、それらの中和能を標準的なアッセイ法（Monogram Biosciences）により確証する。