

(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2012-531202
(P2012-531202A)

(43) 公表日 平成24年12月10日(2012.12.10)

(51) Int.Cl.

C 12Q 1/68
C 12N 15/09(2006.01)
(2006.01)

F 1

C 12Q 1/68
C 12N 15/00Z N A A
A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2012-517553 (P2012-517553)
 (86) (22) 出願日 平成22年6月4日 (2010.6.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年2月7日 (2012.2.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/037477
 (87) 国際公開番号 WO2010/151416
 (87) 国際公開日 平成22年12月29日 (2010.12.29)
 (31) 優先権主張番号 61/220,344
 (32) 優先日 平成21年6月25日 (2009.6.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 511304268
 フレッド ハチンソン キャンサー リサ
 チ センター
 アメリカ合衆国, 98109 ワシントン
 州, シアトル, ファアビュー アベニュー
 ノース 1100
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (72) 発明者 ロビンス, ハーラン, エス.
 アメリカ合衆国, 98105 ワシントン
 州, シアトル, ラトナ アベニュー エヌ
 . イー. 4418

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】適応免疫を測定する方法

(57) 【要約】

免疫能を測定する方法が記載される。この方法は、免疫系を損なう疾患又は状態の影響、及びこれを再構成することを目的とした治療の効果を評価する手段を提供する。この方法は、血球由来の様々なT細胞受容体(TCR)ベータ鎖可変領域の数を計算することによるT細胞多様性の定量化に基づく。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 多数の V セグメントプライマー (各プライマーは、1つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む) ; 及び

(b) 多数の J セグメントプライマー (各プライマーは、J セグメントに対して相補性である配列を含む) を含む組成物であって;

前記 V セグメント及び J セグメントプライマーが、多重ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による TCR 又は Ig CDR3 領域の増幅を可能にして、TCR 又は Ig 遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅された DNA 分子を生成する、組成物。

【請求項 2】

各 V セグメントプライマーが、1つの V セグメント又は類似した V セグメントのファミリーに対して相補性である配列を含み、各 J セグメントプライマーが、J セグメントに対して相補性である配列を含み、V セグメント及び J セグメントプライマーが TCR CDR3 領域の増幅を可能にする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

各 V セグメントプライマーが、1つの V セグメント又は類似した V セグメントのファミリーに対して相補性である配列を含み、各 J セグメントプライマーが、J セグメントに対して相補性である配列を含み、V セグメント及び J セグメントプライマーが TCR CDR3 領域の増幅を可能にする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

各 V セグメントプライマーが、1つの V セグメント又は類似した V セグメントのファミリーに対して相補性である配列を含み、各 J セグメントプライマーが、J セグメントに対して相補性である配列を含み、V セグメント及び J セグメントプライマーにより TCR CDR3 領域の増幅が可能になる、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

各 V セグメントプライマーが、1つの V セグメントまたは類似の V セグメントのファミリーに対して相補性である配列を含み、各 J セグメントプライマーが、J セグメントに対して相補性である配列を含み、V セグメント及び J セグメントプライマーにより TCR CDR3 領域の増幅が可能になる、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

V セグメントが類似のアニーリング強度を有する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 7】

全ての J セグメントプライマーが、同じ保存フレームワーク領域モチーフにアニールする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 8】

増幅された DNA 分子が前記保存モチーフから始まり、J セグメントを診断により同定し、そしてジャンクションを含み、V セグメントに至る、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 9】

1 組のシーケンシングオリゴヌクレオチドを更に含み、シーケンシングオリゴヌクレオチドが増幅された DNA 分子内の領域にハイブリダイズする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 10】

増幅された DNA が V - D - J ジャンクションに及ぶ、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 11】

V セグメント又は J セグメントが、密接に関連する配列の統合による配列エラー訂正を含むように選択される、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 12】

mRNA から cDNA を生成するためのユニバーサル C セグメントプライマーを更に含む、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 13】

V セグメントプライマーが、組換えシグナル配列 (RSS) に対して V セグメントに

10

20

30

40

50

おける位置 - 4 3 で固定される、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 1 4】

V セグメントプライマーの多様性が、1 4 個の異なる V 遺伝子に対して特異的な少なくとも 1 4 個のプライマーから構成される、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 1 5】

V セグメントプライマーが、配列番号 1 ~ 4 5 からなる群から選択される配列を有する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 1 6】

V セグメントプライマーが、配列番号 5 8 ~ 1 0 2 からなる群から選択される配列を有する、請求項 5 記載の組成物。

10

【請求項 1 7】

各 V セグメント又は V セグメントのファミリーの V セグメントプライマーが存在する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 1 8】

プライマーがイントロン / エクソン境界を越えない、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 1 9】

J セグメントプライマーが J セグメントの保存エレメントとハイブリダイズし、類似したアニーリング強度を有する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 2 0】

J セグメントプライマーの多様性が、5 個の異なる J 遺伝子に対して特異的な少なくとも 5 個のプライマーから構成される、請求項 5 記載の組成物。

20

【請求項 2 1】

J セグメントプライマーが、配列番号 4 6 ~ 5 7 及び 4 8 3 からなる群から選択される配列を有する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 2 2】

J セグメントプライマーが、配列番号 1 0 3 ~ 1 1 3 、 4 6 8 及び 4 8 4 からなる群から選択される配列を有する、請求項 5 記載の組成物。

30

【請求項 2 3】

各 J セグメントの J セグメントプライマーが存在する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 2 4】

増幅された J 遺伝子セグメントのそれぞれが、R S S 部位の下流の位置 + 1 1 ~ + 1 4 で独自の 4 個の塩基タグを有する、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 2 5】

シーケンシングオリゴヌクレオチドが、R S S 部位の下流の位置 + 1 1 ~ + 1 4 で増幅された J 遺伝子セグメント内の 4 個の塩基タグに隣接してハイブリダイズする、請求項 2 4 記載の組成物。

【請求項 2 6】

シーケンシングオリゴヌクレオチドが、配列番号 4 7 0 ~ 4 8 2 からなる群から選択される、請求項 2 4 記載の組成物。

40

【請求項 2 7】

(a) 多数の V セグメントプライマー（各 V セグメントプライマーは、1 つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）；及び

(b) 多数の J セグメントプライマー（各 J セグメントプライマーは J セグメントに対して相補性である配列を含む）を含む組成物であって；

前記 V セグメント及び J セグメントプライマーにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) による抗体重鎖 (I G H) V _H 領域の増幅が可能になり、抗体重鎖遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅された D N A 分子が生成する、組成物。

【請求項 2 8】

(a) 多数の V セグメントプライマー（各 V セグメントプライマーが 1 つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）；及び

50

(b) 多数のJセグメントプライマー(各JセグメントプライマーがJセグメントに対して相補性である配列を含む)を含む組成物であって;

前記Vセグメント及びJセグメントプライマーにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による抗体軽鎖(IGL)V_L領域の増幅が可能になり、抗体軽鎖遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅されたDNA分子が生成する、組成物。

【請求項29】

(a) 多数のVセグメントプライマーを選択し(ここで、各Vセグメントプライマーは、1つの機能的Vセグメント又はVセグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む);

(b) 多数のJセグメントプライマーを選択し(ここで、各JセグメントプライマーはJセグメントに対して相補性である配列を含む);

(c) 前記Vセグメント及びJセグメントプライマーをゲノムDNAの試料と組み合わせて、多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるTCRCDR3領域の増幅を可能にし、TCR遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅されたDNA分子を產生することを含む、方法。

【請求項30】

各Vセグメントプライマーが、1つのVセグメント若しくはVセグメントのファミリーに対して相補性である配列を含み、各JセグメントプライマーがJセグメントに対して相補性である配列を含み;前記Vセグメント及びJセグメントプライマーをゲノムDNAの試料と組み合わせることにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるTCRBCDR3領域の増幅が可能になり、多数の増幅されたDNA分子が產生される、請求項29記載の方法。

【請求項31】

増幅されたDNA分子のシーケンシングステップをさらに含む、請求項30記載の方法。

【請求項32】

シーケンシングステップが、増幅されたDNA分子内の所定の領域にハイブリダイズする1組のシーケンシングオリゴヌクレオチドを利用する、請求項31記載の方法。

【請求項33】

増幅されたDNA分子間のTCRCDR3配列の全体的な多様性を計算するステップをさらに含む、請求項32記載の方法。

【請求項34】

正常なヒト対象の全体的な多様性が $1 * 10^6$ 配列を超えることを示す、請求項33記載の方法。

【請求項35】

正常なヒト対象の全体的な多様性が $2 * 10^6$ 配列を超えることを示す、請求項33記載の方法。

【請求項36】

正常なヒト対象の全体的な多様性が $3 * 10^6$ 配列を超えることを示す、請求項33記載の方法。

【請求項37】

ヒト患者における免疫不全を診断する方法であって、患者のTCRCDR3配列の多様性を測定し、そして前記対象の多様性と、正常な対象から得られた多様性とを比較することを含む、方法。

【請求項38】

TCR配列の多様性の測定が:

(a) 多数のVセグメントプライマーを選択するステップ(ここで、各Vセグメントプライマーは1つの機能的Vセグメント又はVセグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む);及び

(b) 多数のJセグメントプライマーを選択するステップ(ここで、各Jセグメントプ

10

20

30

40

50

ライマーは、Jセグメントに対して相補性である配列を含む) ;

(c) 前記Vセグメント及びJセグメントプライマーをゲノムDNAの試料と組み合わせて、多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるTCRCDR3領域の増幅を可能にして、多数の増幅されたDNA分子を生成するステップ；

(d) 増幅されたDNA分子の配列決定をするステップ；

(e) 増幅されたDNA分子間でTCRCDR3配列の全体的な多様性を計算するステップを含む、請求項37記載の方法。

【請求項39】

多様性の比較が、次式：

【数1】

$$\Delta(t) = \sum_x E(n_x)_{measurement1+2} - \sum_x E(n_x)_{measurement2} = S \int_0^{\infty} e^{-\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) dG(\lambda)$$

(式中、G()はパラメータ $\lambda_1, \dots, \lambda_s$ の経験的分散関数であり、 n_x はちょうど x 回配列決定されたクローンタイプの数であり、

【数2】

$$E(n_x) = S \int_0^{\infty} \left(\frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \right) dG(\lambda)$$

である)を用いて計算することにより決定される、請求項38記載の方法。

【請求項40】

ゲノムDNAの少なくとも2つの試料の多様性を比較する、請求項38記載の方法。

【請求項41】

ゲノムDNAの1つの試料が患者由来であり、他の試料が正常な対象由来である、請求項40記載の方法。

【請求項42】

ゲノムDNAの1つの試料が治療的処置前の患者由来であり、他の試料が治療後の患者由来である、請求項40記載の方法。

【請求項43】

ゲノムDNAの2つの試料が、治療中の異なる時点での同じ患者由来である、請求項40記載の方法。

【請求項44】

疾患が、ゲノムDNAの試料間の多様性の比較に基づいて診断される、請求項40記載の方法。

【請求項45】

ヒト患者の免疫能を比較により評価する、請求項40記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は2009年6月25日に出願された米国仮出願番号第61/220,344号の恩恵を主張して、全体として参照することによって本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

記載されるのは、適応免疫系細胞から抽出された核酸の大規模シーケンシングを用いて

、T細胞受容体遺伝子又は抗体遺伝子の多様性を分析することによって、患者の適応免疫を測定する方法である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

免疫能とは、生きた生物（例えば、細菌若しくは真菌）、ウイルス、又は病原体から単離され、ワクチン中に導入された特異抗原成分であり得る病原体に暴露された後に身体が正常な免疫応答（すなわち、抗体産生及び／又は細胞性免疫）を生み出す能力である。免疫能は、免疫不全又は免疫不適格又は免疫低下の反対である。数例は、完全に機能する免疫系をまだ有さないが、母体から伝達された抗体を有する新生児（免疫不全）；免疫系が機能しなくなつたか若しくは機能しなくなりつつある後期AIDS患者（免疫不適格）；提供された臓器を身体が拒絶しないように薬物治療を受けている移植レシピエント（免疫低下）；高齢者におけるT細胞機能の加齢による減弱；又は放射線若しくは化学療法薬にさらされた個体である。重複する場合があるが、これらの用語はすべて機能障害性免疫系の指標である。リンパ球に関して、免疫能とは、B細胞又はT細胞が成熟し、抗原を認識することができ、そして人に免疫応答を起こさせることを意味する。

10

【0004】

免疫能は、適応免疫系の、B細胞によってコード化される高多形性受容体（免疫グロブリン、Ig）及びT細胞によってコード化される高多形性受容体（T細胞受容体、TCR）を用いて、任意の潜在的な外来抗原に特異的な免疫応答を引き起こす能力に依存する。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

B細胞によって発現されるIgは、4つのポリペプチド鎖、つまり2つの重鎖（H鎖）及び2つの軽鎖（L鎖）から構成され、H₂L₂構造を形成するタンパク質である。H及びL鎖の各対は、V_L及びV_H領域からなる超可変ドメイン、並びに定常ドメインを含む。IgのH鎖は、いくつかのタイプ、μ、δ、γ、及びαのものである。個体内のIgの多様性は、主に超可変ドメインにより決定される。H鎖のVドメインは、3種の生殖細胞遺伝子セグメント、V_H、D_H、及びJ_Hセグメントの組み合わせ結合（combinatorial joining）によって作製される。超可変ドメイン配列多様性は、Ig遺伝子再配列のプロセス中のV_H-D_H、D_H-J_H、及びV_H-J_Hジャンクションでのヌクレオチドの独立した付加及び欠失によりさらに増大する。この点に関して、免疫能はIgの多様性に反映される。

30

【0006】

T細胞によって発現されるTCRは、それぞれTCRA及びTCRB遺伝子から発現された2つの膜貫通ポリペプチド鎖（α及びβ）から構成されるタンパク質である。類似したTCRタンパク質は、ガンマ-デルタT細胞において、TCRD及びTCRG座から発現される。各TCRペプチドは、可変的な相補性決定領域（CDR）、並びにフレームワーク領域（FR）及び定常領域を含む。T細胞の配列多様性は、α及びβ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主に決定され、この多様性は、それぞれ、鎖座中の変数（V）、多様性（D）、及び結合（J）遺伝子セグメント間、並びに鎖座中の同様のV及びJ遺伝子セグメント間の組換えの結果である。TCRα及びβ鎖座中に複数のそのような遺伝子セグメントが存在することにより、多数の異なるCDR3配列がコード化される。CDR3配列多様性は、TCR遺伝子再構成の過程でV-D、D-J、及びV-Jジャンクションでのヌクレオチドの独立した付加及び欠失によりさらに増大する。この点に関して、免疫能は、TCRの多様性に反映される。

40

【0007】

自己免疫疾患において、免疫低下又は調節不全の適応免疫であるかどうかによらず、様々な設定で患者の適応免疫系を評価又は測定する方法が長年にわたり切実に必要とされている。患者の免疫能を評価することにより、病状又は加齢の効果を診断する方法に対する

50

需要がある。同様に、免疫系を修飾する治療法の結果を、治療を受けている間、患者の免疫能を評価することによってモニタリングする必要がある。反対に、療法に対する反応をモニタリングするために、自己免疫疾患再発及び寛解に関して適応免疫系をモニタリングする方法に対する需要、又は発症前に予防的治療を開始する必要性がある。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明の一態様は：

- ・多数のVセグメントプライマー（各プライマーは、1つの機能的Vセグメント又はVセグメントの小ファミリーと相補性である配列を含む）；及び
- ・多数のJセグメントプライマー（各プライマーは、Jセグメントと相補性である配列を含む）を含む組成物であって；

Vセグメント及びJセグメントプライマーは、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるTCR CDR3領域の增幅を可能にし、TCR遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅されたDNA分子が產生される。本発明の一実施形態は、各Vセグメントプライマーが、1つのVセグメントと相補性である配列を含み、各JセグメントプライマーがJセグメントと相補性である配列を含み、Vセグメント及びJセグメントプライマーがTCR CDR3領域の増幅を可能にする組成物である。別の実施形態は、各Vセグメントプライマーが1つの機能的Vセグメントと相補性である配列を含み、各JセグメントプライマーがJセグメントと相補性である配列を含み、Vセグメント及びJセグメントプライマーがTCR CDR3領域の増幅を可能にする組成物である。

10

20

30

40

【0009】

本発明の別の実施形態は、Vセグメントプライマーが保存されたセグメントとハイブリダイズし、類似したアニーリング強度を有する組成物である。別の実施形態では、Vセグメントプライマーが、組換えシグナル配列（RSS）に対してVセグメント中の位置-43で固定される。別の実施形態では、Vセグメントプライマーの多様性が、45の異なるV遺伝子に対して特異的な少なくとも45のプライマーからなる。別の実施形態では、Vセグメントプライマーが、配列番号1～45からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、Vセグメントプライマーは、配列番号58～102からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、各VセグメントのVセグメントプライマーが存在する。

30

【0010】

本発明の別の実施形態は、Jセグメントプライマーが、Jセグメントの保存されたフレームワーク領域エレメントとハイブリダイズし、類似したアニーリング強度を有する組成物である。Jセグメントプライマーの多様性が、13の異なるJ遺伝子に対して特異的な少なくとも13のプライマーから構成される、請求項2記載の組成物。別の実施形態は、Jセグメントプライマーが、配列番号46～57からなる群から選択される配列を有する、請求項2記載の組成物である。別の実施形態では、Jセグメントプライマーが、配列番号102～113からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、各JセグメントのJセグメントプライマーが存在する。別の実施形態では、全てのJセグメントプライマーが同じ保存されたモチーフにアニールする。

40

【0011】

本発明の別の実施形態は、増幅されたDNA分子が、前記保存モチーフから始まり、Jセグメントを診断によって同定するために適切な配列を増幅し、CDR3ジャンクションを含み、Vセグメントに及ぶ組成物である。別の実施形態では、増幅されたJ遺伝子セグメントはそれぞれ、RSS部位の下流の位置+11～+14で独自の4個の塩基タグを有する。

【0012】

本発明の別の態様は、1組のシーケンシングオリゴヌクレオチドを更に含む組成物であって、このシーケンシングオリゴヌクレオチドは増幅されたDNA分子内の領域にハイブリダイズする。一実施形態では、シーケンシングオリゴヌクレオチドがRSS部位の下流

50

の位置 + 11 ~ + 14 で増幅された J 遺伝子セグメント内の 4 個の塩基タグに隣接してハイブリダイズする。別の実施形態では、シーケンシングオリゴヌクレオチドは、配列番号 58 ~ 70 からなる群から選択される。別の実施形態では、V セグメント又は J セグメントは、密接に関連する配列の統合による配列エラー訂正を含むように選択される。別の実施形態は、mRNA から cDNA を生成させるためのユニバーサル C セグメントプライマーを更に含む組成物である。

【0013】

本発明の別の態様は：

- ・多数の V セグメントプライマー（ここで、各 V セグメントプライマーは、1 つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）；及び

- ・多数の J セグメントプライマー（各 J セグメントプライマーは J セグメントに対して相補性である配列を含む）を含む組成物であって；
V セグメント及び J セグメントプライマーにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による TCRG CDR3 領域の増幅が可能になり、抗体重鎖遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅された DNA 分子が生成する、組成物である。

【0014】

本発明の別の態様は：

- ・多数の V セグメントプライマー（ここで、各 V セグメントプライマーは、1 つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）；及び

- ・多数の J セグメントプライマー（ここで、各 J セグメントプライマーは、J セグメントに対して相補性である配列を含む）を含む組成物であって；
V セグメント及び J セグメントプライマーにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による抗体重鎖（IGH）CDR3 領域の増幅が可能になり、抗体重鎖遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅された DNA 分子が生成する、組成物である。

【0015】

本発明の別の態様は：

- ・多数の V セグメントプライマー（ここで、各 V セグメントプライマーは、1 つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）；及び

- ・多数の J セグメントプライマー（ここで、各 J セグメントプライマーは、J セグメントに対して相補性である配列を含む）を含む組成物であって；
V セグメント及び J セグメントプライマーにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による抗体軽鎖（IGL）VL 領域の増幅が可能になり、抗体軽鎖遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅された DNA 分子が生成する、組成物である。

【0016】

本発明の別の態様は：

- ・多数の V セグメントプライマー（ここで、各 V セグメントプライマーは、1 つの機能的 V セグメント又は V セグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）を選択し；そして

- ・多数の J セグメントプライマーを選択し（ここで、各 J セグメントプライマーは、J セグメントに対して相補性である配列を含む）；

- ・V セグメント及び J セグメントプライマーをゲノム DNA の試料と組み合わせることにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による CDR3 領域の増幅が可能になり、TCR 遺伝子の多様性を定量化するために十分な多数の増幅された DNA 分子が生成されることを含む方法である。

【0017】

本発明の一実施形態は、各 V セグメントプライマーが 1 つの機能的 V セグメントに対して相補性である配列を含み、各 J セグメントプライマーが J セグメントに対して相補

10

20

30

40

50

性である配列を含む方法であって；Vセグメント及びJセグメントプライマーをゲノムDNAの試料と組み合わせることによって、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるTCR CDR3領域の増幅が可能になり、多数の増幅されたDNA分子を生成する方法である。別の実施形態では、各Vセグメントプライマーが、1つの機能的Vセグメントに対して相補性である配列を含み、各Jセグメントプライマーが、Jセグメントに対して相補性である配列を含み；Vセグメント及びJセグメントプライマーをゲノムDNAの試料と組み合わせることにより、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるTCR CDR3領域の増幅が可能になり、多数の増幅されたDNA分子が生成する。

【0018】

本発明の別の実施形態は、増幅されたDNA分子を配列決定するステップをさらに含む方法である。別の実施形態では、シーケンシングステップは、増幅されたDNA分子内の領域にハイブリダイズする1組のシーケンシングオリゴヌクレオチドを利用する。別の実施形態は、増幅されたDNA分子間のTCR CDR3配列の全体的な多様性を計算するステップをさらに含む方法である。別の実施形態では、当該方法は、正常なヒト対象の全体的な多様性が $1 * 10^6$ 配列を超えるか、 $2 * 10^6$ 配列を超えるか、又は $3 * 10^6$ 配列を超えることを示す。

【0019】

本発明の別の態様は、ヒト患者における免疫不全を診断する方法であって、患者のTCR CDR3配列の多様性を測定し、そして前記対象の多様性と、正常な対象から得られた多様性とを比較することを含む方法である。本発明の一実施形態は、TCR配列の多様性の測定が：

- ・多数のVセグメントプライマーを選択するステップ（ここで、各Vセグメントプライマーは、1つの機能的Vセグメント又はVセグメントの小ファミリーに対して相補性である配列を含む）；及び
- ・多数のJセグメントプライマーを選択するステップ（ここで、各JセグメントプライマーはJセグメントに対して相補性である配列を含む）；
- ・Vセグメント及びJセグメントプライマーをゲノムDNAの試料と組み合わせて、多重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるTCR CDR3領域の増幅を可能にして、多数の増幅されたDNA分子が生成するステップ；
- ・増幅されたDNA分子をシーケンシングするステップ；
- ・増幅されたDNA分子間のTCR CDR3配列の全体的な多様性を計算するステップを含む方法である。

【0020】

本発明の一実施形態は、多様性の比較が、次式：

【数1】

$$\Delta(t) = \sum_x E(n_x)_{measurement1+2} - \sum_x E(n_x)_{measurement2} = S \int_0^{\infty} e^{-\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) dG(\lambda)$$

（式中、G（ ）はパラメータ $\lambda_1, \dots, \lambda_s$ の経験分布関数であり、 n_x はちょうどx回配列決定されたクローン型の数であり、

【数2】

$$E(n_x) = S \int_0^{\infty} \left(\frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \right) dG(\lambda)$$

である）

を用いて計算することにより決定される方法である。

【0021】

本発明の別の実施形態は、ゲノムDNAの少なくとも2つの試料の多様性を比較する方

10

20

30

40

50

法である。別の実施形態では、ゲノムDNAの1つの試料は患者由来であり、他の試料は正常な対象である。別の実施形態では、ゲノムDNAの1つの試料は治療的処置前の患者由来であり、他の試料は治療後の患者由来である。別の実施形態では、ゲノムDNAの2つの試料は、治療中の異なる時点での同じ患者由来である。別の実施形態では、疾患をゲノムDNAの試料間の多様性の比較に基づいて診断する。別の実施形態では、ヒト患者の免疫能を比較により評価する。

【0022】

TCR及びIg遺伝子は、体細胞突然変異により数百万もの異なるタンパク質を生成させることができる。この多様性生成メカニズムのために、これらの遺伝子の超可変相補性決定領域は、数百万のリガンドと相互作用することができる配列をコード化することができ、これらの領域は、タンパク質の同族リガンドの結合を必要とする細胞にシグナルを伝達することができる定常領域と連結される。

10

【0023】

適応免疫系は、潜在的な病原体の領域を認識するために十分な多様性を有するT細胞及びB細胞抗原受容体のレパートリーを生成させるいくつかの方法を用いる。MHC分子によって提示されるペプチド抗原を主に認識する¹及び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（TCR）及び鎖（又は²及び鎖）の第3の相補性決定領域（CDR3）内に含まれる。適応免疫系は最高 10^{18} までの異なるTCR

20

対を生成させることができることが推定されているが、TCR CDR3多様性の直接実験評価は可能でなかった。

【0024】

本明細書中に記載されていることは、單一分子DNAシーケンシングに基づくTCR CDR3多様性を測定する新規方法であり、2人の健常な成人の末梢血T細胞から単離された数百万の再構成されたTCR遺伝子においてCDR3領域を配列決定するためのこの方法の使用である。

【0025】

適応免疫系が、個体がさらされ得る膨大な数の潜在的な外来抗原のいずれかに対して特異的な免疫応答を起こさせる能力は、B細胞によりコード化される高度に多形性の受容体（免疫グロブリン）及びT細胞によりコード化される高度に多形性の受容体（T細胞受容体；TCR）に依存する。主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI及びII分子により提示されるペプチド抗原を主に認識する、T細胞によって発現されるTCRは、2つの膜貫通ポリペプチド鎖（³及び⁴）からなるヘテロ二量体タンパク質であり、それぞれは1つの可変ドメイン及び1つの定常ドメインを含む。T細胞のペプチド特異性は、主に⁵及び⁶鎖可変ドメインの第3の相補性決定領域（CDR3）ループにおいてコード化されるアミノ酸配列により決定される。⁷及び⁸鎖のCDR3領域は、それぞれ、鎖座における非隣接可変（V）、多様性（D）、及び結合（J）遺伝子セグメント間、及び鎖座における類似したV及びJ遺伝子セグメント間の組換えによって形成される。TCR及び鎖座における複数のそのような遺伝子セグメントの存在は、多数の異なるCDR3配列がコード化されるのを可能にする。CDR3配列多様性は、TCR遺伝子再構成のプロセス中のV-D、D-J、及びV-Jジャンクションでのヌクレオチドのテンプレートに無関係の付加及び欠失によりさらに増大する。

30

【0026】

成人ヒトT細胞レパートリーにおける受容体の多様性を評価する以前の試みは、レパートリーの小さく明確なサブセットにおいて発現された再構成されたTCR及び鎖遺伝子を調べ、続いてこれらのサブセット中に存在する多様性を全レパートリーに当てはめて個体ごとに約 10^6 の独自のTCR鎖CDR3配列を推定することに依存し、抗原に出会ったCD45RO⁺区画中の細胞によりこれらの独自のTCR CDR3配列の10~20%が発現される。この推定値の正確さ及び精度は、数百もの配列で観察される多様性を全レパートリーに外挿する必要性によって大幅に制限され、T細胞レパートリーにおける独自のTCR鎖CDR3配列の実際の数は、 1×10^6 よりも有意に大きい

40

50

可能性がある。

【0027】

ハイスループットDNAシーケンシング技術における最近の進歩により、キャピラリーベースの技術よりも有意に深いシーケンシングが可能になった。各末端にユニバーサルPCRアダプター配列を有するテンプレート分子の複雑なライプラリを、固体表面上に固定された相補性オリゴヌクレオチドのローン(lawn)にハイブリダイズさせる。固相PCRを用いて、ハイブリダイズされたライプラリを増幅させ、その結果、表面上に数百万のテンプレートクラスターが得られ、それぞれはもとのライプラリからの1つのDNA分子の多数(~1,000)の同じコピーを含む。各クラスター中の分子における30~54bpの間隔は、可逆的ダイターミネーション(dye-termination)化学を用いて配列決定され、数百万ものT細胞中に含まれる再構成されたTCR鎖CDR3領域のゲノムDNAからの同時シーケンシングを可能にする。この方法により、T細胞の集団においてかなりの割合の独自に再構成されたTCR-CDR3領域の直接シーケンシングが可能になり、これによって、集団における各CDR3配列の相対的頻度の推定が可能になる。

10

【0028】

T細胞の有限の試料において測定された多様性からの、全T細胞レパートリーにおけるTCR-CDR3配列の多様性の正確な推定は、試料中で観察されなかったレパートリー中に存在するCDR3配列の数の推定を必要とする。全T細胞レパートリーにおけるTCR鎖CDR3多様性を、数百万のT細胞を含む血液試料において観察される独自のTCR-CDR3配列の数の直接測定を用いて推定した。本明細書における結果は、先の推定値より数倍高い、CD4⁺及びCD8⁺T細胞区画におけるTCR-CDR3多様性の下限を特定した。加えて、本明細書における結果は、抗原に出会ったT細胞のCD45RO⁺区画において少なくとも 1.5×10^6 の独自のTCR-CDR3配列が存在し、その大部分は低い相対的頻度で存在することを証明する。抗原に出会った細胞におけるTCR-CDR3配列のそのような多様な集団の存在は、以前には証明されていない。

20

【0029】

それぞれの健常な個体におけるTCR鎖の多様なプールは、 10^{11} を超える可能な配列の推定される理論的空間から得られる試料である。しかし、再構成されたTCRの実現されたセットは、この理論的空間から均一にサンプリングされない。異なるV'及びJ'は、1000倍を超える頻度差で見いだされる。さらに、ヌクレオチドの挿入率は強く偏る。実現されたTCR配列の空間のこのような減少は、人々の間で鎖が共有される可能性に至る。本明細書中で記載される方法により生成した配列データを用いて、インビオJ使用、V使用、モノヌクレオチド及びジヌクレオチドバイアス、及び位置に依存したアミノ酸使用を計算することができる。これらのバイアスは、TCRが選択される配列空間のサイズを有意に狭め、このことは異なる個体が同じアミノ酸配列とTCR鎖を共有することを示唆する。本明細書中の結果は、数千ものこのような同じ配列が個々のヒトゲノム間でペアごとに共有されることを示す。

30

【0030】

アッセイ技術は、高多重化PCR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。「順方向」プールは、遺伝子中の各Vセグメントに特異的なプライマーを有する(高度に保存された領域を標的とするいくつかのプライマーを使用して、多くのVセグメントを同時に捕捉する)。「逆」プールプライマーは、結合('J')セグメント中の保存された配列にアニールする。増幅されたセグメントプールは、各Jセグメントを同定し、またJセグメント特異性プライマーが再配列化のためにアニールすることを可能にするために適切な配列を含む。これにより、個体中に存在する大部分の体細胞再構成の直接的観察が可能になる。これは次に、自己免疫障害(又は他の標的疾患徴候)を有する個体におけるTCRレパートリーの、対照のTCRレパートリーとの迅速な比較を可能にする。

40

【0031】

50

適応免疫系は、理論的には、非常に多様な（常にいずれか1つの個体で発現される可能性が高いものよりもはるかに多くの）T細胞受容体CDR3配列を生成することができる。しかし、この理論的多様性のどれくらいの割合が成人T細胞レパートリーにおいて実際に用いられるかを評価するための以前の試みによって、多様性の正確な評価はできなかった。本明細書中で記載されるのは、単一分子DNAシーケンシングに基づいたこの問題に対する新規取り組み及び有限試料における多様性測定を用いたレパートリー多様性の推定に対する分析計算論的取り組みの開発である。分析により、成人レパートリー中の独自のTCR-CDR3配列の数が、レパートリーの小セグメントの徹底的なキャピラリーシーケンシングに基づいた事前の推定値を有意に超えることが証明された。本明細書中で記載される方法を用いて観察されるCD45RO⁺集団（ナイーブT細胞が多い）におけるTCR鎖多様性は、以前に報告されているよりも5倍大きい。重大な発見は、抗原に出会ったCD45RO⁺T細胞で発現された独自のTCR-CDR3配列の数であり、本明細書における結果は、この数が、他者の以前の結果に基づいて予想されるよりも10～20倍大きいことを示す。CD45RO⁺細胞におけるCDR3配列の度数分布は、T細胞レパートリーが小さなクローンサイズの多数のクローンを含むことを示唆する。

10

【0032】

本明細書中の結果は、TCR鎖の実現されたセットが、配列の巨大な潜在的空間から不均一にサンプリングされることを示す。特に、生殖細胞系により近い鎖配列（V-D及びD-J境界でほとんど挿入及び欠失がない）が比較的高頻度で作成されるようである。生殖細胞系に近いTCR配列は、様々な人の間で共有される。なぜなら、V、D及びJの生殖細胞系配列が、少数の多型を法として、ヒト集団間で共有されるからである。

20

【0033】

成熟T細胞により発現されたT細胞受容体は、その2つの構成鎖がTCR及び鎖可変座の独立した再構成現象により生成するヘテロ二量体である。鎖は鎖よりも低い多様性を有するので、より高率のが個体間で共有され、数百もの正確なTCR受容体が個体の任意の対間で共有される。

細胞

【0034】

B細胞及びT細胞は、骨髓、胸腺、リンパ腺、末梢組織及び血液をはじめとする様々な組織試料から得ることができるが、末梢血が最も容易に利用される。末梢血試料は、対象から静脈切開によって得られる。末梢血単核細胞（PBMC）は、当業者に公知の技術により、例えば、Ficoll-Hyque（登録商標）密度勾配分離によって単離される。好ましくは、全PBMCが分析に用いられる。B及び/又はTリンパ球は、その代わりに、蛍光標識された抗ヒト抗体、例えばCD4 FITC（クローンM-T466、Miltenyi Biotec）、CD8PE（クローンRPA-T8、BD Biosciences）、CD45RO ECD（クローンUCHL-1、Beckman Coulter）、及びCD45RO APC（クローンUCHL-1、BD Biosciences）を用いて、各対象の複数の区画：例えば、CD8⁺CD45RO⁺/及びCD4⁺CD45RO⁺/に流動選別することができる。全PBMCの染色は、抗体の適切な組み合わせを用いて実施することができ、続いて細胞を洗浄した後、分析する。リンパ球サブセットを、FACS選別により、例えば、BD FACS Aria（登録商標）細胞選別システム（BD Biosciences）により、そして結果をFlowJoソフトウェア（TreeStar Inc.）で分析することにより、また表面若しくはビーズに固定された特異的抗体を含む概念的に類似した方法によって単離することができる。

30

核酸抽出

【0035】

全ゲノムDNAを細胞から、例えば、QIAamp（登録商標）DNA blood Mini Kit（QIAGEN（登録商標））を用いることによって抽出する。1つのハプロイドゲノムのおよその質量は3pgである。好ましくは、少なくとも100,000

40

50

0 ~ 2 0 0 , 0 0 0 細胞を多様性の分析に使用する（すなわち、ジプロイド T 細胞から約 0 . 6 ~ 1 . 2 μ g の D N A）。供給源として P B M C を用いて、T 細胞の数は、全細胞の約 3 0 % であると推定できる。

【 0 0 3 6 】

別法として、全核酸は、ゲノム D N A 及び m R N A の両方を含む細胞から単離することができる。多様性が核酸抽出物中の m R N A から測定されるならば、m R N A は測定前に c D N A に変換しなければならない。これは、通常の技術の方法によって容易に実施することができる。

D N A 増幅

【 0 0 3 7 】

多重 P C R システムを用いて、ゲノム D N A から、好ましくは C D R 3 領域から、更に好ましくは T C R 、 T C R 又は T C R C D R 3 領域から、最も好ましくは T C R C D R 3 領域から、再構成された T C R 座を増幅する。

【 0 0 3 8 】

一般的に、多重 P C R システムは、少なくとも 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、又は 2 5 、好ましくは 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、又は 3 9 、最も好ましくは 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、又は 4 5 の順方向プライマー（この場合、各順方向プライマーは、配列番号 1 1 4 ~ 2 4 8 で示される 1 以上の T R B V 領域セグメントに対応する配列に対して特異的である）；少なくとも 3 、 4 、 5 、 6 、又は 7 、好ましくは 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 又は 1 3 の逆プライマー（この場合、各逆プライマーは、配列番号 2 4 9 ~ 2 6 1 で示される 1 以上の T R B J 領域セグメントに対応する配列に対して特異的である）を用いることができる。最も好ましくは、全ての J セグメントに関して J セグメントプライマーが存在する。

【 0 0 3 9 】

好ましくは、プライマーはイントロン / エクソン境界を越えないように設計される。順方向プライマーは、好ましくは V セグメント間の比較的強力な配列保存の領域中の V セグメントにアニールして、これらのプライマー間の配列の保存を最大にするようでなければならない。したがって、これにより、各プライマーの差次のアニーリング特性の可能性は最小限に抑えられ、したがって、V 及び J プライマー間の増幅された領域は、用いられる特定の V 遺伝子セグメントを同定するために十分な T C R V 配列情報を含む。

【 0 0 4 0 】

好ましくは、J セグメントプライマーは J セグメントの保存エレメントとハイブリダイズし、類似したアニーリング強度を有する。最も好ましくは、全ての J セグメントプライマーは同じ保存フレームワーク領域モチーフにアニールする。順方向及び逆プライマーはどちらも好ましくは 5 ' 末端で、D N A シーケンサーに適合するユニバーサル順方向プライマー配列で修飾される。

【 0 0 4 1 】

例えば、多重 P C R システムは 4 5 の順方向プライマー（表 1 ）（それぞれ機能的 T C R V セグメントに対して特異的）、及び 1 3 の逆プライマー（表 2 ）（それぞれ、T C R J セグメントに対して特異的）を用いることができる。X n 及び Y n は、それぞれ長さ n 及び m のポリヌクレオチドに対応し、これは、アッセイを読み取るために用いられる単一分子シーケンシング技術に対して特異的である。

10

20

30

40

【表1】

表1 : T C R - V β 順方向プライマー配列

T R B V 遺伝子セグメント	配列番号	プライマー配列*
T R B V 2	1	X n T C A A A T T C A C T C T G A A G A T C C G G T C C A C A A
T R B V 3 - 1	2	X n G C T C A C T T A A A T C T T C A C A T C A A T T C C C T G G
T R B V 4 - 1	3	X n C T T A A A C C T T C A C C T A C A C G C C C T G C
T R B V (4 - 2、4 - 3)	4	X n C T T A T T C C T T C A C C T A C A C A C C C T G C
T R B V 5 - 1	5	X n G C T C T G A G A T G A A T G T G A G C A C C T T G
T R B V 5 - 3	6	X n G C T C T G A G A T G A A T G T G A G T G C C T T G
T R B V (5 - 4、5 - 5、5 - 6、5 - 7、5 - 8)	7	X n G C T C T G A G C T G A A T G T G A A C G C C T T G
T R B V 6 - 1	8	X n T C G C T C A G G C T G G A G T C G G C T G
T R B V (6 - 2、6 - 3)	9	X n G C T G G G G T T G G A G T C G G C T G
T R B V 6 - 4	10	X n C C C T C A C G T T G G C G T C T G C T G
T R B V 6 - 5	11	X n G C T C A G G C T G C T G T C G G C T G
T R B V 6 - 6	12	X n C G C T C A G G C T G G A G T T G G C T G
T R B V 6 - 7	13	X n C C C C T C A A G C T G G A G T C A G C T G
T R B V 6 - 8	14	X n C A C T C A G G C T G G T G T C G G C T G
T R B V 6 - 9	15	X n C G C T C A G G C T G G A G T C A G C T G
T R B V 7 - 1	16	X n C C A C T C T G A A G T T C C A G C G C A C A C
T R B V 7 - 2	17	X n C A C T C T G A C G A T C C A G C G C A C A C
T R B V 7 - 3	18	X n C T C T A C T C T G A A G A T C C A G C G C A C A G
T R B V 7 - 4	19	X n C C A C T C T G A A G A T C C A G C G C A C A G
T R B V 7 - 6	20	X n C A C T C T G A C G A T C C A G C G C A C A G

TRBV7-7	2 1	X n C C A C T C T G A C G A T T C A G C G C A C A G
TRBV7-8	2 2	X n C C A C T C T G A A G A T C C A G C G C A C A C
TRBV7-9	2 3	X n C A C C T T G G A G A T C C A G C G C A C A G
TRBV9	2 4	X n G C A C T C T G A A C T A A A C C T G A G C T C T C T G
TRBV10-1	2 5	X n C C C C T C A C T C T G G A G T C T G C T G
TRBV10-2	2 6	X n C C C C C T C A C T C T G G A G T C A G C T A
TRBV10-3	2 7	X n C C T C C T C A C T C T G G A G T C C G C T A
TRBV(11-1, 11-3)	2 8	X n C C A C T C T C A A G A T C C A G C C T G C A G
TRBV11-2	2 9	X n C T C C A C T C T C A A G A T C C A G C C T G C A A
TRBV(12-3, 12-4, 12-5)	3 0	X n C C A C T C T G A A G A T C C A G C C C T C A G
TRBV13	3 1	X n C A T T C T G A A C T G A A C A T G A G C T C C T T G G
TRBV14	3 2	X n C T A C T C T G A A G G T G C A G C C T G C A G
TRBV15	3 3	X n G A T A A C T T C C A A T C C A G G A G G C C G A A C A
TRBV16	3 4	X n C T G T A G C C T T G A G A T C C A G G C T A C G A
TRBV17	3 5	X n C T T C C A C G C T G A A G A T C C A T C C C G
TRBV18	3 6	X n G C A T C C T G A G G A T C C A G C A G G T A G
TRBV19	3 7	X n C C T C T C A C T G T G A C A T C G G C C C
TRBV20-1	3 8	X n C T T G T C C A C T C T G A C A G T G A C C A G T G
TRBV23-1	3 9	X n C A G C C T G G C A A T C C T G T C C T C A G
TRBV24-1	4 0	X n C T C C C T G T C C C T A G A G T C T G C C A T
TRBV25-1	4 1	X n C C C T G A C C C T G G A G T C T G C C A
TRBV27	4 2	X n C C C T G A T C C T G G A G T C G C C C A
TRBV28	4 3	X n C T C C C T G A T T C T G G A G T C C G C C A

10

20

30

40

TRBV29-1	44	XnCTAACATTCCTCAACTCTGA CTGTGAGCAACA
TRBV30	45	XnCGGCAGTTCATCCTGAGTT CTAAGAAC

【表2】

表2: TCR-J β 逆プライマー配列

10

TRBV遺列 伝子セグメント	配 号	配列 プライマー配列
TRBV2	58	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCAAATTCACCTGAAGATCCGGT CCACAA
TRBV3-1	59	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTGCTCACTTAAATCTTACATCAATT CCTGG
TRBV4-1	60	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTAAACCTCACCTACACGCCCTG C
TRBV(4-2, 4-3)	61	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTTATTCCCTCACCTACACACCCCTG C
TRBV5-1	62	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTGCTCTGAGATGAATGTGAGCACCT G
TRBV5-3	63	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTGCTCTGAGATGAATGTGAGTCGCTT G
TRBV(5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8)	64	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCCT G
TRBV6-1	65	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG
TRBV(6-2, 6-3)	66	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTGCTGGGGTTGGAGTCGGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG
TRBV6-4	67	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACGTTGGCGTCTGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG
TRBV6-5	68	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG
TRBV6-6	69	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCAAGCTGGAGTCAGCTG
TRBV6-7	70	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCAAGCTGGAGTCAGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCAGGCTGGAGTCGGCTG
TRBV6-8	71	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCAGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCAGCTG
TRBV6-9	72	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCAGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGCTCAGGCTGGAGTCAGCTG
TRBV7-1	73	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGTCCAGCGCACAC CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC
TRBV7-2	74	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC
TRBV7-3	75	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC G
TRBV7-4	76	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG
TRBV7-6	77	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG
TRBV7-7	78	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG
TRBV7-8	79	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC
TRBV7-9	80	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACCTGGAGATCCAGCGCACAG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG
TRBV9	81	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCACTCTGAAGACTAAACCTGAGCTCTG CTG
TRBV10-1	82	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACTCTGGAGTCGGCTG CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACTCTGGAGTCAGCTA
TRBV10-2	83	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACTCTGGAGTCAGCTA CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACTCTGGAGTCAGCTA
TRBV10-3	84	CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACTCTGGAGTCAGCTA CAAGCAGAACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTCACTCTGGAGTCAGCTA

20

30

40

TRBV(11-1, 11-3)	85	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCAAGATCCAGCCTGCAG	
	86	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCAAGATCCAGCCTGCAG	
TRBV11-2	A		
TRBV(12-3, 12-4, 12-5)	87		
	88	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTGAAGATCCAGCCTCAG	
TRBV13	TGG		
TRBV14	89	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTGAAGGTGCAGCCTGCAG	
	90	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTGATAACTCCAATCCAGGAGGCCGA	10
TRBV15	ACA		
	91	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTGTAGCCTTGAGATCCAGGCTACG	
TRBV16	A		
TRBV17	92	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCTCCACGCTGAAGATCCATCCCG	
TRBV18	93	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTGACATCTGAGGATCCAGCAGGTAG	
TRBV19	94	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCTCTCACTGTGACATCGGCC	
	95	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTTGCCACTCTGACAGTGACAGT	
TRBV20-1	G		
TRBV23-1	96	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCAGCCTGGCAATCCTGTCCCTCAG	
TRBV24-1	97	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTGCCCCAGTCTGCCAT	
TRBV25-1	98	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTGACCTGGAGTCTGCCA	
TRBV27	99	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTGATCCTGGAGTCGCCCA	20
TRBV28	100	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCA	
	101	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTAACATTCTCAACTCTGACTGTGA	
TRBV29-1	GCAACA		
	102	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTCCGATCTCGGAGTTCATCCTGAGTTCTAAGA	
TRBV30	AGC		

【 0 0 4 2 】

表 1 の 4 5 の順方向 P C R プライマーは、4 8 の機能的可変セグメントのそれぞれに対して相補性であり、表 2 の 1 3 の逆 P C R プライマーは、T R B 座からの機能的結合 (J) 遺伝子セグメント (T R B J) のそれぞれに対して相補性である。T R B V 領域セグメントは、配列番号 1 1 4 ~ 2 4 8 で配列表において特定され、T R B J 領域セグメントは、配列番号 2 4 9 ~ 2 6 1 で特定される。プライマーは、V 及び J 遺伝子の両方を独自に同定するために適切な情報が増幅された配列内に存在する様に設計されている (V 遺伝子組換えシグナル配列 (R S S) の上流の配列の > 4 0 塩基対、及び J 遺伝子 R S S の下流の > 3 0 塩基対)。別のプライマーは、各 T C R サブユニットの遺伝子の V 及び J 領域から当業者が選択することができる。

【 0 0 4 3 】

順方向プライマーは、5' 末端で、D N A シーケンサーに適合性であるユニバーサル順方向プライマー配列 (表 1 の X n) で修飾される。同様に、逆プライマーの全ては、ユニバーサル逆プライマー配列 (表 2 の Y m) で修飾される。そのようなユニバーサルプライマーの一例を、I l l u m i n a G A I I シングルエンドリードシーケンシングシステムについて、表 3 及び 4 に示す。4 5 の T C R V 順方向プライマーは V セグメント間の比較的強力な配列保存の領域中の V セグメントにアニールし、したがって、これらのプライマー間の配列の保存を最大にする。

10

20

30

40

【表3】

表3 : TCR-V β 順方向プライマー配列

T R B V 遺配 伝子セグメント ント(複数可)	番号	プライマー配列*
	5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
	8	TCTTCAAATTCACTCTGAAGATCCGGTCCA
TRBV2	CAA	
	5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
TRBV3	9	TCTGCTCACTTAAATCTCACATCAATTCCC
-1		TGG
TRBV4	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-1	0	TCTCTTAAACCTTCACCTACACGCCCTGC
TRBV(4 -2、4- 3)	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
	1	TCTCTTATTCTTCACCTACACACCCCTGC
TRBV5	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-1	2	TCTGCTCTGAGATGAATGTGAGCACCTTG
TRBV5	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-3	3	TCTGCTCTGAGATGAATGTGAGTGCCTTG
TRBV(5 -4、5- 5、5-6、 5-7、5- 8)	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
		TCTGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCCTTG
TRBV6	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-1	5	TCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTG
TRBV(6 -2、6- 3)	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
		TCTGCTGGGTTGGAGTCGGCTG
TRBV6	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-4	7	TCTCCCTCACGTTGGCGTCTGCTG
TRBV6	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-5	8	TCTGCTCAGGCTGCTGTCGGCTG
TRBV6	6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-6	9	TCTCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTG
TRBV6	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-7	0	TCTCCCTCAAGCTGGAGTCAGCTG
TRBV6	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-8	1	TCTCACTCAGGCTGGTGTGGCTG
TRBV6	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-9	2	TCTCGCTCAGGCTGGAGTCAGCTG
TRBV7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-1	3	TCTCCACTCTGAAGTTCCAGCGCACAC
TRBV7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA
-2	4	TCTCACTCTGACGATCCAGCGCACAC

10

20

30

40

T R B V 7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
- 3	5	TCTCTCTACTCTGAAGATCCAGCGCACAG	
T R B V 7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
- 4	6	TCTCCACTCTGAAGATCCAGCGCACAG	
T R B V 7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
- 6	7	TCTCACCTGACGATCCAGCGCACAG	
T R B V 7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
- 7	8	TCTCCACTCTGACGATTAGCGCACAG	
T R B V 7	7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
- 8	9	TCTCCACTCTGAAGATCCAGCGCACAC	
T R B V 7	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
- 9	0	TCTCACCTTGAGATCCAGCGCACAG	10
	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
TRBV9	1	TCTGCACTCTGAACCTAACCTGAGCTCTCTG	
T R B V 1	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
0 - 1	2	TCTCCCCCTCACTCTGGAGTCTGCTG	
T R B V 1	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
0 - 2	3	TCTCCCCCTCACTCTGGAGTCAGCTA	
T R B V 1	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
0 - 3	4	TCTCCTCCTCACTCTGGAGTCCGCTA	
TRBV(1	8		
1 - 1, 1 1	5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	20
- 3)		TCTCCACTCTCAAGATCCAGCCTGCAG	
T R B V 1	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
1 - 2	6	TCTCTCCACTCTCAAGATCCAGCCTGCCTG	
TRBV(1	8		
2 - 3, 1 2	7		
- 4, 1 2 -		CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
5)		TCTCCACTCTGAAGATCCAGCCCTCAG	
TRBV1	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
3	8	TCTCATCTGAACCTGAACATGAGCTCCCTGG	
T R B V 1	8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
4	9	TCTCTACTCTGAAGGTGCAGCCTGCAG	
TRBV1	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	30
5	0	TCTGATAACTTCCAATCCAGGAGGCCAAACA	
T R B V 1	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
6	1	TCTCTGTAGCCTTGAGATCCAGGCTACGA	
TRBV1	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
7	2	TCTCTTCCACGCTGAAGATCCATCCCG	
T R B V 1	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
8	3	TCTGCATCCTGAGGATCCAGCAGGTAG	
TRBV1	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
9	4	TCTCCTCTCACTGTGACATCGGCC	
T R B V 2	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	40
0 - 1	5	TCTCTTGTCCACTCTGACAGTGACAGTG	
T R B V 2	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTTTCCGA	
3 - 1	6	TCTCAGCCTGGCAATCCTGTCCTCAG	

T R B V 2	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA	
4-1	7	TCTCTCCCTGTCCTAGAGTCTGCCAT	
T R B V 2	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA	
5-1	8	TCTCCCTGACCCCTGGAGTCTGCCA	
T R B V 2	9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA	
7	9	TCTCCCTGATCCTGGAGTCGCCA	
	1		
T R B V 2	0	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA	
8	0	TCTCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCA	
	1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA	10
T R B V 2	0	TCTCTAACATCTCAACTCTGACTGTGAGCA	
9-1	1	ACA	
	1		
T R B V 3	0	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGA	
0	2	TCTCGGCAGTTCATCCTGAGTTCTAAGAAC	

【表4】

表4 : T C R - J β 逆プライマー配列

20

配 列	TR B J 遺伝子 セグメント	番 号	プライマー配列*
	TRBJ1-1	103	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTTACCTACAACACTGTGAGTCTGGTGCTTGTCCAAA
	TRBJ1-2	468	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTACCTACAACCGTTAACCTGGTCCCGAACCGAA
	TRBJ1-3	104	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTACCTACAACAGTGAGCCAACCTCCCTCTCCAAA
	TRBJ1-4	105	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTCCAAGACAGAGAGCTGGGTTCCACTGCCAAA
	TRBJ1-5	484	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTACCTAGGATGGAGAGTCGAGTCCCATCACCAAA
	TRBJ1-6	106	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTGTACAGTGAGCCTGGTCCCGTCCAAA
	TRBJ2-1	107	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTCGGTAGCCGTGTCCTGGCCCGAA
	TRBJ2-2	108	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTCCAGTACGGTCAGCCTAGAGCCTCTCCAAA
	TRBJ2-3	109	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTGTACGCCGGGTGCCTGGGCCAAA
	TRBJ2-4	110	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTAGAGCCGGTCCCGCGCCGAA
	TRBJ2-5	111	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTGGAGCCGCGTGCCTGGCCCGAA
	TRBJ2-6	112	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTGAGCCTGCTGCCGGCCCCGAA
	TRBJ2-7	113	AATGATAACGGCGACCACCGAGATCTGTGAGCCTGGTGCCTGGGCCGAA

30

*太字の配列は、配列分析に関するユニバーサルRオリゴヌクレオチドを示す。

【0044】

このシステムを用いた再構成 T C R C D R 3 領域の全 P C R 産物は、約 2 0 0 b p の長さであることが予想される。ゲノムテンプレートは、4 5 の T C R V F プライマーのプール（「 V F プール」）及び 1 2 の T C R J R プライマーのプール（「 J R プール」）を用いて P C R 増幅される。例えば、5 0 μ l の P C R 反応を、1 . 0 μ M の V F プール（それぞれの独自の T C R V F プライマーについて 2 2 n M ）、1 . 0 μ M の J R プール（それぞれの独自の T C R B J R プライマーについて 7 7 n M ）、1 X Q I A G E N M u l t i p l e P C R マスター・ミックス（ Q I A G E N 品番 2 0 6 1 4 5 ）、1 0 % の Q 溶液（ Q I A G E N ）、及び 1 6 n g / u l の g D N A とともに用いることができる。

40

【0045】

I G H プライマーセットを、ナイーブ B 細胞の最初の刺激後に観察されるように、再構成 I G H 遺伝子内の体細胞超変異の可能性を調節することを試みるように設計した。その

50

結果として、全てのプライマーは、通常よりも若干長くなり、そして機能的体細胞突然変異及び非機能的体細胞突然変異の両方に対して耐性である3以上のヌクレオチドの高度に保存された配列中に各プライマーの3'末端を固定するように設計された。

【0046】

I G H J 逆プライマーは、I G H J セグメント内の高度に保存されたG G G G 配列モチーフ上に各P C R プライマーの3'末端を固定するように設計された。これらの配列を表5に示す。下線を施した配列は、欠失させることができるR S S からの10の塩基対である。これらを、バーコードデザインから除外した。太字配列は、I G H J 逆P C R プライマーの逆補体である。イタリック体配列は、J識別のためのバーコードである(8のバーコードにより、6の遺伝子、及び遺伝子内の2の対立遺伝子が明らかになる)。下線セグメント内のさらなる配列は、更なる対立遺伝子識別を明らかにし得る。

【表5】

IgH Jセグメント	配列番号	配列
>IGHJ4* 01/1-48	452	<u>ACTACTTTGACT</u> ACTACTGGGGCCAAGGA ACCTGGTCACCGTCTCCCTCAG
>IGHJ4* 03/1-48	453	<u>GCTACTTTGACT</u> ACTACTGGGGCCAAGGG ACCTGGTCACCGTCTCCCTCAG
>IGHJ4* 02/1-48	454	<u>ACTACTTTGACT</u> ACTACTGGGGCCAGGGA ACCTGGTCACCGTCTCCCTCAG
>IGHJ3* 01/1-50	455	<u>TGATGCTTTGATGTCT</u> GGGGCCAAG GGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
>IGHJ3* 02/1-50	456	<u>TGATGCTTTGATATCT</u> GGGGCCAAG GGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
>IGHJ6* 01/1-63	457	<u>ATTACTACTACTACTACGGTATGGAC</u> GTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCCTCAG
>IGHJ6* 02/1-62	458	<u>ATTACTACTACTACTACGGTATGGAC</u> GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCCTCAG
>IGHJ6* 04/1-63	459	<u>ATTACTACTACTACTACGGTATGGAC</u> GTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCCTCAG
>IGHJ6* 03/1-62	460	<u>ATTACTACTACTACTACGGTATGGAC</u> GTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCCTCAG
>IGHJ2* 01/1-53	461	<u>CTACTGGTACTTCGATCTCTGGGCC</u> GTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCCTCA G
>IGHJ5* 01/1-51	462	<u>ACAACCTGGTTCGACTCCTGGGCCAA</u> GGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCAG
>IGHJ5* 02/1-51	463	<u>ACAACCTGGTTCGACCCCTGGGCCAG</u> GGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCAG
>IGHJ1* 01/1-52	464	<u>GCTGAATACTTCCAGCAGTGGGCCA</u> GGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCCCTCAG
>IGHJ2P *01/1-6 1	465	CTACAAGTGCTTGGAGCACTGGGGCA GGGCAGCCGGACACCGTCTCCCTGG GAACGTCAG
>IGHJ1P *01/1-5 4	466	AAAGGTGCTGGGGTCCCTGAACCC GACCCGCCCTGAGACCGCAGCCACAT CA
>IGHJ3P *01/1-5 2	467	CTTGCAGGTTGGACTTCCCAGCCGACA GTGGTGGTCTGGCTTCTGAGGGGTCA

IGHJ逆PCRプライマーの配列を表6に示す。

10

20

30

40

【表6】

I g H J セグメント	配列番号	配列
> I G H J 4_1	4 2 1	T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C T T G G C C C
> I G H J 4_3	4 2 2	T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T C C C T T G G C C C
> I G H J 4_2	4 2 3	T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C C T T G G C C C
> I G H J 3_1 2	4 2 4	C T G A A G A G A C G G T G A C C A T T G T C C C T T G G C C C
> I G H J 6_1	4 2 5	C T G A G G A G A C G G T G A C C G T G G T C C C T T G C C C C
> I G H J 6_2	4 2 6	T G A G G A G A C G G T G A C C G T G G T C C C T T G G C C C
> I G H J 6_3 4	4 2 7	C T G A G G A G A C G G T G A C C G T G G T C C C T T G C C C
> I G H J 2_1	4 2 8	C T G A G G A G A C A G T G A C C A G G G T G C C A C G G C C C
> I G H J 5_1	4 2 9	C T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C C T T G G C C C
> I G H J 5_2	4 3 0	C T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T T C C C T T G G C C C
> I G H J 1_1	4 3 1	C T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G T G C C C T T G G C C C

10

20

30

40

【0047】

Vプライマーは、2つの保存トリプトファン(W)コドン間のF R 2の保存領域中で設計された。

【0048】

プライマー配列を、このコドンを保存するすべてのI G H Vファミリーのトリプトファンコドンの3'末端で固定する。これによって、最後の3つのヌクレオチド(トリプトファンのT G G)が体細胞超変異に対して耐性であると予想される配列上に固定され、各プライマーの6つのヌクレオチドのうち5つの3'アンカーを提供する。上流配列は通常よりもさらに延長され、変性ヌクレオチドを含んで、表7に示されるように、プライマーのアニーリング特性を大幅に変更することなく、超変異により誘発されるミスマッチ(又は密接に関連したI G H Vファミリー間)を可能にする。V遺伝子セグメントの配列は、配列番号2 6 2 ~ 4 2 0である。

【表7】

I g H Vセグメント	配列番号:	配列
> I G H V 1	4 4 3	T G G G T G C A C C A G G T C C A N G N A C A A G G G C T T G A G T G G
> I G H V 2	4 4 4	T G G G T G C G A C A G G C T C G N G N A C A A C G C C T T G A G T G G
> I G H V 3	4 4 5	T G G G T G C G C C A G A T G C C N G N G A A A G G C C T G G A G T G G
> I G H V 4	4 4 6	T G G G T C C G C C A G G S C Y C C N G N G A A G G G G C T G G A G T G G
> I G H V 5	4 4 7	T G G G T C C G C C A G G C T C C N G N A A A G G G G C T G G A G T G G
> I G H V 6	4 4 8	T G G G T C T G C C A G G C T C C N G N G A A G G G G C A G G A G T G G
> I G H 7 _ 3. 2 5 p	4 4 9	T G T G T C C G C C A G G C T C C A G G G A A T G G G C T G G A G T T G G
> I G H 8 _ 3. 5 4 p	4 5 0	T C A G A T T C C C A A G C T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G A G
> I G H 9 _ 3. 6 3 p	4 5 1	T G G G T C A A T G A G A C T C T A G G G A A G G G G C T G G A G G G A G

10

20

30

【0049】

熱循環条件は、当業者の方に従う。例えば、P C R E x p r e s s サーマルサイクラー（H y b a i d、英国アシュフォード）を用いて、以下の循環条件を用いることができる：9 5 で 15 分を 1 サイクル、9 4 で 30 秒、5 9 で 30 秒、及び 7 2 で 1 分を 25 ~ 40 サイクル、続いて 7 2 で 10 分を 1 サイクル。

シーケンシング

【0050】

シーケンシングは、増幅された D N A 分子内の所定の領域にハイブリダイズする 1 組のシーケンシングオリゴヌクレオチドを用いて行われる。

【0051】

好ましくは、増幅された J 遺伝子セグメントはそれぞれ、R S S 部位から下流の位置 + 1 1 ~ + 1 4 で独自の 4 個の塩基タグを有する。したがって、シーケンシングオリゴヌクレオチドは、R S S 部位の下流の位置 + 1 1 ~ + 1 4 で増幅された J 遺伝子セグメント内の 4 個の塩基タグに隣接してハイブリダイズする。

【0052】

例えば、T C R B のシーケンシングオリゴヌクレオチドは、この「タグ」のすぐ下流で観察されるコンセンサスヌクレオチドモチーフにアニールして、読み取られた配列の最初の 4 個の塩基が独自に J セグメントを同定するように設計することができる（表 8）。

40

【表8】

表8：シーケンシングオリゴヌクレオチド

シーケンシングオリゴヌクレオチド	配列番号	オリゴヌクレオチド配列
Jseq 1-1	470	ACAACTGTGAGTCTGGTGCCTTGTCCAAAGAAA
Jseq 1-2	471	ACAAACGGTTAACCTGGTCCCCGAACCGAAGGTG
Jseq 1-3	472	ACAAACAGTGAGCCAACCTCCCTCTCCAAAATAT
Jseq 1-4	473	AAGACAGAGAGCTGGGTTCCACTGCCAAAAAAC
Jseq 1-5	474	AGGATGGAGAGTCGAGTCCCACCAAAATGC
Jseq 1-6	475	GTCACAGTGAGCCTGGTCCCGTTCCCAAAGTGG
Jseq 2-1	476	AGCACCGGTGAGCCGTGTCCCTGGCCCCGAAGAAC
Jseq 2-2	477	AGTACGGTCAGCCTAGAGCCTCTCCAAAAAAC
Jseq 2-3	478	AGCACTGTAGCCGGGTGCCTGGCCAAAATAC
Jseq 2-4	479	AGCACTGAGAGCCGGTCCCGCGCCGAAGTAC
Jseq 2-5	480	AGCACCCAGGAGCCGCGTGCCTGGCCCCGAAGTAC
Jseq 2-6	481	AGCACCGTCAGCCTGCTGCCGGCCCCGAAAGTC
Jseq 2-7	482	GTGACCGTGAGCCTGGTGCCTGGCCCCGAAGTAC

10

20

30

40

【0053】

読み取られた配列の J 及び V セグメントを帰属するために用いられる情報は、増幅された配列内に完全に含まれ、PCR プライマーの同一性に依存しない。これらのシーケンシングオリゴヌクレオチドは、別の J セグメントについて特異的なオリゴヌクレオチドによる 1 つの J セグメントのシーケンシング反応の雑多なプライミングが、正しいシーケンシングオリゴヌクレオチドからの配列データとちょうど同じヌクレオチドから始まる配列データを生成するように選択された。このように、シーケンシングオリゴヌクレオチドの雑多なアニーリングは、生成した配列データの質に影響を及ぼさなかった。

【0054】

V セグメントの第 2 の保存されたシステイン及び J セグメントの保存されたフェニルアラニン間のヌクレオチドとして定義される CDR3 領域の平均長さは 35+/-3 であり、したがって J セグメントタグから始まる配列は、読み取られた 50 塩基対中の完全な V-D-J ジャンクションをほぼ常に確保するであろう。

【0055】

TCR J 遺伝子セグメントはおよそ 50 塩基対の長さである。ミスマッチ配列にまで及び、これとアニールする PCR プライマーは、雑多なプライマーと呼ばれる。多重 PCR との関連で雑多なプライミングを最小限に抑えるためにシーケンシングオリゴヌクレオチドとの重複を最小限に抑えるように、TCR J 逆 PCR プライマーを設計した。13 の TCR J 逆プライマーを、シーケンシングプライマーの重複を最小限にして、コンセンサスプライス部位モチーフの 3' 末端で固定する。TCR J プライマーは、デフォルトパラメータのもとで、シーケンサープログラムを用いて一定のアニーリング温度を提供する。

【0056】

シーケンシング反応に関して、IGHJ シーケンシングプライマーは、表 9 に示すように保存された CAG 配列を超えて 3 ヌクレオチド伸長する。

【表9】

表9

I g H J セグメント	配列番号:	配列
> I G H J S E Q 4_1	4 3 2	TGAGGGAGACGGTGACCAAGG GTTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 4_3	4 3 3	TGAGGGAGACGGTGACCAAGG GTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 4_2	4 3 4	TGAGGGAGACGGTGACCAAGG GTTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 3_1 2	4 3 5	CTGAAGAGACGGTGACCAT TGTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 6_1	4 3 6	CTGAGGGAGACGGTGACCGT GGTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 6_2	4 3 7	TGAGGGAGACGGTGACCGTG GTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 6_3 4	4 3 8	CTGAGGGAGACGGTGACCGT GGTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 2_1	4 3 9	CTGAGGGAGACAGTGACCAAG GGTGCCACGGCCCCAG
> I G H J S E Q 5_1	4 4 0	CTGAGGGAGACGGTGACCAAG GGTTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 5_2	4 4 1	CTGAGGGAGACGGTGACCAAG GGTTCCCTTGGCCCCAG
> I G H J S E Q 1_1	4 4 2	CTGAGGGAGACGGTGACCAAG GGTGCCCTTGGCCCCAG

プロセッシング配列データ

10

20

30

40

50

【0057】

シーケンシング結果の迅速な分析のために、当業者はアルゴリズムを開発することができる。好ましい方法は次の通りである。

【0058】

シーケンシング前にT C R C D R 3領域を増幅するためにP C Rステップを使用することにより、異なるV及びJ遺伝子セグメントを利用するC D R 3領域のP C R増幅の効率の違いによって、配列の推測される相対量に系統的バイアスが潜在的に導入され得る。P C R増幅の各サイクルは、潜在的に平均 $1.5^{1/15} = 1.027$ の大きさのバイアスを潜在的に導入する。したがって、25サイクルのP C Rは、異なるC D R 3領域配列の相対量に平均 $1.027^{25} = 1.95$ の合計バイアスを導入する。

【0059】

配列決定された読み取り値を、C D R 3配列を含むものについてフィルタリングした。シーケンサーデータプロセッシングは、各読み取り値の一次配列におけるエラーを除去するため、及びデータを圧縮するための一連のステップを含む。複雑なフィルターにより、シーケンサーから誤って読み取られた配列の約20%が除去される。次いで、配列は、13のT C R B J領域のうちの1つ及び54のV領域のうちの1つの両方と最低6塩基がマッチすることが必要であった。ファージ配列を含む対照レーンにフィルターを適用して、7~8百万中平均で1つの配列しかこれらのステップを通過しなかった。最後に、最近傍アルゴリズムを用いて、P C Rエラー及びシーケンシングエラーの両方を除くために、密接に関連する配列を統合することによって、データを1つの配列に折りたたんだ。

【0060】

データを分析して、P C R 産物中の配列の割合は、血液中のクローン型の真の分布を推定する前の配列データから逆行して誘導されなければならない。本明細書中のデータにおいて所定の回数で観察される各配列について、その配列が特定のサイズのP C R プールからサンプリングされた可能性を推定した。配列決定されたC D R 3 領域はP C R 産物の大きなプールからランダムにサンプリングされるので、各配列についての観察数は、ポアソン分布から引き出される。ポアソンパラメータは、P C R のテンプレートを提供したT 細胞ゲノムの数にしたがって定量化される。簡単なポアソン混合モデルは、これらのパラメータを推定し、かつ各配列が各分布から引き出されるペアサイズの確率を出す。これは、血液から引き出された各配列の量を再構築する予想最大化法である。

10

【0061】

多様性を推定するために、「不可視種」式を使用する。この式を適用するために、独自の適応免疫受容体（例えば、T C R B）クローン型が種の代わりをする。数学的解法により、T C R 「種」又はクローン型の総数Sについて、シーケンシング実験により x_s 個の配列sが観察されるとする。観察されないクローン型のすべてについて、 $x_s = 0$ であり、各T C R クローン型は、パラメータ λ_s でポアソンプロセスにしたがって採血中に「捕捉」される。第1の測定1で、及び第2の測定で配列決定されたT細胞ゲノムの数。多数の独自配列が存在するので、積分は合計を意味するであろう。G()がパラメータ $\lambda_1, \dots, \lambda_s$ の経験分布関数であり、 n_x がちょうどx回配列決定されたクローン型の数であるならば、クローン型の総数、すなわち、多様性Eの測定値は次式によって与えられる：

20

【数3】

$$E(n_x) = S \int_0^{\infty} \left(\frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \right) dG(\lambda)$$

【0062】

30

T細胞がある任意の供給源（例えば、採血）からサンプリングされる所定の実験について、この式を使用して、供給源全体中の種の全多様性を推定する。概念は、各サイズのクローン型のサンプリングされた数は、供給源全体のクローン型の基本的な分布を推定するために十分な情報を含むということである。式を導き出すために、正確な測定が繰り返される場合に予想される新規種の数を推定した。測定を無限回数繰り返すかのような式の範囲。結果は、基本的な供給源集団中の種の予想される数である。（t）の値（第2の測定で観察される新しいクローン型の数）は、好ましくは次式を用いて決定されるはずである：

【数4】

40

$$\Delta(t) = \sum_x E(n_x) \Big|_{msmt1+msmt2} - \sum_x E(n_x) \Big|_{msmt1} = S \int_0^{\infty} e^{-\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) dG(\lambda)$$

（式中、msmt1及びmsmt2は、それぞれ、測定1及び2から得られるクローン型の数である）。 $1 - e^{-\lambda t}$ のテイラー展開により、 $\Delta(t) = E(n_1)t - E(n_2)t^2 + E(n_3)t^3 - \dots$ が得られ、これは、期待値 $E(n_x)$ を第1の測定における観察された数と置き換えることにより近似することができる。第1の測定で観察された数で使用して、この式は、 1.6×10^5 個の新規独自配列が第2の測定で観察される

50

ことを予測する。第2の測定の実際の値は、 1.8×10^5 個の新規 T C R 配列であり、このことは、予測により全多様性の妥当な下限が得られたことを意味する。オイラーの変換を用いて、(t)を正規化して、(¥)の下限を得る。

疾患を診断するための多様性の測定の使用

【0063】

以下のとおり、多様性の測定を用いて、疾患又は治療の効果を診断することができる。T細胞及び/又はB細胞受容体レパートリーを、例えば、白血病のための造血幹細胞移植(HSCT)治療後などの様々な時点での測定することができる。多様性の変化及びT C R B レパートリーの全体的な多様性はどちらも、免疫能を測定するために利用することができる。移植後の予想される免疫再構成率の標準を用いることができる。任意の2つの時点間の多様性の変化率を用いて、治療を積極的に変更することができる。一定の時点での全体的な多様性も重要な手段である。なぜなら、この標準を用いて、異なる患者を比較することができるからである。特に、全体的な多様性は、免疫再構成の臨床的定義と相関しなければならない手段である。この情報を用いて、例えばHSCT後に、抗生物質、抗ウイルス薬、及び抗真菌薬の予防的投薬計画を変更することができる。

10

【0064】

同種異系造血細胞移植後の免疫再構成の評価は、多様性の変化を測定することによって決定できる。これらの技術はまた、予防接種に対するT細胞反応の分析によって測定されるように、年齢とともにどのようにリンパ球多様性が減少するかの分析を拡張する。さらに、本発明の方法は、T細胞の生成、増殖、及び発生に対して直接的影響を及ぼす治療中の治療薬(例えば、インターロイキン-7(IL-7))を評価するための手段を提供する。さらに、これらの技術を胸腺T細胞集団の研究に適用することにより、T細胞受容体遺伝子再配列並びに胸腺細胞の正及び負の選択の両方のプロセスに関する洞察が得られるであろう。

20

【0065】

まだ完全に機能する免疫系を有していないが、母親から伝達された抗体を有する可能性がある新生児は、免疫不全である。新生児は、自身の免疫系が自発的に発生するまでは、多くの疾患に罹りやすく、適応免疫系の本発明者らの測定は、新生児患者に有用であることが判明する可能性が高い。

30

【0066】

リンパ球多様性は、先天性又は後天性免疫不全の他の状態において評価することができる。免疫系が機能しないか又は機能しなくなりつつあるAIDS患者をモニタリングして、疾患の状態を確定し、かつ免疫能を再構成することを目的とする治療に対する患者の反応を測定することができる。

【0067】

本発明の方法の別の応用は、提供された臓器を身体が拒絶しないように薬物治療を受けている固体臓器移植レシピエントの診断手段を提供することである。一般的に、これらの患者は免疫低下療法を受けている。宿主の免疫能をモニタリングするで、移植前後を支援する。

40

【0068】

放射線又は化学療法薬にさらされた個体は、骨髄移植を受けるか、又は他の方法ではT細胞集団の補充を関連する免疫能とともに必要とする。本発明の方法は、骨髄移植片、又はこれらの治療の過程でのリンパ球の再構成を質的および量的に評価するための手段を提供する。

【0069】

多様性を測定する一方法は、ゲノムDNAの少なくとも2つの試料(好ましくはゲノムDNAの1つの試料が患者由来であり、他の試料が正常な対象由来であるか、或いは、ゲノムDNAの1つの試料が治療的処置前の患者由来であり、他の試料が治療後の患者由来であるか、又はゲノムDNAの2つの試料が治療中の異なる時点の同じ患者由来である)を比較することによる。別の方法は、ゲノムDNAの試料間の多様性の比較に基づいても

50

よく、例えばこの場合、ヒト患者の免疫能は比較によって評価される。

バイオマーカー

【0070】

個体間の共有されたT C R配列は、癌、自己免疫疾患、及び感染症をはじめとする種々の疾患に関する新種の潜在的なバイオマーカーである。これらは、多数のヒト疾患について報告されているパブリックT細胞である。T細胞が、それにより免疫系が急速な細胞分裂によりこれらのバイオマーカーを増幅するクローニング増殖の結果であるために、T C Rはバイオマーカーとして有用である。増幅後、T C Rは、標的が小さくても（例えば、初期腫瘍）容易に検出される。多くの場合、T細胞はさらに疾患の原因となり得、したがって薬物標的を構成し得るので、T C Rもバイオマーカーとして有用である。T細胞自己相互作用は、多発性硬化症、I型糖尿病、及び関節リウマチなどの自己免疫に関連するいくつかの疾患において重要な役割を果たすと考えられる。

10

実施例

【0071】

実施例1：試料取得、P B M C 単離、F A C S 分類及びゲノムD N A 抽出

【0072】

2人の健常な男性ドナー（35才及び37才）由来の末梢血試料を、F r e d H u t c h i n s o n C a n c e r R e s e a r c h C e n t e r (F H C R C) の I n s t i t u t i o n a l R e v i e w B o a r d により承認された書式を用いた書面でのインフォームドコンセント付で得た。末梢血単核細胞（P B M C ）を F i c o l l - H y p a q u e (登録商標) 密度勾配分離によって単離した。Tリンパ球を、各対象について4区画：C D 8⁺ C D 4 5 R O⁺ / - 及び C D 4⁺ C D 4 5 R O⁺ / - に流動選別した。リンパ球の特性化のために、以下の共役抗ヒト抗体：C D 4 F I T C (クローニ M - T 4 6 6 , M i l t e n y i B i o t e c) 、 C D 8 P E (クローニ R P A - T 8 、 B D B i o s c i e n c e s) 、 C D 4 5 R O E C D (クローニ U C H L - 1 、 B e c k m a n C o u l t e r) 、 及び C D 4 5 R O A P C (クローニ U C H L - 1 、 B D B i o s c i e n c e s) を使用した。全P B M C の染色を、抗体の適切な組み合わせを用い、20分間4で実施し、染色された細胞を分析前に一度洗浄した。リンパ球サブセットをB D F A C S A r i a (登録商標) 細胞選別システム（B D B i o s c i e n c e s ）でのF A C S 分類により単離した。データを F l o w J o ソフトウェア（T r e e s t a r I n c . ）で分析した。

20

【0073】

全ゲノムD N Aを、分類された細胞からQ I A a m p (登録商標) D N A b l o o d M i n i K i t (Q I A G E N (登録商標)) を用いて抽出した。1つのハプロイドゲノムのおよその質量は3 p gである。試料各T細胞区画中の数百万の再構成されたT C R Bをサンプリングするために、6～27マイクログラムのテンプレートD N Aを各区画から得た（表10を参照）。

30

【表 10】

	CD 8 + / C D 4 5 R O -	CD 8 + / C D 4 5 R O +	CD 4 + / C D 4 5 R O -	CD 4 + / C D 4 5 R O +	ドナー
細胞 ($\times 10^6$)	9.9	6.3	6.3	10	
DNA (μ g)	27	13	19	25	10
PCR サイクル	25	25	30	30	2
クラスター (K / t i 1 e)	29.3	27	102.3*	118.3*	
VJ 配列 ($\times 10^6$)	3.0	2.0	4.4	4.2	
細胞	4.9	4.8	3.3	9	
DNA	12	13	6.6	19	20
PCR サイクル	30	30	30	30	1
クラスター	116.3	121	119.5	124.6	
VJ 配列	3.2	3.7	4.0	3.8	
細胞	NA	NA	NA	0.03	
DNA	NA	NA	NA	0.015	
PCR サイクル	NA	NA	NA	25 + 15	PCR バイアス評価
クラスター	NA	NA	NA	1.4 / 23.8	
VJ 配列	NA	NA	NA	1.6	

【0074】

実施例 2：仮想 T 細胞受容体 鎮スペクトラタイピング

【0075】

仮想 TCR 鎮スペクトラタイピングを以下のように実施した。相補性 DNA を分類された T 細胞集団から抽出された RNA から合成し、再構成された TCR 鎮 CDR3 領域の多重 PCR 増幅用テンプレートとして使用した。各多重反応は、TCR 鎮定常領域に特異的な 6-FAM 標識アンチセンスプライマー、及び 2~5 の TCR 鎮可変 (TRBV) 遺伝子特異的センスプライマーを含んでいた。23 の機能的 V ファミリーすべてを研究した。PCR 反応は、Hybaid PCR Express サーマルサイクラー (Hybaid, Ashford, UK) で、以下のサイクリング条件下で実施した：1サイクルは 95 度 6 分間、40 サイクルは 94 度 30 秒間、58 度 30 秒間、そして 72 度 40 秒間、続いて 1 サイクルは 72 度 10 分間。各反応は、cDNA テンプレート、500 μ M の dNTP、2 mM の MgCl₂ 及び 1 単位の AmpliTaq Gold 緩衝液中 AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (Perkin E 40

1 m e r) を 2 0 μ l の最終体積で含んでいた。完了後、P C R 産物のアリコートを 1 : 5 0 に希釈し、D N A アナライザーを用いて分析した。D N A アナライザーの出力を、既知サイズの標準を含む参考試料の蛍光強度波形と比較することにより、蛍光強度対長さの分布に変換した。

【 0 0 7 6 】

実施例 3 : T C R C D R 3 領域の多重 P C R 増幅

【 0 0 7 7 】

C D R 3 ジャンクション領域を操作上、以下のように定義した。ジャンクションは、V 領域の第 2 の保存システィンから始まり、J 領域の保存フェニルアラニンで終わる。観察される配列の逆補体をとり、フランкиング領域を翻訳して、ジャンクション境界を規定するアミノ酸を特定した。これらの境界間のヌクレオチドの数は、長さを決定し、したがって C D R 3 領域のフレームを決定する。シーケンシング用のテンプレートライブラリを生成するために、多重 P C R システムを選択して、ゲノム D N A から再配列された T C R 座を増幅した。多重システムは、それぞれが機能的 T C R V セグメントに対して特異的である 4 5 の順方向プライマー(表 3)、及びそれが T C R J セグメントに対して特異的である 1 3 の逆プライマー(表 4)を使用する。V 及び J 遺伝子の両方(V 遺伝子組換えシグナル配列(R S S)の上流の配列の > 4 0 塩基対、及び J 遺伝子 R S S の下流の > 3 0 塩基対)を独自に同定するために適切な情報が増幅された配列内に存在するようにプライマーを選択した。

10

【 0 0 7 8 】

順方向プライマーを、 I l l u m i n a G A 2 クラスターステーション固相 P C R に適合性のユニバーサル順方向プライマー配列を用いて 5 ' 末端で修飾した。同様に、逆プライマーのすべてを G A 2 ユニバーサル逆プライマー配列で修飾する。各順方向プライマーの 3 ' 末端を、組換えシグナル配列(R S S)に対して V セグメント中の位置 - 4 3 で固定し、これにより増幅された領域内に独自の V タグ配列を提供する。各 J セグメントに対して特異的な 1 3 の逆プライマーを 3 ' イントロン中に固定し、各プライマーの 3 ' 末端がイントロン / エクソンジャンクションを交差する。J セグメントに対して相補性である 1 3 のシーケンシングプライマーは、J セグメントの増幅された部分に対して相補性であり、したがって生成した最初の数個の塩基が独自の J タグ配列を捕捉するように設計された。

20

【 0 0 7 9 】

平均して、J 欠失は 4 b p + / - 2 . 5 b p であり、このことは、1 0 ヌクレオチドを超える J 欠失が配列の 1 % 未満で起こることを意味する。1 3 の異なる T C R J 遺伝子セグメントはそれぞれ R S S 部位の下流の位置 + 1 1 ~ + 1 4 で独自の 4 個の塩基タグを有していた。したがって、シーケンシングオリゴヌクレオチドは、この「タグ」のすぐ下流で観察されるコンセンサスヌクレオチドモチーフとアニールし、したがって読み取られた配列の最初の 4 個の塩基が独自に J セグメント(表 5)を同定するように設計された

30

【 0 0 8 0 】

読み取られた配列の J 及び V セグメントを帰属するために用いられる情報は、増幅された配列内に完全に含まれ、P C R プライマーの同一性に依存しない。これらのシーケンシングオリゴヌクレオチドは、別の J セグメントに対して特異的なオリゴヌクレオチドにより 1 つの J セグメントに関するシーケンシング反応の雑多なプライミングが、正しいシーケンシングオリゴヌクレオチドからの配列データとちょうど同じヌクレオチドで始まる配列データを生成するように選択された。このようにして、シーケンシングオリゴヌクレオチドの雑多なアニューリングは、生成した配列データの質に影響を及ぼさなかった。

40

【 0 0 8 1 】

慣例にしたがって V セグメントの第 2 の保存システィンと J セグメントの保存フェニルアラニンとの間のヌクレオチドとして定義される C D R 3 領域の平均長さは 3 5 + / - 3 であり、したがって J セグメントタグから始まる配列は、読み取られた 5 0 b p 中にほぼ常に完全 V N D N J ジャンクションを確保する。

50

【0082】

TCR J 遺伝子セグメントはほぼ 50 bp の長さである。ミスマッチ配列まで及び、これとアニールする PCR プライマーは雑多なプライマーと呼ばれる。多重 PCR に関連し、特に遺伝子ファミリーに関連した雑多なプライミングの危険性のために、TCR J 逆 PCR プライマーは、シーケンシングオリゴヌクレオチドとの重複を最小限に抑えるように設計された。したがって、13 の TCR J 逆プライマーは、コンセンサスプライス部位モチーフの 3' 末端で固定され、シーケンシングプライマーの重複は最小である。TCR J プライマーは、デフォルトパラメータのもとで OligoCalc プログラムを使用して (<http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligoCalc.html>)、一貫したアニーリング温度 (50 mM の塩中 58 度) について設計された。
10

【0083】

TCR V 順方向プライマーは、2 つの明確な目的のために、V セグメント間の比較的強い配列保存の領域において V セグメントにアニールするように設計された。まず、これらのプライマー間の配列の保存を最大にすることにより、各プライマーの差次のアニーリング特性の可能性が最小限に抑えられる。第 2 に、プライマーは、V 及び J プライマー間の増幅された領域が、使用される特定の V 遺伝子セグメントを特定するために十分な TCR V 配列情報を含むように選択された。このことは、TCR V プライマーによる雑多なプライミングの場合に、誤った TCR V 遺伝子セグメント帰属の危険性を防止する。TCR V 順方向プライマーは、TCR 座におけるすべての既知非偽遺伝子について設計された。
20

【0084】

このシステムを用いてうまく再構成された TCR CDR3 領域の全 PCR 産物は、約 200 bp の長さであることが予想される。ゲノムテンプレートは、45 の TCR V F プライマーの等モル濃度のプール (「VF プール」) 及び 13 の TCR J R プライマーの等モル濃度のプール (「JR プール」) を用いて PCR 増幅された。50 μl の PCR 反応を、1.0 μM の VF プール (各独自の TCR V F プライマーについて 22 nM)、1.0 μM の JR プール (各独自の TCR BJR プライマーについて 77 nM)、1 X QIAGEN Multiple PCR マスター ミックス (QIAGEN 品番 206145)、10 % の Q 溶液 (QIAGEN)、及び 16 ng/ul の gDNA で準備した。以下の熱循環条件を、PCR Express サーマルサイクラー (Hybaid、英国アシュフォード) 中、以下のサイクリング条件下で使用した：1 サイクルは 95 で 15 分間、25 ~ 40 サイクルは 94 で 30 秒間、59 で 30 秒間そして 72 で 1 分間、続いて 1 サイクルは 72 で 10 分間。数十万 ~ 数百万の再構成された TCR CDR3 座をサンプリングするために、12 ~ 20 ウェルの PCR を各ライプライについて実施した。
30

【0085】

実施例 4：配列データのプレプロセッシング

【0086】

シーケンサーデータプロセッシングは、各読み取り値の一次配列におけるエラーを除去するため、及びデータを圧縮するための一連のステップを含む。まず、複雑なフィルターは、シーケンサーから誤って読み取られた配列の約 20 % を除去する。次いで、配列は、13 の J 領域のうちの 1 つ及び 54 の V 領域のうちの 1 つの両方とマッチする最低 6 個の塩基を有することが必要とされた。フィルターを、ファージ配列を含む対照レーンに適用すると、7 ~ 8 百万中平均して 1 つの配列 (偽陽性なし) しかステップを通過しなかった。最後に、最近傍アルゴリズムを使用して、PCR エラー及びシーケンシングエラーの両方を除去するために、密接に関連する配列を統合することによって、データを 1 つの配列に折り畳んだ (表 10 を参照)。
40

【0087】

実施例 5：PCR プール及び血液試料中の相対的 CDR3 配列量の推定

50

【0088】

データを折り畳んだ後、再構築する血液中のT細胞配列の基本分布は、配列データから誘導された。手順は3つのステップ；1)末梢血から採取されたT細胞の流動選別、2)PCR增幅、及び3)シーケンシングを使用した。データを分析すると、PCR産物中の配列の割合は、血液中のクローン型の真の分布を推定する前の配列データから逆行して誘導しなければならない。

【0089】

本明細書中のデータで所定の回数観察される各配列について、その配列が特定のサイズのPCRプールからサンプリングされた確率を推定する。配列決定されたCDR3領域は、PCR産物の大きなプールからランダムにサンプリングされるので、各配列についての観察数は、ポアソン分布から導き出される。ポアソンパラメータを、PCRのテンプレートを提供したT細胞ゲノムの数にしたがって定量化する。簡単なポアソン混合モデルは、これらのパラメータを推定し、かつ各配列が各分布から引き出されるペアごとの可能性をだす。これは、血液から引き出された各配列の度数を再構築する期待値最大化法である。

10

【0090】

実施例6：真の多様性を推定するための不可視種のモデル

【0091】

混合モデルは、血液から引き出された各TCR CDR3種の頻度を再構築できるが、更に大きな問題は、どれほど多くの独自のCDR3種がドナー中に存在するか？である。これは、利用可能な試料が各ドナー中に限定されるので、回答を必要とする基本的な問題であり、これらの技術は、治療を受けている患者から適度に採取できるより少ない量の血液に推定されるので、将来更に重要になるであろう。

20

【0092】

数学的解法は、TCR「種」又はクローン型の総数Sについて、シーケンシング実験では \times_s 個の配列sが観察されるとする。観察されないクローン型の全てについて、 $\times_s = 0$ であり、各TCRクローン型は、パラメータ λ_s でポアソンプロセスにしたがって採血中に「確保」される。最初の測定1で、及び第2の測定で配列決定されたT細胞ゲノムの数。多数の独自の配列が存在するので、積分は合計である。G()がパラメータ $\lambda_1, \dots, \lambda_s$ の経験分布関数であり、 n_x がちょうど \times 回配列決定されたクローン型の数であるならば、

30

【数5】

$$E(n_x) = S \int_0^{\infty} \left(\frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \right) dG(\lambda)$$

である。

【0093】

(t)値は、第2のシーケンシング実験で観察される新規クローン型の数である
【数6】

40

$$\Delta(t) = \sum_x E(n_x)_{\text{exp1+exp2}} - \sum_x E(n_x)_{\text{exp1}} = S \int_0^{\infty} e^{-\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) dG(\lambda)$$

【0094】

$1 - e^{-t}$ のテイラー展開により、 $(t) = E(x_1) t - E(x_2) t^2 + E(x_3) t^3 - \dots$ が得られ、これは期待値($E(n_x)$)を第1の測定で観察される数で置

50

き換えることによって近似することができる。第1の測定で観察される数で用いて、この式は、 1.6×10^5 の新規独自配列が第2の測定で観察されることを予測する。第2の測定の実際の値は 1.8×10^5 の新規 T C R 配列であり、これは、予測により全多様性の有効な下限が提供されたことを意味する。オイラー変換を使用して、(t)を正規化して、(¥)の下限を得た。

【0095】

実施例7：エラー訂正及びバイアス評価

【0096】

一次配列データ中の配列エラーは、主に2つの起源：(1) T C R C D R 3 テンプレート配列の P C R による增幅中に起こるヌクレオチド誤取り込み、及び(2) C D R 3 配列の P C R 増幅されたライブラリのシーケンシング中に導入されたベースコール中のエラーに由来する。多量のデータにより、本発明者等は直接エラー訂正コードを実施して、これらの2つの起源に起因する一次配列データ中のエラーの大部分を修正することが可能になる。エラー訂正後、独自のフレーム内 C D R 3 配列の数及び各独自配列の観察数を、2人のドナーからの4つの流動選別されたT細胞集団のそれぞれについて表にした。4つのフローサイトメトリーで規定された集団における C D R 3 配列の相対的度数分布は、抗原に出会った C D 4 5 R O⁺ 集団が C D 4 5 R O⁻ 集団よりも高い相対的頻度で有意により多くの独自 C D R 3 配列を含んでいたことを証明した。C D 4、C D 8、及び C D 4 5 R O の発現により区別され、血液中に存在する4つの異なる細胞サブセットにおいて観察される T C R C D R 3 配列の度数ヒストグラムは、10の独自の配列が C D 4⁺ C D 4 5 R O⁺ (抗原経験) T細胞試料中でそれぞれ200回観察されることを示し、これは C D 4⁺ C D 4 5 R O⁻ 集団で観察されるものの2倍を越える頻度であった。

10

20

30

30

40

50

【0097】

シーケンシング前に T C R C D R 3 領域を増幅するための P C R ステップの使用は、異なる V 及び J 遺伝子セグメントを利用する C D R 3 領域の P C R 増幅の有効性の差のために、配列の推測される相対量に系統的バイアスを潜在的に導入する可能性がある。任意のそのようなバイアスの大きさを推定するために、約 30,000 の独自 C D 4⁺ C D 4 5 R O⁺ Tリンパ球ゲノムの試料からの T C R C D R 3 領域を 25 サイクルの P C R により増幅し、この時点で、P C R 産物を半分に分けた。半分をとっておき、P C R 産物のもう半分をさらに 15 サイクルの P C R、合計 40 サイクルで増幅した。25～40 サイクルで増幅された P C R 産物を次いで配列決定し、比較した。25 サイクル配列の 95% 超も 40 サイクル試料で見出され：これらの試料間で配列の頻度を測定する場合、直線的関係が観察される。25 サイクルレーンで所定の回数観察される配列について、P C R バイアスとサンプリング相違の組み合わせは、40 サイクルでの観察回数の平均付近の分散の原因となる。直線のまわりの平均分散 (1.5 倍) を全体として P C R バイアスに保存的に起因するとして、P C R 増幅の各サイクルは、 $1.5^{1/15} = 1.027$ の平均的大きさのバイアスを潜在的に導入する。したがって、25 サイクルの P C R により、別個の C D R 3 領域配列の推定される相対量において、 $1.027^{25} = 1.95$ の平均的大きさの全バイアスが導入される。

【0098】

実施例8：J 遺伝子セグメント使用

【0099】

各 T C R 鎖中の C D R 3 領域は、13の J 遺伝子セグメントのうちの1つ由来の配列を含む。2人のドナー由来の4つの異なるT細胞集団における C D R 3 配列の分析によって、13の異なる J 遺伝子セグメント由来の配列を組み入れた全配列の割合は、20倍を超えて変動することが証明された。1人のドナー由来の異なる T フローサイトメトリーにより規定された T 細胞間での J 利用は、所定のドナー内で比較的一定であった。さらに、G A を用いて配列決定された T 細胞由来のゲノム D N A の分析から推定される2人のドナーで観察された J 利用パターンは、臍帯血及び健常な成人ドナー由来の T 細胞で観察されるものと定量的に類似し、どちらも綿密なキャピラリーベースの技術を用いて配

列決定されたT細胞由来のcDNAの分析から推定された。

【0100】

実施例9：ヌクレオチド挿入バイアス

【0101】

TCR及び鎖中のCDR3ジャンクションでの多様性の多くは、酵素末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase)(TdT)による非テンプレートヌクレオチド挿入によって作製される。しかし、インビオでは、選択が予期せず生じるTCRレパートリーの形成において重要な役割を果たす。TdTヌクレオチド挿入頻度は、選択と無関係に、フレーム外TCR配列を用いて計算された。これらの配列は、第2の対立遺伝子が機能的再構成を有するT細胞において1つの対立遺伝子に関して実施される非機能的再構成である。TdTのモノヌクレオチド挿入バイアスはC及びGで優勢である(表11)。

【表11】

表11：フレーム外データにおけるモノヌクレオチドバイアス

	A	C	G	T
レーン1	0.24	0.294	0.247	0.216
レーン2	0.247	0.284	0.256	0.211
レーン3	0.25	0.27	0.268	0.209
レーン4	0.255	0.293	0.24	0.21

10

20

【0102】

類似したヌクレオチド頻度がフレーム内配列において観察される(表12)。

【表12】

表12：フレーム内データにおけるモノヌクレオチドバイアス

	A	C	G	T
レーン1	0.21	0.285	0.275	0.228
レーン2	0.216	0.281	0.266	0.235
レーン3	0.222	0.266	0.288	0.221
レーン4	0.206	0.294	0.228	0.27

30

【0103】

フレーム外TCR配列由来のN領域を用いて、ジヌクレオチドバイアスを測定した。ジヌクレオチドバイアスの重要でない寄与を分離するために、ジヌクレオチド頻度を2つの塩基のそれぞれのモノヌクレオチド頻度で割った。約数は

【数7】

$$m = \frac{f(n_1 n_2)}{f(n_1) f(n_2)}$$

40

である。

【0104】

m由来のマトリックスは表13で見いだされる。

【表13】

表13：フレーム外データについてのジヌクレオチドオッズ比

	A	C	G	T
A	1. 198	0. 938	0. 945	0. 919
C	0. 988	1. 172	0. 88	0. 931
G	0. 993	0. 701	1. 352	0. 964
T	0. 784	1. 232	0. 767	1. 23

【0105】

10

ジヌクレオチドの多くは過小評価又は過大評価される。一例として、G G 対を見出す確率は非常に高い。コドン G G N はグリシンに翻訳されるので、多くのグリシンは C D R 3 領域にあることが予想される。

【0106】

実施例10：C D R 3 領域におけるアミノ酸分布

【0107】

T C R 鎖のC D R 3 領域におけるアミノ酸の分布は、V、D、及びJ領域の生殖細胞系配列、T d T の挿入バイアス、及び選択によって形成される。4つの異なる細胞サブコンパートメントについてこの領域におけるアミノ酸の分布は、異なる細胞間で非常に類似している。配列を固定長の鎖に分けて、小さい、特別な、及び大きな疎水性、中性極性、酸性及び塩基性の6つの化学的特性によって分類されるアミノ酸間の位置に依存した分布。分布は、特に位置5で酸性塩基の割合が高いC D 8 + 抗原に出会ったT細胞以外は実質的に同一である。

20

【0108】

特に興味深いのは、C D 8 + 及びC D 4 + T C R 配列間の比較である。なぜなら、これらはそれぞれクラスI及びクラスIIのH L A分子によって提示されるペプチドに結合するからである。C D 8 + 抗原に出会ったT細胞は酸性アミノ酸の割合が高い小数の位置を有する。これは、H L A クラスI分子で見出される塩基性残基と結合することができるが、クラスIIで見出される塩基性残基とは結合できなかった。

30

【0109】

実施例11：様々な人で見出される同じアミノ酸配列を有するT C R 鎖

【0110】

T C R 鎖配列をアミノ酸に翻訳し、次いで2人のドナー間でペアごとに比較した。数千もの完全な配列マッチが観察された。例えば、C D 4 + C D 4 5 R O - サブコンパートメントを比較して、ドナー1由来の250,000の独自のアミノ酸配列のうち約8,000はドナー2と完全にマッチした。アミノ酸レベルでこれらのマッチする配列の多くは、第3のコドン位置で複数のヌクレオチド相違を有する。前記例を受けて、1,500/8,000の同じアミノ酸マッチは、>5のヌクレオチドミスマッチを有していた。2つのT細胞サブタイプ間で、独自のT C R 配列の4~5%は同じアミノ酸マッチを有することが判明した。

40

【0111】

2つの可能性：1) T C R 発生中の選択が、これらの共通配列を產生すること、及び2) T d T によるヌクレオチド挿入頻度における大きなバイアスが類似したヌクレオチド配列を作成すること、について調べた。フレーム内ペアワイスのマッチを、フレーム外ペアワイスマッチと比較した（前記実施例1~4を参照）。フレームの変更は遺伝子コードの特性の全てを保存し、したがって配列バイアスが全ての観察結果の原因であるならば、同じ数のマッチが見つかるはずである。しかし、フレーム外マッチのほぼ2倍のフレーム内マッチが見出され、このことは、タンパク質レベルでの選択が重要な役割を果たすことを示唆する。

【0112】

50

数千もの同じ TCR 鎖アミノ酸配列のこの知見を確認するために、2人のドナーを第3のドナー（44才のCMV⁺白人女性）由来のCD8⁺CD62L⁺CD45RA⁺（ナイーブ様）TCRに関して比較した。第3のドナーと、もとの2人のドナーのそれぞれとの間で、アミノ酸レベルで数千もの配列の同じペアワイズマッチが見出された。対照的に、460の配列が3人のドナー全てで共有されていた。ドナー間の独自配列の総数における大きな変動は、出発物質及びシーケンサーへのローディングの変動の積であって、ドナーの血液における真の多様性における変動をあらわすものではない。

【0113】

実施例12：クローン型頻度が高いほど生殖細胞系に近い

【0114】

全てのT細胞サブコンパートメント内の異なる配列間のコピー数の変動は、10,000倍を超える範囲であった。コピー数と相関する唯一の特性は（挿入数+欠失数）であり、これは逆相関する。分析の結果は、欠失が、コピー数との逆相関において挿入よりも果たす役割が小さいことを示した。

【0115】

挿入及び欠失が少ない配列は、生殖細胞系に近い受容体配列を有する。生殖細胞系により近い配列の数の増大についての1つの可能性は、T細胞発生中に複数回作成されたものであるということである。生殖細胞系配列は人々の間で共有されるので、共有されるTCR鎖は、少数の挿入及び欠失を有するTCRによって作成される可能性が高い。

【0116】

実施例13：V遺伝子セグメント利用及びCDR3長さによるTCR CDR3配列の「スペクトラタイプ」分析

【0117】

TCR多様性は、一般的に、TCRスペクトラタイピング技術を用いて評価され、このTCRスペクトラタイピング技術は、TCR CDR3多様性を配列レベルで評価しないが、同じV又はV遺伝子セグメントを使用するT細胞のサブセットにおけるmRNAとして表されるTCR又はTCR CDR3長さの多様性を評価するRT-PCRに基づく技術である。臍帯血又は健常な若年成人の末梢血においてみられるようなTCRC DR3配列の多様なレパートリーを有するポリクローナルT細胞集団のスペクトラタイプは、3つのヌクレオチドの倍数である8~10の異なる長さのCDR3配列を含み、これはフレーム内転写物の選択を反映する。スペクトラタイピングは、それぞれの特定の長さを有するCDR3配列の相対的頻度についてのおおまかな量的情報も提供する。シーケンサーを用いてT細胞ゲノムDNA由来のTCR CDR3領域の直接シーケンシングが、スペクトラタイピングによって同定されるCDR3長さ多様性の全てを忠実に確保できるかどうかを判断するために、「仮想」TCRスペクトラタイプ（前記実施例を参照）を配列データから生成させ、通常のPCR技術を用いて生成させたTCRスペクトラタイプと比較した。仮想スペクトラタイプは、通常のスペクトラタイプにおいて存在するCDR3長さ及び相対的頻度情報の全てを含んでいた。直接TCR CDR3シーケンシングは、通常のスペクトラタイプにおいて存在するTCR多様性情報の全てを取得する。標準的TCRスペクトラタイプデータと、代表的TCRV遺伝子セグメントを利用し、ドナー1由来のCD4⁺CD45RO⁺細胞中に存在する配列に関して計算されたTCR CDR3長さ分布の比較。配列データ中に含まれる情報を、各Vファミリー内で異なる長さを有する独自CDR3配列の頻度ヒストグラムで表すことにより、スペクトラタイプデータに含まれる情報の全てを容易に再現する。加えて、仮想スペクトラタイプは、従来のPCRベースのスペクトラタイピングにより検出されなかった、非常に短いCDR3長さ及び非常に長いCDR3長さの両方を有する希少CDR3配列の各Vファミリー内の存在を明らかにした。

【0118】

実施例14：全体的なCDR3配列多様性の推定

【0119】

10

20

30

40

50

エラー訂正後、シーケンサーフローセルの各レーンで観察される独自 C D R 3 配列の数は、通常、 1×10^5 を上回った。各レーンで配列決定された P C R 産物が 2 人のドナーのそれぞれにおいて存在するわずかな T 細胞ゲノムから必然的に誘導されたと仮定すると、各個人の全 T 細胞レパートリーにおける独自 T C R C D R 3 配列の総数は、はるかに高くなる可能性が高い。全レパートリー中の独自配列の数を推定することは、したがって、血液中に存在するが、試料中で観察されないさらなる独自 C D R 3 配列の数を推定することを必要とする。有限試料中に存在する種多様性の測定を用いて、大きく複雑な集団における全体的な種多様性を推定することは、「不可視種の問題」と歴史的に呼ばれている（前記実施例を参照）。解決案は、実験を繰り返すと、すなわち末梢血 T 細胞の同じ試料、例えばシーケンサーフローセルの異なるレーンにおける T C R C D R 3 P C R 産物の同じように調製されたライブラリに関してシーケンシングが繰り返される場合に観察される、新規種、又は T C R C D R 3 配列の数を測定し、新規 C D R 3 配列の数を数えることから始める。ドナー 2 由来の C D 8⁺ C D 4 5 R O⁺ 細胞に関して、第 2 レーンで予想され、観察される新規 C D R 3 配列の数は 5 % 以内（前記実施例を参照）であり、このことは、この分析的解決法を実際に用いて、全レパートリー中の独自 T C R C D R 3 配列の総数を推定することができることを示唆する。

10

【0120】

4 つのフローサイトメトリーにより規定された T 細胞区画中の独自の T C R C D R 3 配列の総数の結果としての推定値を表 14 に示す。

20

【表 14】

表 14 : T C R レパートリー多様性

ドナ ー	C D 8	C D 4	C D 4 5 R O	多様性
1	+	-	+	6.3×10^5
	+	-	-	1.24×10^6
	-	+	+	8.2×10^5
	-	+	-	1.28×10^6
	全 T 細胞多様性			3.97×10^6
2	+	-	+	4.4×10^5
	+	-	-	9.7×10^5
	-	+	+	8.7×10^5
	-	+	-	1.03×10^6
	全 T 細胞多様性			3.31×10^6

30

【0121】

注目すべきことは、これらの集団における全 T C R 多様性が、末梢血中の 3 ~ 4 百万の独自配列間にあることである。驚くべきことに、C D 4 5 R O⁺、又は抗原と出会った区画は約 150 万のこれらの配列を構成する。これは、予想されるよりも少なくとも一桁大きい。この矛盾は、ディープシーケンシングによってのみ検出できる、低い相対的頻度で観察される多数のこれらの配列に起因する可能性が高い。2 人のドナーにおける各区画の推定される T C R C D R 3 レパートリーサイズは互いに 20 % 以内である。

40

【0122】

本明細書中の結果は、実現された T C R 受容体多様性が、事前の推定値よりも少なくとも 5 倍高いことを示し（ $\sim 4 \times 10^6$ の別個の C D R 3 配列）、特に、C D 4 5 R O⁺ 抗原経験 T 細胞間で、以前に報告されている（ $\sim 1.5 \times 10^6$ の別個の C D R 3 配列）よりもはるかに大きな T C R 多様性を示唆する。しかし、T C R 配列データの生物情報科学分析により、モノヌクレオチド及びジヌクレオチド含有量において強力なバイアスが示され、このことは、使用される T C R 配列が、理論的サイズよりもはるかに小さな分布からサンプリングされることを意味する。高度に圧縮された配列空間からサンプリ

50

グされた各人の T C R 鎖の多様性が大きいので、各人間で T C R 配列プールの重複が予想できる。実際、結果は、完全なアミノ酸マッチを有する C D 8⁺ ナイーブ T C R 鎖の約 5 % が、3人の異なる個人の各対間で共有されていることを示す。T C R プールは、理論的な T C R 多様性よりも実質的に小さいと以前に測定されているので、これらの結果は、数百～数千の真性パブリック T C R を見出すことができる事を示す。

【配列表】

2012531202000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2010/037477									
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 symbol(s)) 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">MARIANI SARA ET AL: "Comprehensive assessment of the TCRBV repertoire in small T-cell samples by means of an improved and convenient multiplex PCR method" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (NEW YORK), vol. 37, no. 6, 20 May 2009 (2009-05-20), - 20 May 2009 (2009-05-20) pages 728-738, XP002596859 ISSN: 0301-472X the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-45</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">EP 2 062 982 A1 (IMMUNID [FR]; COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 27 May 2009 (2009-05-27) the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-45 -/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	MARIANI SARA ET AL: "Comprehensive assessment of the TCRBV repertoire in small T-cell samples by means of an improved and convenient multiplex PCR method" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (NEW YORK), vol. 37, no. 6, 20 May 2009 (2009-05-20), - 20 May 2009 (2009-05-20) pages 728-738, XP002596859 ISSN: 0301-472X the whole document	1-45	X	EP 2 062 982 A1 (IMMUNID [FR]; COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 27 May 2009 (2009-05-27) the whole document	1-45 -/-
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	MARIANI SARA ET AL: "Comprehensive assessment of the TCRBV repertoire in small T-cell samples by means of an improved and convenient multiplex PCR method" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (NEW YORK), vol. 37, no. 6, 20 May 2009 (2009-05-20), - 20 May 2009 (2009-05-20) pages 728-738, XP002596859 ISSN: 0301-472X the whole document	1-45									
X	EP 2 062 982 A1 (IMMUNID [FR]; COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 27 May 2009 (2009-05-27) the whole document	1-45 -/-									
<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 document 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		Date of mailing of the international search report									
8 September 2010		24/09/2010									
Name and mailing address of the ISA		Authorized officer									
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Dolce, Luca									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/037477

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN DONGEN J ET AL: "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobuline and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936" LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 17, no. 12, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 2257-2317, XP008093070 ISSN: 0887-6924 the whole document	1-45
X	MASLANKA KRYSTYNA ET AL: "Molecular analysis of T cell repertoires: Spectratypes generated by multiplex polymerase chain reaction and evaluated by radioactivity or fluorescence" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 44, no. 1, 1995, pages 28-34, XP002596860 ISSN: 0198-8859 the whole document	1-45
X	KIIANITSA KONSTANTIN ET AL: "Development of tools for T cell repertoire analysis (TCRB spectratyping) for the canine model of hematopoietic cell transplantation" BLOOD, vol. 110, no. 11, Part 2, November 2007 (2007-11), page 293B, XP002596861 & 49TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY, ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 08 -11, 2007 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/037477

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2062982	A1 27-05-2009	CA 2706667 A1 EP 2220255 A2 WO 2009095567 A2	06-08-2009 25-08-2010 06-08-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,S,E,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,KM,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ワレン , エダス , エイチ .

アメリカ合衆国 , 9 8 1 1 0 ワシントン州 , ベインブリッジ アイランド , エヌ . イー . ブルームグリー ロード 1 0 7 7 0

(72)発明者 カールソン , クリストファー , スコット

アメリカ合衆国 , 9 8 0 3 3 ワシントン州 , カークランド , 1 0 7 アベニュー エヌ . イー . 5 1 2 5

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA20

4B063 QA01 QQ42 QR08 QR62 QS25