

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6869233号
(P6869233)

(45) 発行日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(24) 登録日 令和3年4月15日(2021.4.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/6804 (2018.01)	C 12 Q 1/6804 Z N A Z
C 12 Q 1/6869 (2018.01)	C 12 Q 1/6869 Z
C 12 Q 1/6851 (2018.01)	C 12 Q 1/6851 Z
G 01 N 33/53 (2006.01)	G 01 N 33/53 D
C 12 N 15/115 (2010.01)	C 12 N 15/115 Z

請求項の数 20 (全 128 頁)

(21) 出願番号	特願2018-515549 (P2018-515549)
(86) (22) 出願日	平成28年9月24日 (2016.9.24)
(65) 公表番号	特表2018-535652 (P2018-535652A)
(43) 公表日	平成30年12月6日 (2018.12.6)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/053598
(87) 國際公開番号	W02017/053905
(87) 國際公開日	平成29年3月30日 (2017.3.30)
審査請求日	令和1年9月4日 (2019.9.4)
(31) 優先権主張番号	62/232,209
(32) 優先日	平成27年9月24日 (2015.9.24)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	517329214 アブビトロ、エルエルシー アメリカ合衆国 ワシントン 98109 , シアトル, デクスター アベニュー ノース 400, スイート 1200
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(74) 代理人	230113332 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートおよびその使用

(57) 【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の少なくとも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、親和性部分とオリゴヌクレオチド部分とを含むコンジュゲートの前記オリゴヌクレオチド部分に付着させることを含み、前記コンジュゲートの前記親和性部分が、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单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】

前記单一の細胞が、单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单一の細胞が単離される前に、前記单一の細胞を含む複数の細胞を前記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 つの單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 つの單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 つの單一ベッセル中の前記单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、前記单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

10

【請求項 7】

前記コンジュゲートの前記オリゴヌクレオチド部分が、親和性分子バーコード (AMB) 配列、またはプライマー結合配列の少なくとも 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、前記コンジュゲートの前記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。

20

【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 (AID) 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 (AMB) 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。

30

【請求項 10】

前記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 つの單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。

40

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの單一ベッセルが、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

50

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】

前記单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
10
、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1つを含む、請求項16に記載の方法。
20

【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の少なくとも1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) コンジュゲートであって、前記コンジュゲートの親和性部分が、前記单一の細胞の標的抗原に結合し、前記コンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分が、抗原識別(AID)配列を含む、コンジュゲート
30
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、そして、必要に応じて、前記单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】

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；
40

(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できる試薬、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できる試薬を含む、1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
50

(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) 複数のベッセルバ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バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、固有のベッセルバ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バーコード化ポリヌクレオチドのベッセルバ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付着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。10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2015年9月24日に出願された米国仮出願番号第62/232,209号に基づく優先権を主張しており、この仮出願は、その全体が参考として本明細書中に援用される。20

【背景技術】

【0002】

背景

内因的に発現されて細胞膜上に位置するタンパク質の特定のセットの存在量によって、多くの細胞型を識別および分類することができる。この現象は、イムノフェノタイピングとして公知のプロセスを使用する細胞の研究を可能にし、このプロセスにおいて、細胞は、細胞の既知の表面タンパク質に特異的な蛍光標識された抗体と共にインキュベートされ、そしてこのような抗体と結合する。フローサイトメトリーは、各細胞に対して表面結合した抗体のレベルを測定するために一般に使用されている。しかし、フローサイトメトリー-ベースのアプローチは、同じ実験で同時に使用できるフルオロフォアの数によって制限される。さらに、フローサイトメトリー-ベースのアプローチを使用して同じ実験で同時に使用できるフルオロフォアの数は、スペクトルの重複によって制限される。さらに、フローサイトメトリーは、多くの生物学的に適切なアッセイおよび引き続くDNA配列決定になじまない。30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

要旨

したがって、これらの制限なしに単一の細胞を特徴付ける、例えばイムノフェノタイピングする方法が必要とされている。フローサイトメトリー-ベースのアプローチとは異なり、本明細書に記載される方法は、個々の細胞のタンパク質を分析するために配列読み出しを使用し、同じ実験で同時に使用できるフルオロフォアの数によってもそれらのスペクトルの重複によっても制限されない。さらに、本明細書に記載される方法は、多くの生物学的に適切なアッセイおよび引き続くDNA配列決定になじむ。本明細書に記載される方法は、親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲート（例えば、抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート）を利用する。このコンジュゲートのオリゴヌクレオチドは、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特異的に結合する表面抗原にバーコード化されている抗原ID（AID）配列を含む。したがって、本明細書に記載される方法を使用すると、単一の細胞の抗原（例えば、表面タンパク質）が、フルオロフォアを必要とせずに分析できる。例えば、ディスプレイされる単一の細胞の表面タンパク質は、抗原ID40

配列から識別できる。単一の細胞の表面タンパク質のうち1種または複数は、単一の細胞の正体、特徴または関連性を規定するために使用され得る。

【0004】

本明細書に記載される方法の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、緩徐な細胞ソーティング、細胞ソーティングと関連する低減された標的収量、限定数の出力ストリーム、および親和性などの親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの定量された特性に対応しない選択されたビン (b i n) の問題を克服するために使用され得る。示された例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、ベッセル中の四量体結合の単一細胞測定を用いて、ソーティングを置き換えまたは増強し得る。示された例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、T C Rペア配列、クローン存在量および相対的四量体親和性を同時に獲得するために、本明細書に記載される方法において使用され得る。10

【0005】

親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを用いて、ベッセル（例えば、エマルジョン）中の細胞を特徴付ける、例えばイムノフェノタイピングする方法が、本明細書に記載される。一部の実施形態では、この方法は、エマルジョンベースの単一の細胞の分析と適合性の様式で細胞サブセットを識別するために使用される。一部の実施形態では、この方法は、エマルジョンベースの単一の細胞の分析と適合性の様式で、抗原に特異的な免疫細胞を識別するために使用される。一部の実施形態では、細胞分析の前に、表面タンパク質特異的抗体は、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、コンジュゲート抗体の標的特異性に固有の配列モチーフを含むように設計される。このオリゴヌクレオチドは、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（例えば、抗体）に、共有結合的または非共有結合的にコンジュゲートされ得る（例えば、ビオチン - オリゴヌクレオチドをストレプトアビシン - 抗体に）。20

【0006】

方法は、混合物または溶液中で、1つまたは複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートと共に細胞をインキュベートすることを含み得る。細胞は、未結合の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを除去するために洗浄され得る。次いで、細胞は、ベッセル、例えば、エマルジョン中にカプセル化される。細胞は、ベッセル1つ当たり単一の細胞の密度でベッセル中に存在し得る。したがって、ベッセル、例えば液滴内の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、例えば、特異的抗体 - 表面タンパク質相互作用を介して、細胞表面に結合される。この方法は、ベッセル特異的DNA配列（例えば、固有のベッセルバーコード）を親和性 - コンジュゲートオリゴヌクレオチドに付着させることを含み得る。さらなる細胞DNAまたはmRNA分析、表現型測定、機能的試験、細胞ソーティングまたは他の反応が、親和性 - コンジュゲートオリゴヌクレオチドを（例えば、DNAバーコードで）バーコード化する前に、それと同時にまたはその後で、実施され得る。30

【0007】

方法は、例えば、エマルジョン実験に引き続いで、エマルジョンから核酸を抽出することを含み得る。抽出された核酸は、配列決定のために調製され得、（例えば、次世代シーケンシング技術を使用して）配列決定され得る。方法は、抗原ID配列および液滴特異的バーコード配列の両方を含むベッセル由来のポリヌクレオチド分子を配列決定することを含み得る。抗原ID配列は、オリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体によって結合された特異的細胞表面タンパク質を規定できる。抗原ID配列は、特定の細胞表面タンパク質に結合するオリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体の特異的抗体を規定できる。したがって、抗原ID配列は、分析された細胞上のどの表面タンパク質が発現されるかを示し得る。単一の細胞を宿すベッセル中で、共有された液滴特異的バーコード配列を含む全ての配列が、単一の細胞と関連する。したがって、単一の細胞は、その正体、特徴または関連性を規定するために使用され得る表面タンパク質のセットを提示すると分析され得る。40

【0008】

一態様では、複数のベッセル中で反応を実行することを含む方法が提供され、反応は、50

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、複数のベッセルのうちの1つのベッセル中で、単離された单一の細胞の標的抗原に結合した親和性 - 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を含む。

【0009】

一部では、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が本明細書で提供され、反応は、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、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、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、複数のベッセルのうちのそ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。

【0010】

一部の実施形態では、細胞は、ベッセル内に含まれる单一の細胞である。一部の実施形態では、ベッセルは、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を含む。一部の実施形態では、ベッセルは、複数のベッセルの各ベッセルを含む。一部の実施形態では、反応は、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。一部の実施形態では、各ベッセル中の細胞は、同じ試料由来である。一部の実施形態では、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つのベッセル中の細胞は、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つのベッセル中の細胞と同じ試料由来である。一部の実施形態では、このオリゴヌクレオチド部分は、抗原識別配列（AID）を含む。一部の実施形態では、AIDは、標的抗原、または親和性 - 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。

10

【0011】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的抗原、または親和性 - 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た抗原識別配列（AID）をさらに含む。一部の実施形態では、抗原識別配列（AID）は、既知の配列である。

【0012】

一部の実施形態では、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、ベッセル中の鋳型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド由来である。

【0013】

一部の実施形態では、この方法は、配列情報を取得するために、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。

20

【0014】

一部の実施形態では、この方法は、配列情報に基づいて、单一の細胞の特徴を決定することをさらに含む。一部の実施形態では、配列情報は、抗原識別（AID）配列を含む。一部の実施形態では、この方法は、配列情報に基づいて、单一の細胞の特徴を決定することをさらに含む。一部の実施形態では、特徴は、表現型である。一部の実施形態では、表現型は、免疫表現型である。

30

【0015】

一部の実施形態では、この方法は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを、单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。一部の実施形態では、接触させることは、ベッセル中で单一の細胞が単離される前である。一部の実施形態では、この方法は、接触させることの後に、複数の細胞を洗浄することをさらに含む。

40

【0016】

一部の実施形態では、ベッセルは、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。

【0017】

一部の実施形態では、この方法は、ベッセル中の单一の細胞を単離することをさらに含む。一部の実施形態では、单一の細胞は、単離することの前に親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合される。

【0018】

50

一部の実施形態では、この方法は、単一の細胞を溶解させることをさらに含む。一部の実施形態では、溶解させることは、ベッセル中で単一の細胞が単離された後である。

【0019】

一部の実施形態では、複数の細胞は、複数のソーティングされていない細胞である。

【0020】

一部の実施形態では、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ベッセルバーコード配列は、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ベッセルバーコード配列とは異なる。一部の実施形態では、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ベッセルバーコード配列は、同じベッセルバーコード配列を含む。一部の実施形態では、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ベッセルバーコード配列は、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ベッセルバーコード配列に対して固有である。10

【0021】

一部の実施形態では、この方法は、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、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をさらに含む。一部の実施形態では、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、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、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は、同時に実行される。20

【0022】

一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、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、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は、同時に実行される。

【0023】

一部の実施形態では、細胞ポリヌクレオチドのベッセルバーコード配列とオリゴヌクレオチドのベッセルバーコード配列とは同じである。30

【0024】

一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、プールすることは、配列決定することの前である。

【0025】

一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、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。一部の実施形態では、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は、固有の抗原識別 (AID) 配列を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、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 (AMB) 配列を含む。一部の実施形態では、複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子は、固有の親和性分子バーコード (AMB) 配列を含む。

【0026】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、融合配列を含み、そして付着させることは、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを融合配列に付着させることを含む。一部の50

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、プライマー結合配列を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは定常配列 (constant sequence) を含む。

【0027】

一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別 (AID) 配列を分析することをさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、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 (AMB) 配列を分析することをさらに含む。一部の実施形態では、分析することは、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AID配列、1もしくは複数の親和性分子バーコード (AMB) 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。一部の実施形態では、分析することは、比較することを含む。一部の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別 (AID) 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 (AMB) 配列と比較することをさらに含む。

【0028】

一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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比較することをさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、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、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、この方法は、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。

【0029】

一部の実施形態では、この方法は、分析することまたは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。一部の実施形態では、この方法は、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TCRを選択することをさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、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TCRを選択することを含む。

【0030】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドに付着させたベッセルバーコード化ポリヌクレオチドと、細胞ポリヌクレオチドに付着させたベッセルバーコード化ポリヌクレオチドとは、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。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドに付着させたベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、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。

【0031】

一部の実施形態では、細胞ポリヌクレオチドに付着させたベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、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。

【0032】

一部の実施形態では、ベッセルは、固体支持体を含む。一部の実施形態では、ベッセルは、固体支持体を含まない。一部の実施形態では、複数のベッセルの各ベッセルは、単一の細胞を含む。一部の実施形態では、ベッセルは、ウェル、エマルジョンまたは液滴であ

10

20

30

40

50

る。一部の実施形態では、鋳型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、固体支持体に結合していない。一部の実施形態では、鋳型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、固体支持体に結合している。

【0033】

一部の実施形態では、この方法は、複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドのうちの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、細胞ポリヌクレオチドに付着させることをさらに含み、分子バーコード配列は、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。

【0034】

一部の実施形態では、付着させることは、ベッセルポリヌクレオチドをオリゴヌクレオチドにライゲーションすることを含む。一部の実施形態では、付着させることは、酵素を用いてベッセルポリヌクレオチドをオリゴヌクレオチドに付着させることを含む。一部の実施形態では、付着させることは、ベッセルポリヌクレオチドを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。一部の実施形態では、付着させることは、オリゴヌクレオチドを伸長させることをさらに含む。一部の実施形態では、付着させることは、鋳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。

【0035】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは二本鎖である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは一本鎖である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドはDNAである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドはRNAである。

10

20

【0036】

一部の実施形態では、細胞ポリヌクレオチドは、可変領域配列を含む。一部の実施形態では、この方法は、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。一部の実施形態では、細胞ポリヌクレオチドはDNAである。一部の実施形態では、細胞ポリヌクレオチドはRNAである。一部の実施形態では、RNAはmRNAである。

【0037】

一部の実施形態では、単一の細胞はB細胞である。一部の実施形態では、単一の細胞はT細胞である。

【0038】

一部の実施形態では、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は、単一の細胞の細胞外抗原に結合する。一部の実施形態では、単一の細胞の細胞外抗原は、免疫細胞に特異的な抗原である。一部の実施形態では、単一の細胞の細胞外抗原は、T細胞に特異的な抗原である。一部の実施形態では、この細胞外抗原はCD4である。一部の実施形態では、この細胞外抗原はCD8である。一部の実施形態では、単一の細胞の細胞外抗原は、B細胞に特異的な抗原である。一部の実施形態では、この細胞外抗原は免疫グロブリンである。

30

【0039】

一部の実施形態では、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は、抗体またはその断片である。一部の実施形態では、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は、ペプチドである。一部の実施形態では、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は、タンパク質である。一部の実施形態では、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は、アプタマーである。一部の実施形態では、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は、小分子である。一部の実施形態では、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は、薬物である。一部の実施形態では、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は、細胞である。一部の実施形態では、この細胞は抗原提示細胞(APC)である。一部の実施形態では、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は、主要組織適合性複合体(MHC)を含む。一部の実施形態では、MHCは、可溶性および/または多量体(例えば、四量体)形態である。一部の実施形態では、MHCは、ペプチドに結合している。一部の実施形態では、ペプチドは合成ペプチドである。一部の実施形態では、MHCは、例えば单一の

40

50

細胞の、T細胞受容体（T C R）および／またはT C R様結合分子、例えば、T C R様抗体もしくは免疫グロブリンもしくはキメラ抗原受容体に結合する。

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態では、親和性部分は、抗原認識分子および／あるいは免疫受容体、例えば、抗体もしくは免疫グロブリンまたはそれらの部分もしくは融合物、操作された免疫受容体、キメラ抗原受容体（C A R）、あるいはT C Rに特異的に結合する。一部のかかる実施形態では、親和性部分は、抗体もしくは受容体、例えばC A Rによって認識される抗原もしくはエピトープまたはそれらの部分を含む。一部の実施形態では、親和性部分は、免疫受容体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む。一部の態様では、抗体またはその抗原結合性断片は、受容体の可変性部分および／または抗原結合性部分、例えば、イディオトープに特異的に結合する。一部の態様では、親和性分子は、抗イディオタイプ抗体またはその断片である。10

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態では、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は、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。一部の実施形態では、親和性部分は、M H Cの多量体、任意選択で、M H Cの四量体を含む。一部の実施形態では、M H Cは、可溶性形態である。一部の実施形態では、M H Cは、M H Cの溝内で、ペプチドに結合しているかおよび／またはペプチドを含む。一部の実施形態では、ペプチドは合成ペプチドである。一部の実施形態では、M H Cは、単一の細胞のT細胞受容体（T C R）に結合する。一部の実施形態では、親和性部分は、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／または標的は、抗体もしくはC A Rである。一部の実施形態では、親和性部分は、抗体もしくは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、および／あるい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。20

【 0 0 4 2 】

一態様では、複数の細胞を含む試料由来の单一の細胞、单一の細胞の標的抗原に結合した親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート、および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各々が含む複数のベッセルを含む組成物が提供される。一部の実施形態では、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は、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れる。30

【 0 0 4 3 】

一態様では、複数の細胞を含む試料由来の单一の溶解細胞、および单一の溶解細胞の標的抗原に結合した親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを各々が含む複数のベッセルを含む組成物が提供され；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は、ベッセルバーコード配列を含み、单一の溶解細胞由来の細胞ポリヌクレオチドは、同じベッセルバーコード配列を含む。

【 0 0 4 4 】

一態様では、複数のベッセルを含む組成物が本明細書で提供され、複数のベッセルのうちの1つのベッセルは、複数の細胞を含む試料由来の单一の細胞、および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、ベッセルは、单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。40

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、反応は、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。一部の実施形態では、ベッセルは、複数のベッセルの各ベッセルを構成する。一部の実施形態では、複数のベッセルは、2またはそれよりも多くの複数のベッセルを構成する。一部の実施形態では、各ベッセル中の細胞は、同じ試料由来である。一部の実施形態では、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つのベッセル中の細胞は、2またはそれよりも多くの複数のベッセルのうち50

の第2の複数のベッセルのうちの1つのベッセル中の細胞と同じ試料由来である。一部の実施形態では、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は、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れる。一部の実施形態では、単一の細胞は溶解される。

【0046】

一態様では、複数のベッセルを含む組成物が本明細書で提供され、複数のベッセルのうちの1つのベッセルは、複数の細胞を含む試料由来の単一の溶解細胞、および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、またはこの親和性 - 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を含み；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は、ベッセルバーコード配列を含み、単一の溶解細胞由來の細胞ポリヌクレオチドは、同じベッセルバーコード配列を含む。
10

【0047】

一態様では、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、第1のAID配列が既知の配列である、第1の容器；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、第2のAID配列が既知の配列であり、第1のAID配列とは異なる、第2の容器；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、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；第1のオリゴヌクレオチドを第1の親和性分子にどのようにコンジュゲートするか、および第2のオリゴヌクレオチドを第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が提供される。
20

【0048】

一態様では、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、AID配列が既知の配列である、第1の容器；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；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；および親和性分子にコンジュゲートされたときに、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が提供される。
30

【0049】

本明細書に開示される方法および組成物は、腫瘍プロファイリングに使用され得る。例えば、これらの方法は、細胞表現型を患者試料中の免疫レパートリーとリンクさせて、腫瘍反応性TCRを識別することを含み得る。本明細書に開示される方法および組成物は、養子細胞療法に使用され得る。例えば、これらの方法は、ソーティングなしのT細胞の遺伝子分析を含み得る。例えば、これらの方法は、産物の製造および処理の間に、T細胞クローニング情報（TCRを使用する）を遺伝子発現パターンと組み合わせることを含み得る。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、養子細胞療法の前、その過程の間、またはその後に、患者から取得された養子移入された細胞を追跡、特徴付け、モニタリングおよび/または評価するために使用され得る。本明細書に開示される方法および組成物は、既知の標的に対するTCRを識別するために使用され得る。例えば、これらの方法は、抗原に対して高度に応答してもよいがあまり増殖しない高親和性クローニングを識別することを含み得る。本明細書に開示される方法および組成物は、細胞試料の多重化に使用され得る。例えば、1つまたは複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させたプールされた細胞試料を含むエマルジョンは、同時に複数の試料を処理しながら、オリジナルの細胞試料を識別するために使用され得る。
40

【0050】

参照による組込み

本明細書で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が参照により組み込まれると具体的かつ個々に示されるのと同じ程度まで、
50

全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 5 1 】

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、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。

10

(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。

20

(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。

30

(項目 8)

前記オリゴヌクレオチド部分が、抗原識別配列 (A I D) 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 A I D 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 (A I D) が既知の配列である、項目 8 または 9 に記載の方法。

40

(項目 11)

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記ベッセル中の錆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 1 ～ 2 に記載の方法。

(項目 14)

前記配列情報が、前記抗原識別 (A I D) 配列もしくはその相補体を含み、および / ま

50

たは前記 A I D 配列を有する分子のコピー数を含む、項目 1 2 または 1 3 に記載の方法。
(項目 1 5)

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 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記特徴が表現型である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記表現型が免疫表現型である、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

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觸させることをさらに含む、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。 10

(項目 1 9)

前記接觸させることが、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 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記接觸させることの後に、前記複数の細胞を洗浄することをさらに含む、項目 1 8 または 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

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 2 0 のいずれか一項に記載の方法。 20

(項目 2 2)

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 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3)

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 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

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 2 3 のいずれか一項に記載の方法。 30

(項目 2 5)

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 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

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 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7)

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 2 6 のいずれか一項に記載の方法。 40

(項目 2 8)

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 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

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 2 8 のいずれか一項に記載の方法。 50

(項目 3 0)

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、前記細胞由來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 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

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、前記單一の細胞由來の細胞ポリヌクレオチドに付着させることが、同時に実行される、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

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 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

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 3 0 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

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が、同時に実行される、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

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 3 0 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

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 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

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 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

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 3 6 または 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

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單一の親和性 - 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

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法。

(項目44)

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43のいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

前記オリゴヌクレオチドが、定常配列を含む、項目1から44のいずれか一項に記載の方法。

(項目46)

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45のいずれか一項に記載の方法。

(項目47)

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46に記載の方法。

(項目48)

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46または47に記載の方法。

(項目49)

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46から48のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目50)

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別(AID)配列を分析することをさらに含む、項目46から49のいずれか一項に記載の方法。

(項目51)

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(AMB)配列を分析することをさらに含む、項目46から50のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目52)

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AID配列、1もしくは複数の親和性分子バーコード(AMB)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48から51のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目53)

前記分析することが、比較することを含む、項目48から52のいずれか一項に記載の方法。

(項目54)

オリゴヌクレオチド配列読み取りの抗原識別(AID)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(AMB)配列と比較することをさらに含む、項目46から53のいずれか一項に記載の方法。

(項目55)

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30から54のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目56)

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55に記載の方法。

(項目57)

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55または56に記載の方法。

(項目58)

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55から5

50

4のいずれか一項に記載の方法。(項目 59)

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55から58のいずれか一項に記載の方法。

(項目 60)

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55から59のいずれか一項に記載の方法。

(項目 61)

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46から61のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 62)

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TCRを選択することをさらに含む、項目46から61のいずれか一項に記載の方法。

(項目 63)

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TCRを選択することを含む、項目55から62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 64)

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63のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 65)

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增幅産物である、項目1から64のいずれか一項に記載の方法。

(項目 66)

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增幅産物である、項目64または65に記載の方法。

30

(項目 67)

前記ベッセルが、固体支持体を含む、項目1から66のいずれか一項に記載の方法。

(項目 68)

前記ベッセルが、固体支持体を含まない、項目1から66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。

40

(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の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

50

ンにバーコード化される、項目 1 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 4)

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 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 5)

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 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 6)

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 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 7 7)

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 7 6 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記付着させることが、錫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 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 9)

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 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 0)

20

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 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 1)

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 8 0 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記細胞外抗原が C D 4 である、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記細胞外抗原が C D 8 である、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 4)

30

前記細胞外抗原が、C D 1 5 4 、 C D 4 、 C D 8 、 C D 1 3 7 、 C D 4 0 L 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 C D 1 1 c 、 C D 2 5 、 C D 6 9 、 C D 4 4 、 C D 1 2 5 、 C D 2 、 C D 3 、 C D 5 、 C D 1 4 および C D 1 9 からなる群から選択される、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 5)

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 8 0 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記細胞外抗原が免疫グロブリンである、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記オリゴヌクレオチドが二本鎖である、項目 1 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法

40

。

(項目 8 8)

前記オリゴヌクレオチドが一本鎖である、項目 1 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法

。

(項目 8 9)

前記オリゴヌクレオチドが D N A である、項目 1 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法

。

(項目 9 0)

前記オリゴヌクレオチドが R N A である、項目 1 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法

。

50

(項目 9 1)

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 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 2)

可変領域配列を含むネイティブ鎖配列を対応させることをさらに含む、項目 1 から 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 3)

前記単一の細胞が T 細胞である、項目 1 から 8 4 および 8 7 から 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 4)

前記単一の細胞が B 細胞である、1 から 8 0 および 8 5 から 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 5)

前記細胞ポリヌクレオチドが D N A である、項目 3 0 から 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 6)

前記細胞ポリヌクレオチドが R N A である、項目 3 0 から 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 7)

前記 R N A が m R N A である、項目 9 6 に記載の方法。

10

(項目 9 8)

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 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 9)

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 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 0)

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 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 1 0 1)

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、アプタマーである、項目 1 から 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 1 0 2)

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 9 7 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 9 7 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 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

(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 9 7 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。

50

(項目108)

前記MHCが可溶性形態である、項目106または107に記載の方法。

(項目109)

前記MHCが、前記MHC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106から108のいずれか一項に記載の方法。

(項目110)

前記ペプチドが合成ペプチドである、項目109に記載の方法。

(項目111)

前記MHCが、前記単一の細胞のT細胞受容体（TCR）に結合する、項目106から110のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目112)

前記親和性部分が、抗体もしくはキメラ抗原受容体（CAR）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CARである、項目1から97のいずれか一項に記載の方法。

(項目113)

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112に記載の方法。

(項目114)

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115)

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114に記載の組成物。

30

(項目116)

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114または115に記載の組成物。

(項目117)

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。

40

(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。

50

(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单一の溶解細胞、および

(b) 前記单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、前記单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。

10

(項目 123)

(a) 第 1 の抗原識別 (A I D) 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 A I D 配列が既知の配列である、第 1 の容器；

(b) 第 2 の抗原識別 (A I D) 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 A I D 配列が既知の配列であり、前記第 1 の A I D 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；

20

(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 (A I D) 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 A I D 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、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。

30

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図 1】図 1 は、本明細書に記載されている方法のベッセルの例示の模式図を示す。

【0053】

【図 2】図 2 は、抗体にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチドタグの例示の設計を示す。各有色ブロックは、完全なオリゴヌクレオチド配列の部分を表わす。融合配列は、エマルジョン反応内での液滴特異的 DNA バーコードの酵素的付着に使用される。配列の 1 つの考え得る配置のみが示されているが、他の配置も本記載の方法と適合する。

40

【0054】

【図 3 A B】図 3 A は、追加の mRNA およびタンパク質標的を有する免疫受容体配列の例示の同時捕捉を示す。表面タンパク質標的は、エマルジョン配列決定の前に、細胞を DNA 標識染色抗体と共に事前にインキュベートすることにより定量化される。

【0055】

図 3 B は、健常ヒト T 細胞から生成された 3 , 6 8 2 個の液滴バーコード T C R V V ペアの、例示の CD 4 および CD 8 mRNA ならびにタンパク質測定を示す。

50

【0056】

【図3C】図3Cは、mRNAとタンパク質測定との例示の合致を示す（各点は、TCR V_HV_Lペアにリンクする液滴バーコードである）。

【0057】

【図3D】図3Dは、エマルジョン内でのソーティングされていないTCR細胞に由来するCD4およびCD8のmRNAおよびタンパク質の同時検出の例示の表を示す。30,000個のインプットTCR細胞から、3,682個のTCRペアが回収された。mRNA対タンパク質（分子計数、多数決原理に基づく）によりCD4⁺またはCD8⁺とみなされたTCRペアの頻度が、マトリックスで示されている。

【0058】

【図3E】図3Eは、CD4を標的とする親和性-オリゴヌクレオチドコンjugateおよびCD8を標的とする親和性-オリゴヌクレオチドコンjugateを使用した、45,870個の単一細胞TCRペアの例示の結果を示す。

【0059】

【図4】図4は、CD4を標的とする親和性-オリゴヌクレオチドコンjugateおよびCD8を標的とする親和性-オリゴヌクレオチドコンjugateが使用される例示の方法の模式図を示す。

【0060】

【図5】図5は、エマルジョン内での単一免疫細胞バーコード付与方法の結果を例示する。

【0061】

図5Aは、細胞および溶解/反応(LR)混合物を含有する2つの水性流動を油内に通して、毎時800万液滴を超えて単分散エマルジョンを生成する例示の図である。

【0062】

図5Bは、ベッセル内の細胞が溶解され、単一反応で分子特異的および液滴特異的バーコード付与に供されることを示す例示の図である。

【0063】

図5Cは、標的mRNAが逆転写され、ユニバーサルアダプター配列で鋳型スイッチタグ化されることを示す例示の図である。その後、初めに1液滴当たり約1分子に希釈された液滴バーコード鋳型のPCR増幅が起こる。増幅されたバーコードを、相補的オーバーラップ伸長法により、鋳型スイッチしたcDNAに追加する。エマルジョンから産物を回収し、追加のライプラリー処理ステップおよびハイスループット配列決定の前に、RTプライマーのビオチンを使用して精製する。

【0064】

図5Dは、二重バーコード付与により、配列決定読み取りをそれらの由来分子および由来液滴にクラスター化することが可能になり、配列決定エラーおよび増幅バイアスを最小限に抑えつつ、ネイティブ受容体鎖対合が再構築されることを示す例示の図である。

【0065】

【図6】図6は、単離された健常B細胞からBCRを回収するための方法の結果を例示する。

【0066】

図6Aは、300万個のB細胞が0.2細胞/液滴でエマルジョン内を通過し、占領細胞の約90%が単一細胞を含有する結果となった液滴の例示の図である。

【0067】

図6Bは、V_HV_L対合精度の例示の図である。エマルジョンバーコード付与および配列決定後、データを、単一細胞液滴に由来するデータについて濃縮し、V_HV_L対合精度を、拡大クローン中のペア-貫性を使用して評価した。

【0068】

図6Cは、液滴バーコードパーセント対Igアイソタイプの例示のグラフである。259,368個のフィルタリングされたV_HV_Lペアの重鎖アイソタイプ（各液滴内の最も

10

20

30

40

50

多量なアイソタイプ) および軽鎖遺伝子座使用率が示されている。

【0069】

図6Dは、6つの独立エマルジョン画分の各々の、100個の最高頻度重鎖のクローンのランク存在量の例示のグラフである。0.05%の全体頻度に印が付けられている。

【0070】

図6Eは、各液滴バーコード内の捕捉mRNAの数により評価した、細胞内でのV_H対V_L発現の例示のグラフである。アイソタイプ毎に、5,000個の点が示されている。

【0071】

図6Fは、BCRペアのV_H対V_L突然変異相関性および各アイソタイプ内の密度分布の例示のグラフである。

10

【0072】

【図7】図7は、HIV広域中和抗体(bNAb)を発見するための方法の結果を例示する。

【0073】

図7Aは、エマルジョンに入れられたHIV長期非進行者のB細胞に由来する38,620個の回収したV_HV_Lペアの重鎖アイソタイプ分布の例示のグラフである。先に知られたbNAb(「PGT様」と良好にアラインするIgG鎖の割合はわずかである。

【0074】

図7Bは、既知のbNAb(黒色)+新たに回収されたもの(赤色、液滴バーコードで標識されている)の完全なVDJアミノ酸配列の系統樹の例示の図である。重鎖(左)および軽鎖(右)は別々にプロットされている。ミスマッチの可能性のある抗体PGT122およびPGT123は青色である。

20

【0075】

図7Cは、PGT121の対照ストックと比較した、10株のHIVに対する、8つの新たに発見されたPGT様バリエントの中和活性(IC₅₀、μg/mL)の例示の図である。

【0076】

【図8】図8は、卵巣腫瘍に由来するTILを特徴付けるための方法の結果を例示する。

【0077】

図8Aは、卵巣腫瘍に由来する400,000個のソーティングされていない分離された細胞がエマルジョンに入れられ、BCRペアおよびTCRペアが、エマルジョンバーコード付与により同時に回収された液滴の例示の図である。

30

【0078】

図8Bは、フィルタリング後に液滴バーコード内で観察された全てのV_H/V_LおよびV_H/V_L組合せの数を示す、液滴バーコード対受容体鎖組合せの例示のグラフである。

【0079】

図8Cは、回収したBCRペアの液滴バーコードパーセント対重鎖アイソタイプ分布の例示のグラフである。

【0080】

図8Dは、BCRペアについてのV_H対V_L突然変異相関性および各アイソタイプ内の密度分布の例示のグラフである。

40

【0081】

図8Eは、全体の(上段)TCRペアおよびBCRペアの、および異なるアイソタイプ(下段)の捕捉mRNAの数の例示のグラフを示す。

【0082】

図8Fは、6つの独立エマルジョン画分の各々における、30個の最高頻度のBCR重鎖クローン(上段)および30個の最高頻度のTCRベータ鎖クローンのランク存在量を示すクローン分析の例示のグラフを示す。1%および10%の全体頻度レベルが示されている。

【0083】

50

図9は、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用してイムノフェノタイピングするための方法を例示する。

【0084】

【図9A】図9Aは、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合されている単一細胞を各々が含有する2つのベッセルを示す例示の模式図を示す。(D B 1 - 液滴バーコード1; D B 2 - 液滴バーコード2; M B 1 - 分子バーコード1; M B 2 - 分子バーコード2; A I D - 抗原IDバーコード; A M B 1 - 抗体分子バーコード1; A M B 2 - 抗体分子バーコード2)。

【0085】

【図9B】図9Bは、図9Aのベッセルの溶解細胞に由来するRNA分子を各々が含有する2つのベッセルを示す例示の模式図を示す。RNA分子が逆転写され、逆転写により創出されたcDNA分子の末端に非鑄型ヌクレオチドが付加されている。逆転写により創出されたcDNA分子の末端に付加された非鑄型ヌクレオチドに、分子バーコードがハイブリダイズされている。

【0086】

【図9C】図9Cは、増幅され、図9BのベッセルのcDNAにハイブリダイゼーションにより付着されている、各々が鑄型バーコード化ポリヌクレオチドを含有する2つのベッセルを示す例示の模式図を示す。cDNAは、伸長されている(上段)。その後、伸長されたcDNAが増幅される(下段)。

【0087】

【図9D】図9Dは、同じ同一RNA配列に付着されている同じ分子バーコード(MB)を有するRNA-MB-DB種が、PCR複製の結果である可能性が高いことを示す例示の模式図を示す。同じ同一RNA配列に付着されている2つの異なるMBを有するRNA-MB-DB種(RNA1-MB1-DBおよびRNA1-MB2-DB)は、2つの当初の独立RNA分子であり、PCR複製由来ではない。

【0088】

【図9E】図9Eは、同じ液滴バーコード(DB)および抗原IDバーコード(AID)を有する配列に付着されている、同じ抗体分子バーコード(AMB)を有するDB-AMB-AID種が、PCR複製の結果である可能性が高いことを示す例示の模式図を示す。同じ液滴バーコード(DB)および抗原IDバーコード(AID)を有する配列に付着されている、2つの異なるAMBを有するDB1-AMB1-AID1およびDB1-AMB2-AID1種は、ベッセル内の同じ単一細胞に付着された同じ標的抗原に特異的に結合する抗体を各々が有する2つの独立オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に由来し、PCR複製由来ではない2つの独立オリゴヌクレオチド分子である。同じ液滴バーコード(DB)および同じまたは異なる抗体分子バーコード(AMB)を有する配列に付着されている、2つの異なるAIDを有するDB1-AMBn-AID1およびDB1-AMBn-AID2種は、ベッセル内の同じ単一細胞に付着されている2つの独立抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に由来する2つの独立オリゴヌクレオチド分子であり、抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の一方は、第1の標的抗原と特異的に結合する抗体を有し、他方の抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子は、第2の標的抗原と特異的に結合する抗体を有する。

【0089】

【図10A】図10Aは、本明細書に記載されている方法の例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの模式図を示す。

【0090】

【図10B】図10Bは、本明細書に記載されている方法の例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの模式図を示す。

【0091】

【図11A】図11Aは、TCRに結合する親和性部分を含む、本明細書に記載されている方法の2つの例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの結合シグナルの例示

10

20

30

40

50

のグラフを示す。

【0092】

【図12】図12Aは、本明細書に記載されている方法の例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合されているT細胞の例示の模式図を示す。

【0093】

図12Bは、本明細書に記載されている方法の例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合されている液滴内T細胞の例示の模式図を示す。液滴中の核酸は、液滴識別用配列で印が付けられ、次世代シークエンシングライブラーに組み込まれる。

【0094】

【図13】図13は、例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート四量体にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチドタグの例示の模式図を示す。四量体IDは、四量体バッヂに対応する短鎖の定常DNA配列であり、単一の実験にて、ペプチド - MHC標的等の異なる標的の多重化を可能にする。分子バーコードは、結合された四量体を定量化するための分子計数を可能にする縮重配列である。

【0095】

【図14】図14は、DNA標識MHC四量体試薬から生成された例示の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの模式図を示す。一実施形態では、Cycl 5連結DNAオリゴヌクレオチドが合成され、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンにコンジュゲートされる。一実施形態では、非蛍光性DNAオリゴヌクレオチドが、APC - ストレプトアビジンにコンジュゲートされる。一実施形態では、非蛍光性DNAオリゴヌクレオチドおよびストレプトアビジンまたはニュートラアビジンの混合物が、活性化APCにコンジュゲートされる。

【0096】

【図15】図15は、クリック化学を使用して、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オリゴヌクレオチドをコンジュゲートするための例示の方法を示す。

【0097】

【図16】図16は、例示の親和性 - オリゴヌクレオチドを調製および特徴付けるための例示のワークフローの模式図を示す。

【0098】

【図17】図17は、CD3、CD19、CD4、CD8、HLA-DR、およびCTL-A-4を標的とする6つの異なる親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが使用する、本明細書に記載されている例示の方法の結果を示す。各点は、液滴バーコード / 単一細胞である。細胞同一性は、回収した受容体ペアのタイプにより明らかにされた(TCR = T細胞; Ig = B細胞)。

【発明を実施するための形態】

【0099】

詳細な説明

いくつかの態様が、例示のために、例となる適用に関連して、以下に記載される。多くの具体的な詳細、関連性および方法が、本明細書に記載される特色の完全な理解を提供するために示されていることを理解すべきである。しかし、当業者は、本明細書に記載される特色が、具体的な詳細のうち1つもしくは複数を伴わずに、または他の方法を伴って実施され得ることを容易に認識する。一部の行為は、他の行為もしくは事象とは異なる順序でおよび / またはそれらと同時に生じ得るので、本明細書に記載される特色は、行為または事象の例示された順序付けによっては限定されない。さらに、全ての例示された行為または事象が、本明細書に記載される特色に従って方法論を実行するために必要とされるわけではない。

【0100】

本明細書で使用される用語法は、特定の場合のみを記載することを目的としているのであって、限定を意図するものではない。本明細書で使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「この(the)」は、文脈が明確に他を示さない限り、複数

10

20

30

40

50

形も同様に含むことが意図される。さらに、用語「含む (including)」、「含む (includes)」、「有する (having)」、「有する (has)」、「有する (with)」、またはそれらの異形は、詳細な説明および / または特許請求の範囲のいずれかで使用される限りにおいて、かかる用語は、用語「含む (comprising)」と類似の様式で包括的である意図である。

【0101】

用語「約」または「およそ」は、値がどのように測定または決定されるか、即ち、測定系の限界に一部依存する、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差範囲内であることを意味し得る。例えば、「約」は、当技術分野の実務に従って、1または1よりも大きい標準偏差以内であることを意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大で20%、最大で10%、最大で5%または最大で1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に、生物学的系またはプロセスに関して、この用語は、ある値の5倍以内、より好ましくは2倍以内のオーダーの大きさ以内であることを意味し得る。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載される場合、特記しない限り、その特定の値についての許容される誤差範囲内であることを意味する用語「約」を前提とすべきである。

10

【0102】

(例えは、エマルジョン中の) 単一の細胞 (免疫細胞) を親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート (例えは、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート) を使用してフェノタイプングするための方法および組成物を提供することが、本発明の目的である。

【0103】

20

定義

したがって、本明細書の用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、これには、断片抗原結合性 (F_ab) 断片、F (a b') 2 断片、F_ab' 断片、F_v 断片、組換え I g G (r I g G) 断片、单鎖可変断片 (s c F_v) を含む单鎖抗体断片、および单ードメイン抗体 (例えは、s d A b、s d F_v、ナノボディ) 断片を含む、インタクトな抗体およびその機能的 (抗原結合性) 抗体断片を含む、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。この用語は、免疫グロブリンの遺伝子操作された形態および / または他の方法で改変された形態、例えは、イントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体、多特異性、例えは二特異性抗体、ダイアボディ、トリニアボディおよびテトラボディ、タンデムジ - s c F_v、タンデムトリ - s c F_v を包含する。特記しない限り、用語「抗体」は、その機能的抗体断片を包含すると理解すべきである。この用語は、I g G ならびにそのサブクラス、I g M、I g E、I g A および I g D を含む、任意のクラスまたはサブクラスの抗体を含む、インタクトな抗体または全長抗体もまた包含する。

30

【0104】

「超可変領域」または「HVR」と同義の用語「相補性決定領域」および「CDR」は、抗原特異性および / または結合親和性を付与する、抗体可変領域内のアミノ酸の非隣接配列を指すことが、当技術分野で公知である。一般に、各重鎖可変領域中の3つのCDR (CDR - H1、CDR - H2、CDR - H3) および各軽鎖可変領域中の3つのCDR (CDR - L1、CDR - L2、CDR - L3) が存在する。「フレームワーク領域」および「FR」は、重鎖および軽鎖の可変領域の非CDR部分を指すことが、当技術分野で公知である。一般に、各全長重鎖可変領域中の4つのFR (FR - H1、FR - H2、FR - H3 および FR - H4) 、および各全長軽鎖可変領域中の4つのFR (FR - L1、FR - L2、FR - L3 および FR - L4) が存在する。

40

【0105】

所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、Kabatら (1991年) 、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版 Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD (「Kabat」 番号付けスキーム) 、Al-Lazikaniら、(1997年) JMB 273巻、927 ~ 948頁 (「Chothia」 番号付けスキーム) 、MacCallumら、J. Mol. Biol. 262巻 : 732 ~ 74

50

5頁(1996年)、「Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography」、J. Mol. Biol. 262巻、732~745頁(「Contact」番号付けスキーム)、Lefranc MPら、「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」、Dev Comp Immunol、2003年1月；27巻(1号)：55~77頁(「IMGT」番号付けスキーム)、ならびにHonegger AおよびPluckthun A、「Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool」、J Mol Biol、2001年6月8日；309巻(3号)：657~70頁、(「Aho」番号付けスキーム)によって記載されるものを含む、いくつかの周知のスキームのいずれかを使用して容易に決定され得る。

10

【0106】

所与のCDRまたはFRの境界は、識別に使用されるスキームに依存して変動し得る。例えば、Kabatスキームは、構造アラインメントに基づくが、Chothiaスキームは、構造情報に基づく。KabatスキームおよびChothiaスキームの両方についての番号付けは、一部の抗体において現れる、挿入文字によって提供される挿入、例えば「30a」および欠失を伴う、最も一般的な抗体領域配列長に基づく。2つのスキームは、異なる位置においてある特定の挿入および欠失(「インデル」)を配置して、示差的な番号付けを生じる。Contactスキームは、複合体の結晶構造の分析に基づき、Chothia番号付けスキームに多くの点で類似している。

【0107】

以下の表Aは、それぞれKabat、ChothiaおよびContactのスキームによって識別された場合の、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3およびCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3の境界の例示の位置を列挙する。CDR-H1については、残基番号付けは、Kabat番号付けスキームおよびChothia番号付けスキームの両方を使用して列挙されている。FRは、CDR間に位置する、例えば、FR-L1は、CDR-L1とCDR-L2との間に位置する、など。示されたKabat番号付けスキームは、H35AおよびH35Bに挿入を配置するので、示されたKabat番号付け慣習を使用して番号付けした場合のChothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに依存して、H32とH34との間で変動することに留意されたい。

20

【表A】

30

表A

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat 番号付け ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 番号付け ²)	H31--H35	H26--H32	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101

40

【0108】

したがって、特記しない限り、所与の抗体またはその領域、例えば、その可変領域の「CDR」または「相補性決定領域」、または個々の特定されたCDR(例えば、CDR-H1、CDR-H2)は、上述のスキームのいずれかによって規定される、ある(または

50

特定の) 相補性決定領域を包含すると理解すべきである。例えば、特定の C D R (例えば、 C D R - H 3) が、所与の V H または V L アミノ酸配列中の対応する C D R のアミノ酸配列を含むと述べられる場合、かかる C D R は、上述のスキームのいずれかによって規定される、可変領域内の対応する C D R (例えば、 C D R - H 3) の配列を有すると理解される。一部の実施形態では、特定された C D R 配列が特定される。

【 0 1 0 9 】

同様に、特記しない限り、所与の抗体またはその領域、例えば、その可変領域の F R または個々の識別された F R (単数または複数) (例えば、 F R - H 1 、 F R - H 2) は、公知のスキームのいずれかによって規定される、ある (または特定の) フレームワーク領域を包含すると理解すべきである。一部の例では、特定の C D R 、 F R 、または F R (複数) もしくは C D R (複数) の識別のためのスキームは、 K a b a t 、 C h o t h i a または C o n t a c t の方法によって規定される C D R のように、特定される。他の場合には、 C D R または F R の特定のアミノ酸配列が与えられる。

10

【 0 1 1 0 】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の抗原への結合に関与する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。ネイティブ抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれ、 V H および V L) は一般に、類似の構造を有し、各ドメインは、 4 つの保存されたフレームワーク領域 (F R) および 3 つの C D R を含む (例えば、 Kindt ら Kuby Immunology 、第 6 版、 W.H. Freeman and Co. 、 91 頁 (2007 年) を参照のこと) 。単一の V H または V L ドメインが、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原と結合する抗体は、それぞれ相補的 V L または V H ドメインのライブラリーをスクリーニングするために、その抗原と結合する抗体由来の V H または V L ドメインを使用して単離され得る。例えば、 Portolano ら J. Immunol. 150 卷 : 880 ~ 887 頁 (1993 年) ; Clarkson ら Nature 352 卷 : 624 ~ 628 頁 (1991 年) を参照のこと。

20

【 0 1 1 1 】

提供される抗体の中でも特に、抗体断片が挙げられる。「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原と結合するインタクトな抗体の一部分を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、 F v 、 F a b 、 F a b ' 、 F a b ' - S H 、 F (a b ') 2 ; ダイアボディ ; 直鎖抗体 ; 単鎖抗体分子 (例えば、 s c F v) ; および抗体断片から形成される多特異性抗体が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、これらの抗体は、可変重鎖領域および / または可変軽鎖領域を含む単鎖抗体断片、例えば、 s c F v である。

30

【 0 1 1 2 】

特記しない限り、用語「 T C R 」は、完全 T C R ならびにその抗原結合性部分または抗原結合性断片 (M H C - ペプチド結合性断片とも呼ばれる) を包含すると理解すべきである。一部の実施形態では、 T C R は、インタクトなまたは全長 T C R である。一部の実施形態では、 T C R は、全長 T C R 未満であるが、 M H C 分子に結合した (即ち、 M H C 分子との関連での) 特異的抗原性ペプチド、即ち、 M H C - ペプチド複合体に結合する、抗原結合性部分である。一部の場合には、 T C R の抗原結合性部分または断片は、全長またはインタクトな T C R の構造ドメインの一部分だけを含み得るが、それでもなお完全 T C R が結合するエピトープ (例えば、 M H C - ペプチド複合体) と結合することが可能である。一部の場合には、 T C R の抗原結合性部分または断片は、特異的 M H C - ペプチド複合体への結合のための結合部位を形成するのに十分な T C R の可変ドメイン、例えば、 T C R の可変 鎖および可変 鎖を含み、ここで、例えば一般に、各鎖は 3 つの相補性決定領域を含む。抗原結合性ドメインであるまたは抗原結合性ドメインと相同である結合性ドメインを有するポリペプチドまたはタンパク質が含まれる。相補性決定領域 (C D R) 移植抗体および T C R ならびに他のヒト化抗体および T C R (C D R 改変およびフレームワーク領域改変を含む) もまた、これらの用語によって企図される。免疫グロブリン鎖 (例えば、重鎖および軽鎖) のみに対して言及がなされ得るが、開示された発明は、複数の他

40

50

の異なる型の対合した配列、例えば、T細胞受容体鎖ペア（TCR鎖およびTCR鎖ならびにTCR鎖およびTCR鎖）に適用され得、免疫グロブリンに限定されないことに留意すべきである。

【0113】

種々のがんまたは感染性生物と関連する抗原を認識するT細胞の能力は、アルファ（ α ）鎖およびベータ（ β ）鎖の両方またはガンマ（ γ ）およびデルタ（ δ ）鎖の両方から構成されるそのTCRによって付与される。これらの鎖を構成するタンパク質は、TCRの極めて大きい多様性を生成するために固有の機構を使用するDNAによってコードされる。この多サブユニット免疫認識受容体は、CD3複合体と会合し、抗原提示細胞（APC）の表面上のMHCクラスIおよびIIタンパク質によって提示されるペプチドと結合する。APC上の抗原性ペプチドへのTCRの結合は、T細胞活性化における中心的な事象であり、これは、T細胞とAPCとの間の接触点の免疫シナプスにおいて生じる。10

【0114】

各TCRは、可変相補性決定領域（CDR）ならびにフレームワーク領域（FR）を含む。および鎖可変ドメインの第3の相補性決定領域（CDR3）ループのアミノ酸配列は、それぞれ、鎖遺伝子座における可変（V）遺伝子セグメント、多様性（D）遺伝子セグメントおよび連結（J）遺伝子セグメントの間での組換え、ならびに鎖遺伝子座における類似のV遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントとの間での組換えから生じる、T細胞の配列多様性を主に決定する。TCRのおよび鎖遺伝子座における複数のかかる遺伝子セグメントの存在は、多数の別個のCDR3配列がコードされることを可能にする。TCR遺伝子再配置のプロセスの間のV-D、D-JおよびV-J接合部におけるヌクレオチドの独立した付加および欠失は、CDR3配列の多様性をさらに増加させる。これに関して、免疫適格性は、TCRの多様性に反映される。20

【0115】

B細胞によって発現される免疫グロブリン（Ig）は、一部の態様では、H₂L₂構造を形成する4つのポリペプチド鎖、2つの重鎖（IgH）および2つの軽鎖（IgL）からなるタンパク質である。IgH鎖およびIgL鎖の各ペアは、V_LおよびV_H領域からなる超可変ドメイン、ならびに定常ドメインを含む。IgのIgH鎖は、いくつかの型、μ、δ、γ、およびαのものである。個体内のIgの多様性は、超可変ドメインによって主に決定される。TCRと同様に、IgH鎖のVドメインは、V_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントのコンビナトリアル連結によって創出される。Ig遺伝子再配置のプロセスの間のV_H-D_H、D_H-J_HおよびV_H-J_H接合部におけるヌクレオチドの独立した付加および欠失は、超可変ドメイン配列の多様性をさらに増加させる。ここで、免疫適格性は、Igの多様性に反映される。30

【0116】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗原への抗体の結合に関与する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。ネイティブ抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、V_HおよびV_L）は一般に、類似の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つのCDRを含む（例えば、Kindtら Kuby Immunology、第6版、W.H. Freeman and Co.、91頁（2007年）を参照のこと）。単一のV_HまたはV_Lドメインが、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原と結合する抗体は、それぞれ、相補的なV_LまたはV_Hドメインのライブラリーをスクリーニングするために、抗原と結合する抗体由来のV_HまたはV_Lドメインを使用して単離され得る。例えば、Portolanoら、J. Immunol. 150巻：880～887頁（1993年）；Clarksonら、Nature 352巻：624～628頁（1991年）を参照のこと。40

【0117】

「親和性部分」とは、標的抗原と相互作用する親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの部分を指す。例示の親和性部分には、抗体、ペプチド、タンパク質、アプタマー、小分子、薬物、細胞、MHCなどが含まれる。50

【0118】

「超可変領域」とは、抗原結合を担う、抗体またはT C Rのアミノ酸残基を指す。この超可変領域は、相補性決定領域またはCDR由来のアミノ酸残基を含む。フレームワークまたはFR残基は、本明細書で定義されるように、超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0119】

提供される抗体の中でも特に、抗体断片が挙げられる。「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原と結合するインタクトな抗体の一部分を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；直鎖抗体；单鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成される多特異性抗体が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、抗体は、可変重鎖領域および/または可変軽鎖領域を含む单鎖抗体断片、例えば、scFvである。10

【0120】

單一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部分、または抗体の軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部分を含む抗体断片である。ある特定の実施形態では、單一ドメイン抗体は、ヒト单一ドメイン抗体である。

【0121】

抗体断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化、ならびに組換え宿主細胞による產生が含まれるがこれらに限定されない種々の技術によって作製され得る。一部の実施形態では、これらの抗体は、組換え產生された断片、例えば、天然に存在しない配置を含む断片、例えば、合成リンカー、例えばペプチドリンカーによって連結された2もしくはそれよりも多くの抗体領域もしくは鎖を有する断片、および/または天然に存在するインタクトな抗体の酵素消化によっては產生されない可能性がある断片である。一部の態様では、これらの抗体断片は、scFvである。20

【0122】

抗原結合性断片を含むT C R断片もまた提供される。一部の実施形態では、T C Rは、その抗原結合性部分、例えば、完全可溶性T C Rと呼ばれ得る、その膜貫通および/または細胞質領域（单数または複数）を含まない全長T C Rのバリエントである。一部の実施形態では、T C Rは、二量体T C R（dT C R）である。一部の実施形態では、T C Rは、单鎖T C R（scT C R）、例えば、PCT特許公開番号WO 03/020763、WO 04/033685またはWO 2011/044186に記載されるような構造を有するscT C Rである。ある特定の実施形態では、T C Rは、ベータ鎖可変領域に連結されたアルファ鎖可変領域を含む单鎖T C R断片、例えば、scTvである。一部の実施形態では、scTvは、scFvとも呼ばれる。30

【0123】

单鎖FvまたはscFvとは、一部の態様では、抗体の可変重鎖（V_H）および可変軽鎖（V_L）ドメイン、またはT C Rの可変アルファもしくはガンマ鎖（V_αもしくはV_γ）および可変ベータもしくはデルタ鎖（V_βもしくはV_δ）ドメインを含む抗体またはT C R断片を指し、これらのドメインは、单一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、抗原結合のための所望の構造をscFvが形成するのを可能にするポリペプチドリンカーを、V_HドメインとV_Lドメインとの間、またはV_αドメインとV_γドメインとの間、またはV_βドメインとV_δドメインとの間にさらに含む。40

【0124】

ダイアボディとは、一部の態様では、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体および/またはT C R断片を指し、この断片は、同じポリペプチド鎖（V_H-V_L）中のV_Lに接続されたV_H、または同じポリペプチド鎖（V_α-V_γ）中のV_αに接続されたV_γ、または同じポリペプチド鎖（V_β-V_δ）中のV_βに接続されたV_δを含む。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合し、2つの抗原結合部位を創出するよう50

に強いられる。例示のダイアボディは、例えば、E P 4 0 4 0 9 7 および W O 9 3 1 1 1 1 6 1 中により完全に記載されている。

【 0 1 2 5 】

二特異性抗体または二特異性 T C R とは、一部の態様では、2つの異なる型の抗原に対する特異性を示す抗体またはT C R を指す。これらの用語には、本明細書で使用する場合、標的抗原に対する、および特定の組織への送達を促進する別の標的に対する結合特異性を示す抗体およびT C R が具体的に含まれるがこれらに限定されない。同様に、多特異性抗体およびT C R は、2またはそれよりも多くの結合特異性を有する。

【 0 1 2 6 】

直鎖抗体または直鎖 T C R とは、一部の態様では、抗原結合性領域の対を形成するタンデム F d セグメント（例えば、V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1} または V_L - C_{L1} - V_L - C_{L1}）の対を指す。直鎖抗体およびT C R は、例えば、Zapataら、Protein Eng. 8巻（10号）：1057～1062頁（1995年）に記載されるように、二特異性または単一特異性であり得る。

【 0 1 2 7 】

抗原結合性ドメインとは、一部の態様では、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体またはT C R の1つまたは複数の断片を指す。かかる用語内に含まれる抗体断片の非限定的な例には、(i) V_L、V_H、C_L および C_{H1} ドメインからなる一価断片である F a b 断片；(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つの F a b 断片を含む二価断片である F (a b')₂ 断片；(iii) V_H および C_{H1} ドメインからなる F d 断片；(iv) s c F v を含む、抗体の単一のアームの V_L および V_H ドメインを含む F v 断片、(v) V_H ドメインを含む d A b 断片（Wardら、（1989年）Nature 341巻：544～546頁）；ならびに(vi) 単離された C D R が含まれるがこれらに限定されない。さらに、単一の重鎖および単一の軽鎖を含む抗体、または単一のアルファ鎖もしくは単一のベータ鎖を有する T C R が、この定義に含まれる。

【 0 1 2 8 】

「F (a b')₂」および「F a b'」部分は、ペプシンおよびパパインなどのプロテアーゼで I g G を処理することによって産生され得、これらには、2つの重鎖の各々中のヒンジ領域間に存在するジスルフィド結合の近傍で免疫グロブリンを消化することによって生成される抗体断片が含まれる。例えば、パパインは、2つの重鎖の各々中のヒンジ領域間に存在するジスルフィド結合の上流で I g G を切断して、V_L および C_L から構成される軽鎖ならびに V_H および C_{H1}（重鎖の定常領域中の 1 領域）から構成される重鎖断片が、それらの C 末端領域においてジスルフィド結合を介して接続される、2つの相同な抗体断片を生成する。これら2つの相同的な抗体断片の各々は、「F a b'」と呼ばれる。ペプシンもまた、2つの重鎖の各々中のヒンジ領域間に存在するジスルフィド結合の下流で I g G を切断して、2つの上述の「F a b'」がヒンジ領域において接続される断片よりも、わずかに大きい抗体断片を生成する。この抗体断片は、F (' a b')₂ と呼ばれる。F a b 断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（C_{H1}）を含む。「F a b'」断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステイン（单数または複数）を含む重鎖 C_{H1} ドメインのカルボキシル末端における数個の残基の付加により、「F a b 断片とは異なる。F a b' - S H は、定常ドメインのシステイン残基（单数または複数）が遊離チオール基を有する F a b' についての本明細書での命名である。F (a b')₂ 抗体断片は元々、それらの間にヒンジシステインを有する F a b' 断片の対として産生される。

【 0 1 2 9 】

F v とは、一部の態様では、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む抗体またはT C R 断片を指す。この領域は、緊密に非共有結合的に会合した、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインまたは1つのT C R 鎖および1つのT C R 鎖または1つのT C R 鎖および1つのT C R 鎖の二量体からなる。この構成では、各可変ドメインの3つの C D R が相互作用して、V_H - V_L 二量体または V_H - V_H 二量体または V_L - V_L 二量体の

10

20

30

40

50

表面上の抗原結合部位を規定する。集合的に、 V_H および V_L 鎖または $V - V$ 鎖または $V - V$ 鎖の各々由來の CDR のうち 1 つまたは複数の組合せは、抗体または TCR に抗原結合特異性を付与する。例えば、CDRH3 および CDRL3 は、レシピエントの選択された抗体、TCR またはそれらの抗原結合性断片の V_H および V_L 鎖または V および V 鎖または $V - V$ 鎖に移入された場合に、抗体または TCR に抗原結合特異性を付与するのに十分であり得、CDR のこの組合せは、結合、親和性などについて試験され得ることが理解される。単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な 3 つの CDR のみを含む Fv の半分）であっても、抗原を認識し抗原と結合する能力を有するが、第 2 の可変ドメインと組み合わせた場合よりも低い親和性である可能性が高い。さらに、Fv 断片の 2 つのドメイン (V_L および V_H または V および V または V および V) は、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、 V_L および V_H または V および V または V および V 鎖領域が対応して一価分子を形成する単一のタンパク質鎖（单鎖 Fv (scFv)）として公知；Birdら (1988 年) Science 242 卷 : 423 ~ 426 頁 ; Huston ら (1988 年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 卷 : 5879 ~ 5883 頁 ; および Osbourn ら (1998 年) Nat. Biotechnol. 16 卷 : 778 頁）としてこれらが作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え方法を使用して連結され得る。かかる scFv もまた、抗体の用語「抗原結合性部分」内に包含される意図である。特異的 scFv の任意の V_H および V_L 配列は、完全な IgG (例えば、IgG1) 分子または他のアイソタイプをコードする発現ベクターを生成するために、Fc 領域の cDNA またはゲノム配列に連結され得る。 V_H および V_L は、タンパク質化学または組換え DNA 技術のいずれかを使用する、Fab、Fv または IgG の他の断片の生成においても使用され得る。

【0130】

抗原結合性ポリペプチドには、例えば、ラクダ科動物およびサメ由來の抗体などの、重鎖二量体もまた含まれ得る。ラクダ科動物抗体およびサメ抗体は、V 様およびC 様ドメインの 2 つの鎖のホモ二量体対を含む（どちらも軽鎖を有さない）。ラクダ科動物における重鎖二量体 IgG の V_H 領域は、軽鎖と疎水性相互作用しないので、軽鎖と通常接触する重鎖中の領域は、ラクダ科動物では親水性アミノ酸残基に変化される。重鎖二量体 IgG の V_H ドメインは、 V_{HH} ドメインと呼ばれる。サメ IgG-NAR は、1 つの可変ドメイン ($V - NAR$ ドメインと呼ばれる) および 5 つの C 様定常ドメイン (C-NAR ドメイン) のホモ二量体を含む。ラクダ科動物では、抗体レパートリーの多様性は、 V_H または V_{HH} 領域中の CDR1、2 および 3 によって決定される。ラクダ V_{HH} 領域中の CDR3 は、平均 16 アミノ酸の、その比較的長い長さを特徴とする (Muyldermands ら、1994 年、Protein Engineering 7 卷 (9 号) : 1129 頁)。

【0131】

「ヒト化」抗体は、全てまたは実質的に全ての CDR アミノ酸残基が非ヒト CDR に由来し、全てまたは実質的に全ての FR アミノ酸残基がヒト FR に由来する抗体である。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含み得る。非ヒト抗体の「ヒト化形態」とは、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しつつ、ヒトに対する免疫原性を典型的には低減させるためにヒト化を受けた非ヒト抗体のバリエントを指す。一部の実施形態では、ヒト化抗体中の一部の FR 残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復または改善するために、非ヒト抗体（例えば、CDR 残基が由来する抗体）由來の対応する残基で置換される。

【0132】

提供される抗体のなかでも特に、ヒト抗体が挙げられる。「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞、またはヒト抗体レパートリーもしくはヒト抗体ライブラリーなどの他のヒト抗体をコードする配列を利用する非ヒト供給源によって產生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。この用語は、非ヒト抗原結合性領域を含む非ヒト抗体のヒト化形態、例えば、全てまたは実質的に全ての CDR が非ヒトであるものを排除する。

【0133】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してインタクトなヒト抗体、またはヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製され得る。かかる動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換える、または染色体外に存在するもしくは動物の染色体中にランダムに組み込まれる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部分を含む。かかるトランスジェニック動物では、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。ヒト抗体はまた、ヒトレパートリーに由来する抗体コード配列を含む、ファージディスプレイライブラリーおよび無細胞ライブラリーを含むヒト抗体ライブラリーに由来し得る。

【0134】

提供される抗体のなかでも特に、モノクローナル抗体断片を含むモノクローナル抗体が挙げられる。用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書で使用する場合、実質的に均一な抗体の集団に由来する抗体またはかかる集団内の抗体を指す、即ち、集団を構成する個々の抗体は、天然に存在する変異を含むまたはモノクローナル抗体調製物の産生の間に生じる可能なバリエントを除いて同一であり、かかるバリエントは一般に、微量で存在する。異なるエピトープに対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、ある抗原上の単一のエピトープに対するものである。この用語は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とする解釈すべきではない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマからの生成、組換えDNA法、ファージディスプレイおよび他の抗体ディスプレイ法が含まれるがこれらに限定されない種々の技術によって作製され得る。

【0135】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために相互交換可能に使用され、最小の長さに制限されない。提供される抗体および抗体鎖ならびに他のペプチド、例えばリンカーおよび結合性ペプチドを含むポリペプチドは、天然および/または非天然のアミノ酸残基を含むアミノ酸残基を含み得る。これらの用語は、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアル酸付加、アセチル化、リン酸化などもまた含む。一部の態様では、ポリペプチドは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、ネイティブまたは天然の配列に対する改変を含んでもよい。これらの改変は、部位特異的変異誘発などを介して計画的であり得、またはタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR增幅に起因したエラーなどを介して偶発的であり得る。

【0136】

「生殖系列配列」とは、生殖系列（一倍体配偶子およびそれらが形成される二倍体細胞）由来の遺伝子配列を指す。生殖系列DNAは、単一のIg重鎖もしくは軽鎖、または単一のTCRもしくはTCR鎖、または単一のTCRもしくはTCR鎖をコードする複数の遺伝子セグメントを含む。これらの遺伝子セグメントは、生殖細胞中に保有されるが、機能的遺伝子へと配置されるまで、転写および翻訳することができない。骨髄におけるB細胞およびT細胞の分化の間に、これらの遺伝子セグメントは、 10^8 よりも大きい特異性を生じることが可能なダイナミックな遺伝子系によってランダムにシャッフルされる。これらの遺伝子セグメントのほとんどは、生殖系列データベースによって公開および収集されている。

【0137】

親和性とは、2つの薬剤の可逆的結合についての平衡定数を指し、 K_D として表される。リガンドに対する結合性タンパク質の親和性、例えば、エピトープに対する抗体の親和性、または例えば、MCH-ペプチド複合体に対するTCRの親和性は、例えば、約100ナノモル濃度(nM)～約0.1nM、約100nM～約1ピコモル濃度(pM)、または約100nM～約1フェムトモル濃度(fM)であり得る。用語「アビディティー」とは、希釈後の解離に対する、2またはそれよりも多くの薬剤の複合体の抵抗性を指す。

【0138】

エピトープとは、一部の態様では、抗体またはTCRの可変領域結合ポケットとの結合

10

20

30

40

50

相互作用を形成することが可能な、抗原または他の高分子の一部分を指す。かかる結合相互作用は、1つまたは複数のCDRの1つまたは複数のアミノ酸残基との分子間接触として顕在化され得る。抗原結合には、例えば、CDR3、CDR3対、または一部の例では、 V_H および V_L 鎖の最大で6つ全てのCDRの相互作用が関与し得る。エピトープは、直鎖ペプチド配列であり得る（即ち、「連續的」）、または非隣接アミノ酸配列から構成され得る（即ち、「コンフォメーション」または「不連續的」）。抗体またはTCRは、1つまたは複数のアミノ酸配列を認識できる；したがって、エピトープは、1つよりも多くの別個のアミノ酸配列を規定できる。一部の態様では、TCRは、MHCとの関連で1つまたは複数のアミノ酸配列またはエピトープを認識できる。抗体およびTCRによって認識されるエピトープは、当業者に周知のペプチドマッピングおよび配列分析技術によって決定され得る。結合相互作用は、CDRの1つまたは複数のアミノ酸残基との分子間接触として顕在化される。

【0139】

一部の実施形態では、特異的結合を有する抗体またはTCRに対する言及は、ある抗体またはTCRが、抗体またはTCRによって認識されるエピトープを含む抗原以外の分子に対するいのちの顕著な結合も示さない状況を指す。この用語は、例えば、抗原結合性ドメインが、いくつかの抗原によって保有される特定のエピトープに特異的である場合にも適用可能であり、この場合、選択された抗体、TCR、または抗原結合性ドメインを保有するそれらの抗原結合性断片は、エピトープを保有する種々の抗原に結合できる。用語「優先的に結合する」または「特異的に結合する」とは、抗体、TCRまたはそれらの断片が、無関係のアミノ酸配列に結合する場合よりも高い親和性でエピトープに結合し、このエピトープを含む他のポリペプチドと交差反応性である場合には、ヒト使用への投与のために製剤化されるレベルにおいてそれらが毒性でないことを意味する。一態様では、かかる親和性は、無関係のアミノ酸配列に対する抗体、TCRまたはそれらの断片の親和性よりも、少なくとも1倍大きい、少なくとも2倍大きい、少なくとも3倍大きい、少なくとも4倍大きい、少なくとも5倍大きい、少なくとも6倍大きい、少なくとも7倍大きい、少なくとも8倍大きい、少なくとも9倍大きい、10倍大きい、少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍大きい、少なくとも40倍大きい、少なくとも50倍大きい、少なくとも60倍大きい、少なくとも70倍大きい、少なくとも80倍大きい、少なくとも90倍大きい、少なくとも100倍大きい、または少なくとも1000倍大きい。用語「結合」とは、例えば、生理的条件下での共有結合、静電、疎水性、ならびにイオン性および/または水素結合相互作用に起因する2つの分子間の直接的会合を指し、これには、相互作用、例えば、塩架橋および水架橋、ならびに結合の任意の他の従来の手段が含まれる。

【0140】

用語「結合」とは、例えば、生理的条件下での共有結合、静電、疎水性、ならびにイオン性および/または水素結合相互作用に起因する2つの分子間の直接的会合を指し、これには、相互作用、例えば、塩架橋および水架橋、ならびに結合の任意の他の従来の手段が含まれる。

【0141】

「薬学的に許容される」とは、生理的に容認可能であり、ヒトに投与した場合にアレルギー反応または類似の有害な反応、例えば、胃の異常亢進、眩暈などを典型的には生じない、分子実体および組成物を指す。

【0142】

「予防（prevention）」とは、予防（prophylaxis）、症状の発症の予防（prevention）、過剰なレベルのタンパク質と関連するまたはタンパク質活性と相關する疾患または障害の進行の予防（prevention）を指す。

【0143】

「阻害」、「処置」および「処置すること」は、相互交換可能に使用され、例えば、症状の停滞、生存の延長、症状の部分的または完全な寛解、および過剰なレベルのタンパク質と関連するまたはタンパク質活性と相關する状態、疾患または障害の部分的または完全

10

20

30

30

40

50

な根絶を指す。例えば、がんの処置には、がん性成長または腫瘍の停滞、部分的または完全な排除が含まれるがこれらに限定されない。処置または部分的排除には、例えば、成長または腫瘍のサイズおよび／もしくは体積における所定倍率の低減、例えば、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍、またはそれらの間の任意の倍率の低減が含まれる。同様に、処置または部分的排除には、成長または腫瘍のサイズおよび／もしくは体積における、約1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれらの間の任意の百分率の低減の、パーセント低減が含まれ得る。

【0144】

中和抗体または中和T C Rとは、一部の態様では、中和が達成される機構に関わりなく、ウイルスまたは細菌などの病原体の複製を阻害する任意の抗体またはT C Rを指す。

10

【0145】

抗体レパートリーまたはT C Rレパートリーとは、抗体、T C Rまたはそれらの断片の収集を指す。抗体レパートリーは、例えば、特定の抗体を選択するため、または特定の特性、例えば、結合能、結合特異性、胃腸輸送の能力、安定性、親和性などについてスクリーニングするために使用され得る。この用語は、例えば、ナイーブ、合成および半合成ライブラリーを含む、任意の供給源由来の単鎖F v (s c F v)およびF a b 抗体ファージディスプレイライブラリーが限定なしに含まれる抗体ファージディスプレイライブラリーなどのコンビナトリアルライブラリーの全ての形態を含む、抗体およびT C Rライブラリーを具体的に含む。

20

【0146】

「標的核酸分子」、「標的ポリヌクレオチド」、「標的ポリヌクレオチド分子」とは、目的の任意の核酸を指す。

【0147】

ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）とは、二本鎖ポリヌクレオチドの相補鎖の同時プライマー伸長によるポリヌクレオチド配列のin vitro増幅反応を指す。P C R反応は、プライマー結合部位が隣接する錆型ポリヌクレオチドのコピーを生成する。2つのプライマーを用いた結果は、各サイクルによって両方の鎖が複製されることによる、各サイクルによる両方の鎖の錆型ポリヌクレオチドコピー数における指数関数的増加である。ポリヌクレオチド二重鎖は、使用されるプライマーの末端に対応する末端を有する。P C Rは、錆型ポリヌクレオチドを変性させること、プライマーをプライマー結合部位にアニーリングさせること、およびヌクレオチドの存在下でD N AまたはR N Aポリメラーゼによってプライマーを伸長させることの、1または複数回の反復を含み得る。特定の温度、各ステップにおける持続時間、およびステップ間の変化の速度は、当業者に周知の多くの因子に依存する（McPhersonら、IRL Press、Oxford（1991年および1995年））。例えば、Taq D N Aポリメラーゼを使用する従来のP C Rでは、二本鎖錆型ポリヌクレオチドは、>90 の温度で変性され得、プライマーは、50～75 の範囲の温度でアニーリングされ得、プライマーは、72～78 の範囲の温度で伸長され得る。一部の実施形態では、P C Rは、逆転写P C R（R T - P C R）、リアルタイムP C R、ネステッドP C R、定量的P C R、多重P C Rなどを含む。一部の実施形態では、P C Rは、R T - P C Rを含まない（米国特許第5,168,038号、同第5,210,015号、同第6,174,670号、同第6,569,627号および同第5,925,517号；Mackayら、Nucleic Acids Research、30巻：1292～1305頁（2002年））。R T - P C Rは、逆転写反応が先行するP C R反応を含み、得られたc D N Aが増幅され、ネステッドP C Rは、第1のセットのプライマーを使用する第1のP C R反応のアンプリコンが、それらのうち少なくとも一方が第1のP C R反応のアンプリコンの内部位置に結合する第2のプライマーセットを使用する第2のP C R反応のための試料になる、二段階P C Rを含む。多重P C Rは、複数のポリヌクレオチド配列が同じ反応混合物中で同時にP C Rに供されるP C R反応を含む。P C R反応体積は、0.2 p L～1000 p Lの間のいずれかであり得る。定量的P C Rは、試料中の1つまたは複数の配列の絶対量も

30

40

50

しくは相対量、存在量、または濃度を測定するために設計されたPCR反応を含む。定量的測定は、1つまたは複数の参照配列または標準を目的のポリヌクレオチド配列と比較することを含み得る(Freemanら、Biotechniques、26巻：112～126頁(1999年)；Becker-Andreら、Nucleic Acids Research、17巻：9437～9447頁(1989年)；Zimmermanら、Biotechniques、21巻：268～279頁(1996年)；Di viaccoら、Gene、122巻：3013～3020頁(1992年)；Becker-Andreら、Nucleic Acids Research、17巻：9437～9446頁(1989年))。

【0148】

「ヌクレオチド」、「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド残基」および「ヌクレオシド残基」とは、本明細書で使用する場合、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド残基、または増幅反応(例えば、PCR反応)における使用に適切なプライマーの成分として機能することが可能な他の類似のヌクレオシドアナログを意味し得る。かかるヌクレオシドおよびその誘導体は、特記した場合を除き、本明細書に記載されるプライマーの構成要素として使用され得る。化学的改变が、必要に応じて、ポリメラーゼによる、デオキシグアニン、デオキシシトシン、デオキシチミジンまたはデオキシアデニンとしてのそれらの認識を妨害しないことを条件として、増幅反応におけるそれらの安定性または有用性を増強するために化学改变されたヌクレオシド誘導体または塩基の利用を妨げることを意味するものは、本出願中には存在しない。一部の実施形態では、ヌクレオチドアナログは、ハイブリッド形成を安定化し得る。一部の実施形態では、ヌクレオチドアナログは、ハイブリッド形成を不安定化し得る。一部の実施形態では、ヌクレオチドアナログは、ハイブリダイゼーションの特異性を増強し得る。一部の実施形態では、ヌクレオチドアナログは、ハイブリダイゼーションの特異性を低減させ得る。

10

20

【0149】

「核酸」または文法的等価物とは、単一のヌクレオチド、または共有結合によって一緒に連結された少なくとも2つのヌクレオチドのいずれかを指す。

【0150】

「ポリヌクレオチド」または文法的等価物とは、共有結合によって一緒に連結された少なくとも2つのヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは、2またはそれよりも多くのヌクレオチドを含む分子を含む。ポリヌクレオチドは、プリンおよびピリミジン塩基、または他の天然のヌクレオチド塩基、化学的に改变されたもしくは生化学的に改变された非天然のヌクレオチド塩基、またはヌクレオチド塩基の誘導体を含む、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはペプチド核酸(PNA)のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。ポリヌクレオチドの骨格は、糖およびリン酸基、または改変もしくは置換された糖もしくはリン酸基を含み得る。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを含み得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、他の分子、例えば、別のハイブリダイズしたポリヌクレオチドを含み得る。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、またはその両方の配列を含む。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、遺伝子間DNA(ヘテロクロマチンDNAが限定なしに含まれる)、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、低分子干渉RNA(siRNA)、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、ある配列の単離されたDNA、ある配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマーが含まれる。ポリヌクレオチドは、天然の供給源から単離された、組換えの、または人工的に合成されたものであり得る。

30

40

【0151】

ポリヌクレオチドは、非標準ヌクレオチド、例えば、ヌクレオチドアナログまたは改変ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、非標準ヌクレオチドは、ハイブリッド形成を安定化し得る。一部の実施形態では、非標準ヌクレオチドは、ハイブリッド形成を不安定化し得る。一部の実施形態では、非標準ヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションの

50

特異性を増強し得る。一部の実施形態では、非標準ヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションの特異性を低減させ得る。非標準ヌクレオチド改変の例には、2' O - M e、2' O - アリル、2' O - プロパルギル、2' O - アルキル、2' フルオロ、2' アラビノ、2' キシロ、2' フルオロアラビノ、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート(phosphoroamidate)、2' アミノ、5' - アルキル置換ピリミジン、3' デオキシグアノシン、5' - ハロ置換ピリミジン、アルキル置換プリン、ハロ置換プリン、二環式ヌクレオチド、2' MOE、PNA分子、LNA - 分子、LNA様分子、ジアミノプリン、S2T、5' - フルオロウラシル、5' - ブロモウラシル、5' - クロロウラシル、5' - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン(xantine)、4' - アセチルシトシン、5' - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5' - カルボキシメチルアミノメチル - 2' - チオウリジン、5' - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D - ガラクトシルキューオシン(beta-D-galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1' - メチルグアニン、1' - メチルイノシン、2', 2' - ジメチルグアニン、2' - メチルアデニン、2' - メチルグアニン、3' - メチルシトシン、5' - メチルシトシン、N⁶ - アデニン、7' - メチルグアニン、5' - メチルアミノメチルウラシル、5' - メトキシアミノメチル - 2' - チオウラシル、ベータ-D - マンノシルキューオシン(beta-D-mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5' - メトキシウラシル、2' - メチルチオ - D46 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5' - オキシ酢酸(v)、ウブトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、キューオシン(queosine)、2' - チオシトシン、5' - メチル - 2' - チオウラシル、2' - チオウラシル、4' - チオウラシル、5' - メチルウラシル、ウラシル - 5' - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5' - オキシ酢酸(v)、5' - メチル - 2' - チオウラシル、3' - (3' - アミノ - 3' - N - 2' - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2', 6' - ジアミノプリン、およびそれらの誘導体が含まれる。

【0152】

「対象」、「個体」、「宿主」または「患者」とは、哺乳動物などの生きた生物を指す。対象および宿主の例には、ウマ、雌ウシ、ラクダ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス(例えば、ヒト化マウス)、スナネズミ、非ヒト靈長類(例えば、マカク)、ヒトなど、例えば、非哺乳動物脊椎動物、例えば、鳥類(例えば、ニワトリまたはアヒル)、魚類(例えば、サメ)またはカエル(例えば、Xenopus)、および非哺乳動物無脊椎動物を含む非哺乳動物、ならびにそれらのトランスジェニック種が含まれるがこれらに限定されない。ある特定の態様では、対象とは、単一の生物(例えば、ヒト)を指す。ある特定の態様では、あるいは、研究のための共通の免疫因子および/もしくは疾患有する小さいコホート、ならびに/または疾患有さない個体のコホート(例えば、陰性/正常対照)を構成する個体の群が提供される。試料が取得される対象は、疾患有および/または障害(例えば、1つまたは複数のアレルギー、感染、がんまたは自己免疫障害など)に苦しみ得、疾患有罹患していない陰性対照対象に対して比較され得る。

【0153】

「キット」とは、本明細書に開示される方法を実行するために材料または試薬を送達するための送達系を指す。一部の実施形態では、キットには、反応試薬(例えば、適切な容器中のプローブ、酵素など)および/または支持材料(例えば、アッセイを実行するための緩衝液、書面の指示書など)の貯蔵、1つの位置から別の位置へのそれらの輸送または送達を可能にする系が含まれる。例えば、キットは、適切な反応試薬および/または支持材料を含む1つまたは複数のエンクロージャー(例えば、箱)を含む。かかる内容物は、意図したレシピエントと一緒にまたは別々に送達され得る。例えば、第1の容器は、アッセイにおける使用のための酵素を含み得るが、第2の容器は、複数のプライマーを含む。

【0154】

ポリペプチドとは、一部の態様では、少なくとも2つのアミノ酸を含む分子を指す。一部の実施形態では、ポリペプチドは、单一のペプチドからなる。一部の実施形態では、ポ

リペプチドは、2またはそれよりも多くのペプチドを含む。例えば、ポリペプチドは、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000のペプチドまたはアミノ酸を含み得る。ポリペプチドの例には、アミノ酸鎖、タンパク質、ペプチド、ホルモン、ポリペプチド、サッカライド、脂質、糖脂質、リン脂質、抗体、酵素、キナーゼ、受容体、転写因子およびリガンドが含まれるがこれらに限定されない。

【0155】

試料とは、一部の態様では、生物学的、環境的、医学的な、対象の、もしくは患者の試料、または標的ポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドを含む試料を指す。

10

【0156】

親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート

親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、親和性分子部分（例えば、抗体またはMHC - ペプチド複合体）およびオリゴヌクレオチド部分を含む。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の抗原識別配列は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが特異的に相互作用する1種または複数の抗原を識別するために使用され得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、コンジュゲートの親和性部分に共有結合的に付着される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、コンジュゲートの親和性部分に非共有結合的に付着される。

【0157】

一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、単一の親和性部分を含む。一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、多価親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。例えば、多価親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド（单数または複数）にコンジュゲートされた少なくとも2つの親和性分子の抗原結合性ドメインを含み得る。例えば、多価親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされた少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、500または1,000の親和性分子の抗原結合性ドメインを含み得る。

20

【0158】

一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、単一のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、2またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドを含む。例えば、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、1つまたは複数の親和性分子（例えば、抗体またはMHC - ペプチド複合体）にコンジュゲートされた少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、500または1,000のオリゴヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、同じ抗原ID（AID）配列を含む2またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドを含む。例えば、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、同じAID配列を含む少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、500または1,000のオリゴヌクレオチドを含み得る。

30

【0159】

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

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（またはドメイン）は、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の領域、分子、ドメイン、部分（portion）、断片または部分（moiety）を含む。したがって、親和性部分は、所与の標的抗原、例えば、細胞表面タンパク質の細胞外ドメインに結合するまたは特異的に結合する能力を付与する。一部の実施形態では、親和性部分は、異なる抗原ID配列を含む別の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの抗原とは実質的に相互作用しない。一部の実施形態では、親和性部分は、核酸を含み得る分子、または標的抗原への親和性部分の

40

50

結合を実質的に消失させることなくオリゴヌクレオチドが付着され得る分子である。

【0160】

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は、核酸分子であり得る、またはタンパク質性であり得る。親和性部分には、RNA、DNA、RNA - DNAハイブリッド、小分子（例えば、薬物）、アプタマー、ポリペプチド、タンパク質、抗体およびその断片、TCRおよびその断片、ウイルス、ウイルス粒子、細胞、それらの断片、ならびにそれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない（例えば、Fredrikssonら、（2002年）Nat Biotech 20巻：473～77頁；Gullbergら、（2004年）PNAS、101巻：8420～24頁を参照のこと）。例えば、親和性部分は、一本鎖RNA、二本鎖RNA、一本鎖DNA、二本鎖DNA、1もしくは複数の二本鎖領域および1もしくは複数の一本鎖領域を含むDNAもしくはRNA、RNA - DNAハイブリッド、小分子、アプタマー、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗体断片、TCR、TCR断片、MHC、MHC - ペプチド複合体、ウイルス粒子、細胞、またはそれらの任意の組合せであり得る。

【0161】

一部の実施形態では、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は、細胞を標的化する。例えば、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は、T細胞またはB細胞を標的化し得る。一部の実施形態では、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は、特定の細胞型または細胞サブセットを標的化する。例えば、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は、CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞を標的化し得る。例えば、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は、特定の抗原を特異的に認識するTCRを含むT細胞を標的化し得る。例えば、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は、特定のMHC - ペプチド複合体を特異的に認識するTCRを含むT細胞を標的化し得る。

【0162】

一部の実施形態では、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は、細胞の標的の細胞外ドメインを標的化する。例えば、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は、細胞の受容体、例えば、T細胞受容体の細胞外ドメインを標的化し得る。例えば、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は、細胞の受容体の細胞外ドメインのグリコシル化された領域を標的化し得る。例えば、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は、細胞の受容体の細胞外ドメインのリガンド結合性領域を標的化し得る。例えば、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は、リガンドに結合しない細胞の受容体の細胞外ドメインの領域を標的化し得る。

【0163】

タンパク質

一部の実施形態では、親和性部分は、ポリペプチド、タンパク質、またはそれらの任意の断片である。一部の実施形態では、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は、タンパク質である。一部の実施形態では、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は、ペプチドである。例えば、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は、抗体、例えば、抗体の結合性ドメインであり得る。例えば、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は、MHC - ペプチド複合体であり得る。例えば、親和性部分は、精製されたポリペプチド、単離されたポリペプチド、融合タグ化ポリペプチド、細胞またはウイルスもしくはビリオンの膜に付着させたポリペプチド、あるいはそれらにまたがるポリペプチド、細胞質タンパク質、細胞内タンパク質、細胞外タンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、アロマターゼ、ヘリカーゼ、プロテアーゼ、オキシドレダクターゼ、レダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、グリコシラーゼ、細胞外マトリックスタンパク質、リガーゼ、イオントランスポーター、チャネル、ポア、アポトーシスタンパク質、細胞接着タンパク質、病原性タンパク質、異常に発現されるタンパク質、転写因子、転写調節因子、翻訳タンパク

10

20

30

40

50

質、シャペロン、分泌型タンパク質、リガンド、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、核タンパク質、受容体、膜貫通受容体、シグナル伝達因子、抗体、膜タンパク質、膜内在性タンパク質、表在性膜タンパク質、細胞壁タンパク質、球状タンパク質、線維状タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、染色体タンパク質、それらの任意の断片、またはそれらの任意の組合せであり得る。一部の実施形態では、親和性部分は、異種ポリペプチドである。一部の実施形態では、親和性部分は、トランスフェクションなどの分子技術を使用して細胞において過剰発現されるタンパク質である。一部の実施形態では、親和性部分は、組換えポリペプチドである。例えば、親和性部分は、細菌（例えば、E. coli）、酵母、哺乳動物または昆虫細胞において産生される試料（例えば、生物によって過剰発現されるタンパク質）を含み得る。一部の実施形態では、親和性部分は、変異、挿入、欠失または多型を含むポリペプチドである。一部の実施形態では、親和性部分は、抗原、例えば、生物を免疫化するため、または生物において免疫応答を生成するため、例えば、抗体産生のために使用されるポリペプチドである。

【 0 1 6 4 】

抗体

一部の実施形態では、親和性部分は、抗体、例えば、抗体の結合性断片である。抗体は、別の分子の特定の空間的および極性機構に特異的に結合し得る。例えば、抗体は、精製された抗体、単離された抗体、抗体の断片、または融合タグ化抗体であり得る。一部の実施形態では、抗体は、トランスフェクションなどの分子技術を使用して細胞において過剰発現される。一部の実施形態では、抗体は、組換え抗体である。抗体は、細胞表面分子などの別の分子の特定の空間的および極性機構に特異的に結合し得る。抗体は、モノクローナル、ポリクローナルまたは組換え抗体であり得、当技術分野で周知の技術、例えば、宿主の免疫化および血清（ポリクローナル）の収集によって、または連続的ハイブリッド細胞株を調製し、分泌されたタンパク質（モノクローナル）を収集することによって、または天然の抗体の特異的結合に必要なアミノ酸配列を少なくともコードするヌクレオチド配列もしくはその変異誘発バージョンをクローニングし発現させることによって、調製され得る。さらに、凝集物、ポリマー、および免疫グロブリンまたはそれらの断片のコンジュゲートは、特定の分子に対する結合親和性が維持される限り、必要に応じて使用され得る。抗体断片の例には、 V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H_1} ドメインからなる一価断片である F a b 断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された 2 つの F a b 断片を含む二価断片である $F(a b)_2$ 断片； V_H および C_{H_1} ドメインからなる F d 断片；抗体の単一のアームの V_L および V_H ドメインからなる F v 断片； V_H ドメインからなる單一ドメイン抗体 (d A b) 断片 (Wardら、(1989年) Nature 341巻：544～46頁)；ならびに単離された C D R、ならびに V_L 領域および V_H 領域が対合して一価分子を形成する单鎖断片 (s c F v) (单鎖 F v (s c F v) として公知；例えば、Birdら、(1988年) Science 242巻：423～26頁；および Hustonら、(1988年) PNAS 85巻：5879～83頁を参照のこと) が含まれる。したがって、抗体断片には、F a b、 $F(a b)_2$ 、s c F v、F v、d A b などが含まれる。2 つのドメイン V_L および V_H は、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、単一のタンパク質鎖としてそれらが作製されることを可能にする人工ペプチドリンクによって、組換え方法を使用して連結され得る。かかる单鎖抗体は、1 つまたは複数の抗原結合性部分を含む。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を使用して取得され得、断片は、インタクトな抗体と同じ様式で、有用性についてスクリーニングされ得る。抗体は、ヒト、ヒト化、キメラ、単離された、イヌ、ネコ、ロバ、ヒツジ、任意の植物、動物または哺乳動物であり得る。

【 0 1 6 5 】

M H C

一部の場合における細胞性免疫系による抗原構造の認識は、表面発現される主要組織適合性複合体 (M H C) によって媒介される。細胞、例えば、抗原提示細胞 (A P C) は、一部の態様では、M H C 分子の特異的ペプチド結合フォールド中に存在し得る、したがつ

10

20

30

40

50

て、一部の態様ではT細胞によって認識され得る短いペプチドへと、抗原などのタンパク質をプロセシングする。T細胞受容体(TCR)によるエピトープ(ペプチド断片)の特異的認識は一般に、MHC分子との同時相互作用を必要とする。安定な多量体複合体は、結合したペプチドを含むMHCタンパク質サブユニットを用いて調製され得る。MHC-抗原複合体は、それらの抗原受容体を介して複合体を認識するT細胞と共に安定な構造を形成し得、それによって、抗原を特異的に認識するT細胞への結合を可能にする。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は、T細胞を標的化し得る。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は、T細胞を特異的に標的化し得る。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は、T細胞受容体またはTCR様分子、例えば、TCR様CARを標的化し得る。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は、T細胞受容体を特異的に標的化し得る。例えば、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は、MHC分子を含み得る。例えば、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は、MHC-Peptid复合体(MHC-p)を含み得る。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は、式(A-B-P)_nを有し得、式中、Aは、MHCクラスIまたはMHCクラスIIタンパク質の鎖であり、Bは、クラスII MHCタンパク質の鎖またはMHCクラスIタンパク質については₂ミクログロブリンであり、Pはペプチドである。一部の実施形態では、nは1である。一部の実施形態では、nは、2よりも大きいか2に等しい。MHCタンパク質サブユニットは、可溶性形態であり得る。例えば、可溶性MHCタンパク質サブユニットは、膜貫通ドメインまたはその部分の欠失によって、ネイティブMHCタンパク質サブユニットから誘導され得る。一部の実施形態では、MHCタンパク質サブユニットは、細胞質ドメインを含まない。一部の実施形態では、MHCタンパク質サブユニットは、膜貫通ドメインを含まない。

【0166】

ペプチド(P)は、クラスI MHCタンパク質との複合体については約6~12アミノ酸長、例えば、約8~10アミノ酸であり得る。ペプチドは、クラスII MHCタンパク質との複合体については約6~20アミノ酸長、例えば、約10~18アミノ酸であり得る。ペプチドは、広範な種々のタンパク質に由来する配列を有し得る。ペプチドは、T細胞エピトープであり得る。いくつかの抗原由来のエピトープ配列が、当技術分野で公知である。あるいは、エピトープ配列は、ネイティブMHCタンパク質に結合したペプチドを単離し、配列決定することによって、標的配列からの一連のペプチドの合成、次いで、異なるペプチドに対して反応性のT細胞についてアッセイすることによって、または異なるペプチドを用いて一連の結合性複合体を生成し、T細胞結合を定量することによって、実験的に決定され得る。断片の調製、配列を識別すること、および最小配列を識別することは、米国特許第5,019,384号およびそこで引用される参考文献に記載されている。ペプチドは、種々の方法で調製され得る。簡便には、これらは、自動合成器を使用する従来技術によって合成され得、または手動で合成され得る。あるいは、特定のペプチドをコードするDNA配列が調製され得、所望のペプチドを提供するためにクローニングおよび発現され得る。この場合、メチオニンが最初のアミノ酸であり得る。さらに、ペプチドは、親和性試薬による融合タンパク質の精製を可能にする、特異的結合対のうちの1つであるタンパク質への融合などの組換え方法と、その後の、通常は操作された部位におけるタンパク質分解性切断とによって生成されて、所望のペプチドを生じ得る(例えば、Driscollら(1993年)J. Mol. Bio. 232巻:342~350頁を参照のこと)。ペプチドはまた、天然の供給源から単離され得、例えば、イオン交換材料上のクロマトグラフィー、サイズによる分離、免疫親和性クロマトグラフィーおよび電気泳動が含まれる公知の技術によって精製され得る。

【0167】

一部の実施形態では、-サブユニットおよび-サブユニットは、別々に產生され、安定なヘテロ二重鎖複合体を形成するようにin vitroで会合される(例えば、Altmanら(1993年)またはGarbocziら(1992年)を参照のこと)。一部の実施形態

では、 - サブユニットおよび - サブユニットは、単一の細胞において一緒に発現される。一部の実施形態では、 - サブユニットおよび - サブユニットを有する単一の分子が使用される。例えば、单鎖ヘテロ二量体は、短いペプチドリンカー、例えば、15～25アミノ酸のペプチドまたはリンカーを使用して、2つのサブユニットを一緒に融合させることによって創出され得る（例えば、Bedzykら（1990年）J. Biol. Chem. 265巻：18615頁を参照のこと）。可溶性ヘテロ二量体は、可溶性産物を产生するために、ネイティブヘテロ二量体の単離、およびプロテアーゼ、例えばパパインによる切断によっても产生され得る。

【0168】

可溶性サブユニットは、トランケート型タンパク質をコードするDNA構築物から独立して発現され得る。発現のために、DNA配列は、適切な発現ベクター中に挿入され得、このとき、ネイティブ転写開始領域が使用され得、または外因性転写開始領域、例えば、通常存在する染色体中の遺伝子と関連するプロモーター以外のプロモーターが使用され得る。プロモーターは、in vitroで組換え方法によって、または染色体中への配列の相同組込みの結果として、導入され得る。転写開始領域は、広範な種々の発現宿主について公知である。発現宿主は、原核生物または真核生物、特に、E. coli、B. subtillis、哺乳動物細胞、例えば、CHO細胞、COS細胞、サル腎臓細胞、リンパ系細胞、ヒト細胞株などを含み得る。

【0169】

サブユニットは、適切な宿主細胞において発現され得、必要に応じて可溶化され得る。2つのサブユニットは、ペプチドと組み合わされ得、鎖内ジスルフィド結合したドメインを有する安定なヘテロ二量体複合体を形成するためにin vitroでフォールドすることが可能であり得る。ペプチドは、最初のフォールディング反応に含まれ得、または後のステップで空のヘテロ二量体に付加され得る。MHC結合部位は、このペプチドの付加の前には、ペプチドなしであり得る。例外は、天然のペプチド-MHC複合体、例えば、自己免疫攻撃の標的である細胞の表面上に存在し得るものなどによってT細胞を標識することが所望される場合である。MHCヘテロ二量体は、クラスIについては2および1、またはクラスIIについては1および1のいずれかの2つの膜遠位ドメインによって形成される溝中でペプチドに結合する。サブユニットおよびペプチドのフォールディングおよび会合を許容する条件は、当技術分野で公知である（例えば、Altmanら（1993年）およびGarbocziら（1992年）を参照のこと）。許容的条件の一例として、大まかに等モル量の可溶化されたサブユニットおよびサブユニットが、尿素の溶液中で混合される。再フォールディングは、尿素なしの緩衝溶液中への希釈または透析によって開始される。ペプチドは、約1～3日間にわたって約pH5～5.5で空のクラスIIヘテロ二量体中に負荷され、その後、中和、濃縮および緩衝液交換される。しかし、具体的なフォールディング条件は本発明の実施にとって重要なことは、当業者によって容易に理解される。

【0170】

一部の実施形態では、単量体複合体（- - P）は、多量体化され得る。例えば、多量体は、サブユニットまたはサブユニット上の特定の付着部位を介して、単量体を多価の実体に結合させることによって形成され得る。一部の実施形態では、多量体は、単量体の化学的架橋結合によって形成される。タンパク質を架橋結合させることができないいくつかの試薬が、当技術分野で公知であり、これには、アジドベンゾイルヒドラジド、N-[4-(p-アジドサリチルアミノ)ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド）、ビス-スルホスクシンイミジルスペレート、アジトイミド酸ジメチル、酒石酸ジスクシンイミジル、N- -マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート、N-スクシンイミジル[4-アジドフェニル]-1,3'-ジチオプロピオネート、N-スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドおよびスクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレー

10

20

30

40

50

トが含まれるがこれらに限定されない。多価実体への結合のための付着部位は、天然に存在してもよく、または遺伝子操作を介して導入されてもよい。部位は、特異的結合対のメンバー、または特異的結合対のメンバーを提供するように改変されたものであり得、ここで、相補的対は、多様な特異的結合部位を有する。相補的結合メンバーへの結合は、化学反応、エピトープ - 受容体結合またはハプテン - 受容体結合であり得、ここで、ハプテンは、サブユニット鎖に連結される。好ましい実施形態では、これらのサブユニットのうち1つは、改変酵素のための認識部位を提供するアミノ酸配列に融合される。この認識配列は通常、抗原性ペプチド結合部位における潜在的な妨害を回避するために、これらのサブユニットのうち1つのカルボキシ末端の近位に融合される。簡便には、発現カセットは、認識部位をコードする配列を含む。

10

【0171】

目的の改変酵素には、BirA、種々のグリコシラーゼ、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ、タンパク質キナーゼなどが含まれる。サブユニットは、任意の都合のよい時、通常は単量体の形成後に、改変酵素と反応され得る。改変酵素によって導入される基、例えば、ビオチン、糖、リン酸、ファルネシルなどは、相補的結合対のメンバー、または相補的結合対のメンバーを提供するさらなる改変、例えば、化学的架橋結合、ビオチン化などに固有の部位を提供する。代替的戦略は、対合していないシステイン残基をサブユニットに導入し、それによって、結合に固有の化学的に反応性の部位を導入することである。付着部位はまた、天然に存在するまたは導入されたエピトープであり得、多価結合パートナーは、抗体、例えば、IgG、IgMなどである。任意の改変は、結合を干渉しない部位、例えば、C末端近位においてである。多量体形成の例示は、タンパク質基質のビオチン化を触媒する酵素BirAのための認識配列の導入である。次いで、ビオチン化サブユニットを有する単量体が、多価結合パートナー、例えば、極端に高い親和性でビオチンが結合するストレプトアビジンまたはアビジンに結合される。ストレプトアビジンは、4の価数を有して、(- - P)₄ の多量体を提供する。多価結合パートナーは、溶液中で遊離であり得る、または不溶性支持体に付着され得る。適切な不溶性支持体の例には、ビーズ、例えば、磁性ビーズ、メンブレンおよびマイクロタイプレートが含まれる。これらは、典型的には、ガラス、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、ポリサッカライド、ナイロンまたはニトロセルロース製である。不溶性支持体への付着は、結合性複合体がT細胞の分離に使用される場合に有用である。

20

【0172】

細胞

一部の実施形態では、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は、細胞である。例えば、親和性部分は、インタクトな細胞、化合物（例えば、薬物）で処理された細胞、固定された細胞、溶解細胞、またはそれらの任意の組合せであり得る。一部の実施形態では、親和性部分は、単一の細胞である。例えば、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は、T細胞またはB細胞であり得る。一部の実施形態では、親和性部分は、複数の細胞である。一部の実施形態では、親和性部分は、T細胞である。一部の実施形態では、親和性部分は、B細胞である。一部の実施形態では、親和性部分は、抗原提示細胞（APC）である。一部の実施形態では、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は、特定の細胞型または細胞サブセットである。例えば、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は、CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞であり得る。例えば、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は、特定の抗原を特異的に認識するTCRを含むT細胞であり得る。例えば、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は、特定のMHC - ペプチド複合体を特異的に認識するTCRを含むT細胞であり得る。一部の実施形態では、親和性部分は、細胞である。

30

【0173】

小分子

一部の実施形態では、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は、薬

40

50

物などの小分子である。例えば、小分子は、大環状分子、阻害剤、薬物または化学化合物であり得る。一部の実施形態では、小分子は、5つ以下の水素結合ドナーを含む。一部の実施形態では、小分子は、10個以下の水素結合アクセプターを含む。一部の実施形態では、小分子は、500ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する。一部の実施形態では、小分子は、約180～500ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、小分子は、5以下のオクタノール-水分配係数 $10g\text{ P}$ を含む。一部の実施形態では、小分子は、-0.4～5.6の分配係数 $10g\text{ P}$ を有する。一部の実施形態では、小分子は、40～130のモル屈折率を有する。一部の実施形態では、小分子は、約20～約70個の原子を含む。一部の実施形態では、小分子は、140オングストローム²またはそれ未満の極性表面積を有する。

10

【0174】

核酸

一部の実施形態では、親和性部分は、リボヌクレオチドおよび/またはデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミンまたはシトシン）のポリマー形態、例えば、DNAまたはRNA（例えば、mRNA）である。DNAには、直鎖DNA分子（例えば、制限断片）、ウイルス、プラスミドおよび染色体において見出される二本鎖DNAが含まれる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド親和性部分は、一本鎖、二本鎖、低分子干渉RNA（siRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスクファーRNA（tRNA）、染色体、遺伝子、非コードゲノム配列、ゲノムDNA（例えば、断片化されたゲノムDNA）、精製されたポリヌクレオチド、単離されたポリヌクレオチド、ハイブリダイズしたポリヌクレオチド、転写因子結合部位、ミトコンドリアDNA、リボソームRNA、真核生物ポリヌクレオチド、原核生物ポリヌクレオチド、合成されたポリヌクレオチド、ライゲーションされたポリヌクレオチド、組換えポリヌクレオチド、核酸アナログを含むポリヌクレオチド、メチル化ポリヌクレオチド、脱メチル化ポリヌクレオチド、それらの任意の断片、またはそれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、親和性部分は、二本鎖領域と二本鎖ではない末端（例えば、5'または3'オーバーハング領域）とを含むポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、親和性部分は、組換えポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、親和性部分は、異種ポリヌクレオチドである。例えば、親和性部分は、細菌（例えば、E. coli）、酵母、哺乳動物または昆虫細胞において産生されるポリヌクレオチド（例えば、生物にとって異種のポリヌクレオチド）を含み得る。一部の実施形態では、親和性部分は、変異、挿入、欠失または多型を含むポリヌクレオチドである。

20

【0175】

一部の実施形態では、親和性部分は、アプタマーである。アプタマーは、タンパク質などの標的分析物に高い特異性および親和性で結合する単離された核酸分子である。アプタマーは、その所与の標的を特異的に結合するための化学的接触を提供するある特定のコンフォメーション（单数または複数）で維持された三次元構造である。アプタマーは、核酸ベースの分子であるが、アプタマーと遺伝子およびmRNAなどの他の核酸分子との間には根本的な差異が存在する。後者では、核酸構造は、その直鎖塩基配列を介して情報をコードし、したがって、この配列は、情報記憶の機能にとって重要なものである。完全に対照的に、標的分子の特異的結合に基づくアプタマー機能は、保存された直鎖塩基配列（非コード配列）に完全に依存するわけではなく、むしろ特定の二次/三次/四次構造に依存する。アプタマーが有し得る任意のコード潜在力は、完全に偶然であり、その同族標的へのアプタマーの結合においていかなる役割も果たさない。アプタマーはまた、ある特定のタンパク質に結合する天然に存在する核酸配列から鑑別されなくてはならない。これら後者の配列は、天然に存在する核酸の転写、翻訳および運搬に関与するタンパク質の特殊化した下位群（例えば、核酸結合性タンパク質）に結合する、生物のゲノム内に埋め込まれた天然に存在する配列である。他方で、アプタマーは、短い単離された天然に存在しない核酸分子である。核酸結合性タンパク質と結合するアプタマーが識別され得るが、ほとんどの場合、かかるアプタマーは、核酸結合性タンパク質によって実際に認識される配列に

30

40

50

対する配列同一性をほとんどまたは全く有さない。より重要なことに、アプタマーは、事実上任意のタンパク質（核酸結合性タンパク質にとどまらない）ならびに、小分子、炭水化物、ペプチドなどを含む目的のほぼ任意の標的と結合し得る。ほとんどの標的について、タンパク質であっても、それが結合する天然に存在する核酸配列は存在しない。かかる配列を有する標的、例えば、核酸結合性タンパク質について、かかる配列は、緊密に結合するアプタマーと比較して、実際に使用される比較的低い結合親和性の結果として、アプタマーとは異なる。アプタマーは、選択された標的に特異的に結合し、標的活性または結合相互作用をモジュレートすることが可能であり、例えば、結合を介して、アプタマーは、それらの標的が機能する能力を遮断し得る。標的への特異的結合の機能的特性は、アプタマーの固有の特性である。典型的なアプタマーは、サイズが 6 ~ 35 kDa (20 ~ 100 ヌクレオチド) であり、マイクロモル濃度からナノモル濃度未満の親和性でその標的と結合し、密接に関連する標的を判別し得る（例えば、アプタマーは、同じ遺伝子ファミリー由来の関連タンパク質を選択的に結合し得る）。アプタマーは、特異的標的と結合するために、一般に見られる分子間相互作用、例えば、水素結合、静電相補性、疎水性接触および立体排除を使用することが可能である。アプタマーは、高い特異性および親和性、低い免疫原性、生物学的効力ならびに優れた薬物動態学的特性を含む、治療剤および診断剤としての使用のためのいくつかの所望の特徴を有する。アプタマーは、共有結合的に連結された相補的ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションから形成される分子システムおよびループ構造（例えば、ヘアピンループ構造）を含み得る。システムは、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドを含み、ループは、2つの相補的ポリヌクレオチドを共有結合的に連結する領域である。10

【 0176 】

一部の実施形態では、親和性部分は、複数の親和性部分、例えば、親和性部分の混合物またはライブラリーである。一部の実施形態では、親和性部分は、複数の異なる親和性部分である。例えば、親和性部分は、複数の少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、25,000 または 30,000 の親和性部分を含み得る20
。

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

【 0177 】

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は、その親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分にカップリングされた核酸である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、親和性部分に直接的にカップリングされる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、親和性部分に間接的にカップリングされる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、親和性部分に非共有結合的にカップリングされる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、親和性部分に共有結合的にカップリングされる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、合成されたオリゴヌクレオチドである。好みの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、親和性部分の標的分析物と直接的には、実質的に相互作用しない。30

【 0178 】

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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のバーコード配列を含み得る。例えば、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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、抗原 ID (AID) 配列および抗原分子バーコード (AMB) 配列を含み得る。オリゴヌクレオチドは、抗原 ID (AID) 配列、融合配列、プライマー部位、分子バーコード配列、定常配列、またはそれらの任意の組合せを含み得る。

【 0179 】

オリゴヌクレオチドは、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へのコンジュゲーションを可能にするための化学的改变（例えば、アミン、チオールまたはビオチン）を含み得る。

【 0 1 8 0 】

オリゴヌクレオチドは、複数のオリゴヌクレオチドを構成し得る。複数のオリゴヌクレオチドは、複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、複数の少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、25,000 または 30,000 のオリゴヌクレオチドを構成し得る。例えば、複数の少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、25,000 または 30,000 のオリゴヌクレオチドは、複数の少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、25,000 または 30,000 の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成され得る。

[0 1 8 1]

オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドバーコード配列、オリゴヌクレオチド融合配列、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列、オリゴヌクレオチド定常配列、またはそれらの任意の組合せを含み得る。

オリゴヌクレオチド抗原 ID (AID) 配列

[0 1 8 2]

オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列またはその相補体を含み得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコードは、このオリゴヌクレオチド抗原バーコードを含む親和性 - オリゴヌクレオチド複合体の識別を可能にし得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコードは、このオリゴヌクレオチド抗原バーコードが付着される親和性部分の識別を可能にし得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコードは、異なる標的分析物に結合する複数の異なる親和性部分由来の親和性部分を識別するために使用され得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコードは、親和性 - オリゴヌクレオチド複合体に排他的にバーコード化され得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコードは、親和性部分に排他的にバーコード化され得る。したがって、オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、特異的親和性部分にバーコード化され得る。

【 0 1 8 3 】

オリゴヌクレオチド抗原バーコードは、固有のバーコード配列であり得る。例えば、複数のオリゴヌクレオチド抗原バーコードのうちの任意の1つのオリゴヌクレオチド抗原バーコードは、固有のバーコード配列であり得る。理論的に可能な異なる抗原バーコード配列の数は、バーコード配列の長さに直接的に依存し得る。例えば、ランダムにアセンブルされたアデニン、チミジン、グアノシンおよびシチジンヌクレオチドを有するDNAバーコードが使用できる場合、可能なバーコード配列の理論的最大数は、10ヌクレオチドの長さについては $1,048,576$ であり得、15ヌクレオチドの長さについては $1,073,741,824$ であり得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、1

8、19、20、25、30、40、45、または50もしくはそれよりも多く連続するヌクレオチドの配列を含み得る。オリゴヌクレオチドは、2もしくはそれよりも多くのオリゴヌクレオチド抗原バーコード配列またはそれらの相補体を含み得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、ヌクレオチドのランダムにアセンブルされた配列を含み得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、ディジェネレート配列であり得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、既知の配列であり得る。オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、予め規定された配列であり得る。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチド抗原バーコード配列は、異なる標的分析物と相互作用する複数の異なる親和性部分のうちの1つの親和性部分を識別するためにオリゴヌクレオチド抗原バーコードまたはその相補体を含むシグナル（例えば、配列読み取り）が使用できるようにそれがカップリングされる親和性部分にバーコード化される既知の固有の配列である。10

【0184】

例えば、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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、抗原 AID (AID) 配列であるバーコードを含み得る。AID 配列は、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得る。AID 配列は、親和性部分が標的化する抗原にバーコード化され得る。AID 配列は、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および / または親和性部分が標的化する抗原を識別するために使用され得る。例えば、AID 配列は、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの抗体にバーコード化され得る。例えば、AID 配列は、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの抗体が標的化する抗原にバーコード化され得る。例えば、AID 配列は、細胞をイムノフェノタイピングするために使用され得る。例えば、AID 配列は、MHC - ペプチド複合体のペプチドにバーコード化され得る。20

【0185】

AID 配列は、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よって標的化される各抗原に固有であり得る。AID 配列は、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固有であり得る。例えば、AID 配列は、細胞の異なる標的抗原に特異的に結合する各抗体に固有であり得る。一部の実施形態では、AID 配列は、規定された配列である。一部の実施形態では、AID 配列は、既知の配列である。各オリゴヌクレオチドについての AID 配列は、例えば、次世代シークエンシングによって、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの増幅産物を配列決定することによって決定され得る。30

【0186】

オリゴヌクレオチド分子バーコード配列

オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド分子バーコード配列またはその相補体を含み得る。オリゴヌクレオチドバーコードは、このオリゴヌクレオチドバーコードを含む親和性 - オリゴヌクレオチド複合体の分子の識別を可能にし得る。オリゴヌクレオチド分子バーコードは、親和性 - オリゴヌクレオチド複合体の分子に排他的にバーコード化され得る。オリゴヌクレオチド分子バーコードは、親和性部分の分子に排他のにバーコード化され得る。したがって、オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、親和性部分の特異的分子にバーコード化され得る。40

【0187】

オリゴヌクレオチド分子バーコードは、固有のバーコード配列であり得る。例えば、複数のオリゴヌクレオチド分子バーコードのうちの任意の1つのオリゴヌクレオチド分子バーコードは、固有のバーコード配列であり得る。理論的に可能な異なる分子バーコード配列の数は、バーコード配列の長さに直接的に依存し得る。例えば、ランダムにアセンブルされたアデニン、チミジン、グアノシンおよびシチジンヌクレオチドを有するDNAバーコードが使用できる場合、可能なバーコード配列の理論的最大数は、10ヌクレオチドの長さについては 1,048,576 であり得、15ヌクレオチドの長さについては 1,073,741,824 であり得る。オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、少なくとも 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50 の長さにおいては、1,048,576 であり得る。50

8、19、20、25、30、40、45、または50もしくはそれよりも多く連続するヌクレオチドの配列を含み得る。オリゴヌクレオチドは、2もしくはそれよりも多くのオリゴヌクレオチド分子バーコード配列またはそれらの相補体を含み得る。オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、ヌクレオチドのランダムにアセンブルされた配列を含み得る。オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、ディジェネレート配列であり得る。オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、既知の配列であり得る。オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、予め規定された配列であり得る。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチド分子バーコード配列は、固有の配列であり、標的分析物と相互作用する複数の親和性部分分子のうちの1つの親和性部分分子を識別するために使用され得る。

【0188】

10

例えば、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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、抗原分子バーコード（AMB）配列であるバーコードを含み得る。抗原分子バーコード（AMB）配列は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの各オリゴヌクレオチド分子に固有であり得る。AMB配列は、ベッセル、例えば、エマルジョン液滴中の個々の細胞の抗原などの抗原に結合した親和性 - 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分子の数の計数を可能にし得る。各オリゴヌクレオチドについてのAMB配列は、例えば、次世代シークエンシングによって、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの増幅産物を配列決定することによって決定され得る。

【0189】

20

オリゴヌクレオチド融合配列

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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、融合配列を含み得る。融合配列は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート、例えば、細胞表面結合した親和性 - 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上への液滴特異的バーコード配列のPCR伸長を可能にし得る。複数のオリゴヌクレオチドの各オリゴヌクレオチドの融合配列は、同一であり得る。融合配列は、液滴バーコードの配列に対して相補的な配列を含み得る。一部の実施形態では、融合配列は、オリゴヌクレオチドの末端に位置する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの末端の融合配列は、抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分に直接的にはコンジュゲートされない。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの末端の融合配列は、遊離末端を含む。

30

【0190】

融合配列は、3'タギングポリヌクレオチド、例えば、ベッセルバーコードを含むポリヌクレオチドの領域に対して相補的な領域を含み得る。融合配列は、ポリヌクレオチド、例えば、ベッセルバーコードを含むポリヌクレオチドの領域の相補体に対して相補的な領域を含み得る。例えば、融合配列は、ベッセルバーコードなどのバーコードを含む3'タギングポリヌクレオチドまたはその相補体に対して相補的な3'領域、例えば、3'末端領域を含み得る。

【0191】

40

3'タギングポリヌクレオチドは、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などの標的ポリヌクレオチドの3'末端に核酸を付加するために使用されるポリヌクレオチドであり得る。3'タギングポリヌクレオチドは、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などの標的ポリヌクレオチドの3'末端に核酸を付加するために鋳型として使用されるポリヌクレオチドであり得る。3'タギングポリヌクレオチドは、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などの標的ポリヌクレオチドの3'末端にハイブリダイズするポリヌクレオチドであり得る。3'タギングポリヌクレオチドは、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などの標的ポリヌクレオチドの3'末端にハイブリダイズする3'領域、例えば3'末端領域を含むポリヌクレオチドであり得る。

【0192】

一部の実施形態では、3'タギングポリヌクレオチドは、ベッセルバーコード化ポリヌ

50

クレオチドである。ベッセルバーコードは、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加され得る。例えば、ベッセルバーコードは、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ハイブリダイズされ得る。ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、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の3'末端にハイブリダイズする3'領域、例えば3'末端領域を含み得る。

【0193】

一部の実施形態では、3'タギングポリヌクレオチドは、増幅された産物である。一部の実施形態では、3'タギングポリヌクレオチドは、単一の分子に起源する増幅された産物である。一部の実施形態では、3'タギングポリヌクレオチドは、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの増幅された産物である。一部の実施形態では、3'タギングポリヌクレオチドは、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドに起源する増幅された産物である。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の3'末端にハイブリダイズする3'領域に対して5'側の領域は、プライマーまたはその相補体に対して相補的な領域を含み得る。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の3'末端にハイブリダイズする3'領域に対して5'側の領域は、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を増幅するために使用され得るプライマーに対して相補的な領域を含み得る。例えば、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またはその相補体の3'末端にハイブリダイズする3'領域に対して5'側の領域に対して相補的な第1のプライマーと、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のプライマー部位に対して相補的な第2のプライマーとを含むプライマーセットが、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を増幅するために使用され得る。

10

20

【0194】

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の3'末端にハイブリダイズする3'領域に対して5'側の領域は、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを増幅するために使用したプライマーまたはその相補体に対して相補的な領域を含み得る。

【0195】

オリゴヌクレオチド融合配列は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれよりも多く連続するヌクレオチドであり得る。オリゴヌクレオチド融合配列は、既知の長さの配列であり得る。オリゴヌクレオチド融合配列は、既知の配列であり得る。オリゴヌクレオチド融合配列は、予め規定された配列であり得る。オリゴヌクレオチド融合配列は、既知の長さの未知の配列であり得る。オリゴヌクレオチド融合配列は、既知の長さの既知の配列であり得る。

30

オリゴヌクレオチド定常配列

【0196】

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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、定常配列を含み得る。この定常配列は、任意選択である。複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの各オリゴヌクレオチドの定常配列は、同一であり得る。

40

【0197】

オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドの長さを増加させるため、またはオリゴヌクレオチドバーコード、オリゴヌクレオチド融合およびオリゴヌクレオチドプライマー結合部位のうち1つもしくは複数を互いから分離するために、使用され得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド定常配列を含まない。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプライマー結合部位を含むオリゴヌクレオチドの末端において親和性部分にカップリングされ得る。

50

【0198】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常配列は、親和性 - オリゴヌクレオチド複合体の親和性部分に付着される。一部の実施形態では、定常オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列の上流に位置する。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列に対して 5' 側に位置し得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常は、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列の下流に位置する。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列に対して 3' 側に位置し得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常は、オリゴヌクレオチドバーコードの上流に位置する。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドバーコードに対して 5' 側に位置し得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常は、オリゴヌクレオチドバーコードの下流に位置する。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドバーコードに対して 3' 側に位置し得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常は、オリゴヌクレオチド融合配列の上流に位置する。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチド融合配列に対して 5' 側に位置し得る。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常配列は、親和性 - オリゴヌクレオチド複合体のオリゴヌクレオチドプライマー結合配列と親和性部分との間に挟まれる。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列に対して 5' 側に位置し得、オリゴヌクレオチドの親和性部分に付着され得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列とオリゴヌクレオチドバーコードとの間に挟まれる。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列に対して 3' 側に位置し得、オリゴヌクレオチドバーコードに対して 5' 側に位置し得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド定常は、オリゴヌクレオチド融合配列とオリゴヌクレオチドバーコードとの間に挟まれる。例えば、オリゴヌクレオチド定常配列は、オリゴヌクレオチドバーコードに対して 3' 側に位置し得、オリゴヌクレオチド融合配列に対して 5' 側に位置し得る。

オリゴヌクレオチド定常配列は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、250、300、400、500 またはそれよりも多く連続するヌクレオチドであり得る。オリゴヌクレオチド定常配列は、ヌクレオチドの非ランダム配列を含み得る。オリゴヌクレオチド定常配列は、既知の長さの配列であり得る。オリゴヌクレオチド定常配列は、既知の配列であり得る。オリゴヌクレオチド定常配列は、予め規定された配列であり得る。オリゴヌクレオチド定常配列は、既知の長さの未知の配列であり得る。オリゴヌクレオチド定常配列は、既知の長さの既知の配列であり得る。

【0199】

オリゴヌクレオチドプライマー結合部位

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カップリングされたオリゴヌクレオチドは、プライマー部位を含み得る。プライマー部位は、増幅プライマーなどのプライマーに対して相補的な配列を含み得る。オリゴヌクレオチドプライマー結合配列は、増幅または配列決定などの反応のためのプライマー結合部位として使用され得る。オリゴヌクレオチドプライマー結合配列は、増幅または配列決定などの反応のために使用されるプライマーの対のための第 1 のプライマー結合配列であり得る。例えば、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列は、フォワードプライマー結合部位であり得る。例えば、オリゴヌクレオチドプライマー結合部位は、リバースプライマー結合部位であり得る。例えば、オリゴヌクレオチドプライマー結合部位は、フォワードプライマー結合部位であり得、オリゴヌクレオチドに付着させたベッセルバーコード化ポリヌクレオチドのプライマー結合配列は、リバースプライマー結合配列であり得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列は、ユニバーサルプライマー結合配列である。

【0200】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドプライマー結合配列と、オリゴヌクレオチドに付着させたポリヌクレオチドの（例えば、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの）プライマー結合配列とは、6、5、4、3、2または1セルシウス度以下異なる融解温度を含み得る。オリゴヌクレオチドプライマー結合配列のヌクレオチド配列と、オリゴヌクレオチドに付着させたポリヌクレオチドのプライマー結合配列のヌクレオチド配列とは、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドに付着させたポリヌクレオチドのプライマー結合配列にハイブリダイズしないように、異なり得る。オリゴヌクレオチドプライマー結合配列のヌクレオチド配列と、オリゴヌクレオチドに付着させたポリヌクレオチドのプライマー結合配列のヌクレオチド配列とは、オリゴヌクレオチドに付着させたポリヌクレオチドのプライマー結合配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列にハイブリダイズしないように、異なり得る。10

【0201】

オリゴヌクレオチドエレメントの配置

オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド融合配列が、オリゴヌクレオチドの一方の末端に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド融合配列の上流にオリゴヌクレオチドバーコードを含むような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドバーコードの上流にオリゴヌクレオチドプライマー結合配列を含むような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド定常配列が、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列の上流または下流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド定常配列がオリゴヌクレオチドバーコード配列の上流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドバーコード配列の上流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド定常配列が、オリゴヌクレオチドの一方の末端、例えば、オリゴヌクレオチド融合配列を含まないオリゴヌクレオチドの末端に位置するような順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド融合配列、オリゴヌクレオチドバーコード配列、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列、およびオリゴヌクレオチド定常配列の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、親和性部分からに向かってまたは親和性部分から進んで、オリゴヌクレオチド融合配列、オリゴヌクレオチドバーコード配列、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列、およびオリゴヌクレオチド定常配列の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、5'末端から3'末端へまたは3'末端から5'末端へ、オリゴヌクレオチド融合配列、オリゴヌクレオチドバーコード配列、オリゴヌクレオチドプライマー結合配列、およびオリゴヌクレオチド定常配列の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、5'末端オリゴヌクレオチド融合配列、固有のオリゴヌクレオチドバーコード配列、リバースオリゴヌクレオチドプライマー結合配列、および親和性部分に（例えば、3'末端に付着させた一級アミン基を介して）付着させた3'オリゴヌクレオチド定常配列を、その順序で含み得る。例えば、親和性部分に付着させたオリゴヌクレオチドは、親和性部分に向かって伝わる、オリゴヌクレオチド融合配列、オリゴヌクレオチドバーコード配列、オリゴヌクレオチド定常配列、およびオリゴヌクレオチドプライマー結合部位配列の順序で配置され得る。30

【0202】

オリゴヌクレオチドは、融合配列がオリゴヌクレオチドの一方の末端に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列がAID配列の下流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列がAMB配列の下流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列が定常配列の下流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列がプライマー部位の下流に位置するような順序で配置され得る。40

【0203】

オリゴヌクレオチドは、プライマー部位がオリゴヌクレオチドの一方の末端に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位がAID配列の上流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位がAMB配列の上流に位置するような順序で配置され得る。50

配列の上流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位が定常配列の上流に位置するような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位が融合配列の上流に位置するような順序で配置され得る。

【0204】

オリゴヌクレオチドは、融合配列の上流に A I D 配列を含むような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位の下流に A I D 配列を含むような順序で配置され得る。A I D 配列は、A M B 配列の上流または下流に位置し得る。A I D 配列は、定常配列の上流または下流に位置し得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列とプライマー部位との間に A I D 配列を含むような順序で配置され得る。

【0205】

オリゴヌクレオチドは、融合配列の上流に A M B 配列を含むような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位の下流に A M B 配列を含むような順序で配置され得る。A M B 配列は、A I D 配列の上流または下流に位置し得る。A M B 配列は、定常配列の上流または下流に位置し得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列とプライマー部位との間に A M B 配列を含むような順序で配置され得る。

10

【0206】

オリゴヌクレオチドは、融合配列の上流に定常配列を含むような順序で配置され得る。オリゴヌクレオチドは、プライマー部位の下流に定常配列を含むような順序で配置され得る。定常配列は、A I D 配列の上流または下流に位置し得る。定常配列は、A M B 配列の上流または下流に位置し得る。オリゴヌクレオチドは、融合配列とプライマー部位との間に定常配列を含むような順序で配置され得る。

20

【0207】

オリゴヌクレオチドは、A M B 配列および / または A I D 配列が、オリゴヌクレオチドの一方の末端、例えば、融合配列またはプライマー部位を含むオリゴヌクレオチドの末端に位置しないような順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、A I D 配列、A M B 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、A M B 配列、A I D 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。

【0208】

例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、A I D 配列、A M B 配列、定常配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、A M B 配列、A I D 配列、定常配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、定常配列、A I D 配列、A M B 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、定常配列、A M B 配列、A I D 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、定常配列、A M B 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、A I D 配列、定常配列、A M B 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、融合配列、A M B 配列、定常配列、A I D 配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。

30

【0209】

例えば、オリゴヌクレオチドは、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向かって伝わる、融合配列、A I D 配列、A M B 配列、定常配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの 5' 末端から 3' 末端へと、融合配列、A I D 配列、A M B 配列、定常配列およびプライマー部位の順序で配置され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、5' 末端融合配列、A I D 配列、A M B 配列、定常配列、および親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの親和性部分に（例えば、オリゴヌクレオチドの 3' 末端に付着させた抗体の一級アミン基を介して）付着させた 3' プライマー部位を、その順序で含み得る。

40

【0210】

親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート調製

本明細書に記載される方法および組成物において使用される親和性 - オリゴヌクレオチ

50

ドコンジュゲートは、任意の簡便な方法を使用して調製され得る。親和性部分は、オリゴヌクレオチドに直接的または間接的（例えば、リンカーを介して）にカップリングされ得る。親和性部分は、オリゴヌクレオチドに共有結合的に（例えば、化学的架橋結合を介して）または非共有結合的に（例えば、ストレプトアビシン - ビオチンを介して）カップリングされ得る。使用され得る種々の異なる親和性部分、近接ライゲーションアッセイのためのオリゴヌクレオチドの設計、および親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成するための親和性部分へのかかるオリゴヌクレオチドのカップリングを含む、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの設計および調製は、当技術分野で広く記載されている。当技術分野で記載される詳細および原理は、本発明の方法における使用のための親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの設計に適用され得る（例えば、WO 20071007743、ならびに米国特許第7,306,904号および同第6,878,515号を参照のこと）。 10

【0211】

オリゴヌクレオチドと親和性部分との間での直接的カップリング反応は、例えば、各々が、他方上の官能基と反応することが可能な官能基（例えば、置換基または化学的ハンドル（chemical handle））を有する場合に、利用され得る。官能基は、オリゴヌクレオチドもしくは親和性部分上に存在し得る、またはこれらの成分上に（例えば、酸化反応、還元反応、切断反応などを介して）導入され得る。核酸 / ポリペプチドコンジュゲートを產生するための方法は、記載されている（例えば、米国特許第5,733,523号を参照のこと）。 20

【0212】

オリゴヌクレオチドへのカップリングに使用され得る抗体またはポリペプチドの官能基には、炭水化物、アミノ酸のチオール基（HS-）、アミノ酸のアミン基（H₂N-）、およびアミノ酸のカルボキシ基が含まれるがこれらに限定されない。例えば、炭水化物構造は、アルデヒドへと酸化され、H₂NNH基含有化合物と反応させられて、官能基 - C = NH - NH - を形成し得る。例えば、チオール基は、チオール反応性基と反応させられて、チオエーテルまたはジスルフィドを形成し得る。例えば、タンパク質の遊離チオール基は、ネイティブシステイン残基中のジスルフィドのチオール化または開裂によって、タンパク質中に導入され得る。例えば、アミノ基（例えば、アミノ末端、またはリシン残基のオメガアミノ基の）は、求電子基（例えば、活性化カルボキシ基）と反応させられて、アミド基を形成し得る。例えば、カルボキシ基（例えば、カルボキシ末端、または二酸性（diacidic）アルファアミノ酸のカルボキシ基）は、活性化され、アミノ基と接触させられられて、アミド基を形成し得る。他の例示の官能基には、例えば、SPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなどが含まれる。 30

【0213】

例示の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、市販のキット（「All-in-One Antibody-Oligonucleotide Conjugation Kit」；SoluLink, Inc.）を使用して、親和性部分に共有結合的にカップリングされる。例えば、第1に、3' - アミノ - オリゴヌクレオチドが、スルホ - S - 4FB を用いて誘導体化され得る。第2に、親和性部分が、S - HyNic 基を用いて改変され得る。第3に、HyNic 改変された親和性部分は、4FB 改変されたオリゴヌクレオチドと反応させられて、ビス - アリールヒドラゾン媒介された親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを得ることができる。過剰な4FB 改変されたオリゴヌクレオチドは、磁性親和性マトリックスを介してさらに除去され得る。全体的な親和性部分の回収は、HyNic 改変された親和性部分および4FB 改変されたオリゴヌクレオチドを、少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%含まない。ビス - アリールヒドラゾン結合は、熱（例えば、94）およびpH（例えば、3 ~ 10）の両方に対して安定であり得る。 40

【0214】

連結基が使用される場合、かかるリンカーは、この連結基を介した親和性部分とオリゴ

ヌクレオチドとの共有結合付着または非共有結合付着を提供するために選択され得る。種々の適切なリンカーは、当技術分野で公知である。一部の実施形態では、このリンカーは、少なくとも約50または100ダルトン100ダルトンである。一部の実施形態では、このリンカーは、多くて約300；500；1,000；10,000または100,000ダルトンである。リンカーは、いずれかの末端において、オリゴヌクレオチドに結合することが可能な反応性官能性を有する官能基を含み得る。リンカーは、いずれかの末端において、親和性部分に結合することが可能な反応性官能性を有する官能基を含み得る。官能基は、オリゴヌクレオチド、親和性部分および／もしくはリンカー上に存在し得、またはこれらの成分上に（例えば、酸化反応、還元反応、切断反応などを介して）導入され得る。

10

【0215】

例示のリンカーには、ポリマー、脂肪族炭化水素鎖、不飽和炭化水素鎖、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、環式リンカー、非環式リンカー、炭水化物、エーテル、ポリアミン、および当技術分野で公知の他のものが含まれる。リンカーの例示の官能基には、求核性官能基（例えば、アミン、アミノ基、ヒドロキシ基、スルフヒドリル基、アミノ基、アルコール、チオールおよびヒドラジド）、求電子官能基（例えば、アルデヒド、エステル、ビニルケトン、エポキシド、イソシアネートおよびマレイミド）、および環化付加反応が可能な、ジスルフィド結合を形成することが可能な、または金属に結合することが可能な官能基が含まれる。例えば、リンカーの官能基は、一级アミン、二级アミン、ヒドロキサム酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、オキシカルボニルイミダゾール、ニトロフェニルエステル、トリフルオロエチルエステル、グリシジルエーテル、ビニルスルホン、マレイミド、アジドベンゾイルヒドラジド、N-[4-(p-アジドサリチルアミノ)ブチル]-3'-[2'-ピリジルジチオ]プロピオンアミド(N-[4-(p-azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridylidithio)propionamid)）、ビス-スルホスクシンイミジルスペレート、アジプイミド酸ジメチル、酒石酸ジスクシンイミジル、N-マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート、N-スクシンイミジル[4-アジドフェニル]-1,3'-ジチオプロピオネート、N-スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート、グルタルアルデヒド、およびスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPD P)、4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)などであり得る。

20

【0216】

他の実施形態では、親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、親和性部分をコードするベクターからin vitroで親和性部分を產生するなどの、親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを生じるin vitroプロトコールを使用して產生され得る。目的のかかるin vitroプロトコールの例には、以下が含まれる：Repaベースのプロトコール（例えば、Fitzgeraldら、Drug Discov Today(2000年)5巻：253～58頁およびWO9837186を参照のこと）、リボソームディスプレイベースのプロトコール（例えば、Hanesら、PNAS(1997年)94巻：4937～42頁；Robertsら、Curr Opin Chem Biol(1999年)6月；3巻：268～73頁；Schaffitzelら、J Immunol Methods(1999年)12月10日；231巻：119～35頁；およびWO9854312を参照のこと）など。

30

【0217】

核酸分子を抗体にコンジュゲートするための技術は、当技術分野で周知である（例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy(Reisfeldら編、Alan R. Liss, Inc.、1985年)；Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(Robinsonら編、Marcel Dekker, Inc.、第2版 19

40

50

87年) ; Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pincheraら編、1985年) ; 「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwinら編、Academic Press、1985年) ; およびThorpeら、1982年、Immunol. Rev. 62巻 : 119 ~ 58頁を参照のこと。例えば、PCT公開WO 89 / 12624もまた参照のこと)。例えば、核酸分子は、例えば、それぞれN-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはマレイミド官能性を介して、抗体上のリシンまたはシステインに共有結合的に付着され得る。

10

【0218】

標的抗原

親和性部分の標的抗原は、核酸分子であり得る、またはタンパク質性、例えば、標的タンパク質もしくはペプチドであり得る。標的抗原は、試料中の細胞上に存在する化合物または組成物であり得る。一部の実施形態では、標的抗原は、特に、ヒトなどの哺乳動物において、細胞媒介性免疫応答(即ち、適応免疫応答)を惹起することが可能な化合物または組成物であり得る。一部の実施形態では、標的抗原は、MHC分子との関連でT細胞によって認識され得る。標的抗原には、細胞、組織抽出物、組織または細胞溶解物、タンパク質、個々にまたは混合物としての、複数のタンパク質、ペプチド、ペプチドの混合物、脂質、炭水化物、糖などが含まれるがこれらに限定されない。標的抗原は、感染性疾患、自己免疫疾患またはがんなどの疾患の特徴であり得る。標的抗原は、例えば、ウイルス抗原、細菌抗原、がん抗原などであり得る。

20

【0219】

一部の実施形態では、標的抗原は、ウイルス抗原である。ウイルス抗原には、例えば、ウイルスコートタンパク質、インフルエンザウイルス抗原、HIV抗原、B型肝炎抗原またはC型肝炎抗原が含まれる。

【0220】

一部の実施形態では、標的抗原は、抗原が腫瘍またはがんと関連するように、腫瘍細胞またはがん細胞によって専らまたは優勢に発現または過剰発現されるがん抗原(例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物など)である。がん抗原は、がん抗原が、1つだけの型のがんまたは腫瘍と関連するまたはその特徴であるように、1つだけの型のがんまたは腫瘍のがん抗原であり得る。あるいは、がん抗原は、1つよりも多くの型のがんまたは腫瘍のがん抗原であり得る(例えば、その特徴であり得る)。例えば、がん抗原は、乳房がん細胞および前立腺がん細胞の両方によって発現され得、正常、非腫瘍もしくは非がん細胞によっては全く発現されない、または最小限にのみ発現される。がん抗原は、黒色腫がん抗原または乳房がん抗原であり得る。例示のがん抗原には、gp100、MART-1、NY-ESO-1、MAGEファミリーのタンパク質のメンバー、例えば、MAGE-A1、メソテリン、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、PMSA、Her-2およびp53からなる群のものが含まれる。

30

【0221】

標的抗原は、天然に、人工的に、合成によりまたは組換えにより產生され得る。したがって、標的抗原は、合成、組換え、単離されたおよび/または精製されたタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドであり得る。かかる抗原を作製または取得する方法は、当技術分野で公知である。例えば、ポリペプチドおよびタンパク質(例えば、抗原性ポリペプチドおよびタンパク質)をde novo合成する適切な方法は、Chanら、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis、Oxford University Press、Oxford、United Kingdom、2005年; Peptide and Protein Drug Analysis、Reid, R.編、Marcel Dekker, Inc.、2000年; Epitope Mapping、Westwoodら編、Oxford University Press、Oxford、United Kingdom、2000年; および米国特許第5,449,752号に記載されている。また、ポリペプチドおよびタンパク質(例えば、抗原性ポリペプチドおよびタン

40

50

パク質)は、標準的な組換え方法を使用して、そのポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸を使用して組換え產生され得る。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning:

A Laboratory Manual、第3版 Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、N.Y. 2001年；およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons、NY、1994年を参照のこと。多くの抗原のヌクレオチド配列は、当技術分野で公知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) ウェブサイトの GenBank データベースから入手可能である。さらに、抗原は、供給源、例えば、植物、細菌、昆虫、哺乳動物、例えば、ラット、ヒトなどから単離および/または精製され得る。単離および精製の方法は、当技術分野で周知である。

10

【0222】

抗原は、遊離抗原、例えば、未結合の抗原性ペプチド(例えば、遊離ペプチド)であり得る、または結合した抗原、例えば、ペプチドでパルスした担体細胞によって提示される MHC - ペプチド四量体または抗原性ペプチドであり得る。

【0223】

一部の実施形態では、標的分析物は、膜結合型タンパク質である。一実施形態では、この膜結合型タンパク質は、単一の膜貫通(TM)ドメインを有する古典的I型膜タンパク質CD4である(Carrら、(1989年)J. Biol. Chem. 264巻：21286～95頁)。別の実施形態では、この膜結合型タンパク質は、複数回膜貫通Gタンパク質共役受容体(GPCR)膜タンパク質GPR77である(CainおよびMonk、(2002年)J. Biol. Chem. 277巻：7165～69頁)。

20

【0224】

さらなる例示の膜結合型タンパク質には、GPCR(例えば、アドレナリン受容体、アンジオテンシン受容体、コレシストキニン受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体、ニューロテンシン受容体、ガラニン受容体、ドパミン受容体、オピオイド受容体、セロトニン(erotonin)受容体、ソマトスタチン受容体など)、イオンチャネル(例えば、ニコチン性アセチルコリン受容体、ナトリウムチャネル、カリウムチャネルなど)、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリン/スレオニンキナーゼ、受容体グリアニル酸シクラーゼ、増殖因子およびホルモン受容体(例えば、上皮増殖因子(EGF)受容体)などが含まれるがこれらに限定されない。膜結合型タンパク質の変異体または改変されたバリアントもまた使用され得る。例えば、GPCRの一部の単一または複数の点変異は、機能を保持し、疾患に関する(例えば、Stadelら、(1997年)Trends in Pharmacological Review 18巻：430～37頁を参照のこと)。

30

【0225】

单一の細胞の特徴付け、細胞ポリヌクレオチドバーコード化、および鎖の対合

本明細書に記載される方法は、親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを利用して細胞を特徴付けることを含み得る。複数の細胞は、1つまたは複数の親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートに接触させられ得る。細胞は、未結合のコンジュゲートを除去するために洗浄され得る。細胞は、ベッセル中で单一の細胞として単離され得る。単離された細胞に結合した親和性-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、例えば、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを、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によって、ベッセルバーコード配列を含むように改変され得る。

40

【0226】

ベッセルバーコードを有するポリヌクレオチドは、ベッセルの形成の間にも導入され得る。これらのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、ベッセルバーコードを含む各オリゴヌクレオチドが、それらが存在するベッセルに対応する固有の正体コードを含むよう、ディジエネレートバーコードを保有し得る。

【0227】

オリゴヌクレオチドは、增幅され得、反応の增幅された産物は、ベッセルから回収され得る。増幅された産物は、次世代シークエンシング(NGS)タグを付加するためにPC

50

R 富化され得る。ライプラリーは、ハイスループット配列決定プラットフォームを使用して配列決定され得、その後、ベッセルバーコード配列および / または A I D 配列および / または A M B 配列が分析され得る。各単一の細胞は、そのそれぞれのベッセル中で単離されるので、2回観察された各ベッセルバーコードについて、配列決定された増幅されたオリゴヌクレオチド産物は、同じベッセルに起源し、したがって、固有の単一の細胞に起源した。オリゴヌクレオチドの各 A I D は、それが付着される親和性 - 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、各単一の細胞は、そのそれぞれのベッセル中で単離されるので、同じベッセルバーコードを含む配列について観察された各 A I D について、配列決定された増幅されたオリゴヌクレオチド産物は、同じベッセル中の単一の細胞に結合した特定の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに起源した。
 同じベッセルバーコードを全てが含む配列のセットの中で個々に観察された各異なる A M B について、配列決定されたセット中の A M B を有する増幅されたオリゴヌクレオチド産物は、同じベッセル中の細胞に結合した、例えば、単一細胞ベッセルが使用される場合にはベッセル中の単一の細胞に結合した単一の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の（他の個々の A M B と比較して）異なる単一のオリゴヌクレオチド部分に起源した。観察された各単一の A M B について、同じベッセルバーコードを含む配列を有する全ての増幅されたオリゴヌクレオチド産物は、単一の（同じ）親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分に起源した（例えば、P C R 重複またはアンブリコンを示す）。したがって、特定の A M B および特定のベッセルバーコードの所与の組合せを用いて観察された各オリゴヌクレオチドは、単一の細胞に結合した親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの単一の分子を示す；したがって、かかる A M B / ベッセルバーコード組合せを有する配列決定された複数のオリゴヌクレオチドの所与の数（例えば、2、3、4 またはそれよりも多い）の検出は、例えば、アッセイした細胞集団または試料内の単一の細胞に結合した親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの数（例えば、2、3、4 またはそれよりも多い）を示す。したがって、かかる数は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの所与の親和性部分が結合するように設計される、細胞上の分子の数、例えば、単一の細胞上または単一の細胞中で発現されたコピーの数を示し得る。
 10
 20

【0228】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞に由来するポリヌクレオチド、および / またはベッセル中の、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートとは別個であり、その部分もしくはコピーとは別個のポリヌクレオチドをバーコード化することをさらに含む。例えば、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合するまたは結合した、ベッセル中にカプセル化された単一の細胞は、溶解され得、さらなるポリヌクレオチド、例えば、単一の細胞由来のまたは単一の細胞内のポリヌクレオチドが、バーコード化され得る。一部の実施形態では、ベッセル中の親和性 - 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、例えば、ベッセル中の単一の細胞に結合するもしくは結合されたオリゴヌクレオチド部分、および / またはそのコピーもしくは増幅された産物は、ベッセルバーコード配列を用いてバーコード化され得る。一部の実施形態では、単一の細胞由来の 1 つまたは複数の細胞ポリヌクレオチドは、同じベッセルバーコード化配列を用いてバーコード化され得；かかるさらなる 1 つまたは複数の細胞ポリヌクレオチドは、一部の実施形態では、分子バーコードを用いてさらにバーコード化される。
 30
 40

【0229】

T 細胞受容体鎖ペアおよび抗体免疫グロブリン鎖ペアは、免疫受容体の両方の型である。一部の実施形態では、細胞ポリヌクレオチドは、抗体免疫グロブリン鎖（または部分）コードポリヌクレオチドであり；一部の実施形態では、これは、T C R（または部分）コードポリヌクレオチドである、またはそれを含む。一部の実施形態では、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートによって結合される抗原は、T C R もしくは抗体またはその鎖もしくは部分である。一態様では、本明細書に記載される方法は、ハイスループット配列決定および診断学のためのポリヌクレオチドライプラリーを生成することをさらに含む。一態様では、本明細書に記載される方法は、特定の共通の性状を有する患者またはコホ
 50

ートからの抗体および / または T C R 発見のためのヒト由来のライプラリーパネルを開発することをさらに含む。開示された発明は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用する単一の細胞の特徴付けと一緒に、複数の異なる型の対合した可変配列、例えば、T 細胞受容体鎖ペアおよび抗体免疫グロブリン鎖ペアに適用され得る。例えば、細胞ポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド、例えば、重鎖および / もしくは軽鎖、例えば、 V_H および / もしくは V_L 抗体鎖ならびに / またはアルファおよび / もしくはベータおよび / もしくはガンマおよび / もしくはデルタ鎖、例えば、 V_H/V_L および V_H/V_L T 細胞受容体 (T C R) 鎖 (例えば、そのフレームワーク部分に由来するもの) は、ベッセルの形成の間に導入され得る (または、ベッセル内に含まれ得る)。ベッセルバーコードを有するポリヌクレオチドもまた、ベッセルの形成の間に導入され得る (または、ベッセル内に含まれ得る)。これらのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドは、ベッセルバーコードを含む各細胞ポリヌクレオチドが、反応 (単数または複数) の間に、それが存在するベッセルに対応する固有の正体コードを含むように、ディジエネレートバーコードを保有し得る。したがって、一部のかかる実施形態では、同じ固有の正体コードを有する複数のポリヌクレオチドは、同じベッセルに起源していると考えられ、したがって、一部の態様では、単一の細胞に起源していると考えられる。分子バーコードを有する複数のポリヌクレオチドもまた、ベッセルの形成の間に導入され得る、または、ベッセル中に含まれ得る。これらの分子バーコード化ポリヌクレオチドは、分子バーコードを含む各細胞ポリヌクレオチド分子が、それらが由来する単一の細胞ポリヌクレオチド分子に対応する固有の正体コードを含むように、ディジエネレートバーコードを保有し得る。数百万の単一の免疫細胞が、エマルジョンの内側で溶解され得、細胞転写物、例えば、 V_H および V_L ならびに / または V_H/V_L および / もしくは V_H/V_L 鎖転写物は、プライマーを使用して逆転写またはコピーされ得、その後、ベッセルバーコードおよび分子バーコードでタグ化され得、バーコード化ポリヌクレオチドが P C R 増幅され得る。単一の免疫細胞 (例えば、B 細胞または T 細胞) から生じる各 V_H および V_L ならびに / または V_H/V_L および / もしくは V_H/V_L 鎖は事実上、同じベッセルバーコード正体を有して、互いに連結され得る。

【 0 2 3 0 】

次いで、 V_H および V_L ならびに / または V_H/V_L および / もしくは V_H/V_L 鎖は、次世代シークエンシング (N G S) タグを付加するために、ベッセルから回収され得、P C R 富化され得る。ライプラリーは、ハイスループット配列決定プラットフォームを使用して配列決定され得、その後、レパートリー多様性の分析、抗体頻度、C D R 3 特徴付け、体細胞超変異系統発生分析などがなされ得る。正確にマッチさせた V_H および V_L ならびに / または V_H/V_L および / もしくは V_H/V_L ペアのデータベースは、ベッセルおよび分子バーコード配列をデコンボリューションすることによって生成され得る。各単一の免疫細胞は、そのそれぞれのベッセル中で単離されるので、2 回観察された各ベッセルバーコードについて、配列決定された転写物は、同じエマルジョン液滴に起源し、したがって、固有の単一の細胞に起源した。同じベッセルバーコードを含む配列について、観察された各異なる分子バーコードについて、配列決定された転写物は、単一の細胞由来の異なる転写物分子に起源した。同じベッセルバーコードを含む配列について、観察された各同じ分子バーコードについて、配列決定された転写物は、単一の細胞由来の同じ転写物分子 (例えば、P C R 重複) に起源した。

【 0 2 3 1 】

配列決定と並行して、ベッセルから回収された V_H および V_L ならびに / または V_H/V_L および / もしくは V_H/V_L 鎖のライプラリーは、抗体発現ベクター中にクローニングされ得、酵母ディスプレイスクリーニングのために共トランスクレプトされ得る。この同一のライプラリープールをクローニングすることは、開始時に生物学的試料を分割することと比較して好ましい方法であるが、それは、一部の稀な免疫細胞が、一方のアッセイまたは他方のアッセイのみにおいて捕捉されるからである。ヒト由来の V_H および V_L ならびに / または V_H/V_L および V_H/V_L 鎖のライプラリーは、古

典型的なディスプレイアッセイと同様、対のマッチングが正確か不正確かに関わらず発現され得る。次いで、酵母ディスプレイが、潜在的抗体候補について富化するために、1つまたは複数の抗原標的に対して実行され得る。

【0232】

酵母ディスプレイなどのディスプレイ技術から出現する陽性候補抗体は、配列決定され得、マッチさせた対のバーコードデータベースに対して問い合わせられ得る。各酵母ディスプレイされた V_H および／または V_L および／または V_L 鎖は、それぞれ、そのそれぞれの V_L または V_L 鎖に再びマッチされ得、各酵母が提示した V_L および／または V_L および／または V_L 鎖は、それぞれ、そのそれぞれの V_H または V_L 鎖に再びマッチされ得る。これらの正確に対応した候補は、哺乳動物細胞株において合成および発現され、目的の標的に対して機能的に検証される遺伝子であり得る。これらの候補は、完全ヒト抗体および／またはTCRであり得る。10

【0233】

試料

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドを含有する任意の試料を、本明細書に記載の方法で使用することができる。一般的に、細胞を含有する任意の試料を、本明細書に記載の方法で使用することができる。例えば、試料は、対象に由来する生物学的試料であってもよく、または対象に由来し、RNAもしくはDNAを含有する試料であってもよい。ポリヌクレオチドは、生物学的試料から抽出してもよく、または試料は、ポリヌクレオチドを抽出または精製せずに、本方法に直接供してもよい。試料は、抽出または単離されたDNAまたはRNAであってもよい。また、試料は、生物学的検体から抽出された全RNAもしくはDNA、cDNAライブラリー、ウイルス、またはゲノムDNAであってもよい。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、タンパク質、脂質、および非鑄型核酸等の様々な他の成分を含有する生物学的試料から単離される。核酸鑄型分子は、動物、植物、細菌、真菌、または任意の他の細胞性生物から得られる任意の細胞性物質から得ることができる。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、単一細胞から得られる。ポリヌクレオチドは、直接的に生物から、または生物から得られる生物学的試料から得ることができる。任意の組織または体液検体を、本発明で使用される核酸の供給源として使用することができる。また、ポリヌクレオチドは、初代細胞培養または細胞株等の培養細胞から単離してもよい。鑄型核酸がそこから得られる細胞または組織は、ウイルスまたは他の細胞内病原体に感染していてもよい。20

【0234】

ある特定の実施形態では、抗体またはTCR産出免疫細胞を、免疫されているか、または感染症、がん、自己免疫状態、もしくは任意の他の疾患を罹患しているヒトまたは他の動物等の、ヒトまたは他の動物等の対象または宿主の血液または他の生物学的試料から単離して、臨床的に重要である可能性がある、病原体特異的、腫瘍特異的、および／または疾患特異的な抗体またはTCRを識別することができる。例えば、ヒトは、疾患有すると診察されていてもよく、疾患の症状を示しているが、疾患有すると診察されていてもよく、または疾患の症状を示していないなくてもよい。例えば、ヒトは、感染因子（例えば、ウイルス、細菌、寄生動物、プリオン等）、抗原、もしくは疾患に曝されたヒト、および／または感染因子（例えば、ウイルス、細菌、寄生動物、プリオン等）、抗原、もしくは疾患に対する有用な抗体またはTCRを作ることができるヒトであってもよい。例えば、動物は、感染因子（例えば、ウイルス、細菌、寄生動物、プリオン等）、抗原、もしくは疾患に曝された動物、および／または感染因子（例えば、ウイルス、細菌、寄生動物、プリオン等）、抗原、もしくは疾患に対する有用な抗体またはTCRを作ることができる動物であってもよい。免疫された宿主に由来するある特定の免疫細胞は、問題となっている1つもしくは複数の標的抗原および／または1つもしくは複数の未知抗原に対する抗体またはTCRを作る。本発明では、リンパ球プールは、抗体鎖が配列決定されるか、抗体が作られるか、または発現ライブラリーが作られる前に、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）、磁気活性化細胞ソーティング（MACS）を使用した細胞のスクリーニン304050

グおよびソーティング、パニング法、または免疫細胞ライブラリー等の、試料に由来する複数の免疫細胞を生成するための他のスクリーニング方法等の、任意の好適な方法により所望の免疫細胞を濃縮することができる。異なる抗体を発現する免疫細胞のほんの少数のサブセット、したがって可変ドメインのほんの少数の天然由来の組合せを提供するに過ぎない従来技術の濃縮方法とは対照的に、本発明の免疫細胞ライブラリーは、異なる抗体またはT C R を発現する個々の免疫細胞の少なくとも 2 つのサブセットを含有する。例えば、本発明の免疫細胞ライブラリーは、異なる抗体またはT C R を発現する個々の免疫細胞の、少なくとも 5 、 10 、 100 、 250 、 500 、 750 、 1000 、 2500 、 5000 、 10000 、 25000 、 50000 、 75000 、 100000 、 250000 、 500000 、 750000 、 1000000 、 2500000 、 5000000 、 7500000 、または 10000000 個のサブセットを含有していてもよい。本発明の方法は、免疫細胞回収を最大化し、非常に高度な多様性をもたらす。

【 0235 】

T 細胞は、末梢血液単核細胞、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、リンパ節組織、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓組織、または任意の他のリンパ組織、および腫瘍を含む、いくつかの供給源から得ることができる。T 細胞は、T 細胞株から、および自己由来または同種異系の供給源から得ることができる。T 細胞は、単一の個体または個体の集団、例えば、全てが、がんまたは感染症等の同じ疾患を罹患している個体の集団から得てもよい。一部の実施形態では、個体の循環血液に由来する細胞が、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシスにより得られる。アフェレーシス産物は、典型的には、T 細胞、单球、顆粒球、B 細胞、他の有核白血球細胞、赤血球細胞、および血小板を含む、リンパ球を含有する。一実施形態では、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシスにより収集した細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、細胞を、その後の処理ごとに適切な緩衝液または培地に配置してもよい。本発明の一実施形態では、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で細胞を洗浄する。代替的な実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠如しており、マグネシウムを欠如していてもよく、または全てではないが、多くの 2 価カチオンを欠如していてもよい。当業者であれば直ちに理解するように、洗浄ステップは、半自動「フロースル」遠心分離機を使用すること等の、当業者に公知の方法により達成することができる。洗浄後、細胞を、例えば、Ca⁺⁺ / Mg⁺⁺ を含まない P B S 等の、様々な生体適合性緩衝液に再懸濁してもよい。あるいは、アフェレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁してもよい。他の実施形態では、T 細胞は、赤血球細胞を溶解し、PERCOLL (商標) 勾配で遠心分離することにより、末梢血リンパ球から単離される。CD 28⁺ 、 CD 4⁺ 、 CD 8⁺ 、 CD 45 RA⁺ 、および CD 45 RO⁺ T 細胞等の T 細胞の特定の部分集団を、ポジティブまたはネガティブ選択技法により、さらに単離してもよい。例えば、CD 3⁺ 、 CD 28⁺ T 細胞は、CD 3 / CD 28 コンジュゲート磁気ビーズ (例えば、DYNABEADS (登録商標) M - 450 CD 3 / CD 28 T Cell Expander) を使用して、ポジティブ選択することができる。一部の実施形態では、ネガティブ選択による T 細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択された細胞に固有な表面マーカーに対する抗体を組み合わせて達成することができる。1 つのそのような方法は、ネガティブ選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルが使用されるネガティブ磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティングおよび / またはセル選択法である。例えば、ネガティブ選択により CD 4⁺ 細胞を濃縮するため、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD 14 、 CD 20 、 CD 11 b 、 CD 16 、 H L A - D R 、および CD 8 に対する抗体を含む。刺激用の T 細胞を調製するための別の方法は、洗浄ステップ後に細胞を凍結することであり、これには、单球除去ステップが必要とされない。理論に束縛されることは望まないが、凍結およびその後の解凍ステップは、細胞集団中の顆粒球およびある程度までは单球を除去することにより、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄ステップの後、細胞を、凍結用溶液に懸濁してもよい。多くの凍結用溶液およびパラメータが当技術分野で公知であり、それらは、本状況で有用となるだろうが、1 つの方法は

10

20

30

40

50

、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン(HSA)を含有するPBSまたは他の好適な細胞凍結用培地を使用することを含む。その後、これを、DMSOおよびHSAの終濃度がそれぞれ10%および4%となるように培地で1:1に希釈する。その後、細胞を、毎分1度-80に凍結し、液体窒素貯蔵タンクの気相に保管する。

【0236】

一部の実施形態では、非免疫ヒトドナーまたは非ヒトドナーに由来する免疫細胞が利用される。動物のナイープレパートリー(抗原負荷前のレパートリー)は、中程度の親和性(約 1×10^{-6} ~ 1×10^{-7} MのK_A)で本質的にあらゆる非自己分子に結合することができる抗体またはTCRを動物に提供する。抗体またはTCR結合部位の配列多様性は、生殖系列に直接にはコードされていないが、V遺伝子セグメントからコンビナトリアル様式でアセンブルされる。免疫処置は、上述のような、免疫原に結合して増殖し(クローン拡大)、対応する抗体を分泌するV_H-V_LまたはV_H-V_HまたはV_L-V_L組合せを作る任意の免疫細胞を誘発する。しかしながら、免疫されていない対象に由来する脾臓細胞および/または免疫細胞もしくは他の末梢血リンパ球(PBL)を使用することにより、考え得る抗体またはTCRレパートリーのより良好な提示を提供することができ、また、その後、任意の動物種を使用してB細胞またはT細胞抗体またはTCRライブラリーを構築することを可能にする。10

【0237】

一部の場合では、試験に十分な核酸を得るために、少なくとも0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、20、25、30、35、40、45、または50mLの血液容積を採取する。20

【0238】

一部の場合では、出発物質は末梢血である。末梢血細胞は、特定の細胞タイプ(例えば、単核細胞、赤血球細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、免疫細胞、T細胞、またはNK細胞等)を濃縮することができる。また、末梢血細胞は、特定の細胞タイプ(例えば、単核細胞、赤血球細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、免疫細胞、T細胞、またはNK細胞等)を選択的に枯渇させることができる。

【0239】

一部の場合では、出発物質は、固体組織を含む組織試料であってもよく、非限定的な例としては、脳、肝臓、肺、腎臓、前立腺、卵巣、脾臓、リンパ節(扁桃腺を含む)、甲状腺、脾臓、心臓、骨格筋、腸、喉頭、食道、および胃が挙げられる。他の場合では、出発物質は、核酸を含有する細胞、免疫細胞、および特にB細胞またはT細胞であってもよい。一部の場合では、出発物質は、遺伝物質を得ることができる、任意の生物に由来する、核酸を含有する試料であってもよい。一部の場合では、試料は、流体、例えば、血液、唾液、リンパ液、または尿である。30

【0240】

試料は、ある状態を有する対象から採取することができる。一部の場合では、試料が採取される対象は、患者、例えば、がん患者、またはがんを有する疑いのある患者であってもよい。対象は、哺乳動物、例えばヒトであってもよく、雄または雌であってもよい。一部の場合では、雌は妊娠している。試料は、腫瘍生検であってもよい。生検は、例えば、医師、医師助手、看護師、獣医、歯科医、脊椎指圧師、医療補助員、皮膚科医、がん専門医、胃腸科専門医、または外科医を含む医療従事者により実施されてもよい。40

【0241】

一部の場合では、非核酸物質を、酵素処理(プロテアーゼ消化等)を使用して出発物質から除去してもよい。

【0242】

一部の場合では、EDTAを含むがそれに限定されないマグネシウムキレート剤を含有する装置内に血液を収集し、4度で保管する。任意選択で、EGTAを含むがそれに限定されないカルシウムキレート剤を添加してもよい。別の場合では、これらに限定されないが、ホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド誘導体、ホルマリン、グルタルアルデヒド、グ50

ルタルアルデヒド誘導体、タンパク質架橋剤、核酸架橋剤、タンパク質および核酸架橋剤、第一級アミン反応性架橋剤、スルフヒドリル反応性架橋剤、スルフヒドリル付加またはジスルフィド還元、炭水化物反応性架橋剤、カルボキシリ反応性架橋剤、光反応性架橋剤、または切断可能架橋剤を含む、細胞溶解阻害剤を血液に添加する。

【0243】

一部の場合では、抽出された物質が、一本鎖RNA、二本鎖RNA、またはDNA-RNAハイブリッドを含む場合、これら分子は、本分野で公知の技法を使用して二本鎖DNAに変換することができる。例えば、逆転写酵素を用いて、RNA分子からDNAを合成してもよい。一部の場合では、RNAのDNAへの変換は、リンカー断片をRNAにライゲーションさせる事前ライゲーションステップを必要とする場合があり、ユニバーサルプライマーを使用することにより、逆転写の開始が可能になる。他の場合では、例えば、mRNA分子のポリAテールを使用して、逆転写を開始させることができる。DNAへの変換後、一部の場合では、本明細書に詳述されている方法を使用して、所望の配列をさらに捕捉、選択、タグ化、または単離することができる。

【0244】

核酸分子としては、デオキシリボ核酸(DNA)および/またはリボ核酸(RNA)が挙げられる。核酸分子は、合成であってもよく、または天然由来の供給源に由来してもよい。一実施形態では、核酸分子は、タンパク質、脂質、および非鑄型核酸等の様々な他の成分を含有する生物学的試料から単離される。核酸鑄型分子は、動物、植物、細菌、真菌、または任意の他の細胞性生物から得られる任意の細胞性物質から得ることができる。ある特定の実施形態では、核酸分子は、単一細胞から得られる。本発明で使用される生物学的試料としては、ウイルス粒子または調製物が挙げられる。核酸分子は、直接的に生物から、または生物から得られる生物学的試料、例えば、血液、尿、脳脊髄液、精液、唾液、痰、糞便、および組織から得ることができる。任意の組織または体液検体を、本発明で使用される核酸の供給源として使用することができる。また、核酸分子は、初代細胞培養または細胞株等の培養細胞から単離してもよい。鑄型核酸がそこから得られる細胞または組織は、ウイルスまたは他の細胞内病原体に感染していてもよい。

【0245】

また、試料は、生物学的検体から抽出される全RNA、cDNAライブラリー、ウイルス、またはゲノムDNAであってもよい。ある特定の実施形態では、核酸分子は、タンパク質、酵素、基質、抗体、結合材、ビーズ、小分子、ペプチド、または任意の他の分子等の他の標的分子に結合されている。一般的に、核酸は、SambrookおよびRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor、N.Y. (2001年)に記載されているもの等の様々な技法により生物学的試料から抽出することができる。核酸分子は、一本鎖、二本鎖、または一本鎖領域を有する二本鎖(例えば、ステムおよびループ構造)であってもよい。

【0246】

DNA抽出法は、当技術分野で周知である。古典的なDNA単離プロトコールは、フェノールおよびクロロホルムの混合物等の有機溶媒を使用して抽出し、その後エタノールで析出させることに基づく(J. Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989年、第2版、Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York、N.Y.)。他の方法としては、以下のものが挙げられる: 塩析DNA抽出法(P. Sunnucksら、Genetics、1996年、144巻: 747~756頁; S. M. Aljanabiら、Nucl. Acids Res.、1997年、25巻: 4692~4693頁)、トリメチルアンモニウム臭化物塩DNA抽出法(S. Gustincichら、BioTechniques、1991年、11巻: 298~302頁)、およびグアニジウムチオシアネートDNA抽出法(J. B. W. Hammondら、Biochemistry、1996年、240巻: 298~300頁)。生物学的試料からDNAを抽出するための様々なキットが、商業的に入手可能である(例えば、BD Biosciences Clontech(パロアルト、カリフォルニア州): Epicentre Technologies(マディソン、ウィスコンシン州); Gentra

10

20

30

40

50

Systems, Inc. (ミネアポリス、ミネソタ州) ; MicroProbe Corp. (ボセル、ワシントン州) ; Organon Teknika (ダーラム、ノースカロライナ州) ; および Qiagen Inc. (バレンシア、カリフォルニア州)) 。

【0247】

また、RNA抽出法は、当技術分野で周知であり（例えば、J. Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989年、第211版、Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York）、および体液からRNAを抽出するためのキットは、商業的に入手可能である（例えば、Ambion, Inc. (オースティン、テキサス州) ; Amersham Biosciences (ピスカタウエイ、ニュージャージー州) ; BD Biosciences Clontech (パロアルト、カリフォルニア州) ; Biotech Laboratories (ハーキュリーズ、カリフォルニア州) ; Dynal Biotech Inc. (レークサクセス、ニューヨーク州) ; Epicentre Technologies (マディソン、ウィスコンシン州) ; Gentra Systems, Inc. (ミネアポリス、ミネソタ州) ; GIBCO BRL (ゲイサーーズバーグ、メリーランド州) ; Invitrogen Life Technologies (カールズバッド、カリフォルニア州) ; MicroProbe Corp. (ボセル、ワシントン州) ; Organon Teknika (ダーラム、ノースカロライナ州) ; Promega, Inc. (マディソン、ウィスコンシン州) ; および Qiagen Inc. (バレンシア、カリフォルニア州) ）。

【0248】

1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の供給源に由来していてもよい。1つまたは複数の試料は、2つまたはそれよりも多くの供給源に由来していてもよい。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の対象に由来していてもよい。1つまたは複数の試料は、2つまたはそれよりも多くの対象に由来していてもよい。1つまたは複数の試料は、同じ対象に由来していてもよい。1つまたは複数の対象は、同じ種に由来していてもよい。1つまたは複数の対象は、異なる種に由来していてもよい。1つまたは複数の対象は、健常であってもよい。1つまたは複数の対象は、疾患、障害、または状態により影響を受けていてもよい。

【0249】

一部の実施形態では、試料は、血液、唾液、リンパ液、尿、脳脊髄液、精液、痰、糞便、または組織ホモジネート等の流体である。

【0250】

試料は、ある状態を有する対象から採取されてもよい。一部の実施形態では、試料が採取される対象は、患者、例えば、がん患者、またはがんを有する疑いのある患者であってもよい。対象は、哺乳動物、例えばヒトであってもよく、雄または雌であってもよい。一部の実施形態では、雌は妊娠している。試料は、腫瘍生検であってもよい。生検は、例えば、医師、医師助手、看護師、獣医、歯科医、脊椎指圧師、医療補助員、皮膚科医、がん専門医、胃腸科専門医、または外科医を含む医療従事者により実施されてもよい。

【0251】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、タンパク質、酵素、基質、抗体、結合材、ビーズ、小分子、ペプチド、または任意の他の分子等の他の標的分子に結合されている。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、固体支持体に結合されていない。核酸は、様々な技法により生物学的試料から抽出することができる（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor、N.Y. (2001年)）。

【0252】

一部の実施形態では、試料は唾液である。一部の実施形態では、試料は全血である。一部の場合では、試験に十分な量のポリヌクレオチドを得るために、少なくとも約0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、20、25、30、35、40、45、または50mLの血液容積を採取する。一部の実施形

10

20

30

40

50

態では、血液は、EDTAを含むがそれに限定されないマグネシウムキレート剤を含有する装置内に収集することができ、4で保管される。任意選択で、EGTAを含むがそれに限定されないカルシウムキレート剤を添加してもよい。

【0253】

一部の実施形態では、これらに限定されないが、ホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド誘導体、ホルマリン、グルタルアルデヒド、グルタルアルデヒド誘導体、タンパク質架橋剤、核酸架橋剤、タンパク質および核酸架橋剤、第一級アミン反応性架橋剤、スルフヒドリル反応性架橋剤、スルフヒドリル付加またはジスルフィド還元、炭水化物反応性架橋剤、カルボキシル反応性架橋剤、光反応性架橋剤、または切断可能架橋剤を含む、細胞溶解阻害剤を血液に添加する。一部の実施形態では、非核酸物質を、酵素処理（プロテアーゼ消化等）を使用して出発物質から除去してもよい。10

【0254】

複数の試料は、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100個、またはそれよりも多くの試料を含んでいてもよい。複数の試料は、少なくとも約100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000個、またはそれよりも多くの試料を含んでいてもよい。複数の試料は、少なくとも約1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000個の試料、9000、または10,000個の試料、または100,000個の試料、または1,000,000個、またはそれよりも多くの試料を含んでいてもよい。複数の試料は、少なくとも約10,000個の試料を含んでいてもよい。20

【0255】

第1の試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドは、第2の試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドと異なっていてもよい。第1の試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドは、複数の試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドと異なっていてもよい。試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドは、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を含んでいてもよい。一部の実施形態では、試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドは、約100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つ未満のヌクレオチドまたは塩基対が異なっていてもよい。複数の試料の1つまたは複数の試料中の複数のポリヌクレオチドは、2つまたはそれよりも多くの同一配列を含んでいてもよい。複数の試料の1つまたは複数中の総ポリヌクレオチドの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%が、同じ配列を含んでいてもよい。複数の試料の1つまたは複数の試料中の複数のポリヌクレオチドは、少なくとも2つの異なる配列を含んでいてもよい。複数の試料の1つまたは複数中の総ポリヌクレオチドの少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、少なくとも2つの異なる配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、互いのバリアントである。例えば、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、遺伝子多型または他のタイプの突然変異を含有していてもよい。別の例では、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、スプライスバリアントである。30

【0256】

第1の試料は、1つまたは複数の細胞を含んでいてもよく、第2の試料は、1つまたは複数の細胞を含んでいてもよい。第1の試料の1つまたは複数の細胞は、第2の試料の1つまたは複数の細胞と同じ細胞タイプであってもよい。第1の試料の1つまたは複数の細40

胞は、複数の試料の1つまたは複数の異なる細胞と異なる細胞タイプであってもよい。

【0257】

複数の試料は、同時的に得てもよい。複数の試料は、同時に得ることができる。複数の試料は、順次得ることができる。複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから年単位の経過にわたって、例えば、100年、10年、5年、4年、3年、2年、または1年にわたって得ることができる。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから約1年以内に得ることができる。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから12か月、11か月、10か月、9か月、8か月、7か月、6か月、4か月、3か月、2か月、または1か月以内に得ることができる。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから30日、28日、26日、24日、21日、20日、18日、17日、16日、15日、14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日、2日、または1日以内に得ることができる。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから約24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、2時間、または1時間以内に得ることができる。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから約60秒、45秒、30秒、20秒、10秒、5秒、2秒、または1秒以内に得ることができる。1つまたは複数の試料は、1つまたは複数の異なる試料を得てから1秒未満以内に得ることができる。

【0258】

試料の異なるポリヌクレオチドは、異なる濃度または量（例えば、異なる数の分子）で試料中に存在していてもよい。例えば、1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、試料中の別のポリヌクレオチドの濃度または量よりも多くてもよい。一部の実施形態では、試料中の少なくとも1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、試料中の少なくとも1つの他のポリヌクレオチドの濃度または量よりも、少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000倍、またはそれよりも大きな倍率で多くてもよい。別の例では、1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、試料中の別のポリヌクレオチドの濃度または量よりも少なくてよい。試料中の少なくとも1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、試料中の少なくとも1つの他のポリヌクレオチドの濃度または量よりも、少なくて約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000分の1、またはそれよりも大きな倍率で少なくてよい。

【0259】

一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くの試料は、異なる量または濃度のポリヌクレオチドを含有していてもよい。一部の実施形態では、1つの試料中の1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、異なる試料中の同じポリヌクレオチドの濃度または量よりも多くてもよい。例えば、血液試料は、尿試料よりも多くの量の特定のポリヌクレオチドを含有する場合がある。あるいは、単一の試料は、2つまたはそれよりも多くのサブ試料に分けることができる。サブ試料は、異なる量または濃度の同じポリヌクレオチドを含有していてもよい。1つの試料中の少なくとも1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、別の試料中の同じポリヌクレオチドの濃度または量よりも、少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000倍、またはそれよりも大きな倍率で多くてもよい。あるいは、1つの試料中の1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、異なる試料中の同じポリヌクレオチドの濃度または量よりも少なくてよい。例えば、1つの試料中の少なくとも1つのポリヌクレオチドの濃度または量は、別の試料中の同じポリヌクレオチドの濃度または量よりも、少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8

、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000分の1、またはそれよりも大きな倍率で少なくともよい。

【0260】

標的ポリヌクレオチド

一部の場合では、本明細書で提供されている方法は、細胞に由来するポリヌクレオチド分子、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、またはそれらのアンプリコン等の標的ポリヌクレオチド分子を増幅および配列決定することに関する。一部の場合では、本明細書で提供されている方法は、標的ポリヌクレオチド分子の少なくとも1つの領域を増幅および配列決定することに関する。一部の場合では、本明細書で提供されている方法は、少なくとも1つの標的ポリヌクレオチド分子を増幅および配列決定することに関する。一様では、標的ポリヌクレオチドは、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である。一様では、標的ポリヌクレオチドは、RNAである。一部の実施形態では、標的RNAポリヌクレオチドは、mRNAである。一部の実施形態では、標的RNAポリヌクレオチドは、ポリアデニル化されている。一部の実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、ポリアデニル化されていない。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、DNAポリヌクレオチドである。例えば、標的ポリヌクレオチドは、cDNAを含む。DNAポリヌクレオチドは、ゲノムDNAであってもよい。DNAポリヌクレオチドは、エクソン、イントロン、非翻訳領域、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

10

20

【0261】

一様では、標的ポリヌクレオチドは、ゲノム核酸である。特定の生物の染色体中の遺伝物質に由来するDNAは、ゲノムDNAであってもよい。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、免疫細胞により産生された抗体またはTCRの可変領域を含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、免疫細胞により産生された抗体の重鎖の可変領域を含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、免疫細胞により産生されたTCRのアルファ鎖の可変領域を含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、免疫細胞により産生されたTCRのベータ鎖の可変領域を含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、免疫細胞により産生されたTCRのガンマ鎖の可変領域を含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、免疫細胞により産生されたTCRのデルタ鎖の可変領域を含む配列を含む。例えば、標的ポリヌクレオチドは、逆転写反応またはプライマー伸長反応の産物を生成するために使用されるポリヌクレオチド錫型を含んでいてもよく、また、逆転写反応またはプライマー伸長反応産物自体を含んでいてもよい。例えば、標的ポリヌクレオチドは、逆転写反応またはプライマー伸長反応に供することができる目的のポリヌクレオチドを含む。

30

【0262】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、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のAIDを含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、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のAMDを含む配列を含む。例えば、標的ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAを含む。例えば、標的ポリヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドを含む。例えば、標的ポリヌクレオチドは、AIDおよび/またはAMBを含有するオリゴヌクレオチドを含む。

40

【0263】

標的ポリヌクレオチドは、事実上任意の供給源から得ることができ、当技術分野で公知の方法を使用して調製することができる。例えば、標的ポリヌクレオチドは、生物または細胞（例えば、免疫細胞）からゲノムDNAの断片またはmRNAを抽出して、標的ポリヌクレオチドを得ることを含むがこれに限定されない、当技術分野で公知の方法を使用して、増幅せずに直接単離してもよい。また、標的ポリヌクレオチドは、RNA(mRNA

50

等)から逆転写PCRにより生成されるcDNAを包含することができる。一部の場合は、標的ポリヌクレオチドは、RNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、mRNA分子またはそのmRNA分子から産生されるcDNAである。一部の場合は、標的ポリヌクレオチドは、単一の免疫細胞に由来するmRNA分子またはそのmRNA分子から産生されるcDNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来するmRNA分子またはそれらmRNA分子から産生されるcDNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、単一の免疫細胞に由来する、抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、重鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、単一の免疫細胞に由来する、重鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。10
一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、軽鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、单一の免疫細胞に由来する、軽鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、抗体可変配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、可変抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、可変軽鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、可変重鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、可変重鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。20
一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、单一の免疫細胞に由来する、可変重鎖抗体配列をコードするmRNA分子である。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、無細胞性の核酸、例えばDNAまたはRNAであってもよい。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、個々の免疫細胞に由来する、可変アルファ、ベータ、ガンマ、およびノまたはデルタ鎖TCR配列をコードするmRNA分子である。

【0264】

本明細書に記載されている方法を使用して、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドから、配列決定用のポリヌクレオチドのライブラリーを生成することができる。一部の実施形態では、ライブラリーは、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれよりも多くの領域から生成されてもよい。一部の実施形態では、方法ライブラリーは、2つまたはそれよりも多くの標的ポリヌクレオチドから生成されてもよい。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、染色体に由来するゲノム核酸またはDNAである。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、遺伝子多型または突然変異等のバリエントを含む配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、DNAを含むが、RNAを含まない。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、RNAを含むが、DNAを含まない。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、DNAおよびRNAを含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖である。30

【0265】

標的ポリヌクレオチドは、任意の生物学的試料から合成または得ることができ、当技術分野で公知の方法を使用して調製することができる。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、增幅せずに直接単離される。直接単離するための方法は、当技術分野で公知である。非限定的な例としては、生物学的試料、生物、または細胞からゲノムDNAまたはmRNAを抽出することが挙げられる。一部の実施形態では、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドは、生物学的試料から精製される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、それが含有されている生物学的試料から精製されていない。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、生物学的試料から単離される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、それが含有されている生物学的試料から単離されていない。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、無細胞性の核酸であってもよい。一部の実施形50

態では、標的ポリヌクレオチドは、断片化核酸であってもよい。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、転写された核酸であってもよい。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、修飾ポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非修飾ポリヌクレオチドである。

【0266】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに由来するオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに由来する複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、複数の親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに由来する、2、3、4、5、6、7、8、9、
10
10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、2
50、300、350、400、450、500、550、600、650、700、7
50、800、850、900、または1000個、またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、2、3、4、5
、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、
150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、
650、700、750、800、850、900、または1000個、またはそれよりも多くの親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに由来する複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、2、3、4、5、6、
7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150
、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650
、700、750、800、850、900、または1000個、またはそれよりも多くの親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに由来する、2、3、4、5、6、7、8
、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、20
0、250、300、350、400、450、500、550、600、650、70
0、750、800、850、900、または1000個、またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドを含む。

【0267】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、AID配列を含む。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、3
0、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、
350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、
850、900、または1000個、またはそれよりも多くのAID配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、AMB配列を含む。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、8
0、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500
、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、15
00、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、90
00、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15
,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、
25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,00
0、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、20
0,000、300,000、400,000、500,000、600,000、70
0,000、800,000、900,000、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、
 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7
 7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 $8 \times$
 10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、
 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
50

$7 \times 1 0^{10}$ 、 $8 \times 1 0^{10}$ 、 $9 \times 1 0^{10}$ 、 $1 \times 1 0^{11}$ 、 $2 \times 1 0^{11}$ 、 $3 \times 1 0^{11}$ 、 $4 \times 1 0^{11}$ 、 $5 \times 1 0^{11}$ 、 $6 \times 1 0^{11}$ 、 $7 \times 1 0^{11}$ 、 $8 \times 1 0^{11}$ 、 $9 \times 1 0^{11}$ 、 $1 \times 1 0^{12}$ 、 $2 \times 1 0^{12}$ 、 $3 \times 1 0^{12}$ 、 $4 \times 1 0^{12}$ 、 $5 \times 1 0^{12}$ 、 $6 \times 1 0^{12}$ 、 $7 \times 1 0^{12}$ 、 $8 \times 1 0^{12}$ 、または $9 \times 1 0^{12}$ 個、またはそれよりも多くのAMB配列を含む。

[0 2 6 8]

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、単一細胞に由来するポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、個々の細胞に由来する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、複数の細胞を含有する試料に由来するポリヌクレオチドである。

10

(0 2 6 9)

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、バイオマーカー配列をコードする。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、2つまたはそれよりも多くのバイオマーカー配列をコードする。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、バイオマーカー配列をコードする。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、2つまたはそれよりも多くのバイオマーカー配列をコードする。一部の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドは、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100個、またはそれよりも多くのバイオマーカー配列をコードする。

[0 2 7 0]

20

20

40

50

9 0 0 、 1 0 0 0 、 1 5 0 0 、 2 0 0 0 、 3 0 0 0 、 4 0 0 0 、 5 0 0 0 、 6 0 0 0 、 7
 0 0 0 、 8 0 0 0 、 9 0 0 0 、 1 0 , 0 0 0 、 1 1 , 0 0 0 、 1 2 , 0 0 0 、 1 3 , 0 0
 0 、 1 4 , 0 0 0 、 1 5 , 0 0 0 、 1 6 , 0 0 0 、 1 7 , 0 0 0 、 1 8 , 0 0 0 、 1 9 ,
 0 0 0 、 2 0 , 0 0 0 、 2 5 , 0 0 0 、 3 0 , 0 0 0 、 3 5 , 0 0 0 、 4 0 , 0 0 0 、 4
 5 , 0 0 0 、 5 0 , 0 0 0 、 6 0 , 0 0 0 、 7 0 , 0 0 0 、 8 0 , 0 0 0 、 9 0 , 0 0 0
 、 1 0 0 , 0 0 0 、 2 0 0 , 0 0 0 、 3 0 0 , 0 0 0 、 4 0 0 , 0 0 0 、 5 0 0 , 0 0 0
 、 6 0 0 , 0 0 0 、 7 0 0 , 0 0 0 、 8 0 0 , 0 0 0 、 9 0 0 , 0 0 0 、 1×10^6 、 2
 $\times 10^6$ 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6
 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7
 $\times 10^7$ 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4
 $\times 10^8$ 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9
 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9
 $\times 10^9$ 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10}
 $\times 10^{10}$ 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2
 $\times 10^{11}$ 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11}
 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12}
 $\times 10^{12}$ 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 または 9×10^{12}

個の免疫グロブリンまたはTCR配列を含有する。一部の実施形態では、免疫グロブリンまたはTCR配列のパネルは、約10~20、10~30、10~40、10~30、10~40、10~50、10~60、10~70、10~80、10~90、10~100、50~60、50~70、50~80、50~90、50~100、100~200、100~300、100~400、100~300、100~400、100~500、100~600、100~700、100~800、100~900、100~1000、500~600、500~700、500~800、500~900、500~1000、1000~2000、1000~3000、1000~4000、1000~3000、1000~4000、1000~5000~6000、1000~7000、1000~8000、1000~9000、1000~10000、5000~6000、5000~7000、5000~8000、5000~9000、5000~10000、1000~10000~20000、1000~10000~30000、1000~10000~40000、1000~10000~30000、1000~10000~40000、1000~10000~50000、1000~10000~60000、1000~10000~70000、1000~10000~80000、1000~10000~90000、1000~10000~100000、5000~6000~70000、5000~6000~80000、5000~6000~90000、5000~6000~100000、1~1×10⁵、1~2×10⁵、1~3×10⁵、1~4×10⁵、1~5×10⁵、1~6×10⁵、1~7×10⁵、1~8×10⁵、 9×10^5 、1~1×10⁶、1~2×10⁶、1~3×10⁶、1~4×10⁶、1~5×10⁶、1~6×10⁶、1~7×10⁶、1~8×10⁶、 9×10^6 、1~1×10⁷、1~2×10⁷、1~3×10⁷、1~4×10⁷、1~5×10⁷、1~6×10⁷、1~7×10⁷、1~8×10⁷、 9×10^7 、1~1×10⁸、1~2×10⁸、1~3×10⁸、1~4×10⁸、1~5×10⁸、1~6×10⁸、1~7×10⁸、1~8×10⁸、 9×10^8 、1~1×10⁹、1~2×10⁹、1~3×10⁹、1~4×10⁹、1~5×10⁹、1~6×10⁹、1~7×10⁹、1~8×10⁹、 9×10^9 、1~1×10¹⁰、1~2×10¹⁰、1~3×10¹⁰、1~4×10¹⁰、1~5×10¹⁰、1~6×10¹⁰、1~7×10¹⁰、1~8×10¹⁰、 9×10^{10} 、1~1×10¹¹、1~2×10¹¹、1~3×10¹¹、1~4×10¹¹、1~5×10¹¹、1~6×10¹¹、1~7×10¹¹、1~8×10¹¹、 9×10^{11} 、1~1×10¹²、1~2×10¹²、1~3×10¹²、1~4×10¹²、1~5×10¹²、1~6×10¹²、1~7×10¹²、1~8×10¹²、 9×10^{12} 個の免疫グロブリンまたはTCR配列を含有する。

【0271】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、長さが、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000

、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、または20,000塩基または塩基対である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、長さが、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、または20,000塩基または塩基対である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、長さが、多くとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、または20,000塩基または塩基対である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、長さが、約10～20、10～30、10～40、10～30、10～40、10～50、10～60、10～70、10～80、10～90、10～100、50～60、50～70、50～80、50～90、50～100、100～200、100～300、100～400、100～300、100～400、100～500、100～600、100～700、100～800、100～900、100～1000、500～600、500～700、500～800、500～900、500～1000、1000～2000、1000～3000、1000～4000、1000～3000、1000～4000、1000～5000、1000～6000、1000～7000、1000～8000、1000～9000、1000～10000、5000～6000、5000～7000、5000～8000、5000～9000、または5000～10000塩基または塩基対である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドまたはそれらの断片の平均の長さは、約100、200、300、400、500、もしくは800塩基対未満であってもよく、または約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100キロベース未満であってもよい。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを含有する試料等の、相対的に短い鋳型に由来する標的配列は、約40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100塩基である。ある特定の実施形態では、配列決定データは、疾患または状態に関連する配列または免疫グロブリンもしくはTCR配列を含有するデータベースを使用して、既知のまたは予想される配列に対してアラインされる。

【0272】

一部の実施形態では、方法は、第1の細胞ポリヌクレオチド、第2の細胞ポリヌクレオチド、または両方の生殖系列配列を決定することをさらに含み、第1の細胞ポリヌクレオチドは、 IgH または V_H 配列を含み、第2の細胞ポリヌクレオチドは、 IgL または V_L 配列、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、方法は、生殖系列の $IgL IgH$ 、 V_H 、 V_L 、またはそれらの任意の組合せの配列からの、 $IgL IgH$ 、 V_H 、 V_L 、またはそれらの任意の組合せの配列の相違を決定することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、固有の IgH 配列の総数、固有の IgL 配列の総数；固有の IgH および IgL 配列の総数；固有の対合した IgL および IgH 配列の総数；1つまたは複数の他の配列に対する、 IgH 配列もしくは IgL 配列の頻度、または IgH 配列および IgL 配列の組合せの頻度の少なくとも1つを決定することをさらに含む。

【0273】

一部の実施形態では、方法は、第1の細胞ポリヌクレオチド、第2の細胞ポリヌクレオチド

チド、または両方の生殖系列配列を決定することをさらに含み、第1の細胞ポリヌクレオチドは、T C R またはV 配列を含み、第2の細胞ポリヌクレオチドは、T C R またはV 配列、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、方法は、生殖系列のT C R 、T C R 、V 、V 、またはそれらの任意の組合せの配列からの、T C R 、T C R 、V 、V 、またはそれらの任意の組合せの配列の相違を決定することをさらに含む。

【0274】

一部の実施形態では、方法は、固有のT C R 配列の総数、固有のT C R 配列の総数；固有のT C R およびT C R 配列の総数；固有の対合したT C R およびT C R 配列の総数；1つまたは複数の他の配列に対する、T C R 配列もしくはT C R 配列の頻度、またはT C R 配列およびT C R 配列の組合せの頻度の少なくとも1つを決定することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、第1の細胞ポリヌクレオチド、第2の細胞ポリヌクレオチド、または両方の生殖系列配列を決定することをさらに含み、第1の細胞ポリヌクレオチドは、T C R またはV 配列を含み、第2の細胞ポリヌクレオチドは、T C R またはV 配列、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、方法は、生殖系列のT C R 、T C R 、V 、V 、またはそれらの任意の組合せの配列からの、T C R 、T C R 、V 、V 、またはそれらの任意の組合せの配列の相違を決定することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、固有のT C R 配列の総数、固有のT C R 配列の総数；固有のT C R およびT C R 配列の総数；固有の対合したT C R およびT C R 配列の総数；1つまたは複数の他の配列に対する、T C R 配列もしくはT C R 配列の頻度、またはT C R 配列およびT C R 配列の組合せの頻度の少なくとも1つを決定することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、第1の遺伝子に由来する配列の総数；第2の遺伝子に由来する配列の総数；第1の遺伝子に由来する固有の配列の総数；第2の遺伝子に由来する固有の配列の総数；または第1の遺伝子に由来する配列もしくは第2の遺伝子に由来する配列の頻度の少なくとも1つを決定することをさらに含む。

【0275】

一部の実施形態では、方法は、個々の対合したI g L およびI g H 配列、またはT C R およびT C R 配列、またはT C R およびT C R 配列の1つまたは複数の対、ならびに生殖系列からの相違の合計量に基づき、抗体またはT C R を選択することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、1つもしくは複数のI g L もしくはI g H 配列、T C R およびT C R 配列、またはT C R およびT C R 配列、ならびに生殖系列からの相違に基づき、抗体またはT C R を選択することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、配列パターン、相違の分析、動力学、または頻度の1つまたは複数に基づき抗体またはT C R を選択することをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、頻度に基づき抗体またはT C R を選択することをさらに含む。

【0276】

抗体およびT C R のクローニングおよび発現

「抗体発現ライブラリー」または「T C R 発現ライブラリー」または「発現ライブラリー」は、本明細書で使用される場合、核酸またはタンパク質レベルのいすれかでの分子のコレクション（つまり2つまたはそれよりも多くの分子）を指す場合がある。したがって、この用語は、複数の抗体またはT C R 分子をコードする発現ベクターのコレクション（つまり、核酸レベル）を指していくてもよく、またはそれらが適切な発現系で発現された後の抗体またはT C R 分子のコレクション（つまり、タンパク質レベル）を指していくてもよい。あるいは、発現ベクター／発現ライブラリーは、それらが発現され得る好適な宿主細胞に含有されていてもよい。本発明の発現ライブラリー中のコードまたは発現されている抗体分子は、任意の適切な形式であってもよく、例えば、抗体またはT C R 分子全体であってもよく、抗体またはT C R 断片、例えば单鎖抗体（例えばs c F v 抗体）、F v 抗体、F a b ' 抗体、(F a b ')₂ 断片、ダイアボディ等であってもよい。用語「コードする（encoding）」および「コードする（coding for）」、例えば、特定の酵素を「コー

10

20

30

40

50

ドする」／「コードする」核酸配列、または特定の酵素のDNAコード配列、または特定の酵素を「コードする」／「コードする」スクレオチド配列など、ならびに他の同義的な用語は、適切な調節配列の制御下に置かれると酵素に転写および翻訳されるDNA配列を指す。「プロモーター配列」は、細胞内でRNAポリメラーゼに結合可能であり、下流(3'方向)コード配列の転写を開始可能であるDNA調節領域である。プロモーターは、DNA配列の一部である。この配列領域は、その3'末端に開始コドンを有する。プロモーター配列は、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで転写を開始させるために必要なエレメントを有する最小数の塩基を含む。しかしながら、RNAポリメラーゼがこの配列に結合し、転写が開始コドン(プロモーターを有する3'末端)から開始されると、転写は、3'方向の下流に進行する。プロモーター配列内には、転写開始部位(スクレアーゼS1でマッピングすることにより便利に規定される)ならびにRNAポリメラーゼの結合をもたらすタンパク結合ドメイン(コンセンサス配列)が見出されることになる。
10

【0277】

本発明の抗体またはTCR発現ライブラリーにより特定される、に由来する、から選択される、またはから得ることができる抗体またはTCR分子は、本発明のまたさらなる様態を形成する。この場合も、これら抗体またはTCR分子は、抗体またはTCR分子をコードするタンパク質または核酸であってもよく、次いで、核酸は、適切な発現ベクターに組み込まれてもよく、および/または好適な宿主細胞に含有されてもよい。

【0278】

cDNAプールは、抗体遺伝子の重鎖の定常領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド、および抗体またはTCR遺伝子のV_HまたはV_LまたはV_κ鎖領域の5'末端にハイブリダイズするポリヌクレオチドと共にPCR反応に供してもよい。cDNAプールは、抗体またはTCR遺伝子の重鎖またはアルファもしくはガンマ鎖の定常領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド、および抗体またはTCR配列を含むバーコード化ポリヌクレオチドのV_HまたはV_LまたはV_κ鎖領域の領域5'～5'末端にハイブリダイズするポリヌクレオチドと共にPCR反応に供してもよい。また、PCR反応は、例えばカッパおよびラムダクラスのV_LまたはV_κまたはV_μ鎖プールを増幅するように設定してもよい。cDNAプールは、抗体遺伝子の軽鎖の定常領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド、および抗体またはTCR遺伝子のV_LまたはV_κまたはV_μ鎖領域の5'末端にハイブリダイズするポリヌクレオチドと共にPCR反応に供してもよい。cDNAプールは、抗体遺伝子の軽鎖の定常領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド、および抗体またはTCR配列を含むバーコード化ポリヌクレオチドのV_LまたはV_κまたはV_μ鎖領域の領域5'～5'末端にハイブリダイズするポリヌクレオチドと共にPCR反応に供してもよい。そのようなオリゴヌクレオチドまたはプライマーは、既知であり公的に入手可能な免疫グロブリンまたはTCR遺伝子配列データベース情報に基づいて設計することができる。
30

【0279】

一部の実施形態では、V_HおよびV_LまたはV_κおよびV_μまたはV_γおよびV_ε配列は、重鎖または軽鎖遺伝子に、特にV_HおよびV_LまたはV_κおよびV_μまたはV_γおよびV_εポリヌクレオチドの末端領域の一方または両方に特異的ではない1つまたは複数のプライマーを使用したPCR増幅により產生されるV_HおよびV_LまたはV_κおよびV_μまたはV_γおよびV_ε配列のライブラリーから便利に得ることができる。一部の実施形態では、V_HおよびV_L配列は、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの領域に特異的なプライマーを使用したPCR増幅により產生されるV_HおよびV_LまたはV_κおよびV_μまたはV_γおよびV_ε配列のライブラリーから便利に得ることができる。一部の実施形態では、V_HおよびV_L配列は、C遺伝子ファミリー特異的プライマーまたはC遺伝子特異的プライマーを使用したPCR増幅により产生されるV_HおよびV_LまたはV_κおよびV_μまたはV_γおよびV_ε配列のライブラリーから便利に得ることができる。一部の実施形態では、V_HおよびV_L配列は、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの領域に特異的な第1のプライマー、およびC遺伝子ファミリー特異的プライマーまたはC遺伝子特異的
40
50

プライマーである第2のプライマーまたは複数の第2のプライマーを有するプライマーセットを使用したPCR増幅により產生されるV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L配列のライブラリーから便利に得ることができる。一部の実施形態では、V_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L配列は、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの領域に特異的な第1のプライマーおよびユニバーサル配列に特異的な第2のプライマーを有するプライマーセットを使用したPCR増幅により產生されるV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L配列のライブラリーから便利に得ることができる。

【0280】

一部の実施形態では、逆転写時に、得られたcDNA配列を、免疫グロブリン遺伝子に特異的な、特にV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_Lポリヌクレオチドの末端領域の一方または両方に特異的な1つまたは複数のプライマーを使用して、PCRにより増幅してもよい。一部の実施形態では、V_HおよびV_L配列は、V遺伝子ファミリー特異的プライマーまたはV遺伝子特異的プライマーを使用したPCR増幅により產生されるV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L配列のライブラリーから得ることができ（Nichollsら、J. Immunol. Meth.、1993年、165巻：81頁；WO93/12227）、または入手可能な情報に基づき、標準的な当技術分野で公知の方法に従って設計される。（V_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L配列を、通常は介在スペーサー配列（例えば、インフレーム可撓性ペプチドスペーサーをコードする）とライゲーションさせて、単鎖抗体をコードするカセットを形成することができる）。V領域配列は、免疫グロブリン発現細胞のcDNAまたはPCR増幅産物として便利にクローニングすることができる。V_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L領域は、任意選択で、本明細書に記載されている方法で、特に、言及されているある特定のステップ後（例えば、単一細胞PCR後、哺乳動物または他の細胞表面ディスプレイ後、およびFACSスクリーニング後等）に配列決定される。他の理由の中でも、多様性のレベルが許容可能なレベルにあることを確認するために、配列決定を使用してもよい。配列決定は、ハイスループット配列決定、ディープシーケンシング（複数の個々の試料に由来する同じ遺伝子を配列決定して、配列の差異を識別する）、またはこの2つの組合せを含んでいてもよい。

【0281】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている方法を使用して、天然のV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L組合せを、物理的に連結することは必要とされない。一部の実施形態では、cDNA、バーコード化ポリヌクレオチド、またはPCR増幅バーコード化cDNAは、物理的に連結されていない。一部の実施形態では、cDNA、バーコード化ポリヌクレオチド、またはPCR増幅バーコード化cDNAは、同じ反応またはベッセルでは、物理的に連結されていない。

【0282】

一部の実施形態では、天然のV_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L組合せは、cDNAプライマーに加えて、V_HまたはV₊またはV₋遺伝子の5'末端に対する1つのプライマーまたは複数のプライマー、およびV_LまたはV₊またはV₋遺伝子の5'末端に対する別のプライマーまたは複数のプライマーを使用して、物理的に連結される。また、これらプライマーは、V_HおよびV_LまたはV₊およびV₋またはV_HおよびV_L遺伝子の自己集合を可能にするための追加的な配列である相補的尾部を含有する。増幅および連結反応は各細胞内で実施されたため、PCR増幅および連結後に、混合産物、言い換えれば混合可変領域を得る可能性は最小限である。混合のリスクは、V領域cDNA対が細胞区画の外に出て相互混合せず、PCR増幅および連結のために細胞内に残留することを更に保証するために、ジゴキシゲニン標識ヌクレオチド等の嵩高い試薬を利用することによりさらに低減させることができる。増幅された配列は、相補的末端配列のハイブリダイゼーションにより連結される。連結後、配列は、本明細書に記載のさらなる方法ステップで使用される細胞から回収することができる。例えば、回収されたDNA

10

20

30

40

50

は、必要に応じて末端プライマーを使用して P C R 増幅し、下記に詳述されているような、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルスベクター、またはそれらの組合せであってもよいベクターにクローニングすることができる。ハイブリダイズされた配列に便利な制限酵素部位を組み込んで、クローニングを容易にしてもよい。また、こうしたベクターは、後に使用するための、連結された可変領域のライブラリーとして保存してもよい。

【 0 2 8 3 】

追加の V_H および V_L または V_{α} および V_{β} または V_{γ} および V_{δ} の組合せを提供するために、発現系を選択することができる。例えば、バクテリオファージ発現系では、重鎖および軽鎖配列のランダム組換えが可能である。他の好適な発現系が当業者に公知である。

10

【 0 2 8 4 】

非ヒトに由来する V_H および V_L または V_{α} および V_{β} または V_{γ} および V_{δ} 配列の場合、一部の実施形態では、これら配列を完全ヒト F c とキメラ化することが好ましい場合があることが留意されるべきである。本明細書で使用される場合、「キメラ化」は、重鎖および軽鎖可変領域または V_{α} および V_{β} または V_{γ} および V_{δ} 領域がヒト由来ではなく、重鎖および軽鎖または V_{α} および V_{β} または V_{γ} および V_{δ} 鎖の定常領域がヒト由来である免疫グロブリンまたは T C R を指す。これは、可変ドメインをヒト F c に増幅およびクローニングすることにより達成される。ヒト F c は、ベクターの一部であってもよく、または別々の分子にあってもよく、F c のライブラリーを使用することもできる。好ましい実施形態では、キメラ化分子を C H O 細胞等の哺乳動物細胞で成長させ、F A C S で 2 回スクリーニングして、細胞集団を、目的の抗体を発現する細胞について濃縮する。キメラ化抗体または T C R は、配列決定してから機能的に特徴付けるか、または直接的な機能特徴付けもしくは動力学のいずれかにより特徴付けられる。成長、スクリーニング、および特徴付けは、下記に詳細に記載されている。

20

【 0 2 8 5 】

上述の P C R 反応は、I g G 形態の抗体をクローニングするために記載されていることに留意することが重要である。I g G 形態の抗体は、一般的により成熟した免疫応答と関連しており、一般的に I g M 抗体よりも高い親和性を示し、ある特定の治療または診断応用により望ましいため、好ましい。しかしながら、明らかに、所望であるかまたは適切である場合、免疫グロブリン分子の他の形態、例えば、I g M、I g A、I g E、および I g D の 1 つまたは複数のクローニングを可能にすることになるポリヌクレオチドを設計することができる。

30

【 0 2 8 6 】

細胞に含有されている遺伝物質の完全性を維持することができ、それにより後日ライブラリーを作ることが可能である場合、抗体または T C R を識別し、細胞の適切な集団を、適切な時点で単離し、任意選択で上述のように濃縮した後、抗体または T C R 発現ライブラリーを直ちに生成する必要はない。したがって、例えば、細胞、細胞溶解物、または核酸、例えば R N A またはそれに由来する D N A は、適切な方法、例えば凍結により後日まで保管し、後日に所望となった時点で、発現ライブラリーを生成してもよい。

40

【 0 2 8 7 】

発現ベクターのライブラリーが生成されたら、コードされた抗体分子を、適切な発現系で発現し、周知であり当技術分野で記録されている適切な技法を使用してスクリーニングすることができる。したがって、上記で規定されている本発明の方法は、適切な発現系で発現ベクターのライブラリーを発現すること、および発現されたライブラリーを所望の特性を有する抗体についてスクリーニングすることをさらに含んでいてもよい。

【 0 2 8 8 】

本明細書に示されているように、抗体または T C R 配列をコードするポリヌクレオチドを含む、本開示の方法により調製されるポリヌクレオチドとしては、これらに限定されないが、それ自体が抗体または T C R 断片のアミノ酸配列をコードするもの、抗体もしくは

50

T C R 全体またはその部分の非コード配列、抗体またはT C R、断片または部分のコード配列、ならびに上述の追加のコード配列を有するまたは有していない、少なくとも1つのシグナルリーダーまたは融合ペプチドのコード配列等の、非コード5'および3'配列を含むがこれらに限定されない追加の非コード配列を共に有する、少なくとも1つのイントロン等の、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル（例えば、リボソーム結合およびm R N A の安定性）を含む、転写、m R N A プロセシングに役割を果たす転写された未翻訳配列等の、追加の配列；追加の機能性を提供するもの等の、追加のアミノ酸をコードする追加のコード配列が挙げられる。したがって、抗体をコードする配列は、抗体またはT C R 断片または部分を含む融合抗体またはT C R の精製を容易にするペプチドをコードする配列等のマーカー配列に融合されていてもよい。

10

【0289】

その後、任意選択で、一次P C R 産物を、抗体またはT C R 可変ドメインV_H、V_LカッパおよびV_LラムダまたはV_HおよびV_LまたはV_HおよびV_Lの5'および3'末端にハイブリダイズする新しいポリヌクレオチドセットが用いられる二次P C R 反応に供してもよい（適宜、新しいポリヌクレオチドセットが使用される一次P C R 反応が、重鎖または軽鎖抗体遺伝子またはV_HもしくはV_L T C R 遺伝子またはV_HもしくはV_L T C R 遺伝子の部分を增幅するように設計されていたか否かに応じて）。これらポリヌクレオチドは、後にクローニングするための規定セットの制限酵素に特異的なD N A 配列（つまり、制限酵素部位）を含むことが有利である。選択された制限酵素は、ヒト抗体またはT C R V 遺伝子セグメント内で切断が起こらないように選択しなければならない。そのようなポリヌクレオチドは、公知であり公的に入手可能な免疫グロブリンまたはT C R 遺伝子配列および制限酵素データベース情報に基づいて設計することができる。しかしながら、含まれる好ましい制限酵素部位は、N c o I、H i n d I I I、M l u I、およびN o t I である。そのような二次P C R 反応の産物は、種々のV重鎖、V軽鎖カッパ、およびV軽鎖ラムダ抗体断片／ドメインのレパートリーである。したがって、目的の発現ライブラリー形式が、s c F v またはF v 形式であり、抗体またはT C R のV_HおよびV_LまたはV_HおよびV_LまたはV_HおよびV_Lドメインのみが存在する場合、一般的に、このタイプの二次P C R 反応が実施される。

20

【0290】

また、P C R 産物は、バーコード化ポリヌクレオチドの5'および3'末端にハイブリダイズする新しいプライマーセットを用いたP C R 反応に供してもよい。これらポリヌクレオチドは、有利には、後にクローニングするための、規定セットの制限酵素に特異的なD N A 配列（つまり、制限酵素部位）を含むことができる。選択された制限酵素は、ヒト抗体またはT C R V 遺伝子セグメント内で切断が起こらないように選択しなければならない。そのようなポリヌクレオチドは、公知であり公的に入手可能な免疫グロブリンまたはT C R 遺伝子配列および制限酵素データベース情報に基づいて設計することができる。しかしながら、導入される好ましい制限酵素部位は、N c o I、H i n d I I I、M l u I、およびN o t I である。そのような二次P C R 反応の産物は、種々のV_H、V_Lカッパ、およびV_Lラムダ抗体断片／ドメイン、またはV_HおよびV_LもしくはV_HおよびV_L T C R 断片／ドメインのレパートリーである。

40

【0291】

また、重鎖もしくは軽鎖またはV_HもしくはV_L鎖またはV_HもしくはV_L鎖F v もしくはF a b 断片または单鎖抗体もしくはT C R を、この系と共に使用することができる。重鎖もしくは軽鎖またはV_HもしくはV_L鎖またはV_HもしくはV_L鎖に突然変異を誘発させ、その後、相補鎖を溶液に添加してもよい。その後、2つの鎖を組み合わせて、機能性抗体断片を形成することができる。ランダムで非特異的な軽鎖もしくは重鎖またはV_HもしくはV_L鎖またはV_HもしくはV_L鎖配列を添加することにより、多様なメンバーのライブラリーを生成するためのコンビナトリアル系を产生することが可能になる。

【0292】

本明細書で規定されている免疫負荷宿主のBまたはTリンパ球に由来する抗体またはT

50

C R 遺伝子の可変重鎖もしくはV鎖もしくはV鎖領域またはそれらの断片、および/あるいは可変軽鎖もしくはV鎖もしくはV鎖領域またはそれらの断片を含む、クローニングされた断片のそのようなレパートリーのライブラリーは、本発明のさらなる態様を形成する。クローニングされた可変領域を含むこうしたライブラリーを、任意選択で発現ベクターに挿入して、発現ライブラリーを形成してもよい。

【 0 2 9 3 】

一部の実施形態では、P C R 反応は、単離された免疫細胞集団に含有されている種々の抗体またはT C R 鎖の定常領域の全体または一部を保持するように設定することができる。これは、発現ライブラリー形式がF a b 形式であり、重鎖またはアルファ鎖またはガンマ鎖成分が、V_H またはV_L およびC_H またはC_L またはC_D ドメインを含み、軽鎖またはV_κ 鎖またはV_λ 鎖成分が、V_κ またはV_λ またはV_γ 鎖およびC_γ またはC_μ またはC_ε ドメインを含む場合に望ましい。この場合も、抗体またはT C R 鎖の定常領域の全体または一部を含むそのようなクローニングされた断片のライブラリーは、本発明のさらなる態様を形成する。

[0 2 9 4]

こうした核酸は、本発明のポリヌクレオチドの他の配列を含むことができるため便利である。例えば、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位を含む多重クローニング部位を核酸に挿入して、ポリヌクレオチドの単離を支援することができる。また、翻訳可能な配列を挿入して、翻訳された本発明のポリヌクレオチドの単離を支援することができる。例えば、ヘキサヒスチジンマーカー配列は、本発明のタンパク質を精製するための便利な手段を提供する。任意選択で、コード配列を除く本発明の核酸は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングおよび／または発現するためのベクター、アダプター、またはリンカーである。

[0 2 9 5]

追加の配列を、そのようなクローニングおよび／または発現配列に付加して、クローニングおよび／または発現時のそれらの機能を最適化し、ポリヌクレオチドの単離を支援し、またはポリヌクレオチドの細胞への導入を向上させることができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプター、およびリンカーの使用は、当技術分野で周知である。（例えば、Ausubel、上記；またはSambrook、上記を参照）。

[0 2 9 6]

, 000個、またはそれよりも多くの分子バーコードまたはベッセルバーコードを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドのライブラリーは、複数の少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、50000、60000、70000、80000、90000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、50,000個、またはそれよりも多くの固有のポリヌクレオチドを含み、各固有のポリヌクレオチドは、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを含む。

【0297】

バーコード

抗原分子バーコード等の分子バーコードは、親和性 - オリゴヌクレオチド複合体の単一のオリゴヌクレオチドまたは単一細胞または単一ベッセルに由来するポリヌクレオチド分子等の、単一細胞に固有な情報を含む。ベッセルバーコードは、異なる単一細胞に由来するかまたは異なる単一ベッセル中に存在するポリヌクレオチドと比較して、単一細胞に由来するかまたは単一ベッセル中に存在するポリヌクレオチドに固有な情報を含む。一部の実施形態では、固有情報は、ヌクレオチドの固有の配列を含む。例えば、分子バーコードまたはベッセルバーコードの配列は、分子バーコードまたはベッセルバーコードを含むヌクレオチドの固有のまたはランダム配列の同一性および順序を決定することにより決定することができる。一部の実施形態では、固有情報を使用して、標的ポリヌクレオチドの配列を識別することはできない。例えば、分子バーコードは、1つの標的ポリヌクレオチドに付着されていてもよいが、分子バーコードを使用して、付着されている標的ポリヌクレオチドを決定することはできない。一部の実施形態では、固有情報は、標的ポリヌクレオチドの配列を識別するために連結されている公知の配列ではない。例えば、ベッセルバーコード、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドに付着されていてもよいが、ベッセルバーコードを使用して、それが1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのどれに付着されているかを決定することはできない。一部の実施形態では、固有情報は、ヌクレオチドのランダム配列を含む。一部の実施形態では、固有情報は、ポリヌクレオチドのヌクレオチドの1つまたは複数の固有の配列を含む。一部の実施形態では、固有情報は、ディジエネレートヌクレオチド配列またはディジエネレートバーコードを含む。ディジエネレートバーコードは、可変ヌクレオチド塩基組成または配列を含んでいてもよい。例えば、ディジエネレートバーコードは、ランダム配列であってもよい。一部の実施形態では、分子バーコードまたはベッセルバーコードの相補体配列も、分子バーコードまたはベッセルバーコード配列である。

【0298】

バーコードは、任意の長さのヌクレオチドを含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載のバーコードはいずれも、2から36個までのヌクレオチドの、4から36個までのヌクレオチドの、または6から30個までのヌクレオチドの、または8から20個までのヌクレオチドの、2から20個までのヌクレオチドの、4から20個までのヌクレオチドの、または6から20個までのヌクレオチドの範囲内の長さを有していてもよい。ある特定の態様では、セット内のバーコードの融解温度は、互いに10以内、互いに5以内、または互いに2以内である。ある特定の態様では、セット内のバーコードの融解温度は、互いに10以内、互いに5以内、または互いに2以内ではない。一部の態様では、バーコードは、クロスハイブリダイゼーションが最小限であるセットのメンバーである。例えば、そのようなセットの各メンバーのヌクレオチド配列は、メンバーがストリンジ

10

20

30

30

40

50

エントなハイブリダイゼーション条件下で任意の他のメンバーの相補体と安定二本鎖を形成することができないように、そのセットの全ての他のメンバーのヌクレオチド配列と十分に異なっていてもよい。一部の実施形態では、クロスハイブリダイゼーションが最小限であるセットの各メンバーのヌクレオチド配列は、少なくとも2つのヌクレオチドが全ての他の配列と異なる。バーコード技術は、Winzelerら(1999年)Science、285巻：901頁；Brenner(2000年)Genome Biol.、1巻：1頁；Kumarら(2001年)Nature Rev.、2巻：302頁；Giaeverら(2004年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻：793頁；Easonら(2004年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻：11046頁；およびBrenner(2004年)Genome Biol.、5巻：240頁に記載されている。

10

【0299】

例えば、バーコードは、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200、500、または1000個のヌクレオチドを含んでいてもよい。例えば、バーコードは、多くとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200、500、または1000個のヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコードは、特定の長さのヌクレオチドを有する。例えば、バーコードは、長さが、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200、500、または1000個のヌクレオチドであってもよい。

20

【0300】

一部の実施形態では、複数のバーコード中の各バーコードは、少なくとも約2つのヌクレオチドを有する。例えば、複数のバーコード中の各バーコードは、長さが、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200、500、または1000個のヌクレオチドであってもよい。一部の実施形態では、複数のバーコード中の各バーコードは、多くとも約1000個のヌクレオチドを有する。例えば、複数のバーコード中の各バーコードは、長さが、多くとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200、500、または1000個のヌクレオチドであってもよい。

30

【0301】

分子バーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数に対して過剰であってもよい。ベッセルバーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数に対して過剰であってもよい。例えば、分子バーコードまたはベッセルバーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数の、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100倍であってもよい。

【0302】

40

50

異なる分子バーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数に対して過剰であってもよい。一部の実施形態では、異なる分子バーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数の、少なくとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100倍である。

【0303】

単一ベッセル中の異なる分子バーコードの数は、単一ベッセル中の標識しようとする異なる分子の数に対して過剰であってもよい。一部の実施形態では、単一ベッセル中の異なる分子バーコードの数は、単一ベッセル中の標識しようとする異なる分子の数の、少なくとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100倍である。10

【0304】

異なるベッセルバーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数よりも少なくてよい。一部の実施形態では、異なるベッセルバーコードの数は、複数のベッセル中の標識しようとする分子の総数の、多くとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100分の1である。

【0305】

単一ベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチド分子に由来する增幅産物分子の数は、単一ベッセル中の標識しようとする異なる分子の数に対して過剰であってもよい。一部の実施形態では、単一ベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチド分子に由来する增幅産物分子の数は、単一ベッセル中の標識しようとする異なる分子の数の、少なくとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100倍である。20

【0306】

単一ベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチド分子の数は、単一ベッセル中の標識しようとする異なる分子の数よりも少なくてよい。一部の実施形態では、単一ベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチド分子の数は、単一ベッセル中の標識しようとする異なる分子の数の、多くとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100分の1である。30

【0307】

単一ベッセル中のベッセルバーコード化ポリヌクレオチド分子の数は、1つの分子であってもよい。単一ベッセル中の増幅されていないベッセルバーコード化ポリヌクレオチド分子の数は、1つの分子であってもよい。

【0308】

一部の実施形態では、異なる分子バーコードの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または100%は、同じ濃度を有する。一部の実施形態では、異なるベッセルバーコードの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または100%は、同じ濃度を有する。40

【0309】

一部の実施形態では、異なる分子バーコードの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または100%は、異なる濃度を有する。一部の実施形態では、異なるベッセルバーコードの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、50

8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、または100 %は、異なる濃度を有する。

[0 3 1 0]

$\times 10^9$ 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10}
 10^0 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 $8 \times$
 10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、
 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12}
 2 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 個、またはそれよりも多くの標的ポリヌクレオチド
 から、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、
 900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、
 9000、10000、10,000、15,000、20,000、25,000、30,
 000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、7
 0,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,
 000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,
 000、900,000、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、
 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 $3 \times$
 10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、
 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 $5 \times$
 10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10}
 0 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、
 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5
 $\times 10^{11}$ 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12}
 2 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12}
 1^2 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 個、またはそれよりも多くの異なる配列を生成するこ
 とができる。

【0311】

一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は、同じ分子バーコードを含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードまたはベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は、アンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、増幅反応中の同じポリヌクレオチド分子に由来していた。

【0312】

一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は、同じベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、単一ベッセルまたは単一細胞に由来するポリヌクレオチド分子に由来していた。

【0313】

一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列を使用して、配列をグループ化またはBINに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列を使用して、配列をグループ化またはBINに振り分け、各BINにおける配列は、同じAID配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列を使用して、配列をグループ化ま

10

20

30

40

50

たはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、単一ベッセルまたは単一細胞に由来するポリヌクレオチド分子に由来していた。

【0314】

一部の実施形態では、1つまたは複数のAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数のAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じAMB配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、単一ベッセルまたは単一細胞に由来するポリヌクレオチド分子に由来していた。

10

【0315】

一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じAID配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じAID配列および異なるAMB配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じAID配列および同じAMB配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、増幅反応中の同じポリヌクレオチドに由来し、単一細胞またはベッセルに由来していた。

20

【0316】

一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードおよびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードおよびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードおよびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じベッセルバーコードおよび異なるAMB配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードおよびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じベッセルバーコードおよび同じAMB配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードおよびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードおよびAMB配列を使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、増幅反応中の同じポリヌクレオチドに由来し、単一細胞またはベッセルに由来していた。

30

【0317】

一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数のAID配列およびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分

40

50

け、各ビンにおける配列は、同じ A I D 配列を含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数の A I D 配列およびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じ A I D 配列および同じベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数の A I D 配列およびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の A I D 配列およびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、増幅反応中の同じポリヌクレオチドに由来し、単一細胞またはベッセルに由来していた。

【 0 3 1 8 】

10

一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分ける。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、同じ分子バーコードおよび同じベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は、1つまたは複数のアンプリコンセットを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、各ビンにおける配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、増幅反応中の同じポリヌクレオチドに由来し、単一細胞またはベッセルに由来していた。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用せずに、配列をアラインする。

20

【 0 3 1 9 】

一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードを使用せずに、配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードを使用して、配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、標的特異的領域を使用して配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用せずに、配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用して、配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数のベッセルバーコードを使用して、配列をグループ化またはビンに振り分け、標的特異的領域を使用して配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用して、配列をアラインする。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードおよびベッセルバーコードを使用して配列をアラインする。

30

【 0 3 2 0 】

一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ A I D を含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ A M B を含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ A I D および A M B を含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ A I D およびベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ A M B およびベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ分子バーコードを含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、アラインされた配列は、同じ分子バーコードおよびベッセルバーコードを含有する。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードまたはベッセルバーコードを使用して、配列をアラインし、アラインされた配列は、アンプリコンセットに由来する 2 つまたはそれよりも多くの配列を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードまたはベッセルバーコードを使用して、配列をアラインし、アラインされた配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、増幅反応中の同じポリヌクレオチド分子に由来していた。一部の実施形態では、1つまたは複数の分子バーコードまたはベッセ

40

50

ルバーコードを使用して、配列をアラインし、アラインされた配列は複数の配列を含み、上記複数の配列が生成されたポリヌクレオチドは、単一細胞または単一ベッセルに由来していた。

【0321】

液滴生成

複数の細胞の試料を小さな反応容積に分割し、複数の細胞の個々の細胞からの、または個々の細胞に由来するポリヌクレオチドの分子およびベッセルバーコード付与と併用することにより、バイオマーカー配列等の配列のレパートリーのハイスループット配列決定が可能になり得る。

【0322】

10

複数の細胞の試料を小さな反応容積に分割し、複数の細胞の個々の細胞からの、または個々の細胞に由来するポリヌクレオチドの分子およびベッセルバーコード付与と併用することにより、生物のトランスクリプトームのパーセントを表す配列等の配列のレパートリーのハイスループット配列決定が可能になり得る。例えば、配列のレパートリーは、生物のトランスクリプトームの少なくとも約0.00001%、0.00005%、0.00010%、0.00050%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%である複数の配列を含んでいてもよい。

20

【0323】

免疫細胞の試料を小さな反応容積に分割し、複数の免疫細胞の個々の免疫細胞からの、または個々の細胞に由来するポリヌクレオチドの分子およびベッセルバーコード付与と併用することにより、重鎖および軽鎖配列のレパートリーのハイスループット配列決定が可能になり得る。また、こうした方法は、バーコード化配列に基づいて配列決定した後、重鎖および軽鎖の対合を可能にし得る。また、本明細書に記載のように試料を小さな反応容積に分割することは、試薬使用量を低減し、それにより分析の材料費の削減を可能にし得る。

【0324】

30

一部の場合では、逆転写反応および／または增幅反応（例えば、PCR）は、液滴デジタルPCR等のように、液滴中で実施される。ある特定の態様では、本発明は、標的物質の全体または部分を含有する流体区画を提供する。一部の実施形態では、区画は、液滴である。明細書の全体にわたって「液滴」が参照されているが、この用語は、別様の指定がない限り、流体区画および流体分配と同義的に使用される。別様の指定がある場合を除き、便宜的に「液滴」を使用し、任意の流体分配または区画を使用することができる。本明細書で使用される液滴は、米国特許第7,622,280号に記載のもの等の、エマルジョン組成物（または、2つまたはそれよりも多くの不混和性流体の混合物）を含んでいてもよい。液滴は、WO2010/036352に記載のデバイスにより生成することができる。用語「エマルジョン」は、本明細書で使用される場合、不混和性液体（油および水等の）の混合物を指す場合がある。油相および／または油中水型エマルジョンは、水性液滴内での反応混合物の区画化を可能にする。エマルジョンは、連続油相内に水性液滴を含むことができる。本明細書で提供されるエマルジョンは、液滴が連続水相内の油液滴である水中油型エマルジョンであってもよい。本明細書で提供される液滴は、区画間の混合を防止し、各区画が、その内容物を、蒸発および他の区画の内容物との凝集から保護するように設計される。

40

【0325】

本明細書に記載されている混合物またはエマルジョンは、安定であってもよく、または不安定であってもよい。エマルジョンは、比較的安定しており、凝集は最小限である。小液滴が組み合わさって次第により大きな液滴を形成する場合、凝集が生じたという。一部の場合では、液滴生成装置から生成された液滴の0.00001%、0.00005%、

50

0 . 0 0 0 1 0 %、0 . 0 0 0 5 0 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 0 5 %、0 . 0 1 %、0 . 0 5 %、0 . 1 %、0 . 5 %、1 %、2 %、2 . 5 %、3 %、3 . 5 %、4 %、4 . 5 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、または1 0 %未満が、他の液滴と凝集する。また、エマルジョンは、フロキュレーションが限定的であってもよく、フロキュレーションとは、分散相が懸濁液からフレーク状に沈殿するプロセスである。

【0326】

約0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、1、5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 8 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、もしくは5 0 0ミクロンの、または約0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、1、5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 8 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、もしくは5 0 0ミクロン未満の、または約0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、1、5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 8 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、もしくは5 0 0ミクロンよりも大きな、または少なくとも約0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、1、5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 8 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、もしくは5 0 0ミクロンの平均直径を有する液滴を生成することができる。液滴は、約0 . 0 0 1～約5 0 0、約0 . 0 1～約5 0 0、約0 . 1～約5 0 0、約0 . 1～約1 0 0、約0 . 0 1～約1 0 0、または約1～約1 0 0ミクロンの平均直径を有していてもよい。マイクロチャネルクロスフローフォーカシング(microchannel cross-flow focusing)または物理的な攪拌を使用して、単分散または多分散エマルジョンのいずれかが生成される、エマルジョン液滴を生成するためのマイクロ流体法が既知である。液滴は、単分散液滴であってもよい。液滴は、液滴のサイズが、液滴の平均サイズのプラスまたはマイナス5 %を超えて変動しないように生成することができる。一部の場合では、液滴は、液滴のサイズが、液滴の平均サイズのプラスまたはマイナス2 %を超えて変動しないように生成される。液滴生成装置は、单一試料から液滴の集団を生成することができ、液滴はいずれも、液滴の全集団の平均サイズのプラスまたはマイナス約0 . 1 %、0 . 5 %、1 %、1 . 5 %、2 %、2 . 5 %、3 %、3 . 5 %、4 %、4 . 5 %、5 %、5 . 5 %、6 %、6 . 5 %、7 %、7 . 5 %、8 %、8 . 5 %、9 %、9 . 5 %、または1 0 %を超えてサイズが変動しない。

【0327】

より高い機械的安定性は、マイクロ流体の操作、およびより高剪断での流体処理(例えば、マイクロ流体毛細管での、または流体経路中のバルブ等の90度屈曲による)に有用であり得る。熱処理前または熱処理後の液滴またはカプセルは、標準的ピペット操作および遠心分離に対して機械的に安定であり得る。

【0328】

液滴は、油相を水性試料に通して流動させることにより形成することができる。水相は、細胞、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、分子バーコード化ポリヌクレオチド、ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド、プライマー、鑄型核酸、ならびにDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、および/または逆転写酵素等の酵素を含む、増幅反応を実施するための緩衝溶液および試薬を含んでいてもよい。

【0329】

水相は、ビーズ等の固体表面を用いてまたは用いずに増幅反応を実施するための緩衝溶液および試薬を含んでいてもよい。緩衝溶液は、約1、5、1 0、1 5、2 0、3 0、5 0、1 0 0、もしくは2 0 0 mMの、約1、5、1 0、1 5、2 0、3 0、5 0、1 0 0、もしくは2 0 0 mMよりも多くの、または約1、5、1 0、1 5、2 0、3 0、5 0、1 0 0、もしくは2 0 0 mM未満のTriisを含んでいてもよい。一部の場合では、塩化カリウムの濃度は、約1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、8 0、1 0 0、2 0 0 mMであるか、約1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、8 0、1 0 0、2 0 0 mMよりも高いか、または約1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、8 0、1 0 0、2 0 0 mM未満で

10

20

30

40

50

あってもよい。緩衝溶液は、約 15 mM Tris および 50 mM KCl を含んでいてもよい。スクレオチドは、濃度が、各々、約 50、100、200、300、400、500、600、もしくは 700 μm の、約 50、100、200、300、400、500、600、もしくは 700 μm よりも高い、または約 50、100、200、300、400、500、600、もしくは 700 μm 未満の dATP、dCTP、dTTP、および dTTP を含むデオキシリボスクレオチド三リン酸分子を含んでいてもよい。一部の場合では、dUTP は、約 50、100、200、300、400、500、600、もしくは 700、800、900、もしくは 1000 μm の、約 50、100、200、300、400、500、600、もしくは 700、800、900、もしくは 1000 μm よりも高い、または約 50、100、200、300、400、500、600、もしくは 700、800、900、もしくは 1000 μm 未満の濃度になるように水相内に添加される。一部の場合では、塩化マグネシウムまたは酢酸マグネシウム (MgCl₂) は、約 1.0、2.0、3.0、4.0、もしくは 5.0 mM の、約 1.0、2.0、3.0、4.0、もしくは 5.0 mM 未満の濃度で水相に添加される。MgCl₂ の濃度は、約 3.2 mM であってもよい。一部の場合では、酢酸マグネシウムまたはマグネシウムが使用される。一部の場合では、硫酸マグネシウムが使用される。
10

【0330】

BSA またはウシ皮膚に由来するゼラチン等の非特異的ブロッキング剤を使用することができ、ゼラチンまたは BSA は、およそ 0.1 ~ 0.9% w/v の濃度範囲で存在する。他の考え得るブロッキング剤としては、ベータラクトグロブリン、カゼイン、粉乳、または他の一般的なブロッキング剤を挙げることができる。一部の場合では、BSA およびゼラチンの好ましい濃度は、約 0.1% w/v である。
20

【0331】

水相内の增幅用プライマーは、約 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、もしくは 2.0 μm の、約 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、もしくは 2.0 μm よりも高い、または約 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、もしくは 2.0 μm 未満の濃度を有していてもよい。水相内のプライマー濃度は、約 0.05 ~ 約 2、約 0.1 ~ 約 1.0、約 0.2 ~ 約 1.0、約 0.3 ~ 約 1.0、約 0.4 ~ 約 1.0、または約 0.5 ~ 約 1.0 μm であってもよい。プライマーの濃度は、約 0.5 μm であってもよい。PCR における標的核酸濃度の許容範囲は、限定されないが、約 1 pg ~ 約 500 ng の間が挙げられる。
30

【0332】

また、一部の場合では、水相は、添加剤を含んでいてもよく、添加剤としては、これらに限定されないが、非特異的バックグラウンド / ブロッキング核酸（例えば、サケ精子DNA）、バイオプリザバティブ (biopreservative)（例えば、アジ化ナトリウム）、PCR エンハンサー（例えば、ベタイン、トレハロース等）、および阻害剤（例えば、RNAse 阻害剤）が挙げられる。他の添加剤としては、例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO)、グリセロール、ベタイン（-）水和物 (N,N,N-Triethylglycine = [カルボキシ (caroxy) - メチル] トリメチルアンモニウム、トレハロース、7-デアザ-2'-デオキシグアノシン三リン酸 (dCTGTP または 7-デアザ-2'-dTTP))、BSA (ウシ血清アルブミン)、ホルムアミド (メタンアミド)、テトラメチルアンモニウムクロリド (TMAC)、他のテトラアルキルアンモニウム誘導体（例えば、テトラエチルアンモニウムクロリド (tetraethylammonium chloride) (TEA-C1) およびテトラプロピルアンモニウムクロリド (TPrA-C1)）、非イオン性洗剤（例えば、Triton X-100、Tween 20、Nonidet P-40 (NP-40)）、または PREXCEL-Q を挙げができる。一部の場合では、水相は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 種の異なる添加剤を含んでいてもよい
40
50

。他の場合では、水相は、少なくとも 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 種の異なる添加剤を含んでいてもよい。

【0333】

一部の場合では、非イオン性エチレンオキシド / プロピレンオキシドブロックコポリマーを、約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、または 1.0% の濃度で水相に添加してもよい。一般的なバイオサーファクタント (biosurfactant) としては、Pluronics F-68、Tetronics、および Zonyl FSN 等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。Pluronics F-68 は、約 0.5% w/v の濃度で存在していてもよい。

【0334】

一部の場合では、塩化マグネシウムの代わりに、硫酸マグネシウムを同様の濃度で用いることができる。種々の供給業者から市販されている広範な一般的 PCR 緩衝液を、緩衝溶液の代わりに用いることができる。

【0335】

エマルジョンは、加熱することにより固体様界面フィルムを有するマイクロカプセルへと変換することができる液体様界面フィルムを有する高度に単分散性の液滴を生成するように調合することができる。そのようなマイクロカプセルは、PCR 増幅等の反応プロセス中にわたって内容物を保持することが可能なバイオリアクターとして働くことができる。マイクロカプセル形態への変換は、加熱時に生じてもよい。例えば、そのような変換は、約 50、60、70、80、90、または 95 よりも高い温度で生じてもよい。一部の場合では、この加熱は、サーモサイクラーを使用して生じる。加熱プロセス中、流体または鉛油オーバーレイを使用して、蒸発を防止してもよい。過剰な連続相油は、加熱前に除去してもよく、または除去しなくてもよい。生体適合性カプセルは、幅広い熱的および機械的処理で凝集および / またはフロキュレーションに耐性であってもよい。変換後、カプセルは、約 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、もしくは 40 で、約 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、もしくは 40 よりも高い温度で、または約 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、もしくは 40 未満で保管することができる。こうしたカプセルは、巨大分子、特に、核酸またはタンパク質または両方一緒に混合物を含有する水性生物学的流体の安定デジタル化封入；薬物およびワクチン送達；生体分子ライブラリー；および臨床イメージング用途等の、生物医学的用途に有用であり得る。

【0336】

マイクロカプセルは、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含有していてもよく、特に高温で凝集に耐性であってもよい。したがって、PCR 増幅反応は、非常に高い密度（例えば、1 単位容積当たりの反応数）で生じてもよい。一部の場合では、1 ml 当たり 100,000, 500,000, 1,000,000, 1,500,000, 2,000,000, 2,500,000, 5,000,000、または 10,000,000 より多くの別個の反応が生じてもよい。一部の場合では、反応は、単一のウェルにて、例えば、マイクロタイタープレートのウェルにて、反応容積間で相互混合を生じさせずに生じる。また、マイクロカプセルは、逆転写、プライマー伸長、および / または PCR 反応が生じることを可能にするために必要な他の成分、例えばプライマー、プローブ、dNTP、DNA または RNA ポリメラーゼ等を含有していてもよい。こうしたカプセルは、幅広い熱的および機械的処理で凝集およびフロキュレーションに耐性を示す。

【0337】

一部の場合では、増幅ステップは、マイクロ流体に基づくデジタル PCR または液滴デジタル PCR 等のデジタル PCR を実施することにより行われる。

【0338】

液滴は、マイクロ流体システムまたはデバイスを使用して生成することができる。本明細書で使用される場合、「マイクロ」という接頭辞（例えば、「マイクロチャネル」）また

10

20

30

40

50

は「マイクロ流体」の) は、一般的に、約 1 mm 未満の、一部の場合では、約 100 ミクロン (マイクロメートル) 未満の幅または直径を有する要素または物品を指す。一部の場合では、要素または物品は、流体が流動し得るチャネルを含む。加えて、「マイクロ流体」は、本明細書で使用される場合、少なくとも 1 つのマイクロスケールチャネルを含むデバイス、装置、またはシステムを指す。

【 0339 】

マイクロ流体システムおよびデバイスは、様々な状況で、典型的には小型実験室 (例えば、臨床) 分析の状況で記載されている。他の使用も同様に記載されている。例えば、国際特許出願公開番号 WO 01 / 89788 、 WO 2006 / 040551 、 WO 2006 / 040554 、 WO 2004 / 002627 、 WO 2008 / 063227 、 WO 2004 / 091763 、 WO 2005 / 021151 、 WO 2006 / 096571 、 WO 2007 / 089541 、 WO 2007 / 081385 、および WO 2008 / 063227 。

【 0340 】

液滴は、一般的に、第 2 のキャリア流体内に、ある量の第 1 の試料流体を含む。当技術分野で既知の、液滴を形成するための任意の技法を、本発明の方法と共に使用することができる。例示の方法は、標的物質 (例えば、免疫細胞) を含有する試料流体の流動を、流動中のキャリア流体の 2 つの対向流動と交差するように流動させることを含む。キャリア流体は、試料流体と不混和性である。試料流体を、流動中のキャリア流体の 2 つの対向流動と交差させることにより、標的物質を含有する個々の試料液滴内への試料流体の分配がもたらされる。

【 0341 】

キャリア流体は、試料流体と不混和性である任意の流体であってもよい。例示のキャリア流体は、油である。ある特定の実施形態では、キャリア流体は界面活性剤を含む。

【 0342 】

同じ方法を適用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 、多重鎖置換增幅等の非 PCR 系增幅反応、または当業者に既知の他の方法等の增幅反応用の試薬等の他の試薬を含有する個々の液滴を創出することができる。 PCR に基づく増幅反応の実施に好適な試薬は当業者に既知であり、これらに限定されないが、 DNA ポリメラーゼ、フォワードおよびリバースプライマー、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) 、ならびに 1 つまたは複数の緩衝液が挙げられる。

【 0343 】

ある特定の実施形態では、流体区画は、標的物質 (例えば、免疫細胞および / またはビーズ等の固体支持体) を含む第 1 の流体分配 (例えば、液滴) および第 2 の流体 (例えば、流体流動として、または液滴内) を提供することにより形成される。第 1 および第 2 の流体を合流させて、液滴を形成する。合流は、 2 つの流体に電場をかけることにより達成してもよい。ある特定の実施形態では、第 2 の流体は、ポリメラーゼ連鎖反応または増幅反応等の増幅反応を実施するための試薬を含有する。

【 0344 】

ある特定の態様では、本発明は、固有にバーコード化された重鎖および軽鎖抗体配列ならびに / またはアルファおよびベータ鎖 TCR 配列ならびに / またはガンマおよびデルタ鎖 TCR 配列のライブラリーを作製するための方法であって、各構築物が固有の N 量体および機能性 N 量体を含む複数の核酸構築物を得ることを含む方法を提供する。機能性 N 量体は、ランダム N 量体、 PCR プライマー、ユニバーサルプライマー、抗体、粘着末端、または任意の他の配列であってもよい。上記方法は、各々が固有の構築物の 1 つまたは複数のコピーを含有する N 数の流体区画の M 個のセットを作製することを含んでいてもよい。上記方法は、追加の構築物をセット内の各区画に添加し、これを各セットについて繰り返して、各々が固有な 1 対の構築物を含有する N × M 個の区画を生成することにより、より高度な複雑さを有するバーコードライブラリーを創出することができる。これらの対をハイブリダイズまたはライゲーションして、新しい構築物を生成してもよい。バーコード

10

20

30

40

50

ライプラリー内の各構築物では、各固有N量体は、配列決定、プローブハイブリダイゼーション、他の方法、または方法の組合せにより識別するのに適していてもよい。

【0345】

液滴ライプラリー

一般的に、液滴ライプラリーは、單一コレクション内に共にプールされているいくつかのライプラリー要素で構成される。ライプラリーは、複雑さが、單一のライプラリー要素から 1×10^{15} 個またはそれよりも多くのライプラリー要素まで、様々であってもよい。各ライプラリー要素は、一定濃度の1つまたは複数の所与の成分である。要素は、これらに限定されないが、細胞、ビーズ、アミノ酸、タンパク質、ポリペプチド、核酸、ポリヌクレオチド、または小分子化合物であってもよい。要素は、分子バーコード、ベッセルバーコード、または両方等の識別子を含有していてもよい。

【0346】

細胞ライプラリー要素としては、これらに限定されないが、ハイブリドーマ、B細胞、T細胞、初代細胞、培養細胞株、がん細胞、幹細胞、または任意の他の細胞タイプを挙げることができる。細胞ライプラリー要素は、1個から数万個までの数の細胞を個々の液滴に封入することにより調製される。封入細胞の数は、通常、細胞の数密度および液滴の容積からポアソン統計により求められる。しかしながら、一部の場合では、個数は、Eddら、Lab Chip、8巻(8号)：1262～1264頁、2008年に記載されているようにポアソン統計から逸脱する。細胞は性質が分散性であるため、ライプラリーを、全てが單一の開始培地に存在する、各々が1つの抗体またはTCRを産生する免疫細胞等の複数の細胞バリエントを有する集団に調製することが可能であり、その後、その培地を、多くとも1つの細胞を含有する個々の液滴カプセルに分ける。その後、個々の液滴カプセル内の細胞を溶解し、溶解細胞に由来する重鎖および軽鎖ポリヌクレオチドならびに／またはアルファおよびベータ鎖ポリヌクレオチドならびに／またはガンマおよびデルタ鎖ポリヌクレオチドを、分子バーコードおよびベッセルでバーコード化し、増幅し、その後組み合わせ、またはプールして、重鎖および軽鎖ならびに／またはアルファおよびベータ鎖ならびに／またはガンマおよびデルタ鎖ライプラリー要素で構成されるライプラリーを形成する。

【0347】

ビーズに基づくライプラリー要素は、1つまたは複数のビーズを含有し、また、抗体、酵素、または他のタンパク質等の他の試薬を含んでいてもよい。全てのライプラリー要素が異なるタイプのビーズを含有するが、周囲媒体が同じである場合、ライプラリー要素は全て、單一の開始流体から調製されていてもよく、または様々な開始流体を有していてもよい。バリエントのコレクションから集団に調製する細胞のライプラリーの場合、ライプラリー要素は、様々な開始流体から調製されることになる。複数の細胞から開始する場合、1液滴当たり正確に1つの細胞を有しており、1つよりも多くの細胞を含有する液滴が極少数であることが望ましい。一部の場合では、1液滴当たり正確に1つの細胞を含有する液滴がより多くなり、空の液滴または1つよりも多くの細胞を含有する液滴が少数の例外になるように、ポアソン統計からの変動を実現して、液滴の積み込み強化を提供することができる。

【0348】

一部の実施形態では、複数のベッセルバーコード化ポリヌクレオチドから開始する場合、1液滴当たり正確に1つのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを有しており、1つよりも多くのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを含有する液滴が極少数であることが望ましい。一部の場合では、1液滴当たり正確に1つのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを有する液滴がより多くなり、空の液滴または1つよりも多くのベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを含む液滴が少数の例外になるように、ポアソン統計からの変動を実現して、液滴の積み込み強化を提供することができる。

【0349】

液滴ライプラリーの例は、ビーズ、細胞、小分子、DNA、プライマー、抗体、および

10

20

30

40

50

バーコード化ポリヌクレオチド等の様々な異なる内容物を有する液滴のコレクションである。液滴のサイズは、直径が、およそ0.5ミクロンから500ミクロンまでの範囲であり、これは、約1ピコリットル～1ナノリットルに対応する。しかしながら、液滴は、5ミクロンと小さくてもよく、500ミクロンと大きくてもよい。好ましくは、液滴は、直径が、100ミクロン未満、約1ミクロン～約100ミクロンである。最も好ましいサイズは、直径が、約20～40ミクロン(10～100ピコリットル)である。液滴ライブラリーの検討される好ましい特性としては、浸透圧バランス、均一なサイズ、およびサイズ範囲が挙げられる。

【0350】

本発明により提供される液滴ライブラリー内に含まれる液滴は、サイズが、好ましくは均一である。すなわち、ライブラリー内の任意の液滴の直径は、同じライブラリー内の他の液滴の直径と比較して、5%、4%、3%、2%、1%、または0.5%未満しか変動しないだろう。ライブラリーの液滴のサイズが均一であることは、液滴の安定性および完全性を保つために重要である場合があり、また、後に、本明細書に記載されている種々の生物学的および化学的アッセイのために、ライブラリー内の液滴を使用するために不可欠である場合がある。

【0351】

本発明は、不混和性流体内に複数の水性液滴を含み、各液滴が、好ましくはサイズが実質的に均一であり、異なるライブラリー要素を含む液滴ライブラリーを提供する。本発明は、液滴ライブラリーを形成するための方法であって、異なるライブラリー要素を含む単一の水性流体を準備すること、各ライブラリー要素を不混和性流体内の水性液滴内に封入することを含む方法を提供する。

【0352】

ある特定の実施形態では、異なるタイプの要素(例えば、細胞またはビーズ)を、同じ培地に含有される単一供給源にプールする。初期プールを行った後、要素を液滴に封入して、液滴のライブラリーを生成し、異なるタイプのビーズまたは細胞を有する各液滴は、異なるライブラリー要素である。初期溶液を希釈することにより、封入プロセスが可能になる。一部の実施形態では、形成される液滴は、単一の要素を含有することになるか、または何も含有しないことになる、つまり空になるかのいずれかである。他の実施形態では、形成される液滴は、ライブラリー要素の複数コピーを含有することになる。封入されている要素は、一般的に、あるタイプのバリエントである。一例では、要素は、血液試料の免疫細胞であり、各免疫細胞は、免疫細胞内の抗体のヌクレオチド配列を増幅およびバーコード化するために封入される。

【0353】

例えば、1つのタイプのエマルジョンライブラリーには、異なる粒子、つまり異なる培地内の細胞またはバーコード化ポリヌクレオチドを有し、プールする前に封入されているライブラリー要素が存在する。一例では、指定数のライブラリー要素、つまりn数の異なる細胞またはバーコード化ポリヌクレオチドが、異なる培地内に含有されている。ライブラリー要素の各々は、別々に乳化およびプールされ、その地点で、n数のプールされた異なるライブラリー要素の各々が組み合わされ、单一プールにプールされる。その結果として得られるプールは、各々が異なるタイプの粒子を含有する複数の油中水型エマルジョン液滴を含有する。

【0354】

一部の実施形態では、形成される液滴は、単一のライブラリー要素を含有することになるか、または何も含有しないことになる、つまり空になるかのいずれかである。他の実施形態では、形成される液滴は、ライブラリー要素の複数コピーを含有することになる。ビーズの内容物は、ポアソン分布に従い、事象が既知の平均率で生じ、その直前の事象と時間的に独立している場合、ある一定期間にいくつかの事象が生じる確率を表す離散確率分布が存在する。ライブラリーを創出するために使用される油および界面活性剤は、ライブラリーの内容物が液滴間で交換されることを防止する。

10

20

30

40

50

【0355】

プライマー

一般的に、1対または複数対のプライマーを増幅反応に使用することができる。プライマー対の1つのプライマーは、フォワードプライマーであってもよく、プライマー対の1つのプライマーは、リバースプライマーであってもよい。

【0356】

一部の場合では、第1の対のプライマーを増幅反応に使用することができる。第1の対の1つのプライマーは、第1の標的ポリヌクレオチド分子の配列に相補的なフォワードプライマーであってもよく、第1の対の1つのプライマーは、リバースプライマーであってもよく、第1の標的ポリヌクレオチド分子の第2の配列と相補的であってもよく、第1の標的遺伝子座は、第1の配列と第2の配列との間に存在してもよい。一部の実施形態では、第1の標的遺伝子座は、 V_H または V または V' 配列を含む。一部の実施形態では、第1の標的遺伝子座は、AID配列および / またはAMB配列を含む。10

【0357】

一部の場合では、第2の対のプライマーを増幅反応に使用することができる。第2の対の1つのプライマーは、第2の標的ポリヌクレオチド分子の第1の配列に相補的なフォワードプライマーであってもよく、第2の対の1つのプライマーは、第2の標的ポリヌクレオチド分子の第2の配列と相補的なリバースプライマーであってもよく、第2の標的遺伝子座は、第1の配列と第2の配列との間に存在してもよい。一部の実施形態では、第2の標的遺伝子座は、 V_L または V または V' 配列を含む。20

【0358】

一部の場合では、第3の対のプライマーを増幅反応に使用することができる。第3の対の1つのプライマーは、第3の標的ポリヌクレオチド分子の第1の配列に相補的なフォワードプライマーであってもよく、第3の対の1つのプライマーは、第3の標的ポリヌクレオチド分子の第2の配列と相補的なリバースプライマーであってもよく、第3の標的遺伝子座は、第1の配列と第2の配列との間に存在してもよい。一部の実施形態では、第3の標的遺伝子座は、分子バーコードまたはベッセルバーコード等のバーコードを含む。

【0359】

フォワードプライマーおよびリバースプライマーの長さは、標的ポリヌクレオチドおよび標的遺伝子座の配列に依存してもよい。例えば、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの長さおよび / または T_M は、最適化することができる。一部の場合では、プライマーは、長さが、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60個の、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60個よりも多くの、または約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60個未満のヌクレオチドであってもよい。一部の場合では、プライマーは、長さが、約15～約20、約15～約25、約15～約30、約15～約40、約15～約45、約15～約50、約15～約55、約15～約60、約20～約25、約20～約30、約20～約35、約20～約40、約20～約45、約20～約50、約20～約55、約20～約60個のヌクレオチドである。40

【0360】

プライマーは、錆型ポリヌクレオチドと結合する前は、一本鎖DNAであってもよい。

50

一部の場合では、プライマーは、初期には二本鎖配列を含む。プライマーの適切な長さは、プライマーの使用目的に依存していてもよいが、約6から約50個までのヌクレオチド、または約15から約35個までのヌクレオチドの範囲であってもよい。短いプライマー分子の場合、一般的には、鑄型との十分に安定したハイブリッド複合体を形成するためには、より低い温度が必要とされる場合ある。一部の実施形態では、プライマーは、鑄型核酸の正確な配列を反映する必要はなく、鑄型とのハイブリダイズに十分な程度に相補的であればよい。一部の場合では、プライマーは、鑄型ポリヌクレオチドと結合する前は、部分的に二本鎖であってもよい。二本鎖配列を有するプライマーは、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個の、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個より多くの、または約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20個未満の塩基のヘアピンループを有していてもよい。プライマーの二本鎖部分は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50個の、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50個よりも多くの、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50個未満の、または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50個の塩基対であってもよい。所与の標的配列を増幅するための好適なプライマーの設計は、当技術分野で周知である。

【0361】

30

プライマーには、プライマーの検出または固定化を可能にするが、プライマーの基本的な特性（例えば、DNA合成開始地点として作用すること）を変更しない追加の特徴を組み込むことができる。例えば、プライマーは、標的核酸にハイブリダイズしないが、クローニングまたはさらなる増幅または増幅産物の配列決定を容易にする追加の核酸配列を5'末端に含有していてもよい。例えば、追加の配列は、ユニバーサルプライマー結合部位等のプライマー結合部位を含んでいてもよい。鑄型とハイブリダイズするのに十分な相補性を有するプライマーの領域は、本明細書では、ハイブリダイズ領域と呼ばれる場合がある。

【0362】

40

別の場合では、本明細書に記載されている方法および組成物に利用されるプライマーは、1つまたは複数のユニバーサルヌクレオシドを含んでいてもよい。ユニバーサルヌクレオシドの非限定的な例は、米国特許出願公開第2009/0325169号および第2010/0167353号に記載されている5-ニトロインドールおよびイノシンである。

【0363】

50

プライマーは、二次構造および自己ハイブリダイゼーションを回避するための既知のパラメータに従って設計することができる。異なるプライマー対は、ほぼ同じ温度で、例えば、別のプライマー対の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以内でアニーリングおよび融解してもよい。一部の場合では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、500、1000、5000、10,000個、またはそれよりも多くのプラ

イマーが、初期に使用される。そのようなプライマーは、本明細書に記載の標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができる。

【 0 3 6 4 】

プライマーは、これらに限定されないが、適切な配列のクローニング、および当技術分野で周知の方法を使用した直接的化学合成を含む様々な方法により調製することができる (Narangら、Methods Enzymol.、68巻：90頁(1979年)；Brownら、Methods Enzymol.、68巻：109頁(1979年))。また、プライマーは、商業的供給源から得ることができる。プライマーは、同一の融解温度を有していてもよい。プライマーは、非同一の融解温度を有していてもよい。プライマーの長さを、5'末端または3'末端で伸長または短縮して、所望の融解温度を有するプライマーを生成することができる。プライマー対のプライマーの一方は、他方のプライマーよりも長くてもよい。プライマー対内の、プライマーの3'アニーリング長は、異なっていてもよい。また、各プライマー対のアニーリング位置は、プライマー対の配列および長さが、所望の融解温度をもたらすように設計することができる。25塩基対よりも短いプライマーの融解温度を決定するための式は、ウォーレスのルール ($T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$) である。また、コンピュータプログラムを使用して、プライマーを設計してもよい。各プライマーの T_m (融解温度またはアニーリング温度) は、ソフトウェアプログラムを使用して算出することができる。プライマーのアニーリング温度は、これらに限定されないが、1、2、3、4、5サイクル目、6～10サイクル目、10～15サイクル目、15～20サイクル目、20～25サイクル目、25～30サイクル目、30～35サイクル目、または35～40サイクル目を含む、任意の增幅サイクル後に再計算し、増加させてもよい。最初の增幅サイクル後、プライマーの5'側半分を、各目的遺伝子座に由来する産物に組み込んでもよく、したがって、 T_m は、各プライマーの5'側半分および3'側半分の両配列に基づいて再計算してもよい。

【 0 3 6 5 】

seqIREStam、seqIRESzpet、seqori、seqPCR、seqpIRES-、seqpIRES+、seqpSectag、seqpSectag+、seqretro+PSI、SP6、T3-prom、T7-prom、およびT7-terminivが挙げられる。本明細書で使用される場合、付着は、共有結合による相互作用および非共有結合による相互作用の両方またはいずれかを指すことができる。ユニバーサルプライマー結合部位へのユニバーサルプライマーの付着を、ポリヌクレオチドおよび/またはアンプリコンの増幅、検出、および/または配列決定に使用してもよい。ユニバーサルプライマー結合部位は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000個のヌクレオチドまたは塩基対を含んでいてもよい。別の例では、ユニバーサルプライマー結合部位は、少なくとも約1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、または10000個のヌクレオチドまたは塩基対を含む。一部の実施形態では、ユニバーサルプライマー結合部位は、1~10、10~20、10~30、または10~100個のヌクレオチドまたは塩基対を含む。一部の実施形態では、ユニバーサルプライマー結合部位は、約1~90、1~80、1~70、1~60、1~50、1~40、1~30、1~20、1~10、2~90、2~80、2~70、2~60、2~50、2~40、2~30、2~20、2~10、1~900、1~800、1~700、1~600、1~500、1~400、1~300、1~200、1~100、2~900、2~800、2~700、2~600、2~500、2~400、2~300、2~200、2~100、5~900、5~800、5~700、5~600、5~500、5~400、5~300、5~200、5~100、10~900、10~800、10~700、10~600、10~500、10~400、10~300、10~200、10~100、25~900、25~800、25~700、25~600、25~500、25~400、25~300、25~200、25~100、100~1000、100~900、100~800、100~700、100~600、100~500、100~400、100~300、100~200、100~100、200~900、200~800、200~700、200~600、200~500、200~400、200~300、300~1000、300~900、300~800、300~700、300~600、300~500、300~400、400~1000、400~900、400~800、400~700、400~600、400~500、500~1000、500~900、500~800、500~700、500~600、600~1000、600~900、600~800、600~700、700~1000、700~900、700~800、800~1000、800~900、または900~1000個のヌクレオチドまたは塩基対を含む。

【0366】

プライマーは、プライマー伸長産物の合成におけるその使用と適合する長さを有してもよい。プライマーは、長さが8~200個のヌクレオチドであるポリヌクレオチドであってもよい。プライマーの長さは、鑄型ポリヌクレオチドおよび鑄型遺伝子座の配列に依存していてもよい。例えば、プライマーまたはプライマーセットの長さおよび/または融解温度(T_m)は最適化することができる。一部の場合では、プライマーは、長さが、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60個の、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、

23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60個よりも多くの、または約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60個未満のスクレオチドであってもよい。一部の実施形態では、プライマーは、長さが約8～100個のスクレオチド、例えば、長さが10～75、15～60、15～40、18～30、20～40、21～50、22～45、25～40、7～9、12～15、15～20、15～25、15～30、15～45、15～50、15～55、15～60、20～25、20～30、20～35、20～45、20～50、20～55、または20～60個の、およびそれら間の任意の長さのスクレオチドである。一部の実施形態では、プライマーは、長さが、多くとも約10、12、15、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個のスクレオチドである。
。

【0367】

一般的に、1対または複数対のプライマーを指数関数的增幅反応に使用することができる。プライマー対の1つのプライマーは、フォワードプライマーであってもよく、プライマー対の1つのプライマーは、リバースプライマーであってもよい。一部の実施形態では、第1の対のプライマーを指数関数的增幅反応に使用することができる。第1の対の1つのプライマーは、第1の錆型ポリヌクレオチド分子の配列に相補的なフォワードプライマーであってもよく、第1の対の1つのプライマーは、第1の錆型ポリヌクレオチド分子の第2の配列と相補的なリバースプライマーであってもよく、第1の錆型遺伝子座は、第1の配列と第2の配列との間に存在していてもよい。一部の実施形態では、第2の対のプライマーを増幅反応に使用することができる。第2の対の1つのプライマーは、第2の標的ポリヌクレオチド分子の第1の配列に相補的なフォワードプライマーであってもよく、第2の対の1つのプライマーは、第2の標的ポリヌクレオチド分子の第2の配列と相補的なリバースプライマーであってもよく、第2の標的遺伝子座は、第1の配列と第2の配列との間に存在していてもよい。一部の実施形態では、第2の標的遺伝子座は、可変軽鎖抗体配列を含む。一部の実施形態では、第3の対のプライマーを増幅反応に使用することができる。第3の対の1つのプライマーは、第3の錆型ポリヌクレオチド分子の第1の配列に相補的なフォワードプライマーであってもよく、第3の対の1つのプライマーは、第3の錆型ポリヌクレオチド分子の第2の配列と相補的なリバースプライマーであってもよく、第3の錆型遺伝子座は、第1の配列と第2の配列との間に存在していてもよい。
。

【0368】

1つまたは複数のプライマーは、複数の錆型ポリヌクレオチドの少なくとも部分にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、複数の錆型ポリヌクレオチドの3'末端および/または5'末端にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、複数の錆型ポリヌクレオチドの内部領域にアニーリングすることができる。内部領域は、複数の錆型ポリヌクレオチドの3'末端または5'末端から、少なくとも約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、100、150、200、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、または50

1000個のヌクレオチドであってもよい。1つまたは複数のプライマーは、一定のパネルのプライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の特注プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の対照プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数のハウスキーピング遺伝子プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含んでいてもよい。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニーリングすることができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の特注プライマーは、SBC、標的特異的領域、それらの相補体、またはそれらの任意の組合せにアニーリングする。1つまたは複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、プライマー伸長、逆転写、線形伸長、非指指数関数的增幅、指指数関数的增幅、PCR、または1つもしくは複数の標的もしくは鑄型ポリヌクレオチドの任意の他の增幅法を増幅または実施するように設計することができる。
10

【0369】

標的特異的領域は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、
12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、2
5、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38
、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、100
、150、200、220、230、240、250、260、270、280、290
、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390
、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490
、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590
、600、650、700、750、800、850、900、または1000個のヌク
レオチドまたは塩基対を含んでいてもよい。別の例では、標的特異的領域は、少なくとも
約1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000
、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000
、9500、または10000個のヌクレオチドまたは塩基対を含む。一部の実施形態で
は、標的特異的領域は、約5～10、10～15、10～20、10～30、15～30
、10～75、15～60、15～40、18～30、20～40、21～50、22～
45、25～40、7～9、12～15、15～20、15～25、15～30、15～
45、15～50、15～55、15～60、20～25、20～30、20～35、2
0～45、20～50、20～55、20～60、2～900、2～800、2～700
、2～600、2～500、2～400、2～300、2～200、2～100、25～
900、25～800、25～700、25～600、25～500、25～400、2
5～300、25～200、25～100、100～1000、100～900、100
～800、100～700、100～600、100～500、100～400、100
～300、100～200、200～1000、200～900、200～800、20
0～700、200～600、200～500、200～400、200～300、30
0～1000、300～900、300～800、300～700、300～600、3
00～500、300～400、400～1000、400～900、400～800、
400～700、400～600、400～500、500～1000、500～900
、500～800、500～700、500～600、600～1000、600～90
0、600～800、600～700、700～1000、700～900、700～8
00、800～1000、800～900、または900～1000個のヌクレオチドま
たは塩基対を含む。
20

【0370】

プライマーは、二次構造および自己ハイブリダイゼーションを回避するための既知のパ
ラメータに従って設計することができる。一部の実施形態では、異なるプライマー対は、
ほぼ同じ温度で、例えば、別のプライマー対の1、2、3、4、5、6、7
、8、9、または10以内でアニーリングおよび融解してもよい。一部の実施形
50

態では、複数のプライマーの1つまたは複数のプライマーは、ほぼ同じ温度で、例えば、複数のプライマー中の別のプライマー対の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以内でアニーリングおよび融解してもよい。一部の実施形態では、複数中の1つまたは複数のプライマーは、複数のプライマー中の別のプライマーとは異なる温度でアニーリングおよび融解してもよい。

【0371】

本明細書に記載されている方法の1つまたは複数のステップのための複数のプライマーは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、110000、120000、130000、140000、150000、160000、170000、180000、190000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000、1000000、1100000、1200000、1300000、1400000、1500000、1600000、1700000、1800000、1900000、2000000、3000000、4000000、5000000、6000000、7000000、8000000、9000000、10000000、11000000、12000000、13000000、14000000、15000000、16000000、17000000、18000000、19000000、20000000、30000000、40000000、50000000、60000000、70000000、80000000、90000000、100000000、110000000、120000000、130000000、140000000、150000000、160000000、170000000、180000000、190000000、200000000、300000000、400000000、500000000、600000000、700000000、800000000、900000000、1000000000、1100000000、1200000000、1300000000、1400000000、1500000000、1600000000、1700000000、1800000000、1900000000、2000000000、3000000000、4000000000、5000000000、6000000000、7000000000、8000000000、9000000000、10000000000、11000000000、12000000000、13000000000、14000000000、15000000000、16000000000、17000000000、18000000000、19000000000、20000000000、30000000000、40000000000、50000000000、60000000000、70000000000、80000000000、90000000000、100000000000個の、多くとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、110000、120000、130000、140000、150000、160000、170000、180000、190000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000、1000000、1100000、1200000、1300000、1400000、1500000、1600000、1700000、1800000、1900000、2000000、3000000、4000000、5000000、6000000、7000000、8000000、9000000、10000000、11000000、12000000、13000000、14000000、15000000、16000000、17000000、18000000、19000000、20000000、30000000、40000000、50000000、60000000、70000000、80000000、90000000、100000000個の、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、110000、120000、130000、140000、150000、160000、170000、180000、190000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000、1000000、1100000、1200000、1300000、1400000、1500000、1600000、1700000、1800000、1900000、2000000、3000000、4000000、5000000、6000000、7000000、8000000、9000000、10000000個の異なるプライマーを含む複数のプライマーを含んでいてもよい。例えば、複数のプライマーの各プライマーは、異なる標的または鋳型特異的領域または配列を含んでいてもよい。

【0372】

逆転写

一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、逆転写によりRNAから調製される。一部の場合では、標的ポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ等を使用して、プライマー伸長によりDNAから調製される。

【0373】

本明細書に記載されている方法は、逆転写-PCR併用法(coupled reverse transcription-PCR)（逆転写-PCR）で使用することができる。例えば、逆転写およびPCRは、2つの個別ステップで実施してもよい。最初に、ポリヌクレオチドdTプライマー、配列特異的プライマー、ユニバーサルプライマー、または本明細書に記載の任意のプライマーのいずれかを使用して、試料mRNAのcDNAコピーを合成してもよい。

10

20

30

40

50

【0374】

逆転写およびPCRは、単一の閉鎖ベッセル反応で実施してもよい。例えば、1つは逆転写用、2つはPCR用の3つのプライマーを用いてもよい。逆転写用のプライマーは、PCRアンブリコンの位置に対して3'側でmRNAと結合してもよい。必須ではないが、逆転写プライマーは、RNA残基、またはmRNAにハイブリダイズしてもRNase Hの基質を形成することができない2'-OメチルRNA塩基等の修飾類似体を含んでいてもよい。

【0375】

逆転写反応を実施する温度は、使用されている逆転写酵素に依存する。一部の場合では、熱安定性逆転写酵素が使用され、逆転写反応は、約37～約75度、約37～約50度、約37～約55度、約37～約60度、約55～約75度、約55～約60度、または約37～約60度で実施される。一部の場合では、3つまたはそれよりも多くの非錆型末端ヌクレオチドを転写産物の末端に移動させる逆転写酵素が使用される。10

【0376】

本明細書に記載の逆転写反応およびPCR反応は、チューブ、マイクロタイタープレート、マイクロ流体デバイス、または好ましくは液滴内等の、当技術分野で公知の種々の形式で実施することができる。

【0377】

逆転写反応は、5μLから100μLまでの範囲の容積で、または10μL～20μLの反応容積で実施することができる。液滴の場合、反応容積は、1pLから100nLまで、または10pL～1nLの範囲であってもよい。一部の場合では、逆転写反応は、約1nLまたはそれ未満の容積を有する液滴中で実施される。一部の場合では、PCR反応は、1pLから100nLまで、好ましくは10pL～1nLの反応容積範囲を有する液滴中である。一部の場合では、PCR反応は、約1nLまたはそれ未満の容積を有する液滴中で実施される。一部の場合では、逆転写反応およびPCR反応は、1pLから100nLまでの、または10pL～1nLの反応容積範囲を有する同じ液滴内で実施される。一部の場合では、逆転写反応およびPCR反応は、約1nLもしくはそれ未満の容積、または約1pLもしくはそれ未満の容積を有する液滴内で実施される。一部の場合では、逆転写反応およびPCR反応は、異なる液滴内で実施される。一部の場合では、逆転写反応およびPCR反応は、各々が、1pLから100nLまでの、または10pL～1nLの反応容積範囲を有する複数の液滴内で実施される。一部の場合では、逆転写反応およびPCR反応は、各々が約1nLまたはそれ未満の容積を有する複数の液滴内で実施される。2030

【0378】

一部の場合では、第1のPCR反応は、1pLから100nLまでの、好ましくは10pL～1nLの範囲の反応容積を有する第1に液滴内であり、第2のPCR反応は、1pLから100nLまでの、好ましくは10pL～1nLの範囲の反応容積を有する第2の液滴内である。一部の場合では、第1のPCR反応は、約1nLまたはそれ未満の容積を有する第1の液滴内であり、第2のPCR反応は、約1nLまたはそれ未満の容積を有する第2の液滴内である。40

【0379】

一部の場合では、第1のPCR反応および第2のPCR反応は、各々が、1pLから100nLまでの、または10pLから1nLの反応容積範囲を有する複数の液滴内で実施される。一部の場合では、第1のPCR反応および第2のPCR反応は、各々が約1nLまたはそれ未満の容積を有する複数の液滴内で実施される。

【0380】

RNA等の標的ポリヌクレオチドを、1つまたは複数の逆転写プライマーを使用してcDNAへと逆転写してもよい。1つまたは複数の逆転写プライマーは、定常領域等の、RNAの領域に相補的な領域（例えば、mRNAの重鎖もしくは軽鎖定常領域またはポリアテール）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、逆転写プライマーは、第1のRNA50

の定常領域に相補的な領域を有する第1の逆転写プライマー、および第2のRNAの定常領域に相補的な領域を有する第2の逆転写プライマーを含んでいてもよい。一部の実施形態では、逆転写プライマーは、それぞれ、第1のRNAの定常領域に相補的な領域を有する第1の逆転写プライマー、および1つまたは複数のRNAの定常領域に相補的な領域を有する1つまたは複数の逆転写プライマーを含んでいてもよい。

【0381】

一部の実施形態では、逆転写プライマーは、バーコードを含まない。

【0382】

逆転写プライマーは、RNAの領域に相補的でない領域をさらに含んでいてもよい。一部の実施形態では、RNAの領域に相補的でない領域は、RNAに相補的なプライマーの領域に対して5'側である。一部の実施形態では、RNAの領域に相補的でない領域は、RNAに相補的なプライマーの領域に対して3'側である。一部の実施形態では、RNAの領域に相補的でない領域は、5'突出領域である。一部の実施形態では、RNAの領域に相補的でない領域は、増幅および/または配列決定反応用のプライミング部位を含む。本明細書に記載の1つまたは複数のプライマーを使用し、当技術分野で公知の好適な試薬を使用して、RNA分子を逆転写する。

10

【0383】

RNA分子の逆転写反応を実施した後、得られたcDNA分子を、分子バーコードおよびベッセルバーコードでバーコード化し、第1および/または第2のPCR反応等の、1つまたは複数のPCR反応により増幅してもよい。第1および/または第2のPCR反応には、1対のプライマーまたは複数のプライマー対を利用してもよい。第1および/または第2のPCR反応には、複数のフォワード/リバースプライマーおよびリバースプライマーを利用してもよい。第1および/または第2のPCR反応には、複数のフォワード/リバースプライマーおよびフォワードプライマーを利用してもよい。複数のフォワード/リバースプライマーの第1および/または第2のプライマーは、cDNA分子またはバーコード化cDNA分子に相補的な領域を含有するフォワード/リバースプライマーであってもよい。複数のフォワード/リバースプライマーの第1および/または第2のプライマーは、バーコード化cDNA分子に相補的な領域を含有するフォワード/リバースプライマーであってもよい。

20

【0384】

一部の実施形態では、複数のフォワード/リバースプライマーは、1つまたは複数のフォワード/リバースプライマーを含み、複数のフォワード/リバースプライマーのフォワード/リバースプライマーの各々は、cDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの1つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。例えば、複数のフォワード/リバースプライマーは、cDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの上流または下流領域に相補的な領域を含むフォワード/リバースプライマー、およびcDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの1つまたは複数の他の上流または下流領域に相補的な領域を含む1つまたは複数の他のフォワード/リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード/リバースプライマーは、cDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの第1および/または第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第1および/または第2のフォワード/リバースプライマー、およびcDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第2のフォワード/リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード/リバースプライマーは、cDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの第1および/または第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第1および/または第2のフォワード/リバースプライマー、およびcDNAまたはバーコード化cDNAのVセグメントの第3の上流または下流領域に相補的な領域を含む第3のフォワード/リバースプライマー等を含む。複数のフォワード/リバースプライマー中のプライマーを使用して、試料中の免疫B細胞またはT細胞等の細胞により

30

40

50

発現されるあらゆるVセグメントのあらゆる考え得る上流または下流領域にアニーリングすることができる。

【0385】

一部の実施形態では、複数のフォワード／リバースプライマーは、1つまたは複数のフォワード／リバースプライマーを含み、複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーの各々は、cDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの1つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、cDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの上流または下流領域に相補的な領域を含むフォワード／リバースプライマー、およびcDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの1つまたは複数の他の上流または下流領域に相補的な領域を含む1つまたは複数の他のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、cDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの第1および／または第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第1および／または第2のフォワード／リバースプライマー、およびcDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第2のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、cDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの第1および／または第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第1および／または第2のフォワード／リバースプライマー、およびcDNAまたはバーコード化cDNAのCセグメントの第3の上流または下流領域に相補的な領域を含む第3のフォワード／リバースプライマー等を含む。複数のフォワード／リバースプライマー中のプライマーを使用して、試料中の免疫B細胞またはT細胞等の細胞により発現されるあらゆるCセグメントのあらゆる考え得る上流または下流領域にアニーリングすることができる。10

【0386】

一部の実施形態では、複数のフォワード／リバースプライマーは、1つまたは複数のフォワード／リバースプライマーを含み、複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーの各々は、バーコード化cDNAの分子バーコードの1つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、バーコード化cDNAの分子バーコードの上流または下流領域に相補的な領域を含むフォワード／リバースプライマー、およびバーコード化cDNAの分子バーコードの1つまたは複数の他の上流または下流領域に相補的な領域を含む1つまたは複数の他のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、バーコード化cDNAの分子バーコードの第1および／または第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第1および／または第2のフォワード／リバースプライマー、およびバーコード化cDNAの分子バーコードの第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第2のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、バーコード化cDNAの分子バーコードの第1および／または第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第1および／または第2のフォワード／リバースプライマー、バーコード化cDNAの分子バーコードの第2の上流または下流領域に相補的な領域を含む第2のフォワード／リバースプライマー、およびバーコード化cDNAの分子バーコードの第3の上流または下流領域に相補的な領域を含む第3のフォワード／リバースプライマー等を含む。複数のフォワード／リバースプライマーを使用して、試料中の免疫B細胞またはT細胞等の細胞により発現されるあらゆる分子バーコードのあらゆる考え得る上流または下流領域にアニーリングすることができる。30

【0387】

一部の実施形態では、複数のフォワード／リバースプライマーは、1つまたは複数のフォワード／リバースプライマーを含み、複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーの各々は、バーコード化cDNAのベッセルバーコードの140

50

50

50

50

つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、バーコード化 cDNA のベッセルバーコードの上流または下流領域に相補的な領域を含むフォワード／リバースプライマー、およびバーコード化 cDNA のベッセルバーコードの 1 つまたは複数の他の上流または下流領域に相補的な領域を含む 1 つまたは複数の他のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、バーコード化 cDNA のベッセルバーコードの第 1 および／または第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 1 および／または第 2 のフォワード／リバースプライマー、およびバーコード化 cDNA のベッセルバーコードの第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 2 のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、バーコード化 cDNA のベッセルバーコードの第 1 および／または第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 1 および／または第 2 のフォワード／リバースプライマー、バーコード化 cDNA のベッセルバーコードの第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 2 のフォワード／リバースプライマー等を含む。複数のフォワード／リバースプライマー中のプライマーを使用して、試料中の免疫 B 細胞または T 細胞等の細胞により発現されるあらゆるベッセルバーコードのあらゆる考え得る上流または下流領域にアニーリングすることができる。
10

【 0 3 8 8 】

複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーは、RNA の領域に相補的でない領域をさらに含む。一部の実施形態では、RNA の領域に相補的でない領域は、RNA に相補的なフォワード／リバースプライマーの領域に対して 5' 側である（つまり、V セグメントの上流または下流領域）。一部の実施形態では、RNA の領域に相補的でない領域は、RNA に相補的なフォワード／リバースプライマーの領域に対して 3' 側である。一部の実施形態では、RNA の領域に相補的でない領域は、5' 突出領域である。一部の実施形態では、RNA の領域に相補的でない領域は、増幅および／または第 2 の配列決定反応用のプライミング部位を含む。一部の実施形態では、RNA の領域に相補的でない領域は、増幅および／または第 3 の配列決定反応用のプライミング部位を含む。一部の実施形態では、RNA の領域に相補的でない領域は、第 2 および第 3 の配列決定反応用のプライミング部位を含む。一部の実施形態では、第 2 および第 3 の配列決定反応用のプライミング部位の配列は、同じである。本明細書に記載の 1 つまたは複数のフォワード／リバースプライマーおよびリバースプライマーを使用し、当技術分野で公知の好適な試薬を使用して、cDNA 分子を増幅する。一部の実施形態では、領域は、mRNA の定常領域またはポリ A テール等の RNA の領域に相補的である。
20
30

【 0 3 8 9 】

一部の実施形態では、複数のフォワード／リバースプライマーは、1 つまたは複数のフォワード／リバースプライマーを含み、複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーの各々は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコードの 1 つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。一部の実施形態では、複数のフォワード／リバースプライマーは、1 つまたは複数のフォワード／リバースプライマーを含み、複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーの各々は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドの AID の 1 つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。一部の実施形態では、複数のフォワード／リバースプライマーは、1 つまたは複数のフォワード／リバースプライマーを含み、複数のフォワード／リバースプライマー中のフォワード／リバースプライマーの各々は、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドの AMB の 1 つまたは複数の上流または下流領域に相補的な領域を含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコード、AID、および／または AMB の上流または下流領域
40
50

に相補的な領域を含むフォワード／リバースプライマー、および親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコード、A I D、および / または A M B の 1 つまたは複数の他の上流または下流領域に相補的な領域を含む 1 つまたは複数の他のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコード、A I D、および / または A M B の第 1 および / または第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 1 および / または第 2 のフォワード／リバースプライマー、および親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコード、A I D、および / または A M B の第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 2 のフォワード／リバースプライマーを含む。例えば、複数のフォワード／リバースプライマーは、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコード、A I D、および / または A M B の第 1 および / または第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 1 および / または第 2 のフォワード／リバースプライマー、親和性 - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのバーコード化オリゴヌクレオチドのベッセルバーコード、A I D、および / または A M B の第 2 の上流または下流領域に相補的な領域を含む第 2 のフォワード／リバースプライマー等を含む。10

。

【 0 3 9 0 】

増幅

ベッセルバーコードを標的ポリヌクレオチドに付加した後、標的ポリヌクレオチドを増幅してもよい。例えば、ベッセルバーコードを親和性 - 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加した後、オリゴヌクレオチドを増幅してもよい。例えば、ベッセルバーコードを細胞ポリヌクレオチドに付加した後、ベッセルバーコード化細胞ポリヌクレオチドを増幅してもよい。20

【 0 3 9 1 】

増幅反応は、1 つまたは複数の添加剤を含んでいてもよい。一部の場合では、1 つまたは複数の添加剤は、ジメチルスルホキシド (D M S O)、グリセロール、ベタイン (-) 水和物 (N , N , N - トリメチルグリシン = カルボキシ - メチル] トリメチルアンモニウム、トレハロース、7 - デアザ - 2 ' - デオキシグアノシン三リン酸 (d C 7 G T P または 7 - デアザ - 2 ' - d G T P)、B S A (ウシ血清アルブミン)、ホルムアミド (メタンアミド)、テトラメチルアンモニウムクロリド (T M A C)、他のテトラアルキルアンモニウム誘導体 (例えば、テトラエチルアンモニウムクロリド (T E A - C 1) およびテトラプロピルアンモニウムクロリド (T P r A - C 1))、非イオン性洗剤 (例えば、T r i t o n X - 1 0 0 、T w e e n 2 0 、N o n i d e t P - 4 0 (N P - 4 0))、または P R E X C E L - Q である。一部の場合では、増幅反応は、0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、または 1 0 種の異なる添加剤を含む。他の場合では、増幅反応は、少なくとも 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、または 1 0 種の異なる添加剤を含む。30

【 0 3 9 2 】

反応容積 (例えば、液滴) に含有されている試料に対して、熱サイクル反応を実施することができる。液滴は、多分散であってもよく、または好ましくは单分散であってもよく、当業者であれば、攪拌、超音波処理、またはマイクロ流体的に T 型チャネル接合部を通過させること、または他の手段により生成することができる。密度は、2 0 , 0 0 0 液滴 / 4 0 u l (1 n L 液滴)、2 0 0 , 0 0 0 液滴 / 4 0 u l (1 0 0 p L 液滴) を超えていてもよい。液滴は、熱サイクル中、完全性を保つことができる。液滴は、約 1 0 , 0 0 0 液滴 / μ L 、1 0 0 , 0 0 0 液滴 / μ L 、2 0 0 , 0 0 0 液滴 / μ L 、3 0 0 , 0 0 0 液滴 / μ L 、4 0 0 , 0 0 0 液滴 / μ L 、5 0 0 , 0 0 0 液滴 / μ L 、6 0 0 , 0 0 0 液40
滴 / μ L 、50

滴 / μ L、700,000液滴 / μ L、800,000液滴 / μ L、900,000液滴 / μ L、または1,000,000液滴 / μ Lを超える密度で、熱サイクル中に完全性を保つことができる。他の場合では、2つまたはそれよりも多くの液滴が、熱サイクル中に凝集しない。他の場合では、100個よりも多くのまたは1,000個よりも多くの液滴が、熱サイクル中に凝集しない。

【0393】

これらに限定されないが、E. coli DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼ1のクレノー断片、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、バクテリオファージ29、RED Taq(商標)、ゲノムDNAポリメラーゼ、またはシーケナーゼを含む、プライマー伸長を触媒する任意のDNAポリメラーゼを使用することができる。一部の場合では、熱安定性DNAポリメラーゼが使用される。また、ポリメラーゼを添加する前に反応を2分間95℃に加熱するか、または1サイクル目の最初の加熱ステップまでポリメラーゼを不活性にしておくことができるホットスタートPCRを実施してもよい。ホットスタートPCRを使用すると、非特異的増幅を最小限に抑えることができる。任意の回数のPCRサイクル、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、もしくは45回のサイクル、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、もしくは45回よりも多くのサイクル、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、もしくは45回未満のサイクルを使用してDNAを増幅することができる。増幅サイクルの回数は、約1～45、10～45、20～45、30～45、35～45、10～40、10～30、10～25、10～20、10～15、20～35、25～35、30～35、または35～40であってもよい。

【0394】

標的核酸の増幅は、当技術分野で公知の任意の手段により実施することができる。標的核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または等温DNA増幅により増幅してもよい。使用することができるPCR技法の例としては、これらに限定されないが、定量PCR、定量蛍光PCR(QF-PCR)、マルチブレックス蛍光PCR(MF-PCR)、リアルタイムPCR(逆転写-PCR)、単一細胞PCR、制限断片長多型PCR(PCR-RFLP)、PCR-RFLP/逆転写-PCR-RFLP、ホットスタートPCR、ネステッドPCR、in situポロニーピCR、in situローリングサークル増幅(RCA)、デジタルPCR(dPCR)、液滴デジタルPCR(ddPCR)、ブリッジPCR、ピコリットルPCR、およびエマルジョンPCRが挙げられる。他の好適な増幅方法としては、リガーゼ連鎖反応法(LCR)、転写増幅法、分子反転プローブ(MIP)PCR法、自家持続配列複製法、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅法、コンセンサス配列プライムドポリメラーゼ連鎖反応法(CP-PCR; consensus sequence primed polymerase chain reaction)、任意プライムドポリメラーゼ連鎖反応法(AP-PCR; arbitrarily primed polymerase chain reaction)、ディジェネレートポリヌクレオチドプライムドPCR法(DOP-PCR; degenerate polynucleotide-primed PCR)、および核酸に基づく配列増幅法(NABSA; nucleic acid based sequence amplification)挙げられる。本明細書で使用することができる他の増幅方法としては、米国特許第5,242,794号、第5,494,810号、第4,988,617号、および第6,582,938号に記載されているもの、ならびにQベータレプト

リカーゼ媒介性RNA增幅法が挙げられる。增幅は、等温增幅、例えば等温線形増幅であつてもよい。

【0395】

一部の実施形態では、増幅は、固体支持体では生じない。一部の実施形態では、増幅は、液滴内の固体支持体では生じない。一部の実施形態では、増幅が液滴内でない場合、増幅は、固体支持体で生じる。

【0396】

配列決定

本明細書に記載されている方法または方法ステップの1つまたは複数を実施した後、生成されたポリヌクレオチドのライプラリーを配列決定してもよい。

10

【0397】

配列決定は、当技術分野で公知の任意の配列決定法により実施することができる。一部の実施形態では、配列決定は、ハイスループットで実施することができる。好適な次世代シーケンシング技術としては、454ライフサイエンスプラットフォーム(Roche、ブランフォード、コネティカット州)(Marguliesら、Nature、437巻、376~380頁(2005年))； Illuminaのゲノムアナライザー、GoldenGateメチル化アッセイ、またはInfiniumメチル化アッセイ、つまりInfinium Human Methylation 27K BeadArray、またはVeraCode GoldenGateメチル化アレイ(Illumina、サンディエゴ、カリフォルニア州、Bibkovaら、Genome Res.、16巻、383~393頁(2006年)、および米国特許第6,306,597号、第7,598,035号、第7,232,656号)、またはライゲーションによるDNA配列決定、SOLIDシステム(Applied Biosystems/Life Technologies、米国特許第6,797,470号、第7,083,917号、第7,166,434号、第7,320,865号、第7,332,285号、第7,364,858号、および第7,429,453号)；またはHelicos True Single Molecule DNA配列決定技術(Harrisら、Science、320巻、106~109頁(2008年)；および米国特許第7,037,687号、第7,645,596号、第7,169,560号、および第7,769,400号)、Pacific Biosciencesの一分子リアルタイム(SMRTTm)技術および配列決定法(Soniら、Clin. Chem.、53巻、1996~2001頁(2007年))が挙げられる。こうしたシステムは、試料から単離された多数のポリヌクレオチドのマルチプレックス並列配列決定を可能にする(Dear、Brief Funct. Genomic Proteomic、1巻(4号)、397~416頁(2003年)、およびMcCaughanら、J. Pathol.、220巻、297~306頁(2010年))。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、色素修飾プローブのライゲーションによる配列決定法、ピロシーケンス法、または一分子配列決定法により配列決定される。ポリヌクレオチドの配列の決定は、Helioscope(商標)一分子配列決定法、ナノポアDNA配列決定法、Lynx Therapeuticsの大規模並列シグネチャー配列決定法(MPSS)、454ピロシーケンス法、一分子リアルタイム(RNAP)配列決定法、Illumina(Solexa)配列決定法、SOLID配列決定法、Ion Torrent(商標)、イオン半導体配列決定法、一分子SMRT(商標)配列決定法、ポロニー配列決定法、DNAナノボール配列決定法、およびVisigen Biotechnologies手法等の配列決定法により実施することができる。あるいは、ポリヌクレオチドの配列の決定には、これらに限定されないが、Illuminaが提供するゲノムアナライザーIIX、HiSeq、およびMiSeq；Pacific Biosciences(カリフォルニア)が提供するPacific Bio RSシステムおよびSolexaシーケンサー等の一分子リアルタイム(SMRT(商標))技術；Helicos Inc.(ケンブリッジ、マサチューセッツ州)が提供するHelioscope(商標)等のTrue Single Molecule Sequencing(tSMS(商標))技術を含む配列決定プラットフォームを使用してもよい。配列決定は、MiSeq

20

30

40

50

配列決定を含んでいてもよい。配列決定は、HiSeq配列決定を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドの配列の決定は、ペアエンド配列決定法、ナノボア配列決定法、ハイスループット配列決定法、ショットガン配列決定法、色素ターミネーター配列決定法、多重プライマーDNA配列決定法、プライマーウォーキング法、サンガーワイデオキシ配列決定法、マクシム・ギルバート配列決定法、ピロシーケンス法、true single molecule配列決定法、またはそれらの任意の組合せを含む。あるいは、ポリヌクレオチドの配列は、電子顕微鏡または化学感応性電界効果トランジスター(chemFET)アレイにより決定してもよい。

【0398】

方法は、ライブラリー中の1つまたは複数のポリヌクレオチドを配列決定することをさらに含んでいてもよい。方法は、ライブラリー中の1つまたは複数のポリヌクレオチド配列、配列読み取り、アンプリコン配列、またはアンプリコンセット配列を互いにアラインすることをさらに含んでいてもよい。

10

【0399】

アラインメントは、配列読み取り等の試験配列を、1つまたは複数の他の試験配列、参照配列、またはそれらの組合せと比較することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、アラインメントを使用して、複数の配列またはアラインされた配列からコンセンサス配列を決定してもよい。一部の実施形態では、アラインメントは、各々が同一の分子バーコードまたはベッセルバーコードを有する複数の配列からコンセンサス配列を決定することを含む。一部の実施形態では、比較目的でアラインされる配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%である。2つまたはそれよりも多くの配列の実際の比較は、周知の方法により、例えば数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。そのような数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin, S.およびAltschul, S.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻 - 5873 ~ 5877頁(1993年)に記載されている。そのようなアルゴリズムは、Altschul, S.ら、Nucleic Acids Res.、25巻: 3389 ~ 3402頁(1997年)に記載されているNB LASTおよびX LASTプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。LASTおよびギャップ付きLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えば、NB LAST)の任意の関連パラメータを使用してもよい。例えば、配列比較のパラメータは、スコア=100、ワード長=12に設定してもよく、または様々であってもよい(例えば、W=5またはW=20)。他の例としては、MyersおよびMiller、CABIOS(1989年)のアルゴリズム、ADVANCE、ADAM、BLAST、およびFASTAが挙げられる。一部の実施形態では、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、例えば、GC Gソフトウェアパッケージ(Accelrys、ケンブリッジ、英国)のGAPプログラムを使用して達成することができる。

20

【0400】

配列決定は、ポリヌクレオチドの少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個、またはそれよりも多くのヌクレオチドまたは塩基対を配列決定することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、配列決定は、ポリヌクレオチドの少なくとも約200、300、400、500、600、700、800、900、1000個、またはそれよりも多くのヌクレオチドまたは塩基対を配列決定することを含む。他の場合では、配列決定は、ポリヌクレオチドの少なくとも約1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000個、またはそれよりも多くのヌクレオチドまたは塩基対を配列決定することを含む。

30

【0401】

配列決定は、1実行当たり、少なくとも約200、300、400、500、600、700、800、900、1000個、またはそれよりも多くの配列決定読み取りを含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、配列読み取りは、配列決定技法により生成されるデータの配列またはストリームから決定されるヌクレオチドの配列を含む。一部の実

40

50

施形態では、配列決定は、1実行当たり、少なくとも約1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000個、またはそれよりも多くの配列決定読み取りを含む。配列決定は、1実行当たり、約1,000,000,000個よりも多くの、約1,000,000,000個未満の、または約1,000,000,000個に等しい配列決定読み取りを含んでいてもよい。配列決定は、1実行当たり、約200,000,000個よりも多くの、約200,000,000個未満の、または約200,000,000個に等しい配列決定読み取りを含んでいてもよい。

【0402】

酵素

10

本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数の酵素を含んでいてもよい。酵素の例としては、これらに限定されないが、リガーゼ、逆転写酵素、ポリメラーゼ、および制限ヌクレアーゼが挙げられる。

【0403】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドに対するアダプターの付着は、1つまたは複数のリガーゼを使用することを含む。リガーゼの例としては、これらに限定されないが、DNAリガーゼI、DNAリガーゼI I I、DNAリガーゼI V、およびT4 DNAリガーゼ等のDNAリガーゼ；ならびにT4 RNAリガーゼIおよびT4 RNAリガーゼI I等のRNAリガーゼが挙げられる。

【0404】

20

本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数の逆転写酵素を使用することをさらに含んでいてもよい。一部の実施形態では、逆転写酵素は、HIV-1逆転写酵素、M - M L V逆転写酵素、A M V逆転写酵素、およびテロメラーゼ逆転写酵素である。一部の実施形態では、逆転写酵素は、M - M L V逆転写酵素である。

【0405】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数のプロテアーゼを使用することを含む。

【0406】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数のポリメラーゼを使用することを含む。ポリメラーゼの例としては、これらに限定されないが、DNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼが挙げられる。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼI I、DNAポリメラーゼI I I ホロ酵素、およびDNAポリメラーゼI Vである。商業的に入手可能なDNAポリメラーゼとしては、これらに限定されないが、Bst 2 . 0 DNAポリメラーゼ、Bst 2 . 0 WarmStart (商標) DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、スルフォロブスDNAポリメラーゼI V、Taq DNAポリメラーゼ、9 ° N (商標) mDNAポリメラーゼ、Deep Vent R (商標) (エキソ) DNAポリメラーゼ、Deep Vent R (商標) DNAポリメラーゼ、Hemo KlenTaq (商標)、LongAmp (登録商標) Taq DNAポリメラーゼ、OneTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ、Q5 (商標) 高フィデリティーDNAポリメラーゼ、Therminator (商標) DNAポリメラーゼ、Therminator (商標) DNAポリメラーゼ、Therminator (商標) II DNAポリメラーゼ、Therminator (商標) III DNAポリメラーゼ、Vent R (登録商標) DNAポリメラーゼ、Vent R (登録商標) (エキソ) DNAポリメラーゼ、Bsu DNAポリメラーゼ、phi 29 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、ターミナルトランスクレーバー、Titanium (登録商標) Taqポリメラーゼ、KAPA Taq DNAポリメラーゼ、およびKAPA Taq ホットスタートDNAポリメラーゼが挙げられる。

【0407】

50

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、RNAポリメラーゼI、RNAポリメラーゼII、RNAポリメラーゼIII、E.coliポリ(A)ポリメラーゼ、phi6 RNAポリメラーゼ(RdRP)、ポリ(U)ポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、およびT7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼである。

【0408】

追加の試薬

本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数の試薬を使用することを含んでいてもよい。試薬の例としては、これらに限定されないが、PCR試薬、ライゲーション試薬、逆転写試薬、酵素試薬、ハイブリダイゼーション試薬、試料調製試薬、親和性捕捉試薬、ビーズ等の固体支持体、ならびに核酸精製および/または単離用の試薬が挙げられる。

【0409】

他の実施形態では、本明細書で開示されている方法、キット、および組成物は、支持体を含んでいてもよい。一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法、キット、および組成物は、支持体を含まない。典型的には、固体支持体は、1つまたは複数の剛性または半剛性表面を含む1つまたは複数の材料を含む。一部の実施形態では、支持体は非固体支持体である。支持体または基材は、膜、紙、プラスチック、被覆表面、平坦表面、ガラス、スライド、チップ、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、支持体の1つまたは複数の表面は実質的に平坦であるが、一部の実施形態では、例えば、ウェル、隆起領域、ピン、またはエッティングされた溝等を有する、様々な化合物のための合成領域が物理的に分離されていることが望ましい場合がある。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズ、樹脂、ゲル、ミクロスフェア、または他の幾何学的構成を含む。あるいは、固体支持体は、シリカチップ、マイクロ粒子、ナノ粒子、プレート、およびアレイを含んでいてもよい。固体支持体は、マイクロウェルでの自己集合可能なビーズの使用を含んでいてもよい。例えば、固体支持体は、 Illumina の Bead Array 技術を含む。あるいは、固体支持体は、Abbott Molecular の Bead Array 技術、および Applied Microarray の FlexiPlate (商標) システムを含む。他の例では、固体支持体は、プレートである。プレートの例としては、これらに限定されないが、MSDマルチアレイプレート、MSD Multi-Spot (登録商標) プレート、マイクロプレート、ProteOnマイクロプレート、AlphaPlate、DELFIAプレート、IsoPlate、およびLumaplateが挙げられる。一部の実施形態では、支持体は、複数のビーズを含んでいてもよい。一部の実施形態では、支持体は、アレイを含んでいてもよい。一部の実施形態では、支持体は、ガラススライドを含んでいてもよい。ポリマーに適用可能な方法、基材、および技法(米国特許第5,744,305号、5,143,854号、第5,242,974号、第5,252,743号、第5,324,633号、第5,384,261号、第5,405,783号、第5,424,186号、第5,451,683号、第5,482,867号、第5,491,074号、第5,527,681号、第5,550,215号、第5,571,639号、第5,578,832号、第5,593,839号、第5,599,695号、第5,624,711号、第5,631,734号、第5,795,716号、第5,831,070号、第5,837,832号、第5,856,101号、第5,858,659号、第5,936,324号、第5,968,740号、第5,974,164号、第5,981,185号、第5,981,956号、第6,025,601号、第6,033,860号、第6,040,193号、第6,090,555号、第6,136,269号、第6,269,846号、および第6,428,752号；米国特許出願公開第20090149340号、第20080038559号、第20050074787；ならびにPCT公開番号WO00/58516、WO99/36760、およびWO01/58593)。支持体へのポリヌクレオチドの付着は、アミン-チオール架橋、マレイミド架橋、N-ヒドロキシスクシンイミド、またはN-ヒドロキシスルホスクシンイミド、Zenon、またはSiteClickを含んでいてもよ

10

20

30

40

50

い。支持体への標識核酸の付着は、ビオチンを複数のポリヌクレオチドに付着させること、および1つまたは複数のビーズをストレプトアビジンでコーティングすることを含んでいてもよい。一部の実施形態では、支持体はビーズである。ビーズの例としては、これらに限定されないが、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、Dyna beads (登録商標)、MACS (登録商標)マイクロビーズ、抗体コンジュゲートビーズ (例えば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ)、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA/Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、ポリヌクレオチドdTコンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、およびBcMag (商標)カルボキシ末端磁気ビーズが挙げられる。ビーズの直径は、約5 μm、10 10 μm、20 μm、25 μm、30 μm、35 μm、40 μm、45 μm、または50 μmであってもよい。固体支持体は、アレイまたはマイクロアレイであってもよい。固体支持体は、個別の領域を含んでいてもよい。固体支持体は、アレイ、例えばアドレス可能なアレイであってもよい。

【0410】

固体支持体は、事実上あらゆる不溶性または固体材料を含むことができ、水に不溶性である固体支持体組成物が選択されることが多い。例えば、固体支持体は、シリカゲル、ガラス (例えば、細孔制御ガラス (CPG))、ナイロン、Sephadex (登録商標)、Sephadose (登録商標)、セルロース、金属表面 (例えば、鋼、金、銀、アルミニウム、ケイ素、および銅)、磁性材料、プラスチック材料 (例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、およびポリビニリデンジフルオリド (PVDF)) 等を含んでいてもよく、またはこれらから本質的になっていてもよい。本実施形態により使用されるビーズの例としては、ビーズと核酸分子との相互作用を可能にする親和性部分を挙げることができる。固相 (例えば、ビーズ) は、結合対のメンバー (例えば、アビジン、ストレプトアビジン、またはそれらの誘導体) を含んでいてもよい。例えば、ビーズは、ストレプトアビジンがコーティングされたビーズであってもよく、ビーズに固定する核酸分子は、ビオチン部分を含んでいてもよい。一部の場合では、各ポリヌクレオチド分子は、ポリヌクレオチドをさらに安定させるために、ビオチン等の2つの親和性部分を含んでいてもよい。ビーズは、核酸の固定に使用するための、または下流でのスクリーニングまたは選択プロセスで使用することができる追加の特徴を含んでいてもよい。例えば、ビーズは、親和性部分、蛍光標識、または蛍光クエンチャーを含んでいてもよい。一部の場合では、ビーズは、磁性であってもよい。一部の例では、支持体はビーズである。ビーズの例としては、これらに限定されないが、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、Dyna beads (登録商標)、MACS (登録商標)マイクロビーズ、抗体コンジュゲートビーズ (例えば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ)、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA/Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、ポリヌクレオチドdTコンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、およびBcMag (商標)カルボキシ末端磁気ビーズが挙げられる。ビーズまたは粒子は、膨潤可能であってもよく (例えば、Wang樹脂等のポリマー性ビーズ)、または膨潤不能であってもよい (例えば、CPG)。一部の実施形態では、固相は、実質的に親水性である。一部の実施形態では、固相 (例えば、ビーズ) は、実質的に疎水性である。一部の実施形態では、固相は、結合対のメンバー (例えば、アビジン、ストレプトアビジン、またはそれらの誘導体) を含み、実質的に疎水性または実質的に親水性である。一部の実施形態では、固相は、結合対のメンバー (例えば、アビジン、ストレプトアビジン、またはそれらの誘導体) を含み、固体支持体1mg当たり約1350ピコモルの遊離捕捉剤 (例えば、遊離ビオチン) よりも高い結合能を有する。一部の実施形態では、結合対のメンバーを含む固相の結合能は、固体支持体1mg当たり、800、900、1000、1100、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1600、1800、2000ピコモルの遊離捕捉剤よりも高い。
40
50

本発明に好適なビーズの他の例は、金コロイド、またはポリスチレンビーズもしくはシリカビーズ等のビーズである。実質的に任意のビーズ半径を使用することができる。ビーズの例としては、150ナノメートルから10ミクロンまでの範囲の半径を有するビーズを挙げることができる。他のサイズも使用することができる。

【0411】

本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数の緩衝液を使用することを含んでいてもよい。緩衝液の例としては、これらに限定されないが、洗浄緩衝液、ライゲーション緩衝液、ハイブリダイゼーション緩衝液、増幅緩衝液、および逆転写緩衝液が挙げられる。一部の実施形態では、ハイブリダイゼーション緩衝液は、T M A C H y b 溶液、S S P E ハイブリダイゼーション溶液、およびE C O N O (商標) ハイブリダイゼーション緩衝液等の商業的に入手可能な緩衝液である。本明細書で開示されている緩衝液は、1つまたは複数の洗剤を含んでいてもよい。

【0412】

本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数の担体を使用することを含んでいてもよい。担体は、本明細書で開示されている1つまたは複数の反応（例えば、ライゲーション反応、逆転写、増幅、ハイブリダイゼーション）の効率を増強または向上させることができる。担体は、分子またはそれらの任意の産物（例えば、ポリヌクレオチドおよび／またはアンブリコン）の非特異性の喪失を減少または防止することができる。例えば、担体は、表面への吸収によるポリヌクレオチドの非特異性の喪失を減少させることができる。担体は、表面または基材（例えば、容器、E p p e n d o r f チューブ、ピペットチップ）へのポリヌクレオチドの親和性を減少させることができる。あるいは、担体は、表面または基材（例えば、ビーズ、アレイ、ガラス、スライド、チップ）へのポリヌクレオチドの親和性を増加させることができる。担体は、ポリヌクレオチドの分解を防止することができる。例えば、担体は、リボヌクレアーゼからR N A 分子を保護することができる。あるいは、担体は、D N a s e からD N A 分子を保護することができる。担体の例としては、これらに限定されないが、D N A および／またはR N A 等のポリヌクレオチド、またはポリペプチドが挙げられる。D N A 担体の例としては、プラスミド、ベクター、ポリアデニル化D N A 、およびD N A ポリヌクレオチドが挙げられる。R N A 担体の例としては、ポリアデニル化R N A 、ファージR N A 、ファージM S 2 R N A 、E . c o l i R N A 、酵母R N A 、酵母t R N A 、哺乳動物R N A 、哺乳動物t R N A 、短鎖ポリアデニル化合成リボヌクレオチド、およびR N A ポリヌクレオチドが挙げられる。R N A 担体は、ポリアデニル化R N A であってもよい。あるいは、R N A 担体は、非ポリアデニル化R N A であってもよい。一部の実施形態では、担体は、細菌、酵母、またはウイルスに由来する。例えば、担体は、細菌、酵母、またはウイルスに由来するポリヌクレオチドまたはポリペプチドであってもよい。例えば、担体は、B a c i l l u s s u b t i l i s に由来するタンパク質である。別の例では、担体は、E s c h e r i c h i a c o l i に由来するポリヌクレオチドである。あるいは、担体は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ヤギ、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、またはウサギ）、トリ、両生類、または爬虫類に由来するポリヌクレオチドまたはペプチドである。

【0413】

本明細書で開示されている方法およびキットは、1つまたは複数の対照物質を使用することを含んでいてもよい。対照物質としては、対照ポリヌクレオチド、不活性酵素、非特異的競合物質を挙げることができる。あるいは、対照物質は、ブライトハイブリダイゼーション(bright hybridization)、ブライトプローブ対照、核酸鑄型、スパイクイン対照、P C R 増幅対照を含む。P C R 增幅対照は、陽性対照であってもよい。他の例では、P C R 増幅対照は、陰性対照である。核酸鑄型対照は、既知の濃度であってもよい。対照物質は、1つまたは複数の標識を含んでいてもよい。

【0414】

スパイクイン対照は、反応または試料に添加される鑄型であってもよい。例えば、スパイクイン鑄型を、増幅反応に添加してもよい。スパイクイン鑄型は、最初の増幅サイクル

10

20

30

40

50

後の任意の時点で増幅反応に添加してもよい。一部の実施形態では、スパイクイン鑄型は、サイクル数が2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、または50回に達した後で、増幅反応に添加される。スパイクイン鑄型は、最後の増幅サイクル前の任意の時点で増幅反応に添加してもよい。スパイクイン鑄型は、1つまたは複数のヌクレオチドまたは核酸塩基対を含んでいてもよい。スパイクイン鑄型は、DNA、RNA、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。スパイクイン鑄型は、1つまたは複数の標識を含んでいてもよい。

【0415】

本明細書で開示されているものは、本明細書で開示されている方法および組成物に使用することができる、方法および組成物と共に使用することができる、方法および組成物を調製するために使用することができる、分枝、材料、組成物および成分であり、または方法および組成物の産物である。これら物質の組合せ、サブセット、相互作用、グループ等が開示されている場合、これら分子および化合物の様々な個々のおよび集合的な組合せおよび順列に対する具体的な参照を明示的に開示することができない場合でも、各々は、本明細書にて具体的に企図および記載されていることが理解される。例えば、ヌクレオチドまたは核酸が開示および考察され、そのヌクレオチドまたは核酸を含むいくつかの分子になすことができるいくつかの修飾が考察されている場合、特に別様の指示がない限り、ヌクレオチドまたは核酸のありとあらゆる組合せおよび順列ならびに考え得る修飾が、具体的に企図されている。この概念は、本開示の方法および組成物を作製および使用するための方法のことを含むがそれらに限定されない、本出願の全ての態様に当てはまる。したがって、実施することができる様々な追加ステップが存在する場合、こうした追加ステップの各々は、本開示の方法の任意の特定の実施形態または実施形態を組み合わせて実施することができ、各々のそのような組合せは、具体的に企図され、開示されているとみなさるべきであることが理解される。

【0416】

本明細書に記載されている一部の実施形態が、本明細書に表示および記載されているが、そのような実施形態は、例示のために提供されているに過ぎない。今や、当業者であれば、本明細書で提供されている開示から逸脱せずに、多数の変異、変更、および置換を想起するだろう。本明細書に記載されている実施形態の種々の代替を、本明細書に記載されている方法の実行に用いることができる事が理解されるべきである。

【0417】

別様に説明されていない限り、本明細書で使用されている技術的および科学的用語は全て、本開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本明細書で使用することができる方法および組成物の実施形態を含む：The Merck Manual of Diagnosis and Therapy、第18版、Merck Research Laboratoriesから出版、2006年（ISBN 0-9119102）；Benjamin Lewin、Genes IX、Jones & Bartlett Publishingから出版、2007年（ISBN - 13 : 9780763740634）；Kendrewら（編）、The Encyclopedia of Mol. Biology、Blackwell Science Ltd.から出版、1994年（ISBN 0-632-02182-9）；およびRobert A. Meyers（編）、Mol. Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.から出版、1995年（ISBN 1-56081-569-8）。

【0418】

本開示の標準的手順は、以下に記載されている：例えば、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、USA（1982年）；Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、USA（1989年）；Davisら、Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier Science Publishing, Inc.、New York、USA（1986年）；またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques、152巻、S. L

10

20

30

40

50

. BergerおよびA. R. Kimmerl(編)、Academic Press Inc.、San Diego、USA(1987年)。Current Protocols in Molecular Biology (CPMB)(Fred M. Ausubeら編、John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Protein Science (CPPS)(John E. Coliganら編、John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Immunology (CPI)(John E. Coliganら編、John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Cell Biology (CPCB)(Juan S. Bonifacinoら編、John Wiley and Sons, Inc.)、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、R. Ian Freshney著、出版社:Wiley-Liss;第5版(2005年)、およびAnimal Cell Culture Methods(Methods in Cell Biology、57巻、Jennie P. MatherおよびDavid Barnes編、Academic Press、第1版、1998年)。

10

【実施例】

【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。

20

【0420】

30,000個のT細胞を、CD4抗原ID配列を含むCD4特異的抗体-オリゴヌクレオチド、およびCD8抗原ID配列を含むCD8特異的抗体-オリゴヌクレオチドの両方と共にインキュベートした。また、T細胞のCD4、CD8、およびTCRのmRNA含有量を、単一細胞エマルジョン実験で分析した。T細胞受容体アルファ、T細胞受容体ベータ、CD4、およびCD8のmRNAを、cDNAへと逆転写し、液滴特異的バーコード配列を、ポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAおよび抗体コンジュゲートオリゴヌクレオチドの両方に融合した。このDNAを、エマルジョンから抽出し、次世代シークエンシング法で分析した。

30

【0421】

ほとんど全ての液滴バーコード(単一細胞に関連付けられる)は、CD4特異的抗原IDまたはCD8特異的抗原IDのいずれかに関連付けられた。mRNAと表面タンパク質に基づく帰属との間に実質的な一致が見出された(図3)。

【0422】

(実施例2)

免疫レパートリーの配列決定は、基礎免疫学、自己免疫、感染症、および腫瘍学において幅広い応用を有する。多くの研究では、循環血液中のBCRおよびTCR多様性が調査されているが、TILの免疫受容体に対する関心が高まっている。その機能は、がん成長または退縮に高度に関連しているが、その程度は様々であり、特徴付けされていないことが多い。TILのより良好な理解に向かって重要なことは、新しい腫瘍関連抗原の識別を可能にし得るため、TILのBCRおよびTCRの回収および機能的な特徴付けである。腫瘍抗原は、がんワクチンを開発するために、チェックポイント阻害剤の役割を理解するために、および固体腫瘍のキメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法を進歩させるために、非常に必要とされている。しかしながら、免疫配列決定における数十年に及ぶ技術的進歩にも関わらず、全長のペイティブに對合したBCR(重鎖および軽鎖)およびTCR(アルファおよびベータ鎖)を、観察されるレパートリーを制限および偏向するin vitro培養または細胞ソーティングを行わずに、腫瘍等の不均質試料から回収した研究

40

50

はない。初代未培養免疫細胞は、*in vitro* 刺激細胞の 100 分の 1 未満の受容体 RNA を含み得るため、技術的な困難性が非常に高い。複雑な不均質試料に由来するネイティブに対合した BCR および TCR の包括的な分析を可能にするため、多数の単一細胞を並列単離および DNA バーコード付与するためのマイクロ流体エマルジョンに基づく方法を開発した。毎時最大 100 万個の細胞が、個々の約 6.5 ピコリットルエマルジョン液滴中で単離される。液滴内で細胞を溶解し、標的特異的プライマーを用いて標的 mRNA を逆転写し、二段階 DNA バーコード付与プロセスにより、分子特異的および液滴特異的バーコードを cDNA に付着する。その後の回収および次世代シークエンシングの後、この二重バーコード付与戦略は、配列読み取りを、それらの当初の分子および細胞の両方にクラスター化することを可能にする。これより、エラーおよび増幅バイアスの広範な矯正、mRNA および細胞の両レベルでのクローニング計数、重鎖アイソタイプの決定、ならびに、重要なことには、BCR および TCR の全長のネイティブに対合した V(D)J 配列を超ハイスループットで同時に回収することが可能になる。

【0423】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) は、抗がん免疫応答に重要であるが、それらの存在量、表現型、および機能は予測不能であるため、研究は困難である。本発明者らは、細胞ソーティング、刺激、または培養を行う必要なく、TIL を高深度で特徴付けるための方法を開発した。エマルジョンに基づく単一細胞バーコード付与法により、数百万個のインプット細胞中のリンパ球の中から、ネイティブに対合した B 細胞および T 細胞受容体 (BCR および TCR) 配列が捕捉される。以前の手法とは対照的に、回収される可変領域は全長であり、さらなる mRNA およびタンパク質標的が付随し得る。卵巣腺癌に由来する 400,000 個のソーティングされていない細胞を処理し、11,000 個を超える TIL から対合した BCR および TCR を回収する前に、健常ヒト血液に由来する 300 万個の B 細胞および HIV 患者に由来する 350,000 個の B 細胞で本方法を検証した。本発明者らの結果は、任意の対合した BCR または TCR レパートリーの最も高深度のサンプリングであると共に、エマルジョン中の単一細胞の同時 RNA 配列決定およびタンパク質測定を最初に実証するものである。

【0424】

(実施例 3)

健常血液試料からの B 細胞 V_H V_L 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プットを、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プ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 + 300 bp 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。

【0425】

得られたデータセットは、少なくとも 1 つの重鎖 (V_H) および 1 つの軽鎖 (V_L) 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_H クローニング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、单

10

20

30

40

50

一細胞液滴に由来するデータを濃縮した(図6B)。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_HV_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、今ま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なく示す。クローン的に関連する細胞は、それらのV_HV_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_HV_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_HV_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_HV_L液滴バーコードまたは「V_HV_Lペア」の75.0%は、IgMおよび/またはIgDを含有していた(図6C)。これは、未感作ナイーブB細胞は典型的にはIgM⁺IgD⁺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_HV_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IgGまたはIgM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(单一液滴中のポアソン確率は、<10-6)。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6D)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、非増殖クローンの広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。

【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6E)。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、IgG対IgM)の両方で、強い相関性を示した(図6F)。さらに、IgGおよびIgA対はほとんど全てが、V_HおよびV_L鎖の両方にかなりの突然変異を示したが、IgMおよびIgDペアはほとんどが、V_HまたはV_L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、IgMおよびIgDからIgGまたはIgA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_H鎖は、高

度に突然変異を起こした V_L 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。

【0427】

(実施例4)

HIV長期非進行者からの公既知の低頻度 $V_H V_L$ 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 $V_H V_L$ 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 $V_H V_L$ 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 IgG を示した。このデータセットに由来する V_H 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_H 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 Ig - 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、全ての既知の新らに生成された PGT121 様 $V_H V_L$ ペアの系統樹(図7B)では、 V_H および V_L ツリーは、鏡像様位置を占める対合した V_H および V_L 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ントペアは、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つたが、その代わりに、PGT122 V_H : PGT123 V_L 様のおよび PGT123 V_H : PGT122 V_L 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 $V_H V_L$ 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 IgG 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ント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。

【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)。

【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メント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_{α} 、 V_{β})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 BC

10

20

30

40

50

$R_{V_H}^+ V_L$ または $T_{CR} V^+ V$ の対合を含有し、混合 B_{CR} - T_{CR} 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 $B_{CR} V_H V_L$ および 5,217 個の $T_{CR} V V$ ペアの信頼性を高度化することが可能である。 B_{CR} 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。

【0430】

末梢血と同様に、 B_{CR} 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な相関性を示した（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。 T_{CR} の場合、および IgD を含有する B_{CR} の場合、1 液滴バーコード当たり、末梢血の B_{CR} 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 T_{IL} - T_{CR} および B_{CR} 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 T_{CR} ペアの中で、2,423 個の異なる T_{CR} ベータクローニングが観察された。7つのクローニングが、> 1% の頻度で存在し、上位クローニングは、全ての液滴バーコードの 16.9% に相当した。6,056 個の合計 B_{CR} ペア中で、1,518 個の異なる重鎖クローニングが観察され、15 個のクローニングが > 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 B_{CR} レパートリーよりも実質的に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ニングはなかった）、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ニングが、腫瘍試料中に非常に多く存在することは、 T_{IL} 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 T_{IL} 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 T_{IL} 免疫受容体ペアを迅速に回収することを可能にする。

【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、 $CD4^+$ および $CD8^+$ 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、 T_{CR} 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、 $CD4^+$ 単離細胞に由来する $T_{CR} V$ および V （「 T_{CR} 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、 $CD8^+$ 単離細胞に由来する 2,235 個の T_{CR} 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 個の細胞を工

10

20

30

40

50

マルジョンに入力する前に、CD4⁺およびCD8⁺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 V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CTL4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。

【0432】

10

(実施例7)

ヒト試料

健常レパートリー検証用の血液試料を、Personal Genome Projectの承認に基づいて収集した。HIV bNAb実験用のPBMCを、IAVIプロトコールGコホートのHIV-1感染ドナーであるドナー17から得た。ヒトHIV試料は全て、ルワンダ共和国国立倫理委員会、エモリー大学内治験審査委員会、ザンビア大学研究倫理委員会、チャーリングクロス研究倫理委員会、UVRI科学および倫理委員会、ニューサウスウェールズ大学研究倫理委員会、聖ビンセント病院および東シドニー地区ヘルスサービス、ケニヤッタ国立病院倫理調査委員会、ケープタウン大学倫理委員会、国際施設内治験審査委員会、マヒドン大学倫理委員会、ウォルターリード陸軍研究所(WRAIR)施設内治験審査委員会、およびコートジボアール委員会「National d'Ethique des Sciences de la Vie et de la Santé」(CNESVS)により承認された臨床試験プロトコールに基づいて書面によるインフォームドコンセントを得たうえで収集した。凍結保存され、解離され、切除された、單一ドナーに由来する卵巣腺癌を、IRB承認プロトコールに基づいて、書面によるインフォームドコンセントを得たうえで、Conversant Biologicsから得た。

20

【0433】

30

(実施例8)

細胞調製

40

300万個の健常B細胞に関する研究では、ヘパリンナトリウム(BD)を有するVacutainer CPT細胞調製チューブに50mLの血液を採取し、1800×gで20分間遠心分離し、細胞調製緩衝液(2%ウシ胎仔血清および2mM EDTAで補填された1×PBS)で2回洗浄し、200×gのスピノンを使用して血小板を除去し、得られたPBMCを、RPMI-1640培地(Life Technologies)+20%ウシ胎仔血清+10%DMSOに、必要になるまで-80で凍結保存した。エマルジョン生成の前に、PBMCを解凍し、細胞調製緩衝液で2回洗浄し、計数した。ネガティブ選択に基づくヒトB細胞濃縮キット(Stem Cell Technologies)を製造業者の説明書に従って使用して、B細胞を単離した。20μm細胞ストレーナーに細胞を通し、細胞調製緩衝液で6.2×10⁶細胞/mL(300万個のB細胞での

50

実験) または $3 \cdot 1 \times 10^6$ 細胞 / mL (PGTドナーおよび卵巣腫瘍での実験) に希釈した。

【0434】

(実施例9)

エマルジョン内での免疫受容体バーコード付与

エマルジョン生成プラットフォームは、親フッ素性にコーティングされた石英Dolomite小型2試薬チップ内への、2つの水相および1つの親フッ素性油連續相のコンピュータ制御流動が可能になるように、単一の空気圧縮機により駆動され、各々がMitos流速センサを有する3つのMitosポンプ(Dolomite Microfluidics)を備えていた。1つの水性インプットチャネルは、所望の1液滴当たりの細胞占有レベルをもたらすように、必要とされる密度の細胞を含有し、第2の水性のチャネルは、AbPair(商標)反応緩衝液およびオリゴヌクレオチド(www.abviro.com/catalog AV2070-1SおよびAV2080-1S)、5单位/ μL のMuMLVに基づく逆転写酵素(Thermo Scientific)、および0.1单位/ μL のHerculase II PCRポリメラーゼを含む溶解および反応混合物を含有していた。100 μL のHamilton Microliterシリングを使用して、100 μL 内部径PEEKチューブ試料ループに、各々約100 μL のLRミックスを2回のインジェクションで負荷した。100 μL のHamilton

Gastightシリングを使用して、約100 μL の0.2mm内部径FEPチューブループに、約110 μL の細胞懸濁液を負荷した。エマルジョンは、チップの2つの油チャネルから油を同時に流動させた2試薬チップに、水相を同一の流速で集中流噴射することにより形成した。チップ出口チャネルを出るエマルジョンを、冷却ブロックに配置した0.2mLのPCRストリップチューブ(Eppendorf)内に滴下させ、その後、過剰な油を、ピペットでチューブの底部から取り除き、40 μL のオーバーレイ溶液(25mM Na-EDTA、pH 8.0)を添加し、チューブを、転写タグ化反応のために標準的サーモサイクラーに移した。45分間の逆転写(RT)ステップ中、標的特異的RTプライマーを用いて、ランダム化分子バーコードを含有するユニバーサルアダプター配列の鋳型スイッチに基づく付加により、RNAを42度で逆転写した。RT後、エマルジョンを、40サイクルの熱サイクル(各サイクル: 82度で10秒間、65度で25秒間)にかけて、液滴バーコード鋳型のPCR增幅を実施し、それを、初期溶解および反応混合物中で30,000cp/ μL に希釈し、15,000cp/ μL または約65pl液滴当たり約1個の最終混合物中での濃度を生成した。液滴バーコードの一方の末端は、11umina読み取り2('P7')プライマー部位を含み、他方の末端は、ユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドの共通配列とマッチングする。したがって、PCR中、鋳型スイッチしたcDNAは、増幅された液滴バーコード鎖にアニーリングし、オーバーラップ伸長によりスプライスされて、標的、分子バーコード、および液滴バーコード配列を含有する全長産物を產生することができる。

【0435】

(実施例10)

エマルジョン破壊、クリーンアップ、下流PCR、プール化、および配列決定

熱サイクル後、オーバーレイ溶液を、ピペットで取り除き、40 μL エマルジョン破壊溶液(1:1 FC-40:パーフルオロオクタノール)を、15 μL 溶解物クリアリング溶液(12.5 μL Qiaegenプロテアーゼ、2.5 μL の0.5M Na-EDTA、pH 8.0)と共に添加した。10回反転させてエマルジョンを破壊した後、混合物を50度で15分間、および95度で3分間インキュベートして、プロテアーゼを不活性化した。15,000 $\times g$ で1分間遠心分離して水相を単離した後、回収した物質を徹底的に精製して、オリゴヌクレオチド、試薬、および過剰な液滴バーコードPCR産物を除去した。全長産物は、RTプライマーの5'ビオチン化によりビオチンを含有するため、ストレプトアビジンビーズをクリーンアップすることにより、それらは、過剰な液滴バーコードPCR産物から効率的に分離することができ、したがって、オーバーラップ伸長法

10

20

30

30

40

50

に共通の問題である下流 P C R 組換えアーティファクトが最小限に抑えられる。まず、製造業者の説明書を使用して 1 : 1 比の A M P u r e X P ビーズ (A g e n c o u r t) を使用し、その後、この場合も製造業者の説明書を使用してストレプトアビジンビーズ (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を使用してクリーンアップし、その後、 95 の脱イオン水で溶出させ、その後 1 : 1 比の A M P u r e X P ビーズで第 2 のクリーンアップを行うことにより、産物を精製した。その後、産物を、標的濃縮 P C R に入れ、 B または T 細胞受容体標的の定常領域に特異的なプライマーを、液滴バーコード配列のユニークバーサル末端に特異的なプライマーと共に使用した。このリバースプライマーは、製造業者の説明書に従って M i S e q 機器でマルチプレックス配列決定するための 6 塩基インデックスバーコードも含んでいた。したがって、このステップでは、全長液滴バーコード化標的配列のみが増幅される。まず、反応開始時に 2 分間の 98 ℃ ポリメラーゼ活性化ステップを含む製造業者の推奨条件下で、 Q 5 ホットスタートポリメラーゼ (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を使用して、全ての標的を、 98 ℃ で 10 秒間 ; 64 ℃ で 20 秒間 ; 72 ℃ で 15 秒間の 7 サイクルで一緒に増幅した。この後、 1.5 : 1 のビーズ : P C R 比で A M P u r e X P クリーンアップを行った。その後、同じ熱サイクル条件を以前と同様に使用して、各鎖 (V_H 、 V_L 、 V₊ 、 V₋) を別々に標的とする第 2 の 7 サイクルを実施し、その後、 A M P u r e X P クリーンアップを行った。その後、同じ熱サイクル条件および 5 ~ 15 サイクル (q P C R により判断される収量に応じて) で、全長 I l l u m i n a 配列決定アダプターを付加し、 T a p e S t a t i o n D 1 0 0 0 (A g i l e n t) 定量化に十分な物質を生成する最終 P C R を実施した。その後、ライブラリーをプールし、 V 3 2 × 3 0 0 b p M i S e q プラットフォーム (I l l u m i n a) で配列決定した。
10
20

【 0 4 3 6 】

(実施例 1 1)

M i S e q プラットフォームの改変

B C R または T C R の完全な可変 V (D) J 領域の再構成には、 2 つのペアエンド I l l u m i n a 読み取りを繋ぎ合わせることが必要である。このプロセスを向上させるため、 2 × 3 0 0 b p キットのフォワード読み取りを 3 2 5 b p に延長した。免疫受容体ライブラリーは、定常領域プライマー部位の多様性を制限するため、 10 % p h i X スパイクインを使用して、ライブラリー多様性の制限という問題を軽減した。
30

【 0 4 3 7 】

(実施例 1 2)

読み取りのバイオインフォマティクス処理の概要

p R E S T O パッケージ (バージョン 0.4) の周辺に組み立てた特注バイオラインを使用して、 I l l u m i n a M i S e q 読み取りを処理して、各液滴から m R N A 分子の全長コンセンサス配列を生成し、 I g B L A S T および / または I M G T / H i g h V - Q U E S T で注釈を付け、特注スクリプトおよび C h a n g e - O パッケージを用いて、さらにアラインし、フィルタリングし、および処理して、統計情報を生成した。
40

【 0 4 3 8 】

(実施例 1 3)

読み取り処理および注釈、アイソタイプ帰属。

生読み取り処理、 V (D) J 注釈、およびクローンの帰属は、 p R E S T O および C h a n g e - O パッケージを利用して特注バイオラインで実施した。手短に言えば、生 I l l u m i n a ペアエンド 3 2 5 + 3 0 0 b p 読み取りを品質管理し、プライマートリミングし、液滴特異的 (D B) および分子特異的バーコード (M B) を、プライマー部位のファジー・マッチングにより識別した。まとめると、 D B および M B により由来分子が固有に識別され、この固有な分子識別子 (U M I) を使用して、同じ分子から生じる一致 P C R 複製読み取り (最小で 2 つ) をグループ化し、各 m R N A 配列のコンセンサスを生成する。アイソタイプ特異的プライミングは、プライマートリミングされた配列内の既知のアイソタイプ特異的定常領域のファジー・マッチングにより確認した。 V (D) J 生殖系列セグ
50

メントおよび再配置構造を、*IgBLAST*を使用して決定し、*IMGT/HIGH-QUEST*で確認し、適切な場合は、*Change-O*および特注スクリプトで解析した。

【0439】

マッチングするIGHV遺伝子、IGHJ遺伝子、および接合部長を有する機能性V(D)J配列を、*Change-O*に実装されているように、グループ内で单一連鎖クラスター化することにより、クローンを帰属させた。300万個の循環細胞データセットでは、対称化トランジション/トランスマージョンモデルを使用して、4.0の重みが加えられたクローン内距離を、クローン内の最近傍距離カットオフとして使用した。

【0440】

(実施例14)

液滴免疫受容体含有フィルタリングおよび対合フィドリティー算出

液滴からB細胞配列を回収する精度は、本バーコード付与法により2つのやり方：液滴内mRNA配列一致および交差画分対合一致を使用してアセスメントすることができる。各液滴内では、1遺伝子座当たり複数のmRNAが捕捉され、1つの細胞に由来する発現V(D)J配列は、一致するはずである。配列一致を規定する、複数のアラインされたV(D)Jセグメントの2%配列多様性(平均のペアを成すヌクレオチド差 $p_i 55 < 0.02$)のカットオフを使用して、1液滴当たり1つよりも多くの生産的VDJおよび1つの生産的VJ配列の存在を、推定免疫受容体含有または複数細胞占有として、バイオインフォマティクス的に目印を付ける。対立遺伝子排除的な液滴毎に重鎖および軽鎖コンセンサス配列を組み立て、クローン規定および交差画分対合分析に使用した。300万個の循環B細胞データセットでは、各V_H系列は、データセット中の $> 20,000$ 個の軽鎖クローンの1つ(理想的な場合)と関連している。V_HV_Lペアを有する259,368個の免疫遺伝子座排除的な液滴中、10,870個のVDJ重鎖遺伝子座再配置クラスターが、少なくとも6つの物理的に分離されたエマルジョン画分の2つに存在していた。これらクラスターは、増殖系列であるか、または同じVJエクソンの、独立しているが類似の再配置であるかのいずれかを表わす。VDJ再配置が、2つの複製で一貫したVJ再配置と対合している場合、両実験は、独立して真の陽性をもたらした(より希少な再配置を有する2,604個のクローンの35,922個の考え得るペアを成す比較のうち33,157個)。したがって、各複製の精度は、96.1%(0.923^0.5)である。

【0441】

(実施例15)

HIV bNAb候補配列の発見

本発明者らの38,620個のV_HV_Lペアを、*tblastx*、*MUSCLE*、および*PhyML*を使用して文献から選別した既知のbNAb HCDR3、VDJ配列、およびドナー17系列との類似性について探索することにより、HIVの新しいネイティブに対合した広域中和抗体(BNAb)を発見し、その後、完全なV(D)Jアミノ酸配列の系統樹を手作業で検査して、既知のbNAb配列で分散されている抗体候補を選択した。

【0442】

(実施例16)

HIV bNAbタンパク質発現および精製

抗体配列を合成し、以前に記載されている重鎖および軽鎖ベクターにクローニングした。重鎖および軽鎖プラスミドを、製造業者のプロトコールに従って293fectin(*In vitro*)を使用して、293Freestyle細胞に同時トランスフェクトした(1:1比)。抗体上清を、トランスフェクトの4日後に採集し、プロテインA親和性クロマトグラフィーで精製した。精製した抗体を、さらなるアッセイで使用する前にPBSで緩衝液交換した。

【0443】

(実施例17)

10

20

30

40

50

擬似ウイルス産生および中和アッセイ

HIV-1 Env 発現プラスミドおよびEnv欠損ゲノムバックボーンプラスミド(pSG3-Env)を293T細胞にトランスフェクトすることにより、擬似ウイルスを生成した。トランスフェクション72時間後に、擬似ウイルスを、中和アッセイで使用するために採取した。単一ラウンドの複製擬似ウイルスアッセイおよびTZM-B1標的細胞を使用して、中和活性をアセスメントした。手短に言えば、TZM-B1細胞を、96ウェル平底プレートに播種した。このプレートに、擬似ウイルスを添加し、それを、抗体の系列希釈物と共に37℃で1時間、事前にインキュベートした。感染72時間後に溶解し、Bright-Gloルシフェラーゼ基質(Promega)を添加して、ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現を定量化した。IC₅₀値を決定するために、用量反応曲線を非線形回帰法でフィッティングした。10

【0444】

(実施例18)

卵巣腫瘍標的鎖の同定識別

エマルジョン中の卵巣解離腫瘍組織からBCRおよびTCRを同時に捕捉した後、以前に記載されるように分子および液滴バーコードを使用して読み取りをフィルタリングしたが、その後、4つの考え得る標的鎖タイプ(BCR V_H、BCR V_L、TCR V、TCR V)の各々の存在を探した。各々が少なくとも2つの配列決定読み取りを有する少なくとも2つのmRNAにより支持されていた場合、標的鎖を保持した。BCR V_H V_LまたはTCR V Vペアのみを含有する全ての液滴バーコードを、さらに分析した。BCR重鎖およびTCRベータ鎖クローンを、個別のCDR3アミノ酸配列に基づいてコールした。20

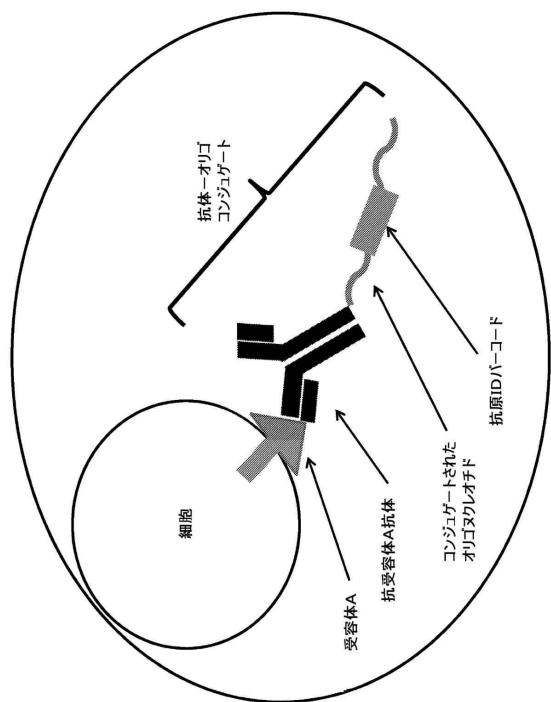
【0445】

(実施例19)

DNA標識抗体染色によるエマルジョン内のタンパク質検出

一本鎖200bp DNAオリゴヌクレオチドを、固有の5bp抗原ID配列を含有するように設計し、5'アミノ基で修飾した(Integrated DNA Technologies)。マウスモノクローナル抗ヒトCD4(BioLegend、#300516)およびCD8a(BioLegend、#301018)抗体を、製造業者のプロトコールに従ってThunder-Linkキット(Innova Biosciences)を使用して、DNAオリゴヌクレオチドタグにコンジュゲートした。エマルジョン前の細胞標識化では、末梢血に由来する200万個のネガティブ選択されたT細胞を、400μL細胞緩衝液+2mM EDTA+0.05%アジ化ナトリウムで希釈した。一本鎖サケ精子DNAを、200μg/mLの最終濃度で細胞に添加し、細胞を室温で5分間回転させた。CD4およびCD8a DNA標識抗体の混合物(各々、5nMの最終濃度)を細胞に添加し、30分間室温でインキュベートした。細胞を、細胞緩衝液+2mM EDTA+0.05%アジ化ナトリウム+200μg/mL一本鎖サケ精子DNAで3回洗浄した。エマルジョン分析に入る前に、細胞を、細胞緩衝液+0.05%アジ化ナトリウムに再懸濁した。30,000個の細胞を、エマルジョン配列決定に使用した。30

【図1】



【図2】



FIG.2

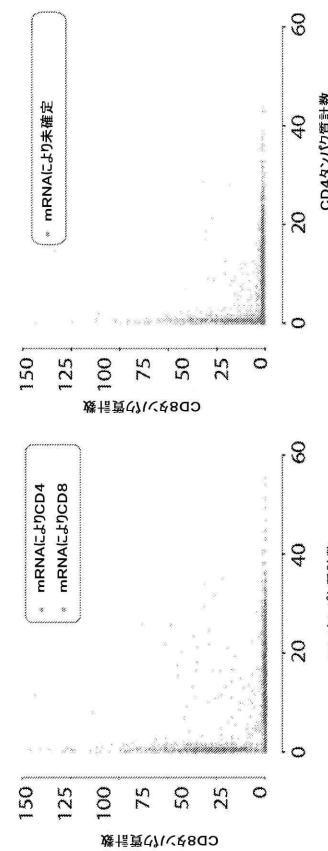
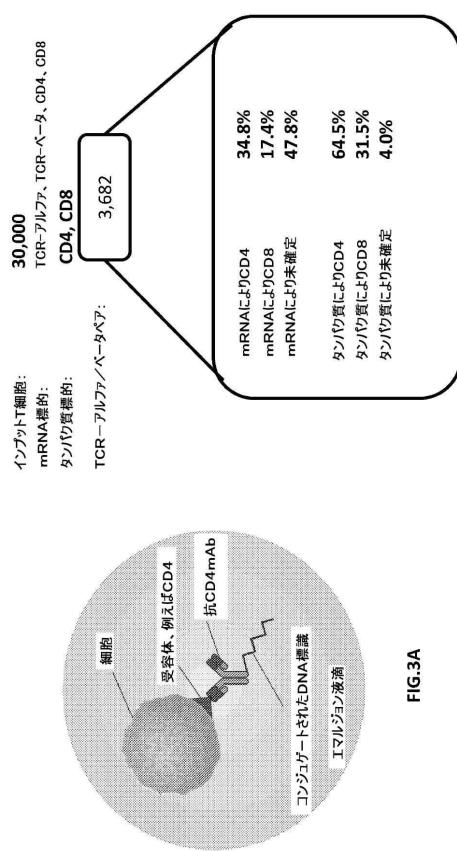


FIG.3C

【図3A B】



【図3D】

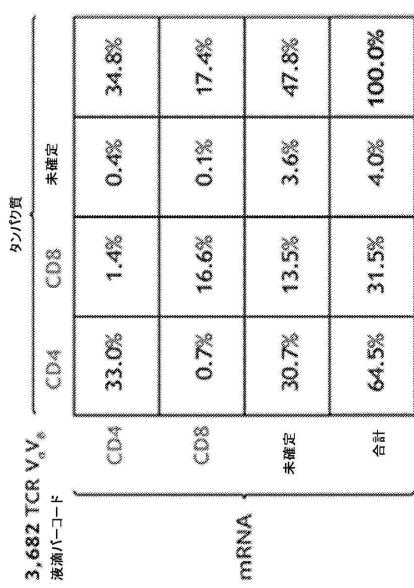


FIG. 3D

【図3E】

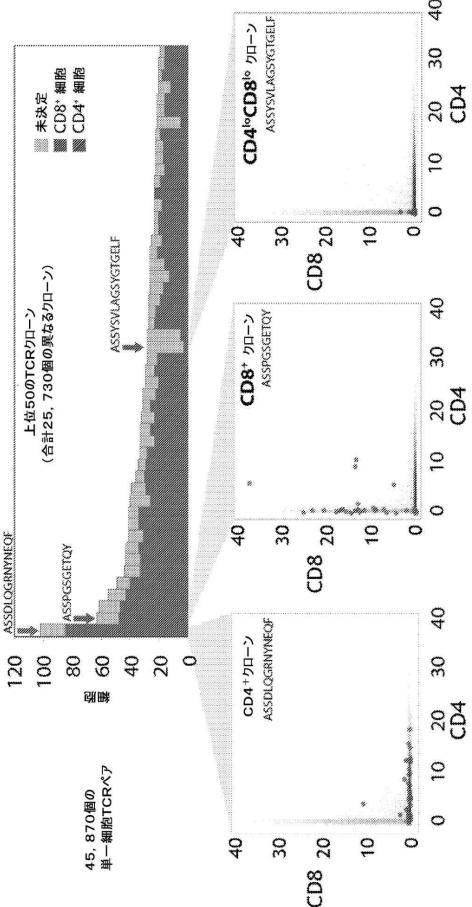


FIG. 3E

〔図4〕

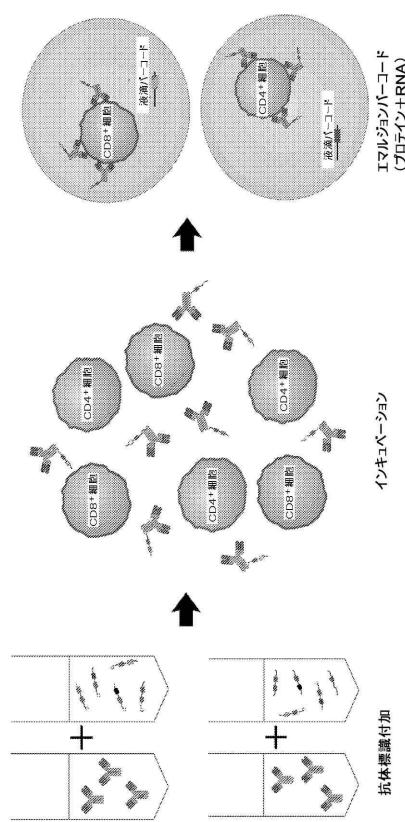


FIG. 4

【図5】



EIG 50

The diagram illustrates the experimental workflow. At the top, a cell with internal structures is shown with an arrow pointing down to a circular filter labeled "滤纸". Below the filter is a horizontal line with two arrows pointing right, leading to a sequencing gel labeled "聚丙烯酰胺凝胶".

HG. 5A

The diagram shows the flow from mRNA to cDNA and then to PCR products.

- mRNA:** At the top, a single-stranded mRNA molecule is shown with a poly-A tail at the 3' end.
- RT (Reverse Transcriptase):** An enzyme labeled "B" converts the mRNA into complementary DNA (cDNA). The cDNA strand is labeled "RTプライマー" (RT primer) at its 5' end and "cDNA" at its 3' end.
- PCR:** The cDNA is used as a template for polymerase chain reaction. Two primers, labeled "A" and "B", are annealed to the cDNA. Primer A is a forward primer located upstream of the target sequence, while primer B is a reverse primer located downstream. The region between the primers is the target DNA sequence.
- Products:** The final PCR products are two fragments of DNA, each consisting of a portion of the target sequence flanked by the primers A and B.

-1G. 5C

【 四 6 】

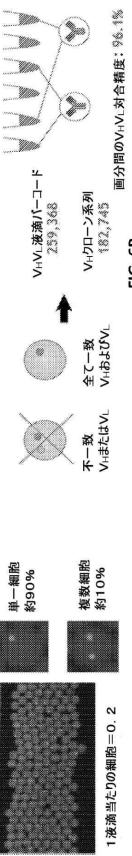


FIG. 6A



FIG. 6C

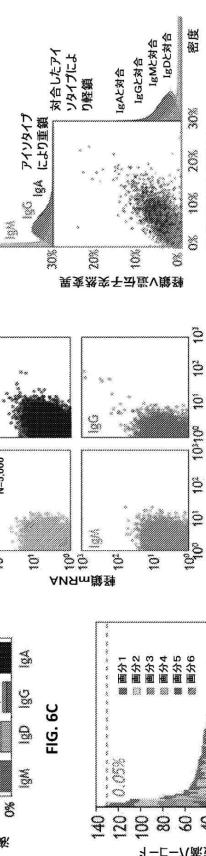


FIG. 6E

FIG. 6E

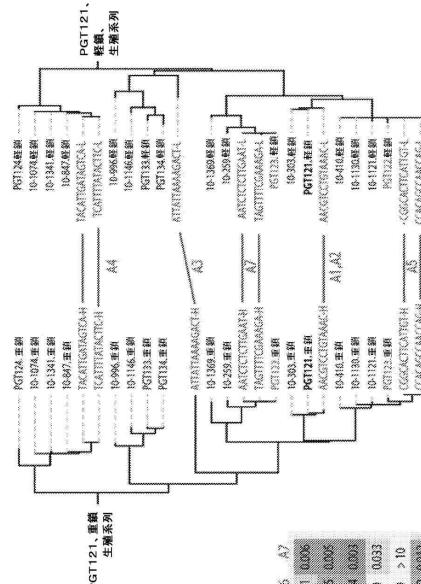
三位100重鎮クリー

FIG. 6D

FIG. 8E

【図9A】

【圖 7】



11

EIGEN

【 四 8 】



FIG. 8E

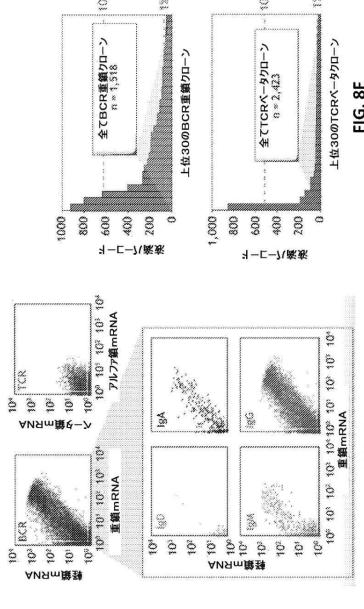


FIG. 8E

卵巣腫瘍由来細胞
FIG. 9A

Antibody Type	Relative Amount (%)
IgM	51.52
IgE	29.6
IgG	11.1
IgD	4.87

IG. 8B

FIG. 8E

The diagram illustrates the relationship between DB genes and MB genes in two different cell types, represented by circles labeled "細胞" (cell).

Top Cell Type:

- DB1** gene is present.
- MB1** and **MB2** genes are present.
- AID** and **AMB2** genes are present.
- AID** and **AMB1** genes are absent.

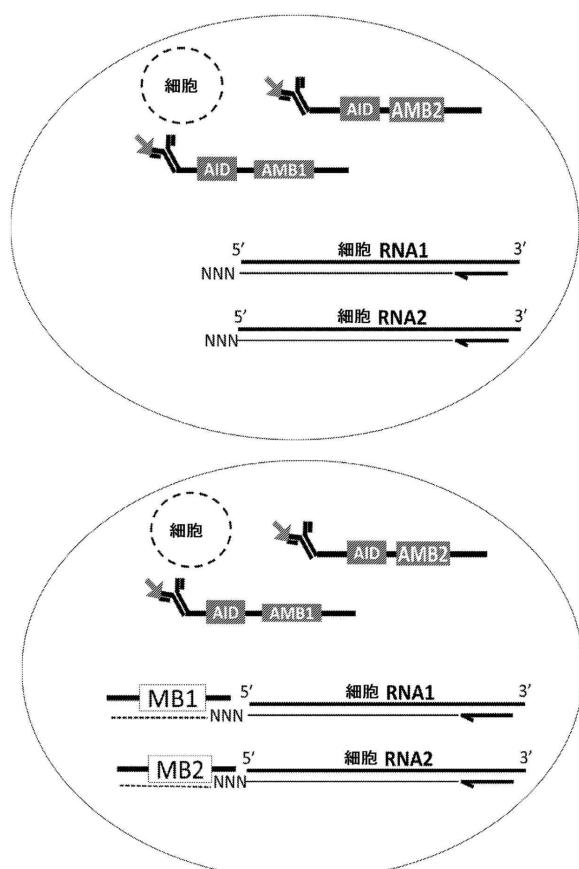
Bottom Cell Type:

- DB2** gene is present.
- MB1** and **MB2** genes are present.
- AID** and **AMB2** genes are present.
- AID** and **AMB1** genes are absent.

In both cell types, the DB genes are located at the top, and the MB genes are located to the right. The AID genes are located below the MB genes, and the AMB genes are located to the right of the AID genes. The genes are represented by black rectangles with diagonal hatching.

FIG. 9A

【図 9 B】



【図 9 C】

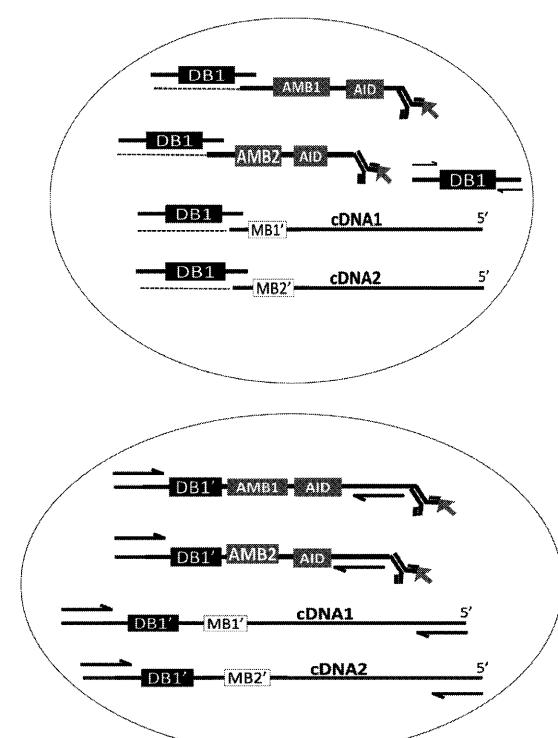
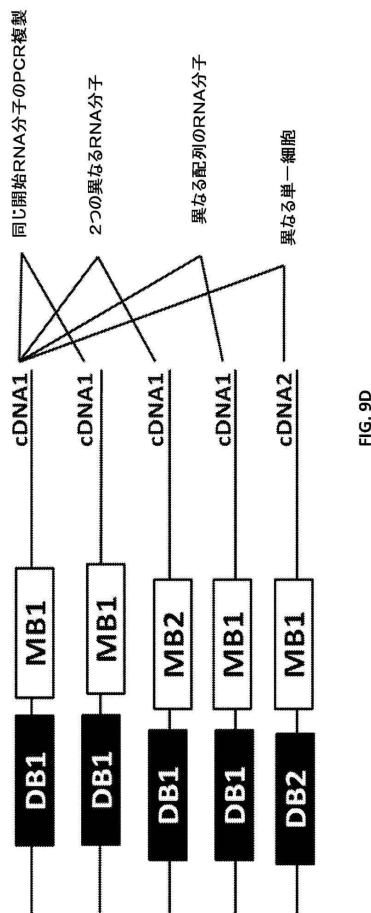
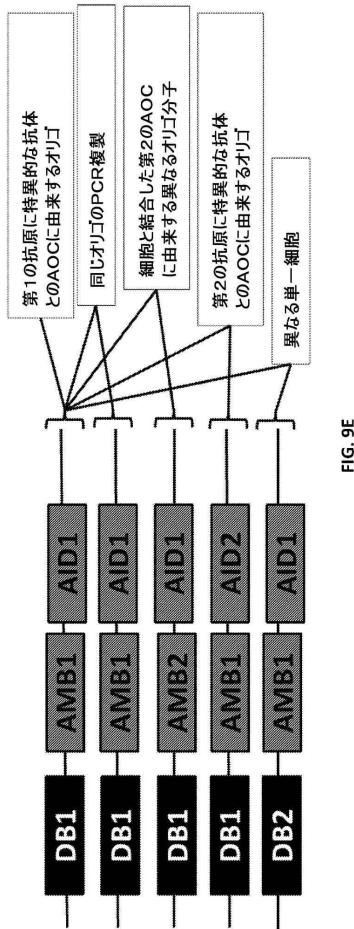


FIG. 9C

【図 9 D】



【図 9 E】



【図 10A】

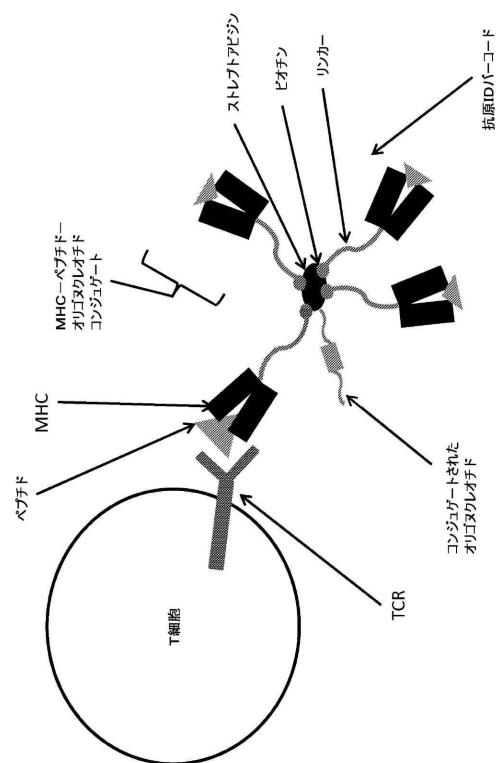


FIG. 10A

【図 10B】

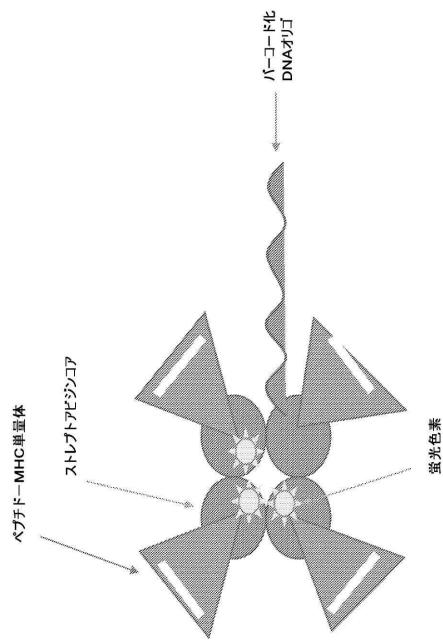


FIG. 10B

【図 11A】

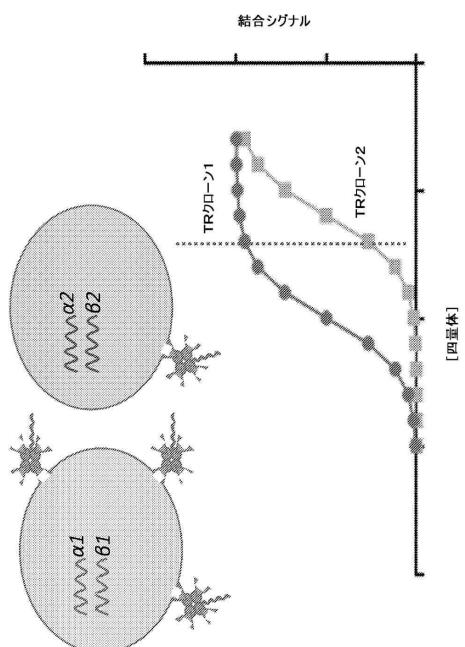


FIG. 11A

【図 12】

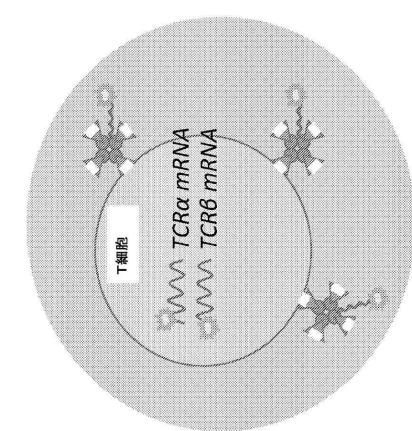


FIG. 12B

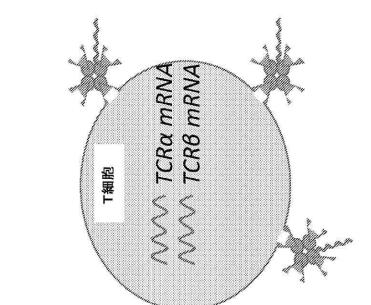


FIG. 12A

【図17】

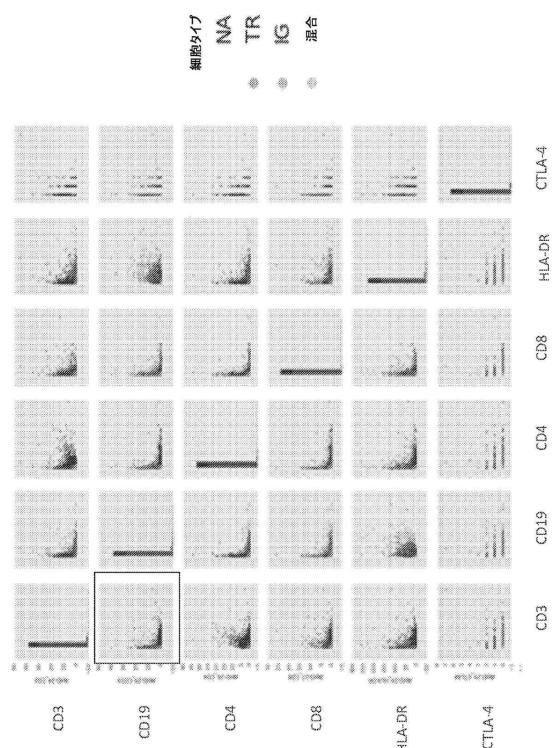


FIG. 17

フロントページの続き

(72)発明者 ヴィニヨー, フランソワ
アメリカ合衆国 ワシントン 98109, シアトル, デクスター アベニュー ノース 4
00, スイート 1200

(72)発明者 ブリッグス, エードリアン ランガム
アメリカ合衆国 ワシントン 98109, シアトル, デクスター アベニュー ノース 4
00, スイート 1200

(72)発明者 ゴールドフレス, ステファン ジェイ.
アメリカ合衆国 ワシントン 98109, シアトル, デクスター アベニュー ノース 4
00, スイート 1200

(72)発明者 ベルモント, ブライアン ジェイ.
アメリカ合衆国 ワシントン 98109, シアトル, デクスター アベニュー ノース 4
00, スイート 1200

審査官 斎藤 貴子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0357500(US, A1)
国際公開第2015/103339(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q C12N G01N
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)