

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 2 月 20 日 (2020.2.20)

【公表番号】特表 2019-537430 (P2019-537430A)

【公表日】令和 1 年 12 月 26 日 (2019.12.26)

【年通号数】公開・登録公報 2019-052

【出願番号】特願 2019-515986 (P2019-515986)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/536 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6804 (2018.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/11 Z

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/536 E

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6804 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 1 月 10 日 (2020.1.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T 細胞受容体 ( T C R ) を選択する方法であって、

( a ) 複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数の T 細胞と接触させるステップと；

( b ) 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を、

( i ) 複数のベッセルのうちの 1 つのベッセル中の、 p M H C - 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、および

( i i ) 前記ベッセル中の複数の T 細胞のうちの 1 つの単一の T 細胞に由来する T C R ポリヌクレオチド

に付着させるステップと；

( c ) 前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記 T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報を生成するステップとを含む方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、検出部分を含み、；

前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチド分子を前記複数の T 細胞と接触させた後、および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を付着させる前に、

( b ' ) 前記検出部分の検出に基づいて、前記複数の T 細胞から、富化させた T 細胞集団を得るステップと；

( b ' ' ) 富化させた前記集団から、 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分

子に結合した 1 つの単一の T 細胞を、複数のベッセルのうちの 1 つのベッセルに単離するステップとを含む方法。

【請求項 3】

前記配列情報に基づいて、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートへの前記 T C R ポリヌクレオチドによってコードされる T C R の結合親和性を決定するステップをさらに含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記富化させた T 細胞集団が、前記接触させるステップの後の前記複数の T 細胞中の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合した T 細胞の全 T 細胞に対する比より高い、p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合した T 細胞の全 T 細胞に対する比を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

T 細胞受容体 ( T C R ) を選択する方法であって、

( a ) 第 1 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を、第 1 の複数の T 細胞と、第 1 の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子対細胞の比で接触させるステップと；

( b ) 第 2 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を、第 2 の複数の T 細胞と、前記第 1 の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子対細胞の比より低い、第 2 の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子対細胞の比で接触させるステップと；

( c ) 第 1 の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を、

( i ) 複数のベッセルのうちの第 1 のベッセル中の前記第 1 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の p M H C - 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、および

( i i ) 前記第 1 のベッセル中の前記第 1 の複数の T 細胞の単一の T 細胞に由来する第 1 の T C R ポリヌクレオチドに付着させるステップと；

( d ) 第 2 の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を、

( i ) 前記複数のベッセルのうちの第 2 のベッセル中の前記第 2 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の p M H C - 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、および

( i i ) 前記第 2 のベッセル中の前記第 2 の複数の T 細胞の単一の T 細胞に由来する第 2 の T C R ポリヌクレオチドに付着させるステップと；

( e ) 前記第 1 のベッセル中の前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報の第 1 のセットを生成するステップと；

( f ) 前記第 2 のベッセル中の前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報の第 2 のセットを生成するステップと；

( g ) 配列情報の前記第 1 のセットに基づいて、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートへの前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる T C R の第 1 の結合シグナルを決定するステップ、および配列情報の前記第 2 のセットに基づいて、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートへの前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる T C R の第 2 の結合シグナルを決定するステップとを含む、前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドおよび前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドが、同じ T C R をコードする、方法。

**【請求項 6】**

前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドおよび前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる同じ T C R の結合親和性を、前記第 1 の結合シグナルおよび前記第 2 の結合シグナルに基づいて決定するステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記第 1 および第 2 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、同じペプチドを含む、または同じ p M H C サブタイプを含む、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 8】**

T 細胞受容体 ( T C R ) を選択する方法であって、

( a ) 複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数の T 細胞と接触させるステップと；

( b )

( i ) 第 1 の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を、複数のベッセルのうちの第 1 のベッセル中の p M H C - 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付着させ、

( i i ) 前記第 1 のベッセル中の T 細胞集団の第 1 の単一の T 細胞に由来する第 1 の T C R ポリヌクレオチドを付着させ；

( i i i ) 第 2 の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を、前記複数のベッセルのうちの第 2 のベッセル中の p M H C - 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付着させ、

( i v ) 前記第 2 のベッセル中の T 細胞集団の第 2 の単一の T 細胞に由来する T C R ポリヌクレオチドを付着させるステップと；

( c )

( i ) 前記第 1 のベッセル中の前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって、T C R ポリヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りおよびオリゴヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りを含む配列情報の第 1 のセットを生成し；

( i i ) 前記第 2 のベッセル中の前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および第 2 の T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって、T C R ポリヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りおよびオリゴヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りを含む配列情報の第 2 のセットを生成するステップと；

( d ) 前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の結合親和性と前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の結合親和性とを比較するステップであって、前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の前記結合親和性が、配列情報の前記第 1 のセットに基づいて決定され、前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の前記結合親和性が、配列情報の前記第 2 のセットに基づいて決定される、ステップと；

( e ) 前記比較するステップに基づいて前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R を選択するステップであって、前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる選択された前記 T C R が、前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R より強力な結合親和性を有する、ステップとを含む方法。

**【請求項 9】**

前記第 1 の単一の T 細胞が、疾患または状態に罹患している患者に由来し、必要に応じて、前記第 2 の単一の T 細胞が、前記疾患または状態に罹患していない患者に由来する、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、検出部分を含み、前記方法

が、前記検出部分の検出に基づいて、富化させた T 細胞集団を得るステップをさらに含む、請求項 5 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記検出部分が、フルオロフォアを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記第 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相補体のベッセルバーコード配列が、複数の前記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異なる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記配列情報が、T C R ポリヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りおよびオリゴヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りを含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記単一の T 細胞に結合した p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の数を決定するステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記オリゴヌクレオチド部分が、前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の単一の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に固有な四量体分子バーコード ( T M B ) 配列を含み、前記配列情報が、T M B 配列読み取りを含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記オリゴヌクレオチド部分が、前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の単一の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に固有な四量体分子バーコード ( T M B ) 配列を含み、前記配列情報が、T M B 配列読み取りを含み、前記単一の T 細胞に結合した p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の数が、前記 T M B 配列読み取りから決定される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の p M H C 部分が、p M H C の多量体、必要に応じて p M H C の四量体を含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記 M H C が、可溶形態である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記 p M H C 部分のペプチドが、合成ペプチドを含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分が、四量体同定 ( T I D ) 配列を含み、必要に応じて、前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の各 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、固有の T I D 配列を含み、さらに必要に応じて、前記 T I D 配列が、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記ペプチドまたは前記 p M H C 部分にバーコード化される、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記ベッセル中の鋳型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドに由来する、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記配列情報が、前記 T I D 配列またはその相補体を含み、および / または前記 T I D

配列を有する分子のコピー数を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記接触させるステップの後に前記複数の T 細胞を洗浄するステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 24】

前記単一の T 細胞を溶解するステップをさらに含み、前記溶解するステップが、前記単一の T 細胞が前記ベッセル中で単離された後である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 25】

前記複数の T 細胞が、複数のソーティングされていない T 細胞である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 26】

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相補体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、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 27】

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またはその相補体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またはその相補体の前記ベッセルバーコード配列に固有である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 28】

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部分に付着させる前記ステップ、およびベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを前記単一の T 細胞に由来する TCR ポリヌクレオチドに付着させる前記ステップが、同時に実行される、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 29】

前記オリゴヌクレオチド部分もしくはその相補体および / または前記 TCR 細胞ポリヌクレオチドもしくはその相補体を増幅するステップをさらに含み、必要に応じて、前記オリゴヌクレオチド部分もしくはその相補体および前記 TCR 細胞ポリヌクレオチドもしくはその相補体を同時に増幅するステップを含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 TCR 細胞ポリヌクレオチドの前記ベッセルバーコード配列および前記オリゴヌクレオチド部分の前記ベッセルバーコード配列が、同じである、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 31】

前記複数のベッセルのうちの 2 またはそれより多くのベッセルから、オリゴヌクレオチド部分または TCR 細胞ポリヌクレオチドまたはその増幅産物またはその相補体をプールするステップをさらに含み、必要に応じて、前記プールするステップが、配列決定するステップの前である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記複数の pMHC - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、異なる pMHC - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 33】

前記オリゴヌクレオチド部分が、融合配列を含み、前記付着させるステップが、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、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 pMHC - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分

が、プライマー結合配列または定常配列を含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分が、T I D 配列および T M B 配列を含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 36】

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、T I D 配列および / または T M B 配列を分析するステップをさらに含み、必要に応じて、1 つまたは複数のベッセルバーコード配列、1 つまたは複数の T I D 配列、1 つまたは複数の T M B 配列、またはその組合せの頻度を決定するステップをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

オリゴヌクレオチド配列読み取りの T I D 配列を、オリゴヌクレオチド配列読み取りの T M B 配列と比較するステップをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

( i ) オリゴヌクレオチド部分配列読み取りを T C R ポリヌクレオチド配列読み取りと比較するステップ、( i i ) オリゴヌクレオチド部分配列読み取りのベッセルバーコード配列を、T C R 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ステップ、( i i i ) T C R ポリヌクレオチド配列読み取りと比較するステップ、( i v ) T C R 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ステップ、および / または ( v ) 前記分析するステップまたは前記比較するステップに基づいて単一の T 細胞の特徴を決定するステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 39】

前記オリゴヌクレオチド部分配列読み取りに基づいて T C R を選択するステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 40】

前記 T C R ポリヌクレオチド配列読み取りに基づいて T C R を選択するステップを含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 41】

前記オリゴヌクレオチドに付着された前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド、および前記 T C R ポリヌクレオチドに付着された前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記ベッセル中の同じ鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドに由来する、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ベッセルが、固体支持体を含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 43】

前記ベッセルが、固体支持体を含まない、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 44】

前記複数のベッセルの各ベッセルが、単一の細胞を含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 45】

前記ベッセルが、ウェル、エマルジョンまたは液滴である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 46】

前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合されていない、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 47】

前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合されている、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 48】

複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドのうち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 T C R ポリヌクレオチドに付着させるステップであって、前記分子バーコード配列が、単一の T C R ポリヌクレオチドおよびその増幅産物にバーコード化される、ステップをさらに含み、必要に応じて、前記 T C R 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ステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 49】

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの前記付着させるステップが、ライゲーションすること、酵素によって付着させることまたはハイブリダイズさせることを含み、必要に応じて、前記付着させるステップが、前記オリゴヌクレオチド部分または T C R ポリヌクレオチドを伸長させるステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 50】

前記付着させるステップが、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、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 51】

前記オリゴヌクレオチド部分または T C R ポリヌクレオチドが、二本鎖である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 52】

前記オリゴヌクレオチド部分または T C R ポリヌクレオチドが、一本鎖である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 53】

前記オリゴヌクレオチド部分または T C R ポリヌクレオチドが、DNA である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 54】

前記オリゴヌクレオチド部分または T C R ポリヌクレオチドが、RNA であり、必要に応じて mRNA である、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 55】

前記 T C R ポリヌクレオチドが、可変領域配列を含み、前記方法が、必要に応じて、可変領域配列を含有するネイティブの T C R 鎖配列を対合させるステップをさらに含む、請求項 1、2、5 または 8 に記載の方法。

【請求項 56】

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 T 細胞を含む試料に由来する単一の T 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 T 細胞の T C R に結合する p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートをさらに含む、組成物。

【請求項 57】

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 T 細胞を含む試料に由来する単一の溶解 T 細胞、および

(b) 前記単一の溶解 T 細胞の T C R に結合する p M H C 部分を含む p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含み、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分が、ベッセルバーコード配列を含み、前記単一の溶解 T 細胞に由来する T C R 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。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

**【補正方法】変更****【補正の内容】****【0063】**

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。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

**(項目1)**

T細胞受容体(TCR)を選択する方法であって、

(a) 複数のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数のT細胞と接触させるステップと；

(b) 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を、

(i) 複数のベッセルのうちの1つのベッセル中の、pMHC-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、および

(ii) 前記ベッセル中の複数のT細胞のうちの1つの単一のT細胞に由来するTCRポリヌクレオチド

に付着させるステップと；

(c) 前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記TCRポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報を生成するステップと

を含む方法。

**(項目2)**

T細胞受容体(TCR)の結合親和性を決定する方法であって、

(a) 複数のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数のT細胞と接触させるステップと；

(b) オリゴヌクレオチド部分またはその相補体を配列決定し、それによって配列情報を生成するステップと；

(c) 前記配列情報に基づいて、pMHCオリゴヌクレオチドコンジュゲートへのTCRの結合親和性を決定するステップと

を含む方法。

**(項目3)**

T細胞受容体(TCR)を選択する方法であって、

(a) 複数のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数のT細胞と接触させるステップであって、前記pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、検出部分を含む、ステップと；

(b) 前記検出部分の検出に基づいて、(a)の前記複数のT細胞から、富化させたT細胞集団を得るステップと；

(c) 富化させた前記集団から、pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合した1つの単一のT細胞を、複数のベッセルのうちの1つの第1のベッセルに単離するステップと；

(d) 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を、

(i) 前記第1のベッセル中の前記pMHC-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、および

(ii) 前記第1のベッセル中の前記単一のT細胞に由来するTCRポリヌクレオチド

に付着させるステップと；

(e) 前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記TCRポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報を生成するステップと

を含む方法。

**(項目4)**



T細胞受容体（TCR）を選択する方法であって、

（a）複数のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数のT細胞と接触させるステップであって、前記pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、検出部分を含む、ステップと；

（b）前記検出部分の検出に基づいて、（a）の前記複数のT細胞から、富化させたT細胞集団を得るステップと；

（c）富化させた前記集団から、pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合した1つの単一のT細胞を、複数のベッセルのうちの1つの第1のベッセルに単離するステップと；

（d）オリゴヌクレオチド部分またはその相補体およびTCRポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報を生成するステップと；

（e）前記配列情報に基づいて、前記pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲートへの前記TCRポリヌクレオチドによってコードされるTCRの結合親和性を決定するステップと

を含む方法。

（項目5）

前記富化させたT細胞集団が、前記接触させるステップの後の前記複数のT細胞中のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合したT細胞の全T細胞に対する比より高い、pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合したT細胞の全T細胞に対する比を含む、項目3または4に記載の方法。

（項目6）

T細胞受容体（TCR）を選択する方法であって、

（a）第1の複数のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を、第1の複数のT細胞と、第1のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子対細胞の比で接触させるステップと；

（b）第2の複数のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を、第2の複数のT細胞と、前記第1のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子対細胞の比より低い、第2のpMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子対細胞の比で接触させるステップと；

（c）第1の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を、

（i）複数のベッセルのうちの第1のベッセル中のpMHC-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、および

（ii）前記第1のベッセル中の第1のT細胞集団の単一のT細胞に由来する第1のTCRポリヌクレオチドに付着させるステップと；

（d）第2の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を、

（i）前記複数のベッセルのうちの第2のベッセル中のpMHC-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、および

（ii）前記第2のベッセル中の第2のT細胞集団の単一のT細胞に由来する第2のTCRポリヌクレオチドに付着させるステップと；

（e）前記第1のベッセル中の前記pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記第1のTCRポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報の第1のセットを生成するステップと；

（f）前記第2のベッセル中の前記pMHC-オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記第2のTCRポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって配列情報の第2のセットを生成するステップと；

（g）配列情報の前記第1のセットに基づいて、前記pMHC-オリゴヌクレオチドコ

ンジュゲートへの前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる T C R の第 1 の結合シグナルを決定するステップ、および配列情報の前記第 2 のセットに基づいて、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートへの前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる T C R の第 2 の結合シグナルを決定するステップと  
を含み、前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドおよび前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドが、同じ T C R をコードする、方法。

( 項目 7 )

前記配列情報に基づいて、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートへの前記 T C R ポリヌクレオチドによってコードされる T C R の結合親和性を決定するステップをさらに含む、項目 1 または 3 に記載の方法。

( 項目 8 )

前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドおよび前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる同じ T C R の結合親和性を、前記第 1 の結合シグナルおよび前記第 2 の結合シグナルに基づいて決定するステップをさらに含む、項目 6 に記載の方法。

( 項目 9 )

前記第 1 および第 2 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、同じペプチドを含む、項目 6 に記載の方法。

( 項目 1 0 )

前記第 1 および第 2 の複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の M H C が、同じサブタイプである、項目 6 または 9 に記載の方法。

( 項目 1 1 )

T 細胞受容体 ( T C R ) を選択する方法であって、

( a ) 複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子を複数の T 細胞と接触させるステップと；

( b )

( i ) 第 1 の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を、複数のベッセルのうちの第 1 のベッセル中の p M H C - 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付着させ、

( i i ) 前記第 1 のベッセル中の T 細胞集団の第 1 の単一の T 細胞に由来する第 1 の T C R ポリヌクレオチドを付着させ；

( i i i ) 第 2 の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を、前記複数のベッセルのうちの第 2 のベッセル中の p M H C - 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付着させ、

( i v ) 前記第 2 のベッセル中の T 細胞集団の第 2 の単一の T 細胞に由来する T C R ポリヌクレオチドを付着させるステップと；

( c )

( i ) 前記第 1 のベッセル中の前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって、T C R ポリヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りおよびオリゴヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りを含む配列情報の第 1 のセットを生成し；

( i i ) 前記第 2 のベッセル中の前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の前記オリゴヌクレオチド部分またはその相補体および第 2 の T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を配列決定し、それによって、T C R ポリヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りおよびオリゴヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りを含む配列情報の第 2 のセットを生成するステップと；

( d ) 前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の結合親和性と前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の結合親和性とを比較するステップであって、前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の前記結合親和性が、配列情報の前記第 1 のセットに基づいて決定され、前記

第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R の前記結合親和性が、配列情報の前記第 2 のセットに基づいて決定される、ステップと；

( e ) 前記比較するステップに基づいて前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R を選択するステップであって、前記第 1 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる選択された前記 T C R が、前記第 2 の T C R ポリヌクレオチドによってコードされる前記 T C R より強力な結合親和性を有する、ステップと

を含む方法。

( 項目 1 2 )

前記第 1 の単一の T 細胞が、疾患または状態に罹患している患者に由来する、項目 1 1 に記載の方法。

( 項目 1 3 )

前記第 2 の単一の T 細胞が、前記疾患または状態に罹患していない患者に由来する、項目 1 2 に記載の方法。

( 項目 1 4 )

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、検出部分を含む、項目 1 または 6 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 5 )

富化させた T 細胞集団を得るステップが、前記検出部分の検出に基づく、項目 1 4 に記載の方法。

( 項目 1 6 )

前記検出部分が、フルオロフォアを含む、項目 1 4 または 1 5 に記載の方法。

( 項目 1 7 )

前記第 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相補体のベッセルバーコード配列が、複数の前記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異なる、項目 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 8 )

前記配列情報が、T C R ポリヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りおよびオリゴヌクレオチドベッセルバーコード配列読み取りを含む、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 9 )

前記接触させるステップの後に、前記接触させるステップの後の前記複数の T 細胞中の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合した T 細胞の百分率よりも高い百分率の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に結合した T 細胞を含む富化させた T 細胞集団を得るステップをさらに含む、項目 1 または 6 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 0 )

前記単一の細胞に結合した p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の数を決定するステップをさらに含む、項目 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 1 )

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記オリゴヌクレオチド部分が、前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の単一の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子に固有な四量体分子バーコード ( T M B ) 配列を含む、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 2 )

前記配列情報が、四量体分子バーコード配列読み取りを含む、項目 2 1 に記載の方法。

( 項目 2 3 )

前記単一の T 細胞に結合した p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の数が、前記配列情報から決定される、項目 2 1 または 2 2 に記載の方法。

( 項目 2 4 )

前記単一の T 細胞に結合した p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の数が、前記四量体分子バーコード配列読み取りから決定される、項目 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 5 )

前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子の各 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート分子が、固有の T M B 配列を含む、項目 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 6 )

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの p M H C 部分が、p M H C の多量体、任意選択で p M H C の四量体を含む、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 M H C が、可溶形態である、項目 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 8 )

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記 p M H C 部分のペプチドが、合成ペプチドを含む、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 p M H C 部分が、前記単一の T 細胞の T 細胞受容体 ( T C R ) に結合する、項目 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 0 )

前記オリゴヌクレオチド部分が、四量体同定配列 ( T I D ) を含む、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 T I D が、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの前記ペプチドまたは前記 p M H C 部分にバーコード化される、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 2 )

前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記ベッセル中の鋳型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドに由来する、項目 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 3 )

前記配列情報に基づいて、前記ベッセル中の前記単一の T 細胞の特徴を決定するステップをさらに含む、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 4 )

前記配列情報が、前記四量体同定 ( T I D ) 配列またはその相補体を含み、および / または前記 T I D 配列を有する分子のコピー数を含む、項目 3 3 に記載の方法。

( 項目 3 5 )

前記接触させるステップの後に前記複数の T 細胞を洗浄するステップをさらに含む、項目 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 6 )

前記ベッセル中の前記単一の T 細胞を単離するステップをさらに含む、項目 1 または 6 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 7 )

前記単一の T 細胞が、単離するステップの前に前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートに結合している、項目 3 6 に記載の方法。

( 項目 3 8 )

前記単一の T 細胞を溶解するステップをさらに含む、項目 1 から 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 9 )

前記溶解するステップが、前記単一の T 細胞が前記ベッセル中で単離された後である、項目 3 8 に記載の方法。

( 項目 4 0 )

前記複数の T 細胞が、複数のソーティングされていない T 細胞である、項目 1 から 3 9

のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

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相補体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相補体の前記ベッセルバーコード配列と異なる、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相補体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 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

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またはその相補体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またはその相補体の前記ベッセルバーコード配列に固有である、項目 1 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

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部分に付着させる前記ステップ、およびベッセルバーコード化ポリヌクレオチドを前記単一の T 細胞に由来する T C R ポリヌクレオチドに付着させる前記ステップが、同時に実行される、項目 1 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記オリゴヌクレオチドまたはその相補体を増幅するステップをさらに含む、項目 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記 T C R 細胞ポリヌクレオチドまたはその相補体を増幅するステップをさらに含む、項目 1 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記オリゴヌクレオチドまたはその相補体を増幅するステップおよび前記 T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体を増幅するステップが、同時に実行される、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

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および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が、同じである、項目 4 4 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記複数のベッセルのうちの 2 またはそれより多くのベッセルから、オリゴヌクレオチド、その増幅産物またはその相補体をプールのステップをさらに含む、項目 1 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記複数のベッセルのうちの 2 またはそれより多くのベッセルから、オリゴヌクレオチド、その増幅産物またはその相補体、および T C R ポリヌクレオチドまたはその相補体をプールのステップをさらに含む、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記プールのステップが、配列決定するステップの前である、項目 4 9 または 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、複数の異なる p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む、項目 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記複数の p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートの各 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、固有の四量体同定 ( T I D ) 配列を含む、項目 5 2 に記載の方法。

( 項目 5 4 )

前記オリゴヌクレオチドが、融合配列を含み、前記付着させるステップが、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 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 5 )

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 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 6 )

前記オリゴヌクレオチドが、定常配列を含む、項目 1 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 7 )

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ステップをさらに含む、項目 1 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 8 )

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの四量体同定 ( T I D ) 配列を分析するステップをさらに含む、項目 1 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 9 )

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りの四量体分子バーコード ( T M B ) 配列を分析するステップをさらに含む、項目 1 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 0 )

前記分析するステップが、1つまたは複数のベッセルバーコード配列、1つまたは複数の T I D 配列、1つまたは複数の四量体分子バーコード ( T M B ) 配列、またはその組合せの頻度を決定することを含む、項目 5 9 に記載の方法。

( 項目 6 1 )

前記分析するステップが、比較することを含む、項目 5 9 または 6 0 に記載の方法。

( 項目 6 2 )

オリゴヌクレオチド配列読み取りの四量体同定 ( T I D ) 配列を、オリゴヌクレオチド配列読み取りの四量体分子バーコード ( T M B ) 配列と比較するステップをさらに含む、項目 5 7 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 3 )

前記 T C R ポリヌクレオチド、その相補体、その増幅産物、またはその組合せを配列決定し、それによって T C R ポリヌクレオチド配列読み取りを産生するステップをさらに含む、項目 4 4 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 4 )

オリゴヌクレオチド配列読み取りを前記 T C R ポリヌクレオチド配列読み取りと比較するステップをさらに含む、項目 6 3 に記載の方法。

( 項目 6 5 )

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 T C R 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ステップをさらに含む、項目 6 3 または 6 4 に記載の方法。

( 項目 6 6 )

前記 T C R ポリヌクレオチド配列読み取りを比較するステップをさらに含む、項目 6 3 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 7 )

前記 T C R 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ステップをさらに含む、項目 6 3 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 8 )

前記 T C R 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ステップをさらに含む、項目 6 3 から 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 6 9 )

前記分析するステップまたは前記比較するステップに基づいて細胞の特徴を決定するステップをさらに含む、項目 6 3 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 0 )

前記オリゴヌクレオチド配列読み取りに基づいて T C R を選択するステップをさらに含む、項目 5 7 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 1 )

前記 T C R ポリヌクレオチド配列読み取りに基づいて T C R を選択するステップをさらに含む、項目 6 3 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 2 )

前記オリゴヌクレオチドに付着された前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチド、および前記 T C R ポリヌクレオチドに付着された前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記ベッセル中の同じ鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドに由来する、項目 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 3 )

前記オリゴヌクレオチドに付着された前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの増幅産物である、項目 1 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 4 )

前記 T C R ポリヌクレオチドに付着された前記ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドの増幅産物である、項目 7 2 または 7 3 に記載の方法。

( 項目 7 5 )

前記ベッセルが、固体支持体を含む、項目 1 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 6 )

前記ベッセルが、固体支持体を含まない、項目 1 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 7 )

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 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 8 )

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 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 9 )

前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合されていない、項目 1 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 0 )

前記鑄型ベッセルバーコード化ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合されている、項目 1 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 1 )

複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドのうち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 T C R ポリヌクレオチドに付着させるステップであって、前記分子バーコード配列が、単一の T C R ポリヌクレオチド分子およびその増幅産物にバーコード化される、ステップをさらに含む、項目 1 から 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 2 )

前記付着させるステップが、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 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 3 )

前記付着させるステップが、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を、酵素によって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 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 4 )

前記付着させるステップが、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 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 5 )

前記付着させるステップが、前記オリゴヌクレオチドを伸長させるステップをさらに含む、項目 8 4 に記載の方法。

( 項目 8 6 )

前記付着させるステップが、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、項目 1 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 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。

( 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、DNA 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、RNA 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 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 )

可変領域配列を含有するネイティブの T C R 鎖配列を対合させるステップをさらに含む、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 T C R ポリヌクレオチドが、DNA である、項目 1 から 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 9 4 )

前記 T C R ポリヌクレオチドが、RNA である、項目 1 から 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 9 5 )

前記 RNA が、mRNA である、項目 9 4 に記載の方法。

( 項目 9 6 )

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 T 細胞を含む試料に由来する単一の T 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 T 細胞の T C R に結合する p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートをさらに含む、組成物。

( 項目 9 7 )

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 T 細胞を含む試料に由来する単一の溶解 T 細胞、および

( b ) 前記単一の溶解 T 細胞の T C R に結合する p M H C 部分を含む p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲート

を含み、前記 p M H C - オリゴヌクレオチドコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分が、ベッセルバーコード配列を含み、前記単一の溶解 T 細胞に由来する T C R 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。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0436

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0436】

( 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 C D 4 および C D 8 の m R N A 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、C D 4 サブタイプまたは C D 8 サブタイプのいずれかであると予想される。C D 4 サブタイプは、C D 4 m R N A および C D 4 タンパク質を共に発現するはずであるが、C D 8 m R N A または C D 8 タンパク質のいずれかを発現するはずである。C D 8 サブタイプは、C D 8 m R N A および C D 8 タンパク質を共に発現するはずであるが、C D 4 m R N A または C D 4 タンパク質のいずれかを発現するはずである。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0441

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0441】

( 実施例 3 )

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

最初に、本技術を開発し、対合能力およびスループットを、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 6 A )。エマルジョン破壊および追加のライブラリー処理ステップを行った後、Illumina MiSeq を用いて、ペアエンド 325 + 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 m R N A 分子から P C R 複製読み取りを収集し、各 m R N A 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 m R N A 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' U T R、完全 V ( D ) J 配列、およびアイソタイプ決定に十分な定常領域を含む全長産物を生成した。IMGT High-VQuest および / または IgBLAST を用いて、再配置された免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に注釈を付けた。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0442

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0442】

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 $V_H$ クローン系列が存在していた。この生セットは、複数細胞ならびに単一細胞液滴に由来するデータを含むため、非一致の重鎖または軽鎖 $V(D)J$ 配列に関連した液滴バーコードをフィルタリングして取り除くことにより、単一細胞液滴に由来するデータを濃縮した（図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 $V_H V_L$ 液滴バーコードを含み、182,745個の $V_H$ のクローン系列を含有していた。これは、現在までで最も高深度の対合した免疫レパートリーのサンプリングであることをほぼ間違いなく示す。クローン的に関連する細胞は、それらの $V_H V_L$ 対合が一貫しているはずであるため、クローン拡大の発生を識別することにより、 $V_H V_L$ 対合の精度を直接的に評価した。1つよりも多くのエマルジョン画分で、クローン的に拡大した細胞であることが高い信頼性で観察された2,604個の $V_H$ クローンが識別された。これら $V_H$ クローンと対合した $V_L$ 配列は、画分間の一貫性が非常に高く、96.1%の対合精度を示した。これにより、259,368個の $V_H V_L$ ペアのフィルタリングされたデータセット全体に高い信頼性が与えられた。交差画分 $V_H$ および $V_L$ 配列は、各画分にて異なる液滴および分子バーコードと関連することが常であり、したがってライブラリー交差汚染を示さなかった。一部のB細胞は複数の軽鎖を発現することが公知であるため、分析は、対合精度を過小評価する場合がある。259,368個のフィルタリングされた $V_H V_L$ 液滴バーコードまたは「 $V_H V_L$ ペア」の75.0%は、IgMおよび/またはIgDを含有していた（図6C）。これは、未感作ナイーブB細胞は典型的にはIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>表現型であることを考慮すると、予想通り一緒に観察されることが多かった。より少ないがかなりの割合のIgA（18.3%）およびIgG（6.6%） $V_H V_L$ ペアも見出された。 $V_H$ アイソタイプは全て、約3:2の比率でIgまたはIgのいずれかと対合した。182,745個の $V_H$ クローン系列中のクローン拡大を2つの方法でアセスメントした：クローンに関連する液滴バーコードの数；およびエマルジョン画分にわたるそのクローンの観察。複数の液滴バーコードでクローンが見られることは、クローン拡大を反映する場合もあり、または複数バーコード液滴を反映する場合もある。初期 = 1であったこと、つまり液滴内へのバーコードの分散がポアソン分散であったことを考慮すると、液滴の約37%で複数バーコード液滴が予想された。しかしながら、>8つの液滴バーコードにより表わされるクローンは全て、間違いなく拡大性である可能性が高い（単一液滴中のポアソン確率は、 $<10^{-6}$ ）。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、非増殖クローンの龐大なバックグラウンドの中から、希少な拡大系列を検出することが可能になる。しかしながら、最も多量の拡大したクローンでさえ、1000個に1個未満の細胞にしか存在していなかったことは注目すべきことであり、ヒト末梢免疫レパートリーの多様性が非常に高いことを例示している。

## 【手続補正6】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0443

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0443】

発現レベルの推定としての、ペア内の各  $V_H$  および  $V_L$  鎖の捕捉 mRNA の数 (図 6 E)。概して、1 液滴バーコード当たり 10 個未満の重鎖 (平均 2.0) および軽鎖 (平均 4.0) mRNA が捕捉され、1 細胞当たり、数ダース～数百個の捕捉重鎖および軽鎖 mRNA を有する液滴バーコードの小集団が、ほとんど排他的に Ig G および Ig A 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、Ig G の場合は、 $V_H$  対  $V_L$ ) 内、およびアイソタイプ間 (例えば、Ig G 対 Ig M) の両方で、強い相関性を示した (図 6 F)。さらに、Ig G および Ig A 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、Ig M および Ig D 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、Ig M および Ig D から Ig G または Ig A へのクラススイッチ、免疫グロブリン発現の増加、ならびに細胞の重鎖および軽鎖遺伝子座の両方に影響を及ぼす体細胞超変異に至る。高度に突然変異を起こした  $V_H$  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 細胞レパトリーに由来する多数の全長のネイティブに対合した BCR を生成することが可能である。

## 【手続補正 7】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0444

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0444】

## (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 7 A) または典型的な健常末梢 B 細胞レパトリーよりも高い割合の Ig G 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、全ての既知の新らたに生成された PGT121 様  $V_H V_L$  ペアの系統樹 (図 7 B) 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ーションペアは、このルールに良好に当てはまる。興味深いことには、2 つの発表されている抗体 PGT122 および PGT123 は、例外であると考えられ、これら 2 つの対合を支持するものは見出されなかったが、その代わりに、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 Ig G として発現させ、複数の HIV 擬似系統を中和する能力を試験した (図 7 C)。抗体は良好に発現され、全てがウイルスに対する強力な中和活性を示し、関連す

る生物学的試料からネイティブに対合した機能性抗体バリエーションを迅速に生成する本発明者らの手法の有用性が実証された。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0445

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0445】

(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巢腺癌試料を得、400,000 個のソーティングされていない細胞をエマルジョンに入れた。別々の等量の試料を CD3 / CD19 染色することにより、かなりの数の浸潤性 B (約 5%) および T 細胞 (約 20%) が物質中に存在することが示唆された。エマルジョン中の単一細胞分散系は、いくつかの限定的な塊が視認されたとはいえ、精製細胞と類似しており、試料の細胞タイプが不均質であったことを考慮すると予想通りに液滴内の細胞サイズおよび形状に広範なばらつきがあった (図 8A)。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0446

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0446】

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ェ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 ( $V_H$ 、 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $V_L$ ) のあらゆる考え得る組合せを計数した (図 8B)。1 つよりも多くの標的鎖を有する液滴バーコードの大部分 (97.9%) は、生物学的に予想される BCR  $V_H + V_L$  または TCR  $V_H + V_L$  の対合を含有し、混合 BCR - TCR 組合せは 2.1% しか含有されていなかった。産物のバーコード付与は、標的鎖に関して偏りがないため、この結果は、得られた 6,056 個の BCR  $V_H V_L$  および 5,217 個の TCR  $V_H V_L$  ペアの信頼性を高度化することが可能である。BCR では、他のアイソタイプと比較して、IgG (>80%) が著しく優勢であったが (図 8C)、全てが存在した (IgE < 0.05% のみ) ことが示された。カッパおよびラムダ軽鎖は、末梢血データセットと同様の比率で存在した。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0447

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0447】

末梢血と同様に、BCR アイソタイプと  $V_H$  および  $V_L$  鎖の両方の突然変異レベルとの間に相関性が観察され、IgG および IgA ペアは、IgD および IgM よりも大きな  $V_H$  および  $V_L$  突然変異、ならびに各アイソタイプ内での  $V_H$  および  $V_L$  間の突然変異の一般的相関性を示した (図 8D)。興味深いことには、IgD、IgM、および IgA ペア

は、腫瘍と末梢血データセットとの間で非常に類似した突然変異分布を示した。また、腫瘍 I g G 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 C R の場合、および I g D を含有する B C R の場合、1 液滴バーコード当たり、末梢血の B C R 結果と同様の数の捕捉 m R N A が観察された (図 8 E、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 I g M、I g A、および I g G 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 m R N A が捕捉された。その後、捕捉 T I L - T C R および B C R レパートリーの多様性をアセスメントした (図 8 F)。5, 217 個の合計 T C R ペアの中で、2, 423 個の異なる T C R ベータクローンが観察された。7 つのクローンが、> 1 % の頻度で存在し、上位クローンは、全ての液滴バーコードの 16.9 % に相当した。6, 056 個の合計 B C R ペア中で、1, 518 個の異なる重鎖クローンが観察され、15 個のクローンが > 1 % の頻度であったが、> 5 % の頻度のものはなかった。これは、多様性が、健常末梢 B C R レパートリーよりも実質的により制限されていることを表わしているが (0.06 % を超える頻度で存在するクローンはなかった)、クラス転換し、突然変異を起こし、高度に発現されたクローンは、腫瘍試料中に非常に多く存在することは、T I L 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 I L 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 I L 免疫受容体ペアを迅速に回収することを可能にする。

#### 【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0448

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0448】

(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、C D 4<sup>+</sup> および C D 8<sup>+</sup> 集団に入る健常 T 細胞を、磁気ビーズ濃縮により分離し、各タイプの 20,000 個の細胞を別々のエマルジョンに入れ、T C R 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 C D 4 および C D 8 の m R N A を用いて実験を行った。配列決定後、C D 4<sup>+</sup> 単離細胞に由来する T C R V および V (「T C R ペア」) を含有する 3,861 個の液滴バーコードの 47.0 % は、C D 4 m R N A に関連していたが、C D 8 m R N A に関連したものは 0.3 % に過ぎなかった。反対に、C D 8<sup>+</sup> 単離細胞に由来する 2,235 個の T C R ペアの 50.6 % が、C D 8 m R N A にリンクしていたが、C D 4 m R N A 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 m R N A 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 m R N A 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 C D 4 および C D 8 抗体にコンジュゲートし、標識抗体を、30,000 個の細胞をエマルジョンに入力する前に、C D 4<sup>+</sup> および C D 8<sup>+</sup> T 細胞の未分離混合物と共にインキュベートした (図 3 A)。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、m R N A 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 T C R、C D 4、および C D 8 m R N A 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 T C R 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CTLA-4等の拡大された免疫腫瘍学的関連マーカーセットを用いて、この手法をTILに応用することは、保証されている。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0466

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0466】

標的特異的CD8+T細胞および非特異的CD8+T細胞対照集団を、蛍光標識標準MHC-ペプチド四量体または様々な漸減濃度の蛍光標識四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートのいずれかと共にインキュベートした。インキュベーションの後、標準のMHC-ペプチド四量体または四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートに陽性染色した細胞の存在は、フローサイトメトリーによって同定した。非特異的CD8+T細胞と共にインキュベートした標準のMHC-ペプチド四量体および四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの両方は、陽性染色をほとんど示さなかったか全く示さなかった(図20、上列フローサイトメトリープロット)。標的特異的CD8+T細胞と共にインキュベートした標準のMHC-ペプチド四量体は、強力な二重陽性MHC-ペプチド四量体+CD8+細胞集団を示した(図20、下列、左のフローサイトメトリープロット)。標的特異的CD8+T細胞と共にインキュベートした四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、強力な二重陽性四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート+CD8+細胞集団を示し、この二重陽性集団は、四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート濃度の低下に伴って減少した(図20、下列、右の3つのフローサイトメトリープロット)。これは、四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートが標準のMHC-ペプチド四量体と同様に標的特異的T細胞に結合したこと、および、標的特異的T細胞に結合している四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、四量体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの濃度に依存性であったことを示した。