(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6431895号
(P6431895)
(45)発行日　平成30年12月5日(2018.12.5)　(24)登録日　平成30年11月9日(2018.11.9)

(51)Int.Cl.　　F I
C12Q 1/6855 (2018.01)　C12Q 1/6855 ZNAZ
C12N 15/12 (2006.01)　C12N 15/12
C12N 15/13 (2006.01)　C12N 15/13

請求項の数 14　(全 110 頁)

(21)出願番号　特願2016-502574 (P2016-502574)
(86)(22)出願日　平成26年3月17日 (2014.3.17)
(65)公表番号　特表2016-512685 (P2016-512685A)
(43)公表日　平成28年5月9日 (2016.5.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/030859
(87)国際公開番号　WO2014/145992
(87)国際公開日　平成26年9月18日 (2014.9.18)
審査請求日　平成29年3月10日 (2017.3.10)
(31)優先権主張番号　61/789,408
(32)優先日　平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2013/045994
(32)優先日　平成25年6月14日 (2013.6.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　514278577
アダプティブ　バイオテクノロジーズ　コーポレイション
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０２，シアトル，スイート　２００，１５５　１　イーストレイク　アベニュー　イースト
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田　直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀　明代
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋　香元

最終頁に続く

(54)【発明の名称】複合遺伝子セットにおいてユニークにタグ付けされた再構成された適応免疫受容体遺伝子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
サンプル中の単一のリンパ系細胞に由来する適応免疫受容体（ＡＩＲ）ヘテロ二量体を形成する第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとを含む複数の同族の適応免疫受容体（ＡＩＲ）の対を同定する方法であって、前記サンプルが、哺乳動物対象に由来する複数のリンパ系細胞を含み、前記方法が、
（Ａ）各容器が複数のリンパ系細胞を含むように複数のリンパ系細胞を複数の容器に分配する工程と、
（Ｂ）前記容器のそれぞれにおいて前記複数のリンパ系細胞に由来するｍＲＮＡ分子をｃＤＮＡ分子に逆転写する工程と、
（Ｃ）ｃＤＮＡ分子の多重ＰＣＲを実施することにより、前記複数の容器において複数のアンプリコンを生成させる工程であって、前記多重ＰＣＲが実質的に全てのＶ遺伝子および／またはＪ遺伝子を増幅し、前記アンプリコンのライブラリが、
（ｉ）（ａ）ユニークな可変（Ｖ）領域コード配列、ユニークなＪ領域コード配列、又はユニークなＪ領域コード配列とユニークなＣ領域コード配列の両方、ならびに（ｂ）ユニバーサルアダプター、を含む第１のＡＩＲ配列をコードする複数の第１のＡＩＲアンプリコンと、
（ｉｉ）（ａ）ユニークなＶ領域コード配列、ユニークなＪ領域コード配列、又はユニークなＪ領域コード配列とユニークなＣ領域コード配列の両方、ならびに（ｂ）ユニバーサルアダプター、を含む第２のＡＩＲ配列をコードする複数の第２のＡＩＲアンプリコ

ンと、
を含む、工程と、
（Ｄ）工程（Ｃ）で得られた前記複数のアンプリコンを第２のＰＣＲ反応において増幅して第２の複数のアンプリコンを生成させる工程であって、前記第２のＰＣＲ反応が、工程（Ｃ）で加えられた前記ユニバーサルアダプターに特異的なプライマーを使用し、前記第２のＰＣＲ反応の前記プライマーが（ａ）前記容器を識別できる少なくとも１種のバーコード、（ｂ）生じたアンプリコンの実質的にそれぞれが、固有のランダムなヌクレオチド配列を有するような、少なくとも１種のランダムなヌクレオチド配列、および（ｃ）シークエンシングプラットホーム特異的アダプター、を含む、工程と、
（Ｅ）工程（Ｄ）で生成された前記第２の複数のアンプリコンのハイスループットシークエンシングを行って、複数の第１のＡＩＲ配列及び第２のＡＩＲ配列のデータセットを得る工程と、
（Ｆ）工程（Ｄ）で加えられた前記バーコード配列に基づいて、特定の容器に、それぞれの第１のＡＩＲアンプリコン配列およびそれぞれの第２のＡＩＲアンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれの第１のＡＩＲ配列およびそれぞれの第２のＡＩＲ配列についての容器占有パターンを決定する工程と、
（Ｇ）推定のＡＩＲ同族対を形成する可能性がある第１及び第２のＡＩＲ配列の可能な対形成のそれぞれに関して、前記第１のＡＩＲ配列及び第２のＡＩＲ配列がリンパ系細胞の同じクローン集団に由来しないことを考慮して、前記第１及び第２のＡＩＲ配列間での容器共有割合を観察する統計学的確率、又は、偶然予想されるより大きい容器共有割合を観察する統計学的確率、を算出する工程と、
（Ｈ）（１）所定の尤度カットオフ値より低いスコアを有する前記統計学的確率に基づき、複数の推定の第１のＡＩＲ配列と第２のＡＩＲ配列との対を特定する工程、または（２）同定された推定の第１のＡＩＲ配列と第２のＡＩＲ配列との対ごとに、前記第１のＡＩＲ配列と前記第２のＡＩＲ配列との可能な間違った対形成に関して、偽発見率の推定値を決定する工程、を実施する工程と、
（Ｉ）前記統計学的確率または前記偽発見率の推定値に基づき、第１のＡＩＲ配列と第２のＡＩＲ配列との複数の同族対を、前記ＡＩＲヘテロ二量体をコードする真の同族対として同定する工程と、
を含む、方法。
【請求項２】
前記複数の容器が、マルチウェルプレートのウェルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
工程（Ｂ）の各容器が、同一の固有のバーコードを有するプライマーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
工程（Ｂ）におけるＲＮＡのｃＤＮＡへの逆転写が、ユニバーサルアダプターの組み込みを導くプライマーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
工程（Ｃ）の前記多重ＰＣＲが、前記ユニバーサルアダプターに特異的にハイブリダイズするプライマーを利用する、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
工程（Ｄ）の前記第２のＰＣＲ反応の前記プライマーが、さらなるバーコード、少なくとも５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドスペーサー、および／またはシークエンシングオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記第１のポリペプチドがＴＣＲαポリペプチドを含み且つ前記第２のポリペプチドがＴＣＲβポリペプチドを含むか、前記第１のポリペプチドがＴＣＲγポリペプチドを含み且つ前記第２のポリペプチドがＴＣＲδポリペプチドを含むか、前記第１のポリペプチドがＩｇＨポリペプチドを含み且つ前記第２のポリペプチドがＩｇλポリペプチドを含むか

、前記第１のポリペプチドがＩｇＨポリペプチドを含み且つ前記第２のポリペプチドがＩｇκポリペプチドを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記サンプルが血液サンプルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記サンプルが組織サンプルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記サンプルが、精製または培養されたヒトリンパ系細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
それぞれの容器が少なくとも$10^4$個のリンパ系細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記統計学的確率を算出する工程が、それぞれ推定の第１のＡＩＲ配列と第２のＡＩＲ配列との対形成についてのｐ値を決定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
偽発見率の推定値の決定が、
（ａ）前記サンプルにおいて同定される前記複数の第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列のそれぞれの可能な対形成についてｐ値を算出する工程と、
（ｂ）第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列の前記可能な対形成の全てについての前記ｐ値を、予想されるｐ値分布と比較する工程であって、前記予想されるｐ値分布が、第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列の真の対が存在しない実験を表すものとして算出される、工程と、
（ｃ）第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列の推定の対ごとに、第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列の前記推定の対のｐ値と同じ若しくはそれ以下の全てのｐ値が、真の同族対形成を表すものとして決定されるように、予想される偽陽性結果の割合を決定する工程と、
を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記予想されるｐ値分布の算出が、
第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列の真の対がないがそれ以外は同一である実験において第１のＡＩＲ配列および第２のＡＩＲ配列がそれぞれ観察されている前記容器の順序を変える工程と、
それぞれの推定のＡＩＲの対に関連するｐ値の前記分布を算出する工程と、
を含む、請求項１３に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願）
本願は、２０１３年３月１５日に出願の米国仮出願番号第６１／７８９，４０８号と、２０１３年６月１４日に出願のＰＣＴ国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０４５９９４号の恩典を主張し、また両出願の全内容を参照により本願に援用する。
【０００２】
（配列表）
本願はＥＦＳ－Ｗｅｂによって提出された配列表を含み、その全内容を参照により本願に援用する。２００４年３月１３日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーを、「２６３７１ＰＣＴ＿ＣＲＦ＿ｓｅｑｕｅｎｃｅｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ」と名前を付けた。サイズは４，３８２，７０２バイトである。
【０００３】
（発明の分野）

本発明の開示は、一般に、多重核酸増幅反応における適応免疫受容体コードＤＮＡ又はＲＮＡ（例えば、Ｔ細胞受容体及び免疫グロブリンコードＤＮＡ又はＲＮＡ）の定量的ハイスループットシークエンシングに供することに関する。具体的には、本明細書に記載される組成物及び方法は、適応免疫受容体ヘテロ二量体の両方の鎖をコードするＤＮＡ配列の、単一の細胞における定量的シークエンシングを可能にする。また、適応免疫受容体コード配列の定量化において、多重ＤＮＡ増幅において特異的オリゴヌクレオチドプライマーの偏った過剰利用及び／又は過少利用から生じうる好ましくないゆがみを克服する態様が、本明細書において開示される。

【背景技術】

【０００４】

適応免疫系は、幾つかのストラテジーを使用して、多数の潜在的病原体を認識するために十分な多様性を有する、Ｔ細胞及びＢ細胞抗原受容体（すなわち適応免疫受容体）のレパートリーを生成する。様々なガン又は感染性微生物に関連する多数の抗原を認識するＴ細胞の能力は、そのＴ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）によって与えられる。それは、ＴＣＲＡ座由来のα（アルファ）鎖とＴＣＲＢ座由来のβ（ベータ）鎖とのヘテロ二量体であるか、又は、ＴＣＲＧ座由来のγ（ガンマ）鎖とＴＣＲＤ座由来のδ（デルタ）鎖とのヘテロ二量体である。これらの鎖を作るタンパク質はＤＮＡによりコードされ、それはリンパ系細胞において、ＴＣＲの相当な多様性を生じさせるために、独特の再構成メカニズムを用いる。このマルチサブユニット免疫認識受容体は、ＣＤ３複合体と会合して、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面で、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩ及びＩＩタンパク質により提示されるペプチドと結合する。ＡＰＣの抗原性ペプチドに対するＴＣＲの結合は、Ｔ細胞活性化の中心事象であり、それはＴ細胞とＡＰＣとの接触部位である免疫学的接合部で起こる。

【０００５】

それぞれのＴＣＲペプチドは、可変的な相補性決定領域（ＣＤＲ）と、フレームワーク領域（ＦＲｓ）と、定常部と、を含む。αβ　Ｔ細胞の配列の多様性は主に、α及びβ鎖の可変ドメイン中の第３の相補性決定領域（ＣＤＲ３）のループのアミノ酸配列により決定され、その多様性は、それぞれ、β鎖遺伝子座の可変性（variable）（$V_{\beta}$）、多様性（diversity）（$D_{\beta}$）及び連結（joining）（$J_{\beta}$）遺伝子セグメント間と、α鎖遺伝子座の類似する$V_{\alpha}$及び$J_{\alpha}$遺伝子セグメント間と、の組み換えの結果である。ＴＣＲのα及びβ鎖遺伝子座のそのような多数の遺伝子セグメントの存在により、膨大な数の全く別個のＣＤＲ３配列がコードされることが可能となる。ＣＤＲ３配列の多様性は、ＴＣＲ遺伝子再構成プロセスの間における、$V_{\beta}$－$D_{\beta}$、$D_{\beta}$－$J_{\beta}$、及び$V_{\alpha}$－$J_{\alpha}$結合部でのヌクレオチドの独立した付加及び欠失により更に増加する。この点で、免疫適格性は、ＴＣＲの多様性に反映されている。

【０００６】

γδ　ＴＣＲは、それが生来の免疫系と密接に相互作用する受容体をコードし、非ＨＬＡ依存的に抗原を認識するという点で、αβ　ＴＣＲとは別個のものである。ＴＣＲγδは、発生の初期に発現され、特殊な解剖学的分布、ユニークな病原及び小分子特異性を有し、並びに広いスペクトルの生来的かつ適応的な細胞相互特性を有する。ＴＣＲγのＶ及びＪセグメントの偏った発現パターンは、個体発生の初期に確立される。したがって、成人の組織における多様なＴＣＲγのレパートリーは、環境中での病原体及び毒性分子への暴露による刺激の後に、末梢で広範囲に拡大した結果である。

【０００７】

Ｂ細胞により発現される免疫グロブリン（ＩｇｓまたはＩＧＧ）（本発明ではＢ細胞受容体（ＢＣＲ）と称する）は、４つのポリペプチド鎖（ＩＧＨ座からの２つの重鎖（Ｈ鎖）及びＩＧＫ（カッパ）若しくはＩＧＬ（ラムダ）部位からの２つの軽鎖（Ｌ鎖））からなるタンパク質であり、$H_2L_2$構造を形成する。Ｈ及びＬ鎖は共に、抗原認識に関係する相補性決定領域（ＣＤＲ）と、定常ドメインと、を含む。ＩｇｓのＨ鎖は最初に、ＩｇＭ若しくはＩｇＤの定常部アイソフォームのいずれかを用いて、膜結合アイソフォームとし

て発現されるが、抗原認識の後、Ｈ鎖定常部はＩｇＧ、ＩｇＥ及びＩｇＡを含む幾つかの更なるアイソタイプへのクラススイッチをすることができる。ＴＣＲと同様に、個体におけるナイーブなＩｇｓの多様性は主に、超可変的な相補性決定領域（ＣＤＲ）により決定される。ＴＣＲと同様、ＩＧＨ鎖のＣＤＲ３ドメインは、ＶＨ、ＤＲ及びＪＨ遺伝子セグメントの結合の組み合わせにより構成される。超可変ドメインの配列多様性は、Ｉｇ遺伝子の再構成プロセスの間における、$V_H-D_H$、$D_H-J_H$及び$V_H-J_H$結合部におけるヌクレオチドの独立した付加及び欠失により、更に増加する。ＴＣＲとは異なり、Ｉｇ配列の多様性は、ナイーブＢ細胞が最初に抗原を認識した後、再構成されたＩｇ遺伝子全体を通じての体細胞超変異（ＳＨＭ）により増加する。ＳＨＭのプロセスは、ＣＤＲ３に制限されず、したがって、フレームワーク領域、ＣＤＲ１及びＣＤＲ２において、並びに体細胞において再構成されたＣＤＲ３において、生殖細胞系の配列に変化を導入することができる。

【０００８】

適応免疫系は、ユニークなＴＣＲ又はＢＣＲｓを発現する細胞のクローン性の増殖によって一部機能しているため、それぞれのクローンの総量の変化を正確に測定することは、適応免疫応答の動力学を理解する上で非常に重要である。例えば、健康なヒトは、２、３百万のユニークＴＣＲβ鎖を有し、それらはそれぞれ、健康な個体におけるおよそ１兆のＴ細胞中の数百～数千のクローン性Ｔ細胞に存在する。ハイスループットシークエンシングの進歩を利用し、膨大なＴＣＲ及びＢＣＲのレパートリーをプロファイリングする分子免疫学の新しい分野が、最近現れている。再構成された適応免疫受容体遺伝子配列を配列決定するための、そして、適応免疫受容体クロノタイプを決定するための組成物と方法が、例えば、Ｒｏｂｉｎｓら、２００９　Ｂｌｏｏｄ　１１４，４０９９；Ｒｏｂｉｎｓら、２０１０　Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌａｔ．Ｍｅｄ．２：４７ｒａ６４；Ｒｏｂｉｎｓら、２０１１　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｊｉｍ．２０１１．０９．００１；Ｓｈｅｒｗｏｏｄら、２０１１　Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌａｔ．Ｍｅｄ．３：９０ｒａ６１；米国特許出願第１３／２１７，１２６号（米国特許出願公開第２０１２／００５８９０２号）；米国特許出願第１２／７９４，５０７号（米国特許出願公開第２０１０／０３３０５７１号）；国際公開第２０１０／１５１４１６号；国際公開第２０１１／１０６７３８号（国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３号）；国際公開第２０１２／０２７５０３号（国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２号）；米国特許出願第６１／５５０，３１１号及び米国特許出願第６１／５６９，１１８号に記載されている（これらの全内容を参照により援用する）。

【０００９】

現在まで、適応免疫受容体をコードする核酸を、ハイスループットで定量的にシークエンシングするためにいくつかの様々なストラテジーが使用されているが、これらのストラテジーは、例えば、ＣＤＲ３コード領域の増幅に使用されるアプローチ、及びゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）又はメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の配列決定の選択により、区別され得る。

【００１０】

ｍＲＮＡのスプライシング事象により、ＪセグメントとＣセグメントの間のイントロンが除去されることから、ｍＲＮＡのシークエンシングは、ｇＤＮＡのシークエンシングよりもおそらく簡易な方法である。これにより、Ｃ領域において共通の３’側のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）用の増幅プライマーを用いた、様々なＶ領域及びＪ領域を有する適応免疫受容体（例えば、ＴＣＲ又はＩｇｓ）の増幅が可能となる。各ＴＣＲβの場合、例えば、１３のＪセグメント全てが、６０塩基対（ｂｐ）未満の長さである。したがって、スプライシング事象により、いかなるＶ及びＪの配列が用いられるかに関係なく、ＴＣＲβ定常部をコードする同一のポリヌクレオチド配列が、再構成されたＶＤＪ結合部の１００ｂｐ未満の内部に導入される。スプライシングされたｍＲＮＡは次に、ｍＲＮＡのポリＡテールと相補的なポリｄＴプライマー、ランダムなスモールプライマー（通常６量体又は９量体）又はＣセグメント特異的オリゴヌクレオチドを用いて、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮ

Ａ）に逆転写され得る。この逆転写により、偏りのないＴＣＲ　ｃＤＮＡのライブラリが得られるはずであり（全てのｃＤＮＡｓがポリｄＴ、ランダム６量体又はＣセグメント特異的オリゴのいずれであるかによらず、同じオリゴヌクレオチドによってプライミングされることから）、次にこれらをシークエンシングすると、それぞれの再構成において用いられるＶ及びＪセグメントに関する情報それぞれ、並びにＣＤＲ３の特異的な配列に関する情報が得られ得る。そのようなシークエンシングは、単一の、ＣＤＲ３に及ぶロングリード（long read）技術を用いることができるか、又はその代わりにより長い配列の多くのコピーを分画すること、及びよりハイスループットのより短い配列リードを用いることが必要となる。

【００１１】

ｍＲＮＡ配列に基づく特定の再構成されたＴＣＲ（又はＩｇ）を発現するサンプル中の細胞数を定量化する努力は、しかしながら、それぞれの細胞におけるＴＣＲ　ｍＲＮＡの発現量が異なるため、解釈が困難である。例えば、インビトロで活性化されたＴ細胞には、休止したＴ細胞と比較し、細胞あたり１０～１００倍の量のｍＲＮＡが存在する。現在まで、様々な機能的状態のＴ細胞における、ＴＣＲ　ｍＲＮＡの相対的な量に関する情報が非常に限られているため、ｍＲＮＡをまとめて定量しても、それぞれクローン性ＴＣＲを有する細胞の数を必ずしも正確に測定するわけではない。

【００１２】

一方、大部分のＴ細胞は、生産的に再構成された１つのＴＣＲα遺伝子と、生産的に再構成された１つのＴＣＲβ遺伝子（又は２つの再構成されたＴＣＲγ及びＴＣＲδ）とを有し、また大部分のＢ細胞は、生産的に再構成された１つのＩｇ重鎖遺伝子と、生産的に再構成された１つのＩｇ軽鎖遺伝子（ＩＧＫ又はＩＧＬのいずれか）を有するため、ＴＣＲ又はＢＣＲｓをコードするゲノムＤＮＡをサンプル中での定量化は、それぞれ、サンプル中のＴ細胞又はＢ細胞の数と、直接相関するはずである。適応免疫受容体鎖の任意の１つ以上をコードするポリヌクレオチドのゲノム配列決定（例えば、ヒトのＴＣＲβ鎖を代表例として用いる）は、対象のリンパ系系細胞のＤＮＡを含むサンプル中に存在する、可能な多くの再構成ＴＣＲβ鎖コードする配列の全てを等しい効率で増幅すること、その後定量的シークエンシングを行うことを必要とするうのが好ましく、それにより、それぞれのクロノタイプの相対量を得ることが可能となる。

【００１３】

しかしながら、そのようなアプローチでも、例えば、各クローンが、５４個の可能な生殖細胞系のＶ領域コード遺伝子のうちの１つと１３個の可能なＪ領域コード遺伝子のうちの１つを使用するそれぞれ再構成ＴＣＲβコードクローンの場合、等しい増幅及びシークエンシング効率が容易に得られないというそれぞれ問題が生じる。ＴＣＲβのゲノム座における、非常に多様なＶ及びＪセグメントの特異的配列は、前記でまとめたような多様性を生じさせるメカニズムにより、様々なＶ又はＪ遺伝子の使用の結果、多数の可能な再構成において大きく変動する。

【００１４】

この配列多様性により、複雑なＤＮＡサンプルが得られるが多重増幅とハイスループットシークエンシングとを同時に用いる複数の分子種の定量化能には技術的限界があることにより、その中に含まれる複数の異なる配列を正確に決定することはできない。更に、既存の方法論では、ＴＣＲ又はＩｇヘテロ二量体の両方の鎖をコードするＤＮＡ又はＲＮＡを、両方の鎖が同じリンパ系系細胞に由来するか否かを決定することができる方式で定量的にシークエンシングすることは困難である。

【００１５】

１つ以上の要因が、シークエンシングデータのアウトプットをゆがめるアーティファクトを生じる場合があり、これによってＴＣＲ又はＩｇ遺伝子テンプレートの非常に多様なコレクションの多重増幅に基づくシークエンシングのストラテジーから信頼可能な定量的データを得ることが難しくなる。これらのアーティファクトは、多重増幅工程の際の、しばしば多様なプライマーの不均等な使用から生じる。多様な増幅テンプレートを使用する

多重反応における、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのそのような偏った利用は、テンプレート及び／又はオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド塩基組成の１つ以上の違い、テンプレート及び／又はプライマー長の違い、用いる特定のポリメラーゼ、増幅反応温度（例えばアニーリング、伸長及び／又は変性温度）、並びに／又は他の要因に応じて生じ得る（例えば、Ｋａｎａｇａｗａ，２００３　Ｊ．Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｅｎｇ．９６：３１７；Ｄａｙら、１９９６　Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．５：２０３９；Ｏｇｉｎｏら、２００２　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｄｉａｇｎｏｓｔ．４：１８５；Ｂａｒｎａｒｄら、１９９８　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２５：６８４；Ａｉｒｄら、２０１１　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．１２：Ｒ１８）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１６】

明らかに、複雑なサンプルにおいて、適応免疫受容体をコードするＤＮＡ及びＲＮＡの配列多様性を、特に、歪曲された結果（例えば複雑なテンプレートＤＮＡ集団の多重増幅に用いるオリゴヌクレオチドプライマーセット中の１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーの利用の偏りに由来する、個々の配列の読み間違い又は過少な表示）を回避する方法で、並びに、同じリンパ系系細胞に由来するＴＣＲ又はＩｇヘテロ二量体の両方の鎖のコード配列を決定することができる方式で、正確に定量することができる、改善された組成物及び方法に対するニーズが存在する。本発明の具体的態様は、このニーズに応えるものであり、また他の関連する優位性を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

本発明は、適応免疫受容体ヘテロ二量体を形成する第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとを含む複数の同族対の同定方法の提供に関し、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体は、サンプル中の１つのクローンに由来するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）又は免疫グロブリン（Ｉｇ）を含み、前記サンプルは、哺乳動物対象に由来する複数のリンパ系系細胞を含み、前記方法は、複数のリンパ系細胞を複数の容器に分配する工程であって、それぞれの容器が複数のリンパ系細胞を含む工程と、前記複数のリンパ系細胞から得られるｍＲＮＡ分子から逆転写されているｃＤＮＡ分子の多重ＰＣＲを実施することにより、前記複数の容器においてアンプリコンのライブラリを生成させる工程であって、前記アンプリコンのライブラリが、ｉ）前記第１のポリペプチドをコードする複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークな可変（Ｖ）領域コード配列、ユニークなＪ領域コード配列、又はユニークなＪ領域コード配列とユニークなＣ領域コード配列の両方、少なくとも１つのバーコード配列、少なくとも１つのユニバーサルアダプター配列及びシークエンシングプラットホームタグ配列を含むアンプリコンと、ｉｉ）前記第２のポリペプチドをコードする複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード配列、ユニークなＪ領域コード配列、又はユニークなＪ領域コード配列とユニークなＣ領域コード配列の両方、少なくとも１つのバーコード配列、少なくとも１つのユニバーサルアダプター配列及びシークエンシングプラットホームタグ配列を含むアンプリコンと、を含みと、前記アンプリコンのライブラリをハイスループットシークエンシングに供し、複数の第１及び第２の適応免疫受容体のアンプリコン配列のデータセットを得る工程と、を含む。

【００１８】

前記方法は、１つ以上の容器に、それぞれのユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれのユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の容器占有パターンを決定することと、１つ以上の容器に、それぞれのユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれのユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の容器占有パターンを決定することを含み、前記ユニークな第１又は第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列のそれぞれのバーコード配列は、特定の容器と関連付けられている。前記方法はま

た、推定の同族対を形成するために、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列の可能なそれぞれの対形成のために、前記容器占有パターンを観察する統計学的確立を算出する工程、又は、前記第１及び第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列が同じクローン集団のリンパ系細胞に由来しないことを考慮して、偶然に予想されるより大きい容器共有割合観察する工程と、所定の尤度カットオフ値より低いスコアを有する前記統計学的確率に基づき、複数の推定の同族対を特定する工程と、を含む。

【００１９】

前記方法は、同定された推定の同族対ごとに、前記ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列と前記ユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の可能な間違った組合せに関して、偽発見率の推定値を決定する工程と、前記統計学的確率及び前記偽発見率推定値に基づき、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体の配列の複数の同族対を、前記サンプル中の前記適応免疫受容体をコードする真の同族対として同定する工程と、を含む。

【００２０】

幾つかの実施形態では、統計スコアは、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列のそれぞれの推定の同族対の対形成に関して算出されるｐ値を含む。一実施形態では、統計スコアの算出は、真でない同族対形成を仮定して、前記ユニークな第１の適応免疫受容体アンプリコン配列により占められる容器の数と前記ユニークな第２の適応免疫受容体アンプリコン配列により占められる容器の数を考慮して、前記ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列が、それらが共同で占めるのが観察されたのと同数又はより多くの容器を共同で占める確率を算出する工程、を含む。

【００２１】

別の実施形態では、前記統計学的確率に基づく対形成の高い尤度を有する複数の推定の同族対を同定することは、ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列ごとに、最も低いマッチングのｐ値スコアを有するユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を同定する工程、又は、ユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列ごとに、最も低いマッチングのｐ値スコアを有するユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を発見する工程、を含む。

【００２２】

他の実施形態では、偽発見率の推定値の決定は、前記サンプルで同定される前記複数の推定の同族対のそれぞれについてｐ値を算出する工程と、前記複数の推定の同族対の全てに関するｐ値と、予想されるｐ値分布とを比較する工程であって、予想される前記ｐ値分布が、真の同族対が存在しない実験を表すものとして算出される工程と、推定の同族対ごとに、前記推定の同族対のｐ値と同じ若しくはそれ未満の全てのｐ値が、真の同族対形成を表すものとして決定されるように、偽陽性結果の予想される割合を決定する工程と、を含む。

【００２３】

特定の実施形態では、前記予想されるｐ値分布の算出は、それぞれの第１及び第２の適応免疫受容体の配列が、真の同族対はないがそれ以外は同一の実験で観察されている容器の順序を変える工程と、それぞれの推定の同族対に関連するｐ値分布を算出する工程と、を含む。

【００２４】

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記偽発見率の推定値に基づいて算出される閾値未満のｐ値を有する複数の推定の同族対を選択することにより、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体の配列の複数の同族対を、真の同族対として同定することを含む。

【００２５】

一実施形態では、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列の同定された同族対は、１％未満の偽発見率の推定値を有する。

【００２６】

別の実施形態では、前記複数の容器のそれぞれは、前記複数のリンパ系細胞から得られ

るｍＲＮＡ分子の逆転写を促進するのに十分な条件下及び時間において、第１の逆転写プライマーセットと接触させる。特定の実施形態では、第一のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセット（Ａ）は、複数の第１及び第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを作製するために、前記複数の第１及び第２の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする複数のｍＲＮＡ配列を逆転写することができるプライマーを含み、前記第１の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする前記複数の第１の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンは、１）ユニークなＶ領域コード遺伝子配列と、２）ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列の両方と、を含み、前記第２の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする前記複数の第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンは、１）ユニークなＶ領域コード遺伝子配列と、２）ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列の両方と、を含む。

【００２７】

特定の態様では、前記方法は、前記第１及び第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンの多重ＰＣＲ増幅を促進するために十分な条件及び時間において、前記複数の容器のそれぞれに、第２の（Ｂ）及び第３の（Ｃ）オリゴヌクレオチドプライマーセットを接触させる工程を含む。幾つかの態様では、第２のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｂ）は、前記複数の第１の逆転写されたアダプター免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーは、それぞれ、前記第１の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンとハイブリダイズすることができる。一態様では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるそれぞれのフォワード及びリバースプライマーのセットは、前記第１の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅することができる。別の態様では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、第１のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｖ領域コード遺伝子配列と相補的な領域とを含む。他の態様では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、第２のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｊ領域コード遺伝子配列又は前記Ｃ領域コード遺伝子配列と相補的な領域と、を含む。別の態様では、第３のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｃ）は、前記複数の逆転写された第２の適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅することができるフォワード及びリバースプライマーを含む。一実施形態では、前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセット中のフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅することができる。一態様では、前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、第１のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｖ領域コード遺伝子配列と相補的な領域を含む。幾つかの態様では、前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、第２のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｊ領域コード遺伝子配列と相補的であるか、又は前記Ｃ領域コード遺伝子配列と相補的である領域を含む。

【００２８】

前記方法はまた、ｉ）複数の第３の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード遺伝子配列若しくはその相補配列と、ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列との両方、若しくはその相補配列と、前記第１及び第２のユニバーサルアダプター配列と、を含む、前記アンプリコンと、ｉｉ）複数の第４の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード遺伝子配列若しくはその相補配列と、ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列の両方、若しくはそれらの相補配列と、前記第１及び第２のユニバーサルアダプター配列と、を含むアンプリコン、を生じさせることを含む。

【００２９】

別の実施形態では、方法は前記複数の容器のそれぞれに、の前記複数の第３及び第４の

適応免疫受容体アンプリコンの第２の多重ＰＣＲ増幅を促進するために十分な条件及び時間で、第４の（Ｄ）オリゴヌクレオチドプライマーセット及び第５の（Ｅ）オリゴヌクレオチドプライマーセットを接触させることを含む。一実施形態では、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｄ）は、前記複数の第３のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅することができるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーはそれぞれ、前記第３の適応免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズすることができる。一態様では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記第３のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅することができる。別の態様では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、前記複数の第３の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第１のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と（前記リバースプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列を含む）、前記複数の第３の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第２のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含む。他の実施形態では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおける前記フォワード及びリバースプライマーの一方又は両方は、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットが添加される前記容器と関連するユニークなバーコード配列を含む。

【００３０】

一実施形態では、第５のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｅ）は、前記複数の第４のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅することができるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーはそれぞれ、前記第４の適応免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズすることができる。一実施形態では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記複数の第４のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅することができる。他の実施形態では、前記第５のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、前記複数の第４の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第１のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含み、前記第５のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおける前記リバースプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、前記複数の第４の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第２のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含む。他の実施形態では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットの前記フォワード及びリバースプライマーの一方又は両方は、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットが添加される前記容器に関連するユニークなバーコード配列を含み、それによって前記複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンと前記複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンとを含む前記アンプリコンのライブラリを生じさせる。

【００３１】

一態様では、前記方法は、前記複数の容器からの前記アンプリコンのライブラリをシークエンシング用に組み合わせて混合することを含む。別の態様では、複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンは、Ｃ領域コード配列を含む。幾つかの態様では、複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンは、Ｃ領域コード配列を含む。

【００３２】

一実施形態では、サンプルは血液サンプルを含む。他の実施形態では、サンプルは組織サンプルを含む。特定の実施形態では、サンプルは、精製又は培養されたヒトのリンパ系細胞のサンプルを含む。他の実施形態では、容器は少なくとも$10^4$個のリンパ系細胞を含む。他の実施形態では、サンプルは少なくとも$10^4$個の細胞を含む。

【００３３】

特定の態様では、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドはＴＣＲ　α（ＴＣＲＡ）鎖であり、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドはＴＣＲ　β（ＴＣＲＢ）鎖である。一態様では、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドはＴＣＲ　γ（ＴＣＲＧ）鎖であり、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２の

ポリペプチドがＴＣＲ　δ（ＴＣＲＤ）鎖である。別の態様では、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドは免疫グロブリン重鎖（ＩＧＨ）であり、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖ＩＧＬ又はＩＧＫ鎖から選択される。更に別の態様では、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドがＩＧＨ鎖であり、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドがＩＧＬ及びＩＧＫの両方である場合、以下を含む３つの異なる増幅プライマーセットが用いられる：ＩＧＨのための第１のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット、ＩＧＫのための第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット、及びＩＧＬのための第３のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット。

【００３４】

本発明は、適応免疫受容体ヘテロ二量体を形成する第１のポリペプチドと第２のポリペプチドと、を含む複数の同族対を同定する方法の提供に関し、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体は、サンプル中の１つのクローンに由来するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）又は免疫グロブリン（Ｉｇ）を含み、前記サンプルは、哺乳動物の対象からの複数のリンパ系細胞を含む。前記方法は、複数のリンパ系細胞を、複数のリンパ系細胞を含む複数の容器にそれぞれ分配することと、前記複数のリンパ系細胞から得られるゲノム分子の多重ＰＣＲを実行することにより、前記複数の容器においてアンプリコンのライブラリを生じさせることと、を含む。前記アンプリコンのライブラリは、ｉ）前記第１のポリペプチドをコードする複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークな可変的な（Ｖ）領域コード配列と、ユニークなＪ領域コード配列と、少なくとも１つのバーコード配列と、少なくとも１つのユニバーサルアダプター配列と、シークエンシングプラットホームタグ配列と、を含む前記アンプリコンと、ｉｉ）前記第２のポリペプチドをコードする複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード配列と、ユニークなＪ領域コード配列と、少なくとも１つのバーコード配列と、少なくとも１つのユニバーサルアダプター配列と、シークエンシングプラットホームタグ配列と、を含む前記アンプリコンと、を含む。

【００３５】

前記方法は、前記アンプリコンのライブラリのハイスループットシークエンシングを実施して、複数の第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列のデータセットを得る工程と、１つ以上の容器にそれぞれのユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれのユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の容器占有パターン、及び、１つ以上の容器にそれぞれのユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれのユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の容器占有パターン、を決定する工程と、を含み、前記ユニークな第１又は第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列中のそれぞれのバーコード配列は、特定の容器に関連する。

【００３６】

幾つかの実施形態では、前記方法は、推定の同族対を形成するために、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列の可能な対形成ごとに、前記容器占有パターンが観察される統計学的確率を算出する工程か、又は、前記第１及び第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列は、同じクローン集団のリンパ系細胞に由来しないことを考慮して、偶然に予想されるより大きい容器共有の割合を観察する工程を含む。幾つかの実施形態では、前記方法は、所定の尤度カットオフ値より低いスコアを有する前記統計学的確率に基づき、複数の推定の同族対を特定する工程を含む。

【００３７】

他の実施形態では、同定された推定の同族対ごとに、前記ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列と前記ユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の可能な間違った対形成に関する偽発見率の推定値を決定する工程を含む。

【００３８】

一実施形態では、前記方法は、前記統計学的確率及び前記偽発見率に基づき、ユニーク

な第１及び第２の適応免疫受容体の配列の複数の同族対を、前記サンプル中の前記適応免疫受容体をコードする真の同族対として同定する工程と、を含む。

【００３９】

他の実施形態では、統計スコアは、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列のそれぞれの推定の同族対の対形成に関して算出されるｐ値を含む。他の実施形態では、前記統計スコアを算出する工程は、真でない同族対形成を仮定し、前記ユニークな第１の適応免疫受容体アンプリコン配列により占められる容器の数と前記ユニークな第２の適応免疫受容体アンプリコン配列により占められる容器の数を考慮して、前記ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列が、それらが共同で占めるのが観察されたのと同数又はより多くの容器を共同で占める確率を算出する工程工程、を含む。

【００４０】

別の実施形態では、前記方法は、前記統計学的確率に基づいて対形成の高い尤度を有する複数の推定の同族対を同定することが、ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列ごとに、最も低いマッチングのｐ値スコアを有するユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を同定する工程、又は、ユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列ごとに、最も低いマッチングのｐ値スコアを有するユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を発見する工程、を含む。

【００４１】

他の実施形態では、偽発見率の推定値を決定する工程は、前記サンプルにおいて同定される前記複数の推定の同族対のそれぞれについてｐ値を算出する工程と、前記複数の推定の同族対の全てのｐ値と、予想されるｐ値分布とを比較する工程であって、前記予想されるｐ値分布が、真の同族対が存在しない実験を表すものとして算出される工程と、推定の同族対ごとに、前記推定の同族対のｐ値と同じ若しくはそれ以下の全てのｐ値が、真の同族対形成を表すものとして決定されるように、予想される偽陽性の結果の割合を決定する工程と、を含む。

【００４２】

一実施形態では、前記予想されるｐ値分布を算出する工程は、それぞれの第１及び第２の適応免疫受容体の配列が、真の同族対がないこと以外は同一の実験で観察されている容器の順序を変える工程と、それぞれの推定の同族対に関連するｐ値分布を算出する工程と、を含む。

【００４３】

別の態様では、前記方法は、前記偽発見率の推定値に基づいて算出される閾値以下のｐ値を有する複数の推定の同族対を選択することにより、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体配列の複数の同族対を、真の同族対として同定することを含む。

【００４４】

一実施形態では、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列の確認された同族対は、１％未満の偽発見率の推定値を有する。

【００４５】

別の実施形態では、前記方法は、前記複数の容器のそれぞれに、前記第１及び第２の適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンの多重ＰＣＲ増幅を促進するために十分な条件及び時間で、第１の（Ａ）及び第２の（Ｂ）オリゴヌクレオチドプライマーセットを接触させることを含む。一実施形態では、第１のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ａ）は、前記複数の第１のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーはそれぞれ、前記第１の適応免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズできる。一態様では、前記第１のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記第１の適応免疫受容体アンプリコンを増幅できる。別の態様では、前記第１のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、第１のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｖ領域コード遺伝子配列と相補的な領域と、を含む。一態様では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、第２の

ユニバーサルアダプター配列と、前記Ｊ領域コード遺伝子配列と相補的な領域と、を含む。

【００４６】

別の態様では、第２のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｂ）は、前記複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含む。一実施形態では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記第２の適応免疫受容体アンプリコンを増幅できる。他の実施形態では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、第１のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｖ領域コード遺伝子配列と相補的な領域と、を含む。別の態様では、前記第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、第２のユニバーサルアダプター配列と、前記Ｊ領域コード遺伝子配列と相補的な領域と、を含む。

【００４７】

幾つかの実施形態では、上記方法はまた、ｉ）複数の第３の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード遺伝子配列若しくはその相補配列と、ユニークなＪ領域コード遺伝子配列若しくはその相補配列と、前記第１及び第２のユニバーサルアダプター配列と、を含む、前記アンプリコンと、ｉｉ）複数の第４の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード遺伝子配列若しくはその相補配列と、ユニークなＪ領域コード遺伝子配列若しくはそれらの相補配列と、前記第１及び第２のユニバーサルアダプター配列と、を含む前記アンプリコンと、を生じさせることを含む。

【００４８】

前記方法は前記複数の容器のそれぞれに、前記複数の第３及び第４の適応免疫受容体アンプリコンの第２の多重ＰＣＲ増幅を促進するために十分な条件及び時間で、第３のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｃ）及び第４のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｄ）を接触させることを含む。一実施形態では、第３のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｃ）は、前記複数の第３のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーは、それぞれが、前記第３の適応免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズできる。他の実施形態では、前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記第２のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できる。更に他の実施形態では、前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、前記複数の第３の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第１のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と（前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセット中の前記リバースプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列を含む）、前記複数の第２の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第２のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含む。一態様では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおける前記フォワード及びリバースプライマーの一方又は両方は、前記第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットが添加される前記容器に関連するユニークなバーコード配列を含む。

【００４９】

別の実施形態では、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｄ）は、前記複数の第４のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーは、それぞれ、前記第４の適応免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズできる。一実施形態では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記複数の第４のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅することができる。幾つかの実施形態では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、前記複数の第４の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第１のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含み、前

記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセット中の前記リバースプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、前記複数の第４の適応免疫受容体アンプリコン中の前記第２のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含む。更に他の実施形態では、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットの前記フォワード及びリバースプライマーの一方又は両方は、前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットが添加される前記容器に関連するユニークなバーコード配列を含み、それによって、前記複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンと前記複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンとを含む前記アンプリコンのライブラリを生じさせる。

【００５０】

他の実施形態では、前記方法は、シークエンシング用に前記複数の容器からの前記アンプリコンのライブラリを組み合わせて混合することを含む。

【００５１】

幾つかの実施形態では、サンプルは血液サンプルを含む。一実施形態では、サンプルは組織サンプルを含む。他の実施形態では、サンプルは、精製又は培養されたヒトのリンパ系細胞のサンプルを含む。幾つかの実施形態では、それぞれの容器は少なくとも$10^4$個のリンパ系細胞を含む。他の実施形態では、サンプルは少なくとも$10^4$個の細胞を含む。

【００５２】

他の実施形態では、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドはＴＣＲα（ＴＣＲＡ）鎖であり、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドはＴＣＲ　β（ＴＣＲＢ）鎖である。幾つかの実施形態では、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドはＴＣＲ　γ（ＴＣＲＧ）鎖で、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドがＴＣＲ　δ（ＴＣＲＤ）鎖である。他の実施形態では、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドは免疫グロブリン重鎖（ＩＧＨ）であり、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖ＩＧＬ又はＩＧＫ鎖から選択される。他の実施形態では、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドがＩＧＨ鎖であり、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドがＩＧＬ及びＩＧＫである場合、以下を含む３つの異なる増幅プライマーセットが用いられる：ＩＧＨのための第１のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット、ＩＧＫのための第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット、及びＩＧＬのためのに対する第３のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット。

【図面の簡単な説明】

【００５３】

本発明の上記の、及び他の特徴、態様及び長所は、以下の記載及び添付の図面を参照することにより更に理解されうる。

【図１】本明細書に記載の組成物及び方法の代表例の略図を表す。Ｕ１及びＵ２は、ユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドを表す。ＢＣ１及びＢＣ２はバーコードオリゴヌクレオチドを表す。Ｊは、適応免疫受容体の連結（Ｊ）領域の遺伝子を表し、Ｊｐｒは、Ｊ特異的オリゴヌクレオチドプライマーが特異的にアニールする遺伝子の領域を表す。Ｖは、適応免疫受容体可変（Ｖ）領域の遺伝子を表し、Ｖｐｒは、Ｖ特異的オリゴヌクレオチドプライマーが特異的にアニールする遺伝子の領域を表す。ＮＤＮは、非テンプレートヌクレオチドを含み得る結合部ヌクレオチド（Ｎ）がいずれかの側に隣接する、いくつかの適応免疫受容体コード遺伝子において見出される多様性（Ｄ）領域を表す。Ａｄａｐ１及びＡｄａｐ２は、シークエンシングプラットホーム特異的アダプターを表す。「ｎ６」として示されるセグメントは、任意のヌクレオチド配列のスペーサーヌクレオチドセグメントを表し、この場合、６つのヌクレオチドがランダムに選択されたスペーサーである。

【図２】本明細書に記載の特定の組成物及び方法の略図を表す。個々の第１及び第２の微小滴を接触させて、１つの第１及び第２の微小滴の間での融合事象を可能にし、当該融合事象により、個々のリンパ系細胞（例えばＴ又はＢ細胞）からのＤＮＡが、融合微小滴中で、それぞれ、同細胞からの第１及び第２の適応免疫受容体ポリペプチドコード遺伝子の

ＤＮＡコード配列（例えば、ＣＤＲ３コードＤＮＡ）を増幅できる第１及び第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットに、添加される。本明細書に記載の、例えば［ＩＧＨ＋ＩＧＬ］、［ＩＧＨ＋ＩＧＫ］、［ＩＧＨ＋ＩＧＫ＋ＩＧＬ］、［ＴＣＲＡ＋ＴＣＲＢ］、［ＴＣＲＧ＋ＴＣＲＧ］などのように、同細胞からの少なくとも２つの再構成されたＤＮＡ座の増幅及びオリゴヌクレオチドバーコード標識が企図される。

【図３】本明細書に記載の組成物及び方法の典型的な略図を表す。それにより、例えば、個々のリンパ系細胞（例えばＴ又はＢ細胞）からのＤＮＡ又は１つのリンパ系細胞のｍＲＮＡから逆転写されたｃＤＮＡが、融合微小滴内で、それぞれ、同細胞からの第１及び第２の適応免疫受容体ポリペプチドコード遺伝子のＤＮＡコード配列（例えば、ＣＤＲ３コードＤＮＡ）を増幅できる、第１及び第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットに添加される。その後、個々の微小滴が崩壊すると（例えば化学的、物理的及び／又は機械的な消滅、分離、破損、その他により）、放出されたバーコード付き二本鎖ＤＮＡは、ユニバーサルオリゴヌクレオチドプライマーとシークエンシングプラットホーム特異的なアダプターにより増幅され、大規模な多重定量的シークエンシングが可能となる。略語については、図１についての簡単な説明を参照。

【図４】ｃＤＮＡにオリゴヌクレオチドバーコード及びユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を組み込むオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを用いて、逆転写の間に、適応免疫受容体ポリペプチドコードｃＤＮＡを標識する工程の略図を表す。

【図５】ｃＤＮＡにオリゴヌクレオチドバーコード及びユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を組み込むオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを用いて、逆転写の間に適応免疫受容体ポリペプチドコードｃＤＮＡを標識する工程の略図を表す。

【図６】増幅された適応免疫受容体ポリペプチドをコードするｃＤＮＡのＩｌｌｕｍｉｎａシークエンシングアダプターによる修飾後のシークエンシングに使用可能なＤＮＡ産物の略図を表す。当該ｃＤＮＡは、オリゴヌクレオチドバーコード及びユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を組み込むオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを用いた逆転写の間に標識されたものである。

【図７】占有されたＴ細胞サブセットの数、対、共有サブセットの確率を表す。それぞれ７０，０００個のＴ細胞を含んでいる９６のサブセットにＴ細胞を分割する、本発明の方法を使用したシミュレーション実験に関して、このプロットは、所定の数のサブセット（ｘ軸）に存在する任意のクローンが正確に同じサブセットに出現する確率（ｙ軸）を示すものである。

【図８】９６穴プレートの各ウェルにランダムに割り当てた一定数のＴ細胞（例えば、７０，０００個のＴ細胞）を表す。このウェルにおいてｍＲＮＡが抽出され、ｃＤＮＡに変換され、ＴＣＲに特異的なプライマーにより増幅される。ウェル特異的バーコードを付し、ＴＣＲ分子をシークエンシング用にプールし、更にコンピューターによる逆多重化により、元のウェルに戻るようそれぞれのＴＣＲ配列をマッピングする。免疫レパートリーは非常に多様であり、２つのクローンがウェルパターンを共有する確率は非常に小さいため、ウェルパターンを共有するいかなるＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ対も、同じクローンに由来することと推論できる。

【図９】図９Ａ及び９Ｂは、本発明の実施形態に係るハイスループット対形成実験の結果を示す。図９Ａは、９６ウェル及びウェルあたり７０，０００個のＴ細胞のハイスループット対形成実験の偽発見率曲線を表す。合計３４，７６３対のＴＣＲ配列を、ＦＤＲ＜１％（赤い点線）でコールした。図９Ｂは、ウェル占有の関数としての、シークエンシングされた（淡い灰色）ＴＣＲＢクローンの数及び対を形成した（暗い灰色）ＴＣＲＢクローンの数を表す。折り込み図は、２０個より多くのウェルで認められたクローンの拡大図である。

【図１０】本発明の実施形態に係るハイスループット対形成実験の典型的なワークフローを表す。

【図１１】本発明の実施形態に係るウェル占有率、対、対を形成したＴＣＲＢ配列の分画を表す。９６ウェル及びウェルあたり７０，０００個のＴ細胞による、ハイスループット

対形成実験からのＴＣＲＢクローンの対形成収率（対形成した配列の分画）を示す。ＴＣＲＢクローンが観察されたウェルの数（ｘ軸）毎にＴＣＲＢクローンを群分けし、ＦＤＲ＜１％で対形成したこれらの配列の分画を算出した（ｙ軸）。

【図１２】本発明の実施形態に係る、２人の対象によるバリデーション実験の概略図を表す。２人の対象Ｘ及びＹから末梢血を採取する。詳細なイムノシークエンシングを用い、各患者のＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのレパートリーの特徴づけを行う。次に２人の対象からのＰＢＭＣを混合し、得られた混合物を用いて、本発明のハイスループット対形成実験を行う。真の陽性対は同じ対象からのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢを含まなければならず、一方、偽陽性の結果の約半分は、交叉対象ＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ対であろう。

【図１３】図１３Ａ及び１３Ｂは、２人のドナーを用いたハイスループット対形成アプローチのバリデーションを示す。図１３Ａでは、実験の偽発見率曲線を示す。２人の対象（「Ｘ」及び「Ｙ」）から採取したＰＢＭＣを混合し、２５，０００個の細胞を９６の各ウェルに分配した。対を、「Ｘ／Ｘ」（対の両メンバーが対象Ｘでのみ見られる）「Ｙ／Ｙ」（対の両メンバーが対象Ｙでのみ見られる）及び「Ｘ／Ｙ」（対の１つのメンバーが対象Ｘでのみ見られ、１つのメンバーが対象Ｙでのみ見られる）という名前の群に分ける。垂直の点線は、推定ＦＤＲ＜１％のカットオフを示す。この閾値より下には、１，１１５のＸ／Ｘ対、７０６のＹ／Ｙ対及び７のＸ／Ｙ対が含まれる。図１３Ｂでは、サンプル混合実験からの$\log_{10}$ ＦＤＲの予測値、対、経験値を示す。可能なｐ値カットオフ毎に、本発明の統計方法により予測ＦＤＲ値を算出し、Ｘ／Ｙ対がエラーの総数の半分を表すという仮定に基づき、コールされた対の数で割ったＸ／Ｙ対の数を２倍して、ＦＤＲ経験値を算出した。垂直の点線は図１３Ａで用いられるカットオフと一致する。

【図１４】１４Ａ～１４Ｄは、ｍＲＮＡのサブサンプル及び対内でのウェルのドロップアウト率を表す。図１４Ａは、ウェルあたり７０，０００個のＴ細胞を用いた本発明のハイスループット対形成法からの、第１のｍＲＮＡのサブサンプルにおけるウェルのドロップアウト率を表す。ドロップアウト率の中央値（垂直点線）は、ＴＣＲＡでは２０％、ＴＣＲＢでは１４％である。図１４Ｂは、本発明のハイスループット対形成法からの、第２のｍＲＮＡのサブサンプルにおけるウェルのドロップアウト率を表す。ドロップアウト率の中央値は、ＴＣＲＡでは２４％、ＴＣＲＢでは２１％である。図１４Ｃは、第１のｍＲＮＡ（パネルＡと同じデータ）のサブサンプル中の、信頼できる対形成配列（ＦＤＲ＜１％）から推定されるウェルドロップアウト率を表す。ドロップアウト率の中央値はＴＣＲＡでは１４％、ＴＣＲＢでは１０％であり、それはパネルＡでは推定値から下方向に偏っている。図１４Ｄは、ｍＲＮＡの完全な混合サンプル（すなわち、本発明者らが～３５，０００対を発見した際に用いたデータ）における、信頼できる対配列（ＦＤＲ＜１％）から推定されるウェルドロップアウト率を表す。ドロップアウト率の中央値は、ＴＣＲＡでは７％、ＴＣＲＢでは３％である。偏りを考慮すると、正確なドロップアウト率の中央値は、それぞれ１０％及び５％であると予想される。

【図１５】クローン頻度及び投入Ｔ細胞数の関数としての、シミュレーションされたウェル占有率を表す。本発明のハイスループット対形成法の鍵となる設計パラメータは、各ウェルに割り当てられたＴ細胞の数である。図１５は９６穴プレート、及び１ウェルあたり１００～１００，０００個の範囲のＴ細胞投入量（ｘ軸）による本発明のシミュレーション実験の結果を表す。異なる色は、異なるレパートリー頻度のクローンを表し、プロットはシミュレーションにおいてクローンが占有したウェルの数を示す。様々な頻度帯のクローンを得るためには、実験において投入Ｔ細胞数を変更するだけでよい。プレート上のウェル全域で投入Ｔ細胞数を変更することにより、一回の実験で複数の頻度帯を捉えることも可能である。

【発明を実施するための形態】

【００５４】

本発明は、特定の実施形態で、及び本明細書に記載されるように、適応免疫受容体（例えば免疫グロブリン（Ｉｇ）及び／又はＴ細胞レセプター（ＴＣＲ））をコードする再構成された遺伝子の大きい構造的に多様な集団の配列を信頼可能に定量化し、決定するため

に有用な組成物及び方法を提供する。これらの再構成された遺伝子は、ヒト対象を含む対象又は生物学的ソースのリンパ系細胞のＤＮＡを含む生物学的サンプルに存在すると考えられ、及び／又は、これらの再構成された遺伝子のｍＲＮＡ転写物は、上記サンプルに存在すると考えられ、逆転写によるｃＤＮＡ合成のテンプレートとして使用され得る。

【００５５】

本発明で開示されるのは、確立された核酸増幅技術により、遺伝子セグメント又はその転写物（その逆転写物を含む）集団を増幅する従来の工程を行う前に、そのような標識化を実行することにより、個々の配列特異的なＩＧ及びＴＣＲコード遺伝子セグメント又、はそのｍＲＮＡ転写物、又は、そのようなｍＲＮＡコピーから逆転写されたｃＤＮＡをユニークに、かつ明白に標識するための予想外に有利なアプローチである。特定の理論に拘束されないが、シークエンシング用に十分な量のＤＮＡコピーを生成するために使用される一般的に用いられる増幅工程の前に、本発明に記載される個々のＴＣＲ及びＩＧコード遺伝子セグメント又はその転写物（逆転写により生成される相補的ＤＮＡを含む）を標識することにより、本発明の実施形態は、多様なＴＣＲ及びＩＧコード配列の検出及び定量化において、先例のない感度を提供するのと同時に、多様な配列を有する増幅プライマーセットを使用して、元のサンプルからの複数回にわたる核酸増幅の際に生じる、オリゴヌクレオチドプライマーの利用の偏りが原因で生じ得る紛らわしい、不正確な、若しくは不完全な結果を回避することが可能となる。

【００５６】

また、本明細書に記載のように、特定の実施形態では、Ｔ細胞由来のＴＣＲＡとＴＣＲＢ、又はＢ細胞由来のＩｇＨとＩｇＬの両方などの単細胞由来の適応免疫受容体ヘテロ二量体中の両方のポリペプチドをコードする配列の定量的決定を可能にする新規な組成物と方法が開示される。対象に由来するＴ細胞若しくはＢ細胞の不均質混合物を含むサンプルなどの複合試料から、そのような情報を得る能力を提供することにより、これらの及び関連する実施形態において、特定のＴ細胞及び／又はＢ細胞のクローン集団のサンプルにおける、従来可能であったよりも正確な相対表示の決定が可能となる。

【００５７】

特定の実施形態では、増幅産物の定量的ハイスループットシークエンシングを行う前に、適応免疫受容体をコードする再構成された遺伝子を含む生物学的サンプルから、増幅された再構成されたＤＮＡ分子集団を生成するために、多重核酸増幅反応に用いられるオリゴヌクレオチドプライマーセットに対する本明細書に記載されるような修飾が、企図される。再構成されたＴＣＲ及びＢＣＲコードＤＮＡ配列の多重増幅及びハイスループットシークエンシングについては、例えば、Ｒｏｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ｂｌｏｏｄ １１４：４０９９；Ｒｏｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，２０１０ Ｓｅｉ．Ｔｒａｎｓｌａｔ．Ｍｅｄ．２：４７ｒａ６４；Ｒｏｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，２０１１ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｊｉｍ．２０１１．０９．００１；Ｓｈｅｒｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．２０１１ Ｓｅｉ．Ｔｒａｎｓｌａｔ．Ｍｅｄ．３：９０ｒａ６１；Ｕ．Ｓ．Ａ．Ｎ．１３／２１７，１２６（ＵＳ Ｐｕｂ．Ｎｏ．２０１２／００５８９０２），Ｕ．Ｓ．Ａ．Ｎ．１２／７９４，５０７（ＵＳ Ｐｕｂ．Ｎｏ．２０１０／０３３０５７１），ＷＯ／２０１０／１５１４１６，ＷＯ／２０１１／１０６７３８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３），ＷＯ２０１２／０２７５０３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２），Ｕ．Ｓ．Ａ．Ｎ．６１／５５０，３１１及びＵ．Ｓ．Ａ．Ｎ．６１／５６９，１１８に記載されており、したがって、これらの開示は参照に本発明に援用され、本明細書に記載の実施形態に従う利用のために適応され得る。

【００５８】

特定の実施形態では、配列の多様な複数のＴＣＲ又はＩＧコード遺伝子セグメントを含むサンプル、例えば、ＤＮＡ再構成が起こって、機能的なＴＣＲ及び／又はＩＧヘテロ二量体をコードする（又は非機能的ＴＣＲ又はＩＧ偽遺伝子がＤＮＡ再構成に関係している）リンパ系細胞由来のＤＮＡ（又はそこから転写されたｍＲＮＡ、又はそのようなｍＲＮＡから逆転写されたｃＤＮＡ）を含むサンプルにおいて、一ラウンドの核酸増幅（例えば

ポリメラーゼ連鎖反応：ＰＣＲ）を通じて、複数の個々のＴＣＲ又はＩＧコード配列は、本発明に記載される特異的それぞれオリゴヌクレオチドバーコード配列によってユニークにタグ付けされうる。タグ付けされたポリヌクレオチド集団を次に増幅して、タグ付けされた分子のライブラリを得ることができ、更に、例えば、米国特許出願第１３／２１７，１２６号（米国特許出願公開第２０１２／００５８９０２号）、米国特許出願第１２／７９４，５０７号（米国特許出願公開第２０１０／０３３０５７１号）、国際公開２０１０／１５１４１６号、国際公開第２０１１／１０６７３８号（ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３）、国際公開第２０１２／０２７５０３号（ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２）、米国特許出願第６１／５５０，３１１号及び米国特許出願第６１／５６９，１１８号で記載されるような既存の手順により、定量的にシークエンシングすることができる。

【００５９】

これらの配列解読の過程で、組み込まれたバーコードタグ配列を決定して、得られた配列データを編集及び分析する過程で識別子として用いることができる。特定の実施形態では、バーコードタグ配列ごとに、関連するＴＣＲ又はＩＧ配列のコンセンサス配列が決定され得ることが考えられる。次に、クラスタリングアルゴリズムを、同じ元のクローン細胞集団から生成された分子を特定するために適用することができる。そのようなアプローチにより、シークエンシングのアーティファクトに関連する不正確さを克服する方式で、高品質の配列データを得ることができる。

【００６０】

典型的な実施形態が、図１に示されており、そこにおいて、リンパ系細胞を含む集団からのゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡの開始テンプレート集団から、本発明に記載のような、一般式ＵＩ－Ｂ１$_n$－Ｘを有するプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマー組成物を用いて、２サイクル以上のＰＣＲを実施する。図１に示すように、Ｊ特異的プライマー１１０ａは、Ｊセグメントの一部と相補的であるＪプライマー配列１００と、図１のバーコードタグ（ＢＣ１）１０１（又は一般式のＢ１ｎ）とを含み、同様に第１の外部ユニバーサルアダプター配列（Ｕ１）１０２と、を含み、一方、Ｖ特異的プライマー１１０ｂは、Ｖセグメントの一部と相補的であるＶプライマー配列１０３と、第２の外部ユニバーサルアダプター配列（Ｕ２）１０４と、を含む。しかしながら、本発明は、限定されないが、前記バーコードが、Ｖ－特異的プライマーの代わりに、又はその一部として存在してもよく、Ｖ－配列と第２のユニバーサルアダプターとの間に位置してもよい実施形態にも関する。本発明の開示に基づき、当業者は、他の適当なプライマーを設計することができ、それにより、本明細書に記載のバーコードタグを導入して、個々のＴＣＲ及び／又はＩＧコード遺伝子セグメントにユニークに標識することが可能となることを認識するであろう。

【００６１】

本明細書の記載では、多数の異なるバーコード配列（最高４$^n$、ｎはバーコード配列の長さである）が、本明細書に記載の一般式Ｕ１－Ｂ１$_n$－Ｘのプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマー組成物中に存在し、それにより適切なＶ及びＪ特異的プライマーの特異的アニーリングの後に、多数の異なる増幅事象のＰＣＲ産物が、異なるように標識される。一実施形態では、１９２個の異なるバーコード配列の組が、長さｎ＝８のバーコードに基づいて用いられる。バーコードの長さ「ｎ」により、可能なバーコードの数（本願の記載では４$^n$）が決定されるが、幾つかの実施形態では、近縁のバーコード又は異なるアニール温度のバーコードを回避するために、より少ないサブセットが用いられる。他の実施形態では、本明細書の記載では、ｍ及びｎ個のバーコード配列の組は、以降の増幅工程において、例えば、それぞれの再構成されたＴＣＲ又はＩＧ配列を個々に標識して、次に、同じソース又はサンプルから得られた一組の配列を均一に標識（「テール付加」）するのに用いられる。好ましい実施形態では、Ｖ及びＪプライマー１００及び１０３は、図１でＮＤＮ領域１１１を含むＣＤＲ３コード配列を含むＴＣＲ又はＩｇコード配列の増幅を促進することができる。また図１で示されるように、わずか２回の増幅サイクルの後、第１の増幅プライマーセット１１０ａ及び１１０ｂは、二本鎖ＤＮＡ産物から分離する。かかる工程により、特定の理論に限定されないが、それ以降の増幅ラウンドによる産物調

製物の混入が回避できると考えられる。そうでなければ、複雑な反応系に存在し、最初の１回または２回の増幅サイクルにおいて二本鎖ＤＮＡを生成するために用いられたプライマーとは異なる増幅プライマーが、新たに形成された二本鎖ＤＮＡ分子を増幅することによって、混入物質が生成され得る。二本鎖ＤＮＡをオリゴヌクレオチド増幅プライマーから分離するための、様々な化学的及び生化学的技術が当技術分野において公知である。

【００６２】

第１の増幅プライマーセット１１０ａ及び１１０ｂが取り除かれた後、ユニークなバーコードタグ配列が導入され、タグ付けされた二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）産物を、第２の増幅プライマーセット１２０ａ及び１２０ｂ（本明細書に記載され、図１に示される）を用いて増幅することができ、シークエンシングに適するＤＮＡライブラリが得られる。第２の増幅プライマーセットは、前の工程の際に工程、ユニバーサルアダプター配列１０２、１０４（例えば、図１のＵ１及びＵ２）のｄｓＤＮＡ産物への導入を利用すると都合がよい。したがって、これらのユニバーサルアダプター配列は、図１においてユニークなバーコードタグ（ＢＣ１）１０１の外側に存在することから、シークエンシングされるＤＮＡライブラリを含む増幅産物は、それぞれの特定の再構成されたＶ－Ｊ遺伝子セグメントの組合せに結合するユニークなバーコード識別子の配列を保持し、一方で、ユニバーサルアダプターによる増幅を受ける。そのような第２のプライマーセット（別名「テール付加」プライマー）の例示的なセットを、表７に示す。

【００６３】

好ましい実施形態では、また図１に表されるように、第２の増幅プライマーセット１２０ａ及び１２０ｂは、シークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列（図１の中のＡｄａｐ１　１０５及びＡｄａｐ２　１０６）を導入し得るが、これらは特定の他の関連する実施形態では必要でない。第２の増幅プライマーセット１２０ａ及び１２０ｂはまた、第２のオリゴヌクレオチドバーコード識別子タグ（図１のＢＣ２　１０７）、例えば、望ましくは特定のサンプル（例えば、ソース対象識別するコードとして）に由来する全ての増幅産物を特定して、複数のサンプルの複合化を容易にし、更なるハイスループットを可能にする１つのバーコード配列を任意で導入してもよい。バーコード（ＢＣ２、図１の１０７）は、アッセイのスループットを向上させる修飾である（例えば、シーケンサーにおけるサンプルの複合化を可能にする）が、必須ではない。あるいは、アダプターを含まないユニバーサルプライマーを用いて、タグ付けされた分子を増幅することができる。増幅の後、分子を、プラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列でさらにタグ付けすることができる。第２のサンプル識別バーコードをそのように含めることにより、異なる複数の対象からのサンプルを混合する場合、又は他のサンプル調製物由来材料による１つのサンプル調製物の不注意な混入の同定において、サンプル起源の識別を有益に補助しうる。第２の増幅プライマーセットは、図１で示すように、シークエンシングプラットホーム特異的配列の操作を容易にしうるスペーサーヌクレオチド（「ｎ６」、図１の１０８）を任意に含んでもよい。スペーサーは、シークエンシングデータの品質を改善するが、必須ではなく、特定の実施形態では存在しない。スペーサーは、上記方法のシークエンシング工程の最初の１２サイクルの間、ランダムな塩基対の数を増やすために特異的に添加される。最初の１２サイクルの多様性を増やすことにより、クラスター定義及びベースコーリングが改善される。スペーサーヌクレオチド１０８は、任意の配列、典型的にはランダムに生成させた配列の０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１～２０、２１～３０又はそれ以上のヌクレオチドであってもよい。そのようなランダムな配列の存在が、そのような配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー間で不均一なアニーリング速度をもたらすことが懸念され得る場合には、下流の結果をゆがめうる増幅の不均一性の可能性を減らすため、比較的少ない数の増幅サイクル（典型的に３、４又は５サイクル）、又は任意に１～６若しくは８以下のサイクルを実行するのが好ましい場合がある。

【００６４】

得られたＤＮＡライブラリを次に標準的な方法論により、本明細書に記載され、当技術分野で公知の装置を用いて、配列決定することができる。第２のサンプル識別バーコード

（図１のＢＣ２　１０７）が存在する場合、そのようなバーコードの両方の解読を含むシークエンシングを実行し、同時に、サンプル識別バーコード１０７の２回の出現の間の配列情報（ＣＤＲ３コード配列を含むＶ－Ｊ接合部と、それぞれの異なる配列をユニークにタグ付けする第１のオリゴヌクレオチドバーコードＢＣ１　１０１）も解読される。シークエンシングプライマーは、例えば、図１を参照すると、第１の解読用のＮＤＮ　１１１のＪ側のユニバーサルプライマー１０２と、それに続くバーコード配列ＢＣ１　１０１、Ｊプライマー配列１００及びＣＤＲ３配列を含み得る。第２の増幅プライマーセットは、Ｊ側にプラットホーム特異的プライマー（Ａｄａｐ１　１０５）を含むフォワードプライマーと、ランダムなヌクレオチドを含むスペーサー配列（「ｎ６」と表示；図１の１０８）と、ＢＣ２サンプル識別バーコード１０７と、を含む。第２の増幅プライマーセットのリバースプライマーは、ＮＤＮ　１１１のＶ側にユニバーサルプライマー１０４と、ランダムなヌクレオチドを含むスペーサー配列１０８と、ＢＣ２サンプル識別バーコード配列１０７と、を含み、任意に、第２のシークエンシングプラットホーム特異的リバースプライマー（Ａｄａｐ２　１０６）を用いる、ペアエンドリードを含む。第２のシークエンシングプラットホーム特異的プライマー（Ａｄａｐ２　１０６）は、スペーサー配列１０８、サンプル識別バーコード配列ＢＣ２　１０７、ユニバーサルアダプター配列１０４、Ｖ配列１０３及びＮＤＮ　１１１のシークエンシング及び解読に用いられる。ＣＤＲ３配列を捕捉するため、Ｊ増幅プライマー、Ｃ増幅プライマー又はＶ増幅プライマーを使用できる。

【００６５】

配列データを、ＢＣ２サンプル識別バーコード１０７を使って分類してもよく、次に、共通の第１のバーコードＢＣＬ　１０１を含む配列により、更に分類してもよい。そのような分類された配列の中で、クラスタリングに関する既知の多様な任意のアルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴＣｌｕｓｔ、ＵＣＬＵＳＴ、ＣＤ－ＨＩＴなど、又はＲｏｂｉｎｓら、２００９　Ｂｌｏｏｄ　１１４：４０９９に記載の方法）を用いて、ＣＤＲ３配列をクラスタにして、複数の配列クラスタが存在するか否かを決定することができる。更に、又はその代わりに、少なくとも二回見出される配列に基づいて、配列データを分類及び選抜してもよい。次に、コンセンサス配列を配列比較により決定して例えば、シークエンシングエラーを修正してもよい。複数のユニークな識別子バーコードタグ（ＢＣ１　１０１）が、それ以外は共通のコンセンサス配列を共有する配列において検出される場合、同定されるそのようなバーコードタグの数は、同じＴ細胞又はＢ細胞クローンに由来するサンプル中の分子の数を反映すると考えられ得る。

【００６６】

単一の適応免疫細胞からの、ＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体の両方の鎖の同定：

上記のとおり、本発明の特定の他の実施形態では、１つのリンパ系細胞に存在する適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチド配列をコードする再構成されたＤＮＡ配列（又はそこから転写されるｍＲＮＡ配列又はかかるｍＲＮＡから逆転写されるｃＤＮＡ）を決定する方法が提供される。前記方法は、特定の細胞及び／又はサンプルを同定するためのユニークなバーコード配列を有するそれぞれの再構成されたＤＮＡ配列をユニークに標識することを含む。

【００６７】

簡潔に言えば、非限定的な例として、これらの及びそれと関連する実施形態は、以下の工程を含む：（１）複数の平行した反応のそれぞれにおいて、第１及び第２の微小滴を接触させ、核酸増幅を許容する条件下でそれらを融合させて、全てが同一のバーコードオリゴヌクレオチド配列を含み、適応免疫受容体ヘテロ二量体の２つの鎖と一致する二本鎖ＤＮＡ産物（又は一本鎖ｃＤＮＡ産物）を生成させる工程と、（２）融合微小滴を崩壊させて二本鎖（又は一本鎖）ＤＮＡの不均質な混合物を得る工程と、（３）二本鎖（又は一本鎖）ＤＮＡ産物の不均質な混合物を増幅してシークエンシング用のＤＮＡライブラリを得る工程と、（４）当該ライブラリをシークエンシングして、ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列のデータセットを得る工程。

【００６８】
前記方法は、（Ａ）個々の第１の微小滴であって、それぞれ（又は全ての第ｎ回目の小滴）が、１つのリンパ系細胞、又はそこから単離されたゲノムＤＮＡ、又はｍＲＮＡから逆転写されたｃＤＮＡを含む微小滴と、（Ｂ）複数の第２の微小液滴からの個々の第２の微小滴であって、それぞれが、２つのオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットを含む個々の第２の微小滴と、を対を形成するように接触及び融合させる工程を含み、第１のセットは、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１の鎖（例えば、１ＩＧＨ鎖又はＴＣＲＡ鎖）をコードする再構成された任意のＤＮＡを増幅するためであり、第２のセットは、当該ヘテロ二量体の第２の鎖（例えば、１ＩＧＬ鎖又はＴＣＲＢ鎖）をコードする再構成された任意のＤＮＡを増幅するためである。特に、所定の第２の微小滴において、全てのオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、同じバーコードオリゴヌクレオチドを含むが、異なる第２の微小滴中では、プライマーセットは異なるバーコード配列を含む。接触させる工程は、複数の事象のそれぞれにおいて、１つの第１の微小滴が、１つの第２の微小滴と融合して、融合微小滴が得られるように制御される。第１及び２の微小滴のそれぞれの内容物は、融合微小滴中で相互に接触する。所定のＴＣＲ又はＩｇポリペプチドをコードする再構成された任意のＤＮＡを増幅できるオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットは、本願明細書及び本願発明に援用する文献に記載されている。
【００６９】
当業者であれば、多くの微小流体装置及びデバイスを認知しており、それにより、所定の成分及び特性（例えば、制御可能に融合を受ける能力）を有する微小滴組成物を調製することができる。かかる技術としては、例えば、ＲａｉｎＤａｎｃｅ（商標）ｍｉｃｒｏｄｒｏｐｌｅｔ ｄｉｇｉｔａｌ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（ＲａｉｎＤａｎｃｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）又は、例えばＰｅｋｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１１ Ｌａｂ Ｃｈｉｐ １１：２１５６に記載のシステム；Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１２ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０９：３７８；Ｂｒｏｕｚｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０６：１４１９５；Ｊｏｅｎｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．８１：４８１３；Ｂａｒｅｔ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ｌａｂ Ｃｈｉｐ ９：１８５０；Ｆｒｅｎｚ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ｌａｂ Ｃｈｉｐ ９：１３４４；Ｋｉｓｓ ｅｔ ａｌ．，２００８ Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．８０：８９７５；Ｌｅａｍｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００６ Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｓ．３：５４１；が挙げられ、それらは本発明の開示を考慮し、ルーチン的な微調整を行うことにより、本明細書に記載のような特定の方法に適合させることができる。
【００７０】
非限定的な例として、特定の実施形態では、微小流体チャネルを用いて、油相に分散させた水相中の微小滴の特性を利用してもよい。微小滴は、油中水型エマルジョン、水中油型エマルジョン、又は類似の水性及び非水性エマルジョン組成物であり得る。微小滴は、微小滴又ミセル状微小滴と呼ばれ得る。従来の油中水型（ＷＯ）エマルジョンは、生物学において多く用いられ、次世代シークエンシング（Ｍａｒｇｕｌｉｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ ２００５，４３７，３７６～３８０）、珍しい突然変異の発見（Ｄｉｅｈｌ，Ｆ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｅｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．２００５，１０２，１６３６８～１６３７３；Ｌｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２００６，３，９５～９７；Ｄｉｅｈｌ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．２００８，１４，９８５～９９０）、及びＤＮＡメチル化の定量的検出（Ｌｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００９，２７，８５８－Ｕ１１８）に利用されている。しかしながら、これらのエマルジョンは、微小滴の多分散、及び当該エマルジョンを形成するのに用いられる機械的撹拌の際に細胞を破壊し得る剪断応力を欠点として有する。微小流体工学の使用により、これらの課題が克服され、生化学アッセイ及び細胞ベースのアッセイの性能が改善されている（Ｚｅｎｇ，Ｙ．ら、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．２０１０，８２，３１８３～３１９０）。１０～１００μｍのチャネル直径の微小流体チップは、典型的に、標準的なソ

フトフォトリソグラフィー技術を使用して、水晶、シリコン、ガラス又はポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）から作製される（Ａ．Ｍａｎｚ，Ｎ．Ｇｒａｂｅｒ ａｎｄ Ｈ．Ｍ．Ｗｉｄｍｅｒ：Ｍｉｎｉａｔｕｒｉｚｅｄ ｔｏｔａｌ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｓｙｓｔｅｍｓ：Ａ Ｎｏｖｅｌ Ｃｏｎｃｅｐｔ ｆｏｒ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｅｎｓｉｎｇ，Ｓｅｎｓｏｒｓ ａｎｄ Ａｃｔｕａｔｏｒｓ，Ｂ Ｃｈｅｍｉｃａｌ（１９９０）２４４～２４８）。小滴は、典型的には、～１～１０Ｈｚの速度で、１つのチャネル中の水溶液を油の流れの中に流すことにより生成される。流れを収束させるノズルの使用により、サイズが制御された水相液滴の生成が可能となる。所定のノズルジオメトリーに関して、小滴サイズ及び小滴生成速度は、油相及び水相の流速の比率により制御される。チップのチャネル表面は、通常、例えば、公表された多くのシラン化化学（Ｚｅｎｇ，Ｙ．ら、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．２０１０，８２，３１８３～３１９０）のいずれかを用いて修飾することにより疎水化される。小滴を完全に機能的な微小容器とするため、疎水性及び親油性の油脂の使用が有益であり得る。その理由として、小滴間の分子拡散が最小であり、油は、水相に含まれる生物学的試薬の溶解度が低く、ガスの溶解性が良好で、それにより、特定の用途では、封入された細胞の生存を確保することが挙げられる。更に、小滴は合体する傾向があるため、特定の実施形態では、界面活性剤を油相に添加することが有用でありうる。界面活性剤は、微小滴の界面における生体分子の吸着も妨げ得る。ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と結合したパーフルオロ化ポリエーテル（ＰＦＰＥ）を含む、新規クラスのブロック共重合体界面活性剤を、フルオロカーボンオイル（例えば、フッ化油ＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）、すなわち、トリ－ｎ－ブチルアミンとジ（パーフルオロ（ｎ－ブチル））パーフルオロメチルアミンとの混合物）と共に使用した例が紹介されている（Ｈｏｌｔｚｅ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｌａｂ Ｃｈｉｐ，２００８，ＤＯＩ：１０．１０３９／ｂ８０６７０６ｆ）。これらの組成物は、非常に安定な、生物学的適合性を有するエマルジョンをもたらす（Ｂｒｏｕｚｅｓ、Ｅ．ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２００９、１０６（３４）、１４１９５～１４２００）。

【００７１】

微小流体チャネルを移動する小滴は、その表面張力により、個々の微小滴として維持され得る。表面張力に打ち勝ち、滴を必要に応じて結合させ、それにより、試薬の混合を可能にするための様々な方法も提案されており、例えば、チャネル内の受動的な、流れ減少要素の微細加工（Ｎｉｕ，Ｘ．ｅｔ ａｌ．，Ｌａｂ Ｃｈｉｐ ２００８，８，１８３７～１８４１）、静電荷の使用（電気的合体）（Ｚａｇｎｏｎｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｇｍｕｉｒ，２０１０，２６（１８），１４４４３～１４４４９）、又はマイクロチャネルジオメトリーの操作（ドロマイト合併チップ（Dolomite Merger chip）、国際公開第２０１２／０８３２２５号を参照）による方法が提案されている。ピコインジェクターにより微小流体チャネル中の小滴に試薬を添加する方法（電界により操作される、小滴チャネルに対して垂直な加圧された試薬充填チャネル）が、最近紹介され（Ａｂａｔｅ，Ａ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ２０１０，１０７（４５），１９１６３～１９１６６）、本明細書に記載の特定の企図される実施形態に応用することができる。

【００７２】

微小滴の内容物及び接触工程は、ゲノムＤＮＡと増幅プライマーとの間の核酸増幅相互作用を許容ように選択される。核酸増幅（例えばＰＣＲ）のための試薬及び条件は公知である。かかる増幅は、本明細書に記載の第１及び第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーのヌクレオチド配列を含む第１及び第２の二本鎖ＤＮＡ産物と、その相補的な配列が少なくとも得られるように進行する。このように、例えば、単一の融合微小滴は、（ｉ）少なくとも第１のユニバーサルアダプター配列と、バーコード配列と、ヘテロ二量体の第１の適応免疫受容体ポリペプチドの一部をコードするＶ領域及びＪ若しくはＣ領域の配列と、第２のユニバーサルアダプター配列と、を含む第１の二本鎖ＤＮＡ産物と、（ｉｉ）少なくとも第３のユニバーサルアダプター配列と、（ｉ）と同じバーコード配列と、ヘテロ二量体の第２の適応免疫受容体ポリペプチドの一部をコードするＶ領域及びＪ若しくはＣ領域の配列と、第４のユニバーサルアダプター配列と、を含む第２の二本鎖ＤＮＡ産物と

、を含みうる。

【００７３】

融合微小滴における増幅工程の条件は、次の工程の前に停止される。これは、微小滴が含まれる環境（例えば容器又はウェル）において温度を変化させて増幅プロセスを停止させることにより達成できる。

【００７４】

幾つかの実施形態では、前記方法は、複数の融合微小滴を崩壊させて第１及び第２の二本鎖産物の不均質混合物を得る工程を含む。前記崩壊は、微小滴の化学的性質及び組成に基づいて選ばれてもよく、例えば、化学的、生化学的及び／又は物理的な操作、例えば希釈剤、洗浄剤、カオトロピック剤、界面活性剤、浸透剤若しくは他の化学物質の添加、又は超音波処理、圧力、電界若しくは他の破壊的条件を用いて実施してもよい。好ましい条件は、微小滴中に含まれる内容物のため、及び／又は、崩壊工程により生じる不均質混合物のために、水性溶媒の使用を伴うと認識される。アッセイフォーマットとして個々の細胞の代わりに微小滴を用いることにより、サンプル中の投入細胞数に関するデータを分析することができる。ＰＣＲ及びシークエンシングのエラーを修正することができ、また、ＩＧ分子の場合、体細胞超変異（ＳＨＭ）による非生殖細胞の配列と、ＰＣＲエラーにより導入される非生殖細胞の配列とを区別することができる。

【００７５】

幾つかの実施形態では、前記方法は、第１及び第２の二本鎖ＤＮＡ産物の混合物と、本明細書に記載の第３及び第４の増幅プライマーセットとの接触を確実に行わせる工程を含む。この工程の条件は同様に、シークエンシング用のＤＮＡライブラリを得るための確立されたＤＮＡ増幅方法論を用いて達成でき、また、多数の確立されたＤＮＡシークエンシングのいずれの技術によっても達成され得る。特定の関連する実施形態では、それぞれの１つのリンパ系細胞又はそこから単離されるゲノムＤＮＡを含む第１の微小液滴を用いる代わりに、第１の微小液滴のそれぞれは、１つのリンパ系細胞のｍＲＮＡから逆転写された相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を含み、例えば適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１の鎖をコードする第１のｃＤＮＡと、ヘテロ二量体の第２の鎖をコードする第２のｃＤＮＡを含む。

【００７６】

特定の関連する実施形態では、個々の第２の微小滴は、リンパ球の状態の指標となる１つ以上の分子をコードする更なるｃＤＮＡ配列を増幅できる第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットを含み得る。第３のプライマーセットは、微小滴中の第１及び第２のプライマーセットに存在するのと同じバーコード配列で標識されている。かかる実施形態では、生物学的状態は、所定のＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体の配列が同定される単一ソースの細胞に関して決定することができる。生物学的状態は、活性化状態対静止状態、成熟段階、ナイーブ対メモリー、制御的対エフェクター、等でありうる。リンパ球の状態の指標分子の例としては、例えば、ｌｃｋ、ｆｙｎ、ＦｏｘＰ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ６２、ＣＤ６９、ＣＤ７１、ＣＤ１０３、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＨＬＡ－ＤＲなどが挙げられる。

【００７７】

特定の実施形態は、リンパ球の状態の指標分子をコードする第３のｃＤＮＡ配列を増幅できる第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットを含み、この場合第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットは、第１及び第２のプライマーセットに存在する同じバーコード配列で標識され、また、リンパ球の状態の指標分子としては、以下の１つ以上が挙げられる：ＦｏｘＰ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ２１、ＣＤ２５、ＣＤ２９、ＣＣＤ３０、ＣＤ３８、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ６２、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６９、ＣＤ７１、ＣＤ１０３、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１３８、ＣＤ１６１、ＣＤ２９４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ４、ＩｇＧｌ－４Ｈ－鎖定常領域、ＩｇＡ　Ｈ鎖定常領域、ＩｇＥ　Ｈ鎖定常領域、ＩｇＤ　Ｈ鎖定常領域、Ｉ

ｇＭ　Ｈ鎖定常領域、ＨＬＡ－ＤＲ、ＩＬ－２、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＴＧＦ－β、ＴＬＲｌ、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９及びＴＬＲ１０。

【００７８】

【表１】

表１：例示的なリンパ球の状態の指標

| 遺伝子名 | 状態マーカー: | ヒトの転写配列の受託番号 |
|---|---|---|
| FOXP3 | Treg細胞 | NM_014009、M_001114377 |
| IL9 | Th9細胞 | NM_000590 |
| CD21 | B細胞上のEBV受容体 | NM_001006658、NM_001877 |
| CD30 | 活性化されたT細胞及びB細胞、NK細胞単球、及びReed－Stemburg細胞（ホジキンリンパ腫） | NM_001243、NM_152942 |
| CD38 | 形質細胞、活性化B細胞及びT細胞 | NM_001775 |
| CD138 | 形質細胞 | NM_001006946、NM_002997 |
| CD45RA | ナイーブT細胞 | NM_002838、NM_080921、NM_001267798 |
| CD45RO | メモリーT細胞 | NM_002838、NM_080921、NM_001267798 |
| CD62L | 末梢リンパ節へのナイーブ細胞のホーミング | NM_000655 |
| CD294 | TH2細胞 | NM_004778 |
| Helios | 胸腺Treg細胞 | NM_001079526、NM_016260 |
| CD161 | NK細胞 | NM_002258 |
| IL2 | $CD4^+$T細胞及び若干のCD8＋T細胞 | NM_000586 |
| IL5 | TH2細胞 | NM_000879 |
| IL6 | マクロファージ、内皮細胞及びT細胞 | NM_000600 |
| IL10 | マクロファージ及びTH2細胞 | NM_000572 |
| TGF－$\beta$ | T細胞及びマクロファージ | NM_000660 |
| IL12B | マクロファージ及び樹枝細胞 | NM_002187 |
| IL12A | マクロファージ及び樹枝細胞 | NM_000882 |
| IL13 | TH2細胞 | NM_002188 |
| IL15 | マクロファージ | NM_0172175、NM_000585 |
| IL21 | 活性化T細胞（主にTH2、Th17及びNKT細胞） | NM_021803、NM_001207006 |
| CCR5 | T細胞及びマクロファージ | NM_000579、NM_001100168 |
| CXCR4 | T細胞 | NM_003467、NM_001008540 |
| IGHG1 | IgG1重鎖定常領域 | AJ294730、J00228 |
| IGHG2 | IgG2重鎖定常領域 | AJ294731、J00230 |
| IGHG3 | IgG3重鎖定常領域 | D78345 |
| IGHG4 | IgG4重鎖定常領域 | AJ294733、K01316 |
| IGHA1 | IgA1重鎖定常領域 | J00220 |
| IGHA2 | IgA2重鎖定常領域 | M60192、J00221 |
| IGHE | IgGE1重鎖定常領域 | L00022、J00222 |
| IGHD | IgD重鎖定常領域 | K02875、K02876、K02877、K02878、K02879、K02880、K02881、K02992、X57331 |
| IGHM | IgM重鎖定常領域 | J00260、K01310、X14939、X14940、X57331 |
| TLR1 | B細胞 | NM_003263 |
| TLR2 | T細胞及びB細胞 | NM_003264 |
| TLR3 | T細胞 | NM_003265 |
| TLR4 | T細胞 | NM_003266、NM_138554、NM_138557 |
| TLR5 | Treg、及びナイーブT細胞 | NM_003268 |

【００７９】

これらの、及び関連する実施形態は、上記に限定されず、その他にも考えられる実施形

態が存在し、それにより、それに加え、又はその代わりに、リンパ球の状態の指標分子をコードする第３のｃＤＮＡ配列を増幅できる第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットを含んでもよく、その場合、第３のプライマーセットが、第１及び第２のプライマーセットに存在するのと同じバーコード配列で標識され、リンパ球の状態の指標分子として、細胞表面受容体が含まれる。

【００８０】

細胞表面受容体の例としては、以下のものが挙げられる：ＣＤ２（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｙ００００２３、ＳＥＧ＿ＨＵＭＣＤ２、Ｍ１６３３６、Ｍ１６４４５、ＳＥＧ＿ＭＵＳＣＤ２、Ｍ１４３６２）、４－１ＢＢ（ＣＤｗ１３７、Ｋｗｏｎ ｅｔ ａｌ，１９８９ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１９６３）、４－１ＢＢリガンド（Ｇｏｏｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ，１９９３ Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：２３６１；Ｍｅｌｅｒｏ ｅｔ ａｌ，１９９８ Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３：１１６）、ＣＤ５（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ７８９８５、Ｘ８９４０５）、ＣＤ１０（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ８１５９１、Ｘ７６７３２）、ＣＤ２７（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ６３９２８、Ｌ２４４９５、Ｌ０８０９６）、ＣＤ２８（Ｊｕｎｅ ｅｔ ａｌ，１９９０ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １１：２１１、また、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｊ０２９８８、ＳＥＧ＿ＨＵＭＣＤ２８、Ｍ３４５６３を参照）、ＣＤ１５２／ＣＴＬＡ－４（例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ１５００６、Ｘ０５７１９、ＳＥＧ＿ＨＵＭＩＧＣＴＬ）、ＣＤ４０（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ８３３１２、ＳＥＧ＿ＭＵＳＣ０４０Ａ０、Ｙ１０５０７、Ｘ６７８７８、Ｘ９６７１０、Ｕ１５６３７、Ｌ０７４１４）、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ、例えば、Ｆａｒｒａｒ ｅｔ ａｌ．１９９３ Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１：５７１及びその引用文献、Ｇｒａｙ ｅｔ ａｌ．１９８２ Ｎａｔｕｒｅ ２９５：５０３，Ｒｉｎｄｅｒｋｎｅｃｈｔ ｅｔ ａｌ．１９８４ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５９：６７９０，ＤｅＧｒａｄｏ ｅｔ ａｌ．１９８２ Ｎａｔｕｒｅ ３００：３７９を参照）、インターロイキン４（ＩＬ－４、例えば、５３ｒｄ Ｆｏｒｕｍ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１９９３ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４４：５５３～６４３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．，１９９４ ｉｎ Ｔｈｅ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，２ｎｄ ｅｄ．，Ａ．Ｔｈｏｍｓｏｎ，ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｅ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，ｐ．９９；Ｋｅｅｇａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｊ Ｌｅｕｋｏｃｙｔ．Ｂｉｏｌ．．５５：２７２、及びその中の引用文献を参照）、インターロイキン－１７（ＩＬ－１７）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ３２６５９、Ｕ４３０８８）及び、インターロイキン－１７受容体（ＩＬ－１７Ｒ）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ３１９９３、Ｕ５８９１７）。

【００８１】

更なる細胞表面受容体としては、例えば以下のものが挙げられる：ＣＤ５９（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＳＥＧ＿ＨＵＭＣＤ５９０、Ｍ９５７０８、Ｍ３４６７１）、ＣＤ４８（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ５９９０４）、ＣＤ５８／ＬＦＡ－３（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ａ２５９３３、Ｙ００６３６、Ｅ１２８１７、また、特開１９９７－０７５０９０号を参照）、ＣＤ７２（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＡ３１１０３６、Ｓ４０７７７、Ｌ３５７７２）、ＣＤ７０（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｙ１３６３６、Ｓ６９３３９）、ＣＤ８０／Ｂ７．１（Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ，１９８９，７．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２７１４；Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ，１９９１ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４：６２５、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ３３２０８、１６８３３７９を参照）、ＣＤ８６／Ｂ７．２（Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ，１９９３ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７８：２１８５，Ｂｏｒｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ，１９９５ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５：５４９０、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０９９１０５、ＳＥＧ＿ＭＭＢ７２Ｇ、Ｕ３９４６６、Ｕ０４３４３、ＳＥＧ＿ＨＳＢ７２５、Ｌ２５６０６、Ｌ２５２５９を参照）、Ｂ７－Ｈ１／Ｂ７－ＤＣ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ ０１４１４３、ＡＦ１７７９３７、ＡＦ３１７０８８、Ｄ

ｏｎｇ ｅｔ ａｌ，２００２ Ｎａｔ．Ｍｅｄ．Ｊｕｎ ２４［ｅｐｕｂ ａｈｅａｄ ｏｆ ｐｒｉｎｔ］，ＰＭＩＤ １２０９１８７６、Ｔｓｅｎｇ ｅｔ ａｌ，２００１ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９３：８３９、Ｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ，２００１ Ｂｌｏｏｄ ９７：１８０９、Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ，１９９９ Ｎａｔ．Ｍｅｄ．５：１３６５）、ＣＤ４０リガンド（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＨＵＭＣＤ４０Ｌ、Ｘ６７８７８、Ｘ６５４５３、Ｌ０７４１４）、ＩＬ－１７（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ３２６５９、Ｕ４３０８８）、ＣＤ４３（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ５２０７５、Ｊ０４５３６）、ＩＣＯＳ（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＨ０１１５６８）、ＣＤ３（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿０００７３（γサブユニット）、ＮＭ＿０００７３３（εサブユニット）、Ｘ７３６１７（δサブユニット））、ＣＤ４（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０００６１６）、ＣＤ２５（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０００４１７）、ＣＤ８（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託Ｎｏ．Ｍ１２８２８）、ＣＤ１１ｂ（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｊ０３９２５）、ＣＤ１４（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＸＭ＿０３９３６４）、ＣＤ５６（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託Ｎｏ．Ｕ６３０４１）、ＣＤ６９（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託Ｎｏ．ＮＭ＿００１７８１）及びＶＬＡ－４（$\alpha_4\beta_7$）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ１２００２、Ｘ１６９８３、Ｌ２０７８８、Ｕ９７０３１、Ｌ２４９１３、Ｍ６８８９２、Ｍ９５６３２）。

【００８２】

以下の細胞表面受容体は、典型的にはＢ細胞と関連する：ＣＤ１９（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＳＥＧ＿ＨＵＭＣＤ１９Ｗ０、Ｍ８４３７１、ＳＥＧ＿ＭＵＳＣＤ１９Ｗ、Ｍ６２５４２）、ＣＤ２０（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号区分ＨＵＭＣＤ２０、Ｍ６２５４１）、ＣＤ２２（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．１６８０６２９、Ｙ１０２１０、Ｘ５９３５０、Ｕ６２６３１、Ｘ５２７８２、Ｌ１６９２８）、ＣＤ３０（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ８３５５４、Ｄ８６０４２）、ＣＤ１５３（ＣＤ３０リガンド（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ０９７５３、Ｍ８３５５４））、ＣＤ３７（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＳＥＧ＿ＭＭＣＤ３７Ｘ、Ｘ１４０４６、Ｘ５３５１７）、ＣＤ５０（ＩＣＡＭ－３（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ ００２１６２））、ＣＤ１０６（ＶＣＡＭ－１）（例えば、Ｘ５３０５１ ＧｅｎＢａｎｋ受託番号、Ｘ６７７８３、ＳＥＧ＿ＭＭＶＣＡＭ１Ｃ、また米国特許第５，５９６，０９０号を参照）、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ８４７３７、Ｓ８２８４７、Ｘ０６９９０、Ｊ０３１３２、ＳＥＧ＿ＭＵＳＩＣＡＭ０）、インターロイキン１２（Ｒｅｉｔｅｒ ｅｔ ａｌ，１９９３ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：１及びその中の引用文献）、ＣＤ１３４（０Ｘ４０、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＪ２７７１５１）、ＣＤ１３７（４１ＢＢ、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ１２９６４、ＮＭ＿００１５６１）、ＣＤ８３（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ００１０３６、ＡＬ０２１９１８）、ＤＥＣ－２０５（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０１１３３３、Ｕ１９２７１）。

【００８３】

他の細胞表面受容体の例としては、以下のものが挙げられる：ＨＥＲ１（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ４８７２２、ＳＥＧ＿ＨＥＧＦＲＥＸＳ、ＫＯ３１９３）、ＨＥＲ２（Ｙｏｓｈｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：２３９３；Ｄｉｓｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｃａｎｃ．Ｒｅｓ．５４：１６、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０３３６３、Ｍ１７７３０、ＳＥＧ＿ＨＵＭＨＥＲ２０を参照）、ＨＥＲ３（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ２９３３９、Ｍ３４３０９）、ＨＥＲ４（Ｐｌｏｗｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３ Ｎａｔｕｒｅ ３６６：４７３、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ 受託番号Ｌ０７８６８、Ｔ６４１０５）、上皮細胞増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ４８７２２、ＳＥＧ＿ＨＥＧＦＲＥＸＳ、ＫＯ３１９３）、血管内皮細胞増殖因子（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ番Ｍ３２９７７）、血管内皮細胞増殖因子受容体（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０２２３７５、

１６８０１４３、Ｕ４８８０１、Ｘ６２５６８）、インスリン様成長因子－Ｉ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ００１７３、Ｘ５６７７４、Ｘ５６７７３、Ｘ０６０４３、また、欧州特許番号ＧＢ２２４１７０３号を参照）、インスリン様成長因子－ＩＩ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０３５６２、Ｘ００９１０、ＳＥＧ＿ＨＵＭＧＦＩＡ、ＳＥＧ＿ＨＵＭＧＦＩ２、Ｍ１７８６３、Ｍ１７８６２）、トランスフェリン受容体（Ｔｒｏｗｂｒｉｄｇｅ ａｎｄ Ｏｍａｒｙ，１９８１ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．ＵＳＡ ７８：３０３９、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番Ｘ０１０６０、Ｍｌ １５０７を参照）、エストロゲン受容体（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ３８６５１、Ｘ０３６３５、Ｘ９９１０１、Ｕ４７６７８、Ｍ１２６７４）、黄体ホルモン受容体（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ５１７３０、Ｘ６９０６８、Ｍ１５７１６）、小胞刺激ホルモン受容体（ＦＳＨ－Ｒ）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｚ３４２６０、Ｍ６５０８５）、レチノイン酸受容体（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ１２０６０、Ｍ６０９０９、Ｘ７７６６４、Ｘ５７２８０、Ｘ０７２８２、Ｘ０６５３８）、ＭＵＣ－１（Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８９ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：７１５９、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号区分ＭＵＳＭＵＣＩＯ、Ｍ６５１３２、Ｍ６４９２８を参照）、ＮＹ－ＥＳＯ－１（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＪ００３１４９、Ｕ８７４５９）、ＮＡ １７－Ａ（例えば、欧州特許番号ＷＯ ９６／４００３９）、Ｍｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１（Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３５１５、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ０６６５４、Ｕ０６４５２を参照）、チロシナーゼ（Ｔｏｐａｌｉａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：９４６１、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ２６７２９、ＳＥＧ＿ＨＵＭＴＹＲＯを参照。また、Ｗｅｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ（１９９８）１０２：１２５８を参照）、Ｇｐ－１００（Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３５１５、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｓ７３００３を参照。また、欧州特許番号ＥＰ ６６８３５０、Ａｄｅｍａ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２０１２６を参照）、ＭＡＧＥ（ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｒｕｇｇｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５４：１６４３、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ９３１６３、ＡＦ０６４５８９、Ｕ６６０８３、Ｄ３２０７７、Ｄ３２０７６、Ｄ３２０７５、Ｕ１０６９４、Ｕ１０６９３、Ｕ１０６９１、Ｕ１０６９０、Ｕ１０６８９、Ｕ１０６８８、Ｕ１０６８７、Ｕ１０６８６、Ｕ１０６８５、Ｌ１８８７７、Ｕ１０３４０、Ｕ１０３３９、Ｌ１８９２０、Ｕ０３７３５、Ｍ７７４８１を参照）、ＢＡＧＥ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ１９１８０、また、米国特許第５，６８３，８８６号及び第５，５７１，７１１号を参照）、ＧＡＧＥ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０５５４７５、ＡＦ０５５４７４、ＡＦ０５５４７３、Ｕ１９１４７、Ｕ１９１４６、Ｕ１９１４５、Ｕ１９１４４、Ｕ１９１４３、Ｕｌ ９１４２）、ＳＳＸ２遺伝子によりコードされる特定のＨＯＭ－ＭＥＬ－４０抗原などのＣＴＡクラスの任意の受容体（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ８６１７５、Ｕ９０８４２、Ｕ９０８４１、Ｘ８６１７４）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ，Ｇｏｌｄ ａｎｄ Ｆｒｅｅｄｍａｎ，１９８５ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１２１：４３９、また、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＳＥＧ＿ＨＵＭＣＥＡ、Ｍ５９７１０、Ｍ５９２５５、Ｍ２９５４０）、及びＰｙＬＴ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｊ０２２８９、Ｊ０２０３８）。

【００８４】

また、リンパ球の状態の指標として、１つ以上のアポトーシスシグナリングポリペプチドが挙げられてもよく、その配列は、例えば以下の文献で論評されるように公知である：「Ｗｈｅｎ Ｃｅｌｌｓ Ｄｉｅ：Ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ａｎｄ Ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ」（Ｒ．Ａ．Ｌｏｃｋｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｅｄｓ．，１９９８ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、また、例えば、Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ，１９９８ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１：１３０９及びその中の引用文献、Ｆｅｒｒｅｉｒａ ｅ

ｔ ａｌ，２００２ Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｅ．Ｒｅｓ．８：２０２４、Ｇｕｒｕｍｕｒｔｈｙ ｅｔ ａｌ，２００１ Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓ．Ｒｅｖ．２０：２２５、Ｋａｎｄｕｃ ｅｔ ａｌ，２００２ Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．２１：１６５）．一般的に、アポトーシスシグナリングポリペプチド配列は、受容体デスドメインポリペプチドの全体又は一部を含むか、又はそれに由来し、例えば以下のものが挙げられる：ＦＡＤＤ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ２４２３１、Ｕ４３１８４、ＡＦ００９６１６、ＡＦ００９６１７、ＮＭ＿０１２１１５）、ＴＲＡＤＤ（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿００３７８９）、ＲＡＩＤＤ（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｕ８７２２９）、ＣＤ９５（ＦＡＳ／Ａｐｏ－１；例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ８９１０１、ＮＭ００３８２４、ＡＦ３４４８５０、ＡＦ３４４８５６）、ＴＮＦ－α－レセプター－１（ＴＮＦＲ１、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｓ６３３６８、ＡＦ０４０２５７）、ＤＲ５（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＡＦ０２０５０１、ＡＦ０１６２６８、ＡＦ０１２５３５）、ＩＴＩＭドメイン（例えば；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０８１６７５、ＢＣ０ｌ５７３１、ＮＭ ００６８４０、ＮＭ ００６８４４、ＮＭ ００６８４７、ＸＭ０１７９７７、また、例えばＢｉｌｌａｄｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０９：１６１を参照）、ＩＴＡＭ領域（例えば；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ ００５８４３、ＮＭ ００３４７３、ＢＣ０３０５８６、また、例えばＢｉｌｌａｄｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００２を参照）、又は、当技術分野で公知の他のアポトーシス関連受容体デスドメインポリペプチド、例えば、ＴＮＦＲ２（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号Ｌ４９４３１、Ｌ４９４３２）、カスパーゼ／プロカスパーゼ－３（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＸＭ＿５４６８６）、カスパーゼ／プロカスパーゼ－８（例えば、ＡＦ３８０３４２、ＮＭ＿００４２０８、ＮＭ＿００１２２８、ＮＭ ０３３３５５、ＮＭ ０３３３５６、ＮＭ ０３３３５７、ＮＭ ０３３３５８）、カスパーゼ／プロカスパーゼ－２（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ ａｃｃ．番号ＡＦ３１４１７４、ＡＦ３１４１７５）など。アポトーシスを受けていることが疑われる生物学的サンプルの細胞は、当業者に公知の、形態学的変化、透過性の変化、生化学変化、分子遺伝学的変化、又は他の変化に関して試験することができる。

【００８５】

これら及び関連する方法により、初めて、単細胞からのＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体の両方の鎖をコードする再構成されたＤＮＡ配列の迅速な決定が可能となる。かかる実施形態は、複数の単細胞のそれぞれからの適応免疫受容体コード配列のハイスループットシークエンシングを可能にすることにより、診断及び予後判定目的での用途に役立ち、同様にＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体の対形成、及びそれらの根底に存在する分子機構の免疫学的解析、に関して有益な情報を提供する。例えば、多数のＴＣＲ及び／又はＩＧヘテロ二量体の両方のサブユニットに関するＤＮＡ配列情報を迅速かつ大規模に利用できることは、合成抗体技術及び関連技術の開発を加速させる。例としては、抗体又はＴＣＲ若しくはＩＧ抗原結合領域の全部若しくは一部は、診断組成物、治療組成物、生体模倣組成物、酵素組成物、触媒組成物（例えばアブザイム）又は他の産業的用途において有用な組成物に有用に工学操作され得る。本発明に係る、ハイスループットＴＣＲ及び／又はＩＧのシークエンシングの定量的性質により、サンプル中に存在するＴＣＲ及び／又はＩＧのヘテロ二量体配列の高い精度の定量的特徴付けは、特定のＴ細胞又はＢ細胞クローンに属する細胞数の決定能を有利に向上させる。

【００８６】

前記のように、単一の適応免疫細胞に由来するＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体の両方の鎖を同定するためのこれらの実施形態により、いかなる所定の第２の微小滴においても、全てのオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、同じバーコードオリゴヌクレオチドを含むが、異なる第２の微小滴中では、当該プライマーセットは異なるバーコード配列を含む。したがって、配列のデータセットを得るために上記のように得られたＤＮＡライブラリのシークエンシングの後、データセットの配列を、同一のバーコード配列を有する配列の群に分類することができ、かかるバーコードグループは、Ｘ１又はＸ２配列（Ｖ及びＪ又はＣ

領域の部分を含む）を有する配列に更に分類されうる。それにより、所定の配列が、第１のＴＣＲ又はＩＧコード鎖（例えば、ＴＣＲＡ又はＩＧＨ鎖）、又は第２のＴＣＲ又はＩＧコード鎖（例えば、ＴＣＲＢ又はＩＧＬ鎖）の増幅産物を反映するか否かが示される。

【００８７】

バーコードにより、及びＴＣＲ又はＩＧ鎖により分類されている配列を更に、既知の多様なクラスタリングアルゴリズムのいずれかを使用したクラスター分析（例えば、ＢＬＡＳＴＣｌｕｓｔ，ＵＣＬＵＳＴ，ＣＤ－ＨＩＴ、また、ＩＥＥＥ Ｒｅｖ Ｂｉｏｍｅｄ Ｅｎｇ．２０１０；３：１２０～５４．ｄｏｉ：１０．１１０９／ＲＢＭＥ．２０１０．２０８３６４７；Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ ａｌｇｏｒｉｔｈｍｓ ｉｎ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ：ａ ｒｅｖｉｅｗ，Ｘｕ Ｒ，Ｗｕｎｓｃｈ ＤＣ ２ｎｄ；Ｍｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ Ｓｅｐ；３１（１）：５５～８０、Ｄａｔａ ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ ｉｎ ｌｉｆｅ ｓｃｉｅｎｃｅｓ．Ｚｈａｏ Ｙ，Ｋａｒｙｐｉｓ Ｇ；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１０；５９３：８１～１０７．ｄｏｉ：１０．１００７／９７８－１－６０３２７－１９４－３＿５、Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｎ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ ｃｌｕｓｔｅｒ ａｎａｌｙｓｉｓ．Ｆｒａｄｅｓ Ｉ，Ｍａｔｔｈｉｅｓｅｎ Ｒを参照）及び共有バーコード配列を有する他の配列とクラスターを形成することができないが、その代わりに、一塩基の相違を有するバーコードを有する配列とはクラスターを形成する配列の場合、エラーの修正に供してもよい。例えば、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１２ Ｊａｎ ２４；１０９（４）：１３４７～５２．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１１１８０１８１０９．Ｅｐｕｂ ２０１２ Ｊａｎ ９．Ｄｉｇｉｔａｌ ＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｍｉｎｉｍｉｚｅｓ ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｂｉａｓ ａｎｄ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｎｏｉｓｅ ｗｉｔｈ ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ｓｉｎｇｌｅ－ｍｏｌｅｃｕｌｅ ｂａｒｃｏｄｅｓ．Ｓｈｉｒｏｇｕｃｈｉ Ｋ，Ｊｉａ ＴＺ，Ｓｉｍｓ ＰＡ，Ｘｉｅ ＸＳ、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１２ Ｓｅｐ ４；１０９（３６）：１４５０８～１３．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．１２０８７１５１０９．Ｅｐｕｂ ２０１２ Ａｕｇ １．Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｕｌｔｒａ－ｒａｒｅ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｂｙ ｎｅｘｔ－ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ．Ｓｃｈｍｉｔｔ ＭＷ，Ｋｅｎｎｅｄｙ ＳＲ，Ｓａｌｋ ＪＪ，Ｆｏｘ ＥＪ，Ｈｉａｔｔ ＪＢ，Ｌｏｅｂ ＬＡ．を参照されたい。

【００８８】

したがって、特定の実施形態は、（ａ）配列のデータセット（上記のように得られる）を、その中で同定されるオリゴヌクレオチドバーコード配列により分類して、それぞれがユニークなバーコードを有する複数のバーコード配列セットを得る工程と、（ｂ）（ａ）のそれぞれのバーコード配列セットを、Ｘ１配列を含むサブセットとＸ２配列を含むサブセットに分類する工程と、（ｃ）Ｘ１及びＸ２の配列に従い、Ｘ１及びＸ２配列含有サブセットのそれぞれのメンバーをクラスター形成させて、それぞれ、１つ又は複数のＸ１配列クラスターセット及び１つ又は複数のＸ２配列クラスターセットを得、１つ以上の前記Ｘ１及びＸ２配列クラスターセット内のバーコード配列の一ヌクレオチドミスマッチをエラー修正する工程と、（ｄ）同じ１つ以上のバーコード配列セットに属するＸ１及びＸ２配列クラスターセットのメンバーである同じ細胞の配列に由来していることを同定する工程と、を含む。

【００８９】

非限定的な理論によれば、同じバーコード配列のセットにより出現する、第１及び第２の適応免疫受容体鎖コード配列は、同じ融合微小滴に由来する確率、すなわち、同じソース細胞に由来する確率が非常に高いと考えられる。例えば、$10^4$の異なるバーコードが、第１及び第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーの構築に用いられる場合、２つの独立した（すなわち、異なる細胞に由来する）二本鎖の第１及び第２の産物が同じバーコード配列を有する確率は、$10^8$分の１である。それゆえに、本発明に記載の方法に従って、３コピー以上の第１及び第２の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする配列（例えば

、Ｘ１及びＸ２）の所定のセットが、共通のバーコード配列（例えば、同じバーコード配列セットに属する）を共有する場合し、配列が独立した細胞起源の配列である確率は０に近づく。

【００９０】

同様に、本発明の方法により得られる配列のデータセットの分析が、ゲノムＤＮＡのリンパ系細胞ソースの生物学的状態を特徴づけることにも用いられ得ると認識される。例えば、Ｂ細胞におけるＩＧＨ遺伝子の再構成が、ＩＧＬ遺伝子の再構成より先に起こることが知られているため、本明細書に記載のバーコード配列の分析を行うことにより、単一のリンパ系細胞の多数のゲノムが、同じ再構成されたＩＧＨ配列を有するが異なるＩＧＬ配列を有することが明らかとなり得て、それらの配列の起源が免疫学的にナイーブな細胞であることを示している。

【００９１】

あるいは、当該分析は、Ｔ細胞が、それらの機能に特異的なタンパク質（例えば本明細書に記載されるリンパ球の状態の指標分子）を発現するという知見利用してもよい。例えば、制御性Ｔ細胞は、タンパク質ＦＯＸＰ３を発現する。Ｔ細胞ｍＲＮＡから逆転写されているｃＤＮＡをその後増幅する場合、共増幅産物は、ＴＣＲＢ及びＴＣＲＡ分子をコードするｃＤＮＡｓと共に、ＦＯＸＰ３のような表現型特異的なタンパク質をコードする他のｍＲＮＡを反映するｃＤＮＡ種を含みうる。このアプローチにより、特異的な表現型を有するＴ細胞（例えば制御性Ｔ細胞又はエフェクターＴ細胞）により発現される適応免疫受容体の同定が可能となり得る。

【００９２】

すなわち、本発明では、１つのリンパ系細胞の適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチド配列をコードする再構成されたＤＮＡ配列を決定する方法が提供され、当該方法は、（１）それぞれが１つのリンパ系細胞又はそこから単離されるゲノムＤＮＡを含む（Ａ）個々の第１の微小滴と、複数の第２の微小液滴からの（Ｂ）個々の第２の微小滴と、を接触させる工程であって、それぞれの微小滴が、（ｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドの第１の相補性決定領域－３（ＣＤＲ３）をコードする再構成されたＤＮＡ配列を増幅できる、第１のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットと、（ｉｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドの第２の相補性決定領域－３（ＣＤＲ３）をコードする再構成されたＤＮＡ配列を増幅できる、第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットと、を含む、工程を含む方法が提供される。第１のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットは、一般式：Ｕ１／２－Ｂ１－Ｘ１の複数のオリゴヌクレオチド配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を含み、式中、Ｕ１／２は、Ｂ１が存在する場合には、第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含み、Ｂ１が存在しない場合には、第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、Ｂ１は、何も含まないか、又は、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９若しくは２０個の連続するヌクレオチドを有する第１のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドを含み、Ｘ１は、以下のうちの１つであるオリゴヌクレオチドを含む：（ａ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドの、適応免疫受容体の可変（Ｖ）領域コード遺伝子配列、又はその相補配列の、少なくとも２０、３０、４０又は５０個で、かつ、１００、９０、８０、７０又は６０個を超えない、連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ１／２－Ｂ１－Ｘ１の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ１がユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド；（ｂ）含む（ｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドの、適応免疫受容体の連結（Ｊ）領域コード遺伝子配列若しくはその相補配列、又は、（ｉｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドのための、適応免疫受容体定常（Ｃ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配列のいずれかの、少なくとも１５～３０個又は３１～５０個で、かつ、８０、７０、６０若しくは５５個を超えない連続するヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ１／２－Ｂ１

－Ｘ１の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘがはユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットは、一般式：Ｕ３／４－Ｂ２－Ｘ２の複数のオリゴヌクレオチド配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を含み、式中、Ｕ３／４は、Ｂ２が存在する場合には、第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含み、Ｂ２が存在しない場合には、第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドを含む。Ｂ２は、存在しないか、又は、Ｂ１と同様の６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９若しくは２０個の連続するヌクレオチドの第２のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドを含み、Ｘ２は、以下のうちの１つであるオリゴヌクレオチドを含む：（ａ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドのための、適応免疫受容体の可変（Ｖ）領域をコードする遺伝子配列、又はその相補配列である、少なくとも２０、３０、４０又は５０個で、かつ、１００、９０、８０、７０又は６０個を超えない、連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ３／４－Ｂ２－Ｘ２の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ２がユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド；（ｂ）含む（ｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドのための、適応免疫受容体の連結（Ｊ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配列、又は、（ｉｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドのための、適応免疫受容体定常（Ｃ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配のいずれかの、少なくとも１５～３０個又は３１～５０個で、かつ、８０、７０、６０若しくは５５個を超えない連続するヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ３／４－Ｂ２－Ｘ２の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ２がユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。接触させる工程は、第１の微小滴のうちの１つと第２の微小滴のうちの１つとの間での複数の融合事象が起こるために十分な条件及び時間にて行うことで、複数の融合微小滴を生産することができ、この微小滴において、ゲノムＤＮＡと第１及び第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットとの間で、核酸増幅相互作用が起こり、１つ以上の前記複数の融合微小滴において：少なくとも１つの第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、少なくとも１つの第１のオリゴヌクレオチドバーコード配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドの少なくとも１つのＸ１オリゴヌクレオチドＶ領域をコードする遺伝子配列と、少なくとも１つの第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドの少なくとも１つのＸ１オリゴヌクレオチドＪ領域又はＣ領域をコードする遺伝子配列と、を含む第１の二本鎖ＤＮＡ産物が得られる。また、上記の条件により、１つ以上の前記複数の融合微小滴のそれぞれにおいて：少なくとも１つの第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、少なくとも１つの第２のオリゴヌクレオチドバーコード配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドの少なくとも１つのＸ２オリゴヌクレオチドＶ領域をコードする遺伝子配列と、少なくとも１つの第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドの少なくとも１つのＸ２オリゴヌクレオチドＪ領域又はＣ領域をコードする遺伝子配列と、を含む第２の二本鎖ＤＮＡ産物を得ることができる。

【００９３】

前記方法はまた、複数の融合微小滴を崩壊させて、前記第１及び第２の二本鎖ＤＮＡ産物の不均質混合物を得る工程と、第１及び第２の二本鎖ＤＮＡ産物の混合物と、第３の増幅プライマーセット及び第４の増幅プライマーセットとを、接触させる工程と、を含む。幾つかの実施形態では、第３の増幅プライマーセットは、（ｉ）第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれが含む、複数の第１のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第１のシークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列と、（ｉｉ）第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴ

ヌクレオチド配列をそれぞれ含む、複数の第２のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第２のシークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列と、を含む。他の実施形態では、第４の増幅プライマーセットは、（ｉ）第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれ含む、複数の第３のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第３のシークエンシングプラットホームに特異的なオリゴヌクレオチド配列と、（ｉｉ）第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれ含む、複数の第４のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第４のシークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列と、を含む。前記接触させる工程は、（２）の第１及び第２の二本鎖ＤＮＡ産物の両方の鎖を増幅するのに十分な条件及び時間にて行い、シークエンシング用にＤＮＡライブラリを得ることができる。前記方法はまた、（３）で得たＤＮＡライブラリをシークエンシングして、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチド配列をコードする配列のデータセットを得ることを含む。

【００９４】

図２は、１つのリンパ系細胞又はゲノムＤＮＡを含む複数の第１の微小滴２１０が、複数の個々の第２の微小滴２２０と融合して、複数の融合微小滴２３０を形成する、１つの方法を例示する。本明細書の記載のように、第２の複数の小滴は、増幅プライマーセットを含むことができ、融合小滴を、増幅プライマーが小滴内で１つのリンパ系細胞に存在するＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ（又はｃＤＮＡ）を増幅できる条件下に置くことができる。

【００９５】

これらの、及びこれらと関連する実施形態により、同じ細胞からの適応免疫受容体ヘテロ二量体（例えばＩＧＨ＋ＩＧＬ、又はＩＧＨ＋ＩＧＫ、又はＴＣＲＡ＋ＴＣＲＢ、又はＴＣＲＧ＋ＴＣＲＤ）の両方の鎖をコードする再構成された遺伝子のハイスループットシークエンシングが可能となる。有利なことに、このアプローチはまた、所定のＴＣＲ又はＩＧを有する細胞数の定量化を可能にする。典型的な実施形態の概要を図３に示す。それらは、前記と非常に類似する工程で実施されるが、有意に異なる点は、１つのリンパ系細胞由来のＤＮＡと、本明細書に記載の第１及び第２の増幅プライマーセットと、を接触させる工程により、ユニークな分子タグ付けバーコードが組み込まれる第１の増幅反応が１つの微小滴内で起こる点であり、これらの微小滴は、例えばそれらのいずれも、本明細書に記載の組成物及び方法で使用するために当業者によって適合され得る、ＲａｉｎＤａｎｃｅ（商標）微小滴デジタルＰＣＲシステム（ＲａｉｎＤａｎｃｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）（例えば、Ｐｅｋｉｎら、２０１１ Ｌａｂ．Ｃｈｉｐ １１（１３）：２１５６；Ｚｈｏｎｇら、２０１１ Ｌａｂ．Ｃｈｉｐ １１（１３）：２１６７；Ｔｅｗｈｅｙら、２００９ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２７：１０２５；２０１０ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２８：１７８）、又は他の同等のシステムで使用されるエマルジョンから形成される。複数の別個のｄｓＤＮＡ産物への、複数のユニークな分子タグ付けバーコードの取り込みの後、微小滴を破壊してもよく、また、シークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチドの増幅及び導入を含む次の工程を、本明細書に記載され、図３に示されるように実施してもよい。

【００９６】

これらの、及びこれらと関連する実施形態では、１つのタグ付けバーコード（ＢＣ１）は、全てのＪプライマー（又は特定の実施形態では全てのＶプライマー）により共有されてもよく、特異的で予め同定されたバーコード配列の有限の組を用いて、かかるプライマーを作製することは、望ましいと考えられる。しかしながら、ただ１つのタグ付けバーコード配列（ＢＣ１）が、第１工程の間、いずれか所定の微小滴中に存在するであろう。それゆえに、本発明で提供されるような、複数の異なるリンパ系細胞を含むサンプルを開始

材料として行なうシークエンシング工程の後で、膨大かつ多様なセットのシーケンス情報が得られる。かかる情報の解析には、同じタグ付けバーコード（ＢＣ１）を含む第１及び第２のＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体ポリペプチド鎖コード配列を決定する工程が含まれてもよく、それにより、蓋然性に基づき、非常に高い可能性で、両方の鎖が同じ細胞由来の産物であることが示される。したがって、本発明の開示は、サンプル中の、同じ細胞にて発現するＴＣＲ又はＩＧヘテロ二量体の両方の鎖の相対的表示を決定及び定量化するための組成物及び方法を、初めて提供するものである。

【００９７】

微小滴を用いない、クローン性ヘテロ二量体配列の決定：

特定の他の実施形態では、単一の細胞中の第１及び第２の適応免疫受容体ヘテロ二量体ポリペプチド配列をコードする再構成されたＤＮＡ配列の決定は、それぞれが、１つのリンパ系細胞のゲノムＤＮＡ（又はそれに由来するｍＲＮＡから逆転写されているｃＤＮＡ）と、オリゴヌクレオチド増幅プライマーセットと、を含む第１及び第２の微小滴の異なる集団を最初に調製せずに実施することができる。

【００９８】

その代わりに、これらの他の実施形態では、当該細胞を、複数の容器、例えばマルチウェルの細胞培養プレート又はアッセイプレート（例えば、９６、３８４、又は、１５３６ウェルのフォーマット）の複数のセルに分配することにより、リンパ系細胞を含有する細胞懸濁液（例えば、対象の血球調製物又はその細胞部分集団）中の細胞を部分集団に分配することを企図する。当業者であれば、ウェル、容器、チューブ、区画等あたりの望ましい細胞数を得るために、例えば蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣ）、又は少量型の自動分配機、又は限界希釈法を使用して、細胞懸濁液を、かかる複数の容器に分配するための装置及び方法を認知している。特定の実施形態では、それぞれの容器に実質的に同じ数の細胞を分布させることが好ましいと考えられるが、他の企図される特定の実施形態をそのように制限する必要はない。

【００９９】

手短に言えば、これらの及び関連する実施形態では、分離されたリンパ系細胞の部分集団は、逆転写（ＲＴ）工程（図４及び５を参照）の間に同時に標識されるｃＤＮＡ分子を生産するための逆転写テンプレートとして用いられるｍＲＮＡ分子を提供しうる。図４は、オリゴヌクレオチドバーコード及びユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列をｃＤＮＡに組み込ませるオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを用いることによって、逆転写の間、適応免疫受容体ポリペプチドコードｃＤＮＡを標識する工程の略図を表す。ｃＤＮＡ鎖は、ｐＧＥＸ－Ｒｅｖ配列と、バーコードＢＣ及びＮ６スペーサー配列（ＢＣ－Ｎ６）と、「Ｃｎ－ＲＣ」と、を含むプライマーにより増幅される。増幅されたｃＤＮＡ鎖の３’末端は、ｐＧＥＸ－ＦＲＣ配列、バーコードＢＣ－Ｎ６スペーサー配列及び「Ｓｍａｒｔｅｒ　ＵＡＩＩ」配列を含む。増幅されたｃＤＮＡのウェル又は容器をプールして、ＳＰＲＩビーズ精製を第１のｃＤＮＡ鎖のプールに対して行う。ＰＣＲ増幅は、テーリング－ｐＧＥＸ　Ｆ／Ｒ配列を用いて実施される。アンプリコンは、サイズに基づいて精製・選抜される。得られたｃＤＮＡアンプリコンを、図４に示す。

【０１００】

図５は、ｃＤＮＡにオリゴヌクレオチドバーコード及びユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を組み込ませるオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを用いることによって、逆転写の間、適応免疫受容体ポリペプチドをコードするｃＤＮＡを標識する工程の略図を表す。図６は、増幅された適応免疫受容体ポリペプチドコードｃＤＮＡをＩｌｌｕｍｉｎａシークエンシングアダプターにより修飾後にシークエンシングに供されるＤＮＡ産物の略図を表す。当該ｃＤＮＡは、オリゴヌクレオチドバーコード及びユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を組み込ませるオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを用いることにより、逆転写の間、標識されている。

【０１０１】

本明細書に示すように、かかる実施形態のオリゴヌクレオチドＲＴプライマーは、Ｖ、

Ｊ又はＣ領域配列などの、標的適応免疫受容体コード領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド配列を含み、また、分子標識としてのオリゴヌクレオチドバーコード配列と、本明細書に記載のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、を含む。適応免疫受容体をコードするｍＲＮＡからの逆転写プロセスはこのように、（ｉ）ソース識別子としてのオリゴヌクレオチドバーコード配列と、（ｉｉ）本明細書に記載のように自動化ハイスループットシークエンシングを促進するユニバーサルアダプターの、ｃＤＮＡ産物への組み込みを伴いうる。説明を目的とし、限定しないが、これらの実施形態のうちの幾つかでは、１つの特定の容器（例えばマルチウェルプレート１つのウェル）の内容物と接触するオリゴヌクレオチドＲＴプライマーセットの全てのＲＴプライマーは、共通のバーコードオリゴヌクレオチド配列（Ｂ）を共有し、異なるバーコードオリゴヌクレオチド配列（Ｂ）は、それぞれ別々の容器（例えばマルチウェルプレートのそれぞれのウェル）に存在する。

【０１０２】

例えば、細胞懸濁液（例えば、血球又はその分画（有核細胞、リンパ系細胞等））を、マルチウェルプレートの異なるウェルにランダムに分配することによって分け、細胞を物理的にサブセットに分離させてもよい。次に、それぞれのウェル中の細胞のサブセットは、任意の従来の手法により溶解又は処理し、細胞中に存在するｍＲＮＡを放出させることができる。当該ｍＲＮＡとしては、細胞により発現されるＴＣＲ（例えばＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ、又はＴＣＲＧ及びＴＣＲＧ）又はＩＧ（例えばＩＧＨ及びＩＧＬ）ヘテロ二量体の両方の鎖をコードするｍＲＮＡを含んでもよく、１つ以上のリンパ球の状態の指標分子をコードするｍＲＮＡも含んでもよい。

【０１０３】

ｍＲＮＡは次に、確立した逆転写（ＲＴ）プロトコルを修正してｃＤＮＡ合成の鋳型として用いることができる。その際、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットを使用して、ＴＣＲ又はＩＧコード配列又はその相補配列（図４～５参照）と連結されるユニークなオリゴヌクレオチドバーコード配列を、それぞれのウェル中で、ｃＤＮＡ産物に導入することができる。バーコードの外側（例えば、バーコードに対して、ＴＣＲ又はＩＧコード配列の遠位側）に、本明細書に記載されるユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列及び／又は、他の既知のオリゴヌクレオチド配列特徴が導入されるよう、オリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットを設計してもよく、配列特徴の例は、自動化ハイスループット定量的シークエンシングと適合する工程などの、下流の増幅、処理及び／又は他の操作工程を容易にし得る特徴である。

【０１０４】

逆転写ｃＤＮＡ産物のＤＮＡ増幅の後、マルチウェルプレートの所定のウェルの中のそれぞれの増幅されたＤＮＡ分子は、同じオリゴヌクレオチドバーコード配列を有する一方で、それぞれの異なるウェル中の増幅産物のバーコード配列は、互いに異なる。このように、それぞれのウェルでは、適応免疫受容体ヘテロ二量体（例えば、ＩＧＨ及びＩＧＬ、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ、ＴＣＲＧ及びＴＣＲＤ）のいずれかの鎖をコードする全てのＤＮＡ分子は、同じオリゴヌクレオチドバーコード配列を有する。

【０１０５】

増幅産物をプールして、本明細書に記載の自動化ハイスループットＤＮＡシークエンシングを用いて定量的にシークエンシングして、配列のデータセットを得ることができ、データセットには、連結されたオリゴヌクレオチドバーコード配列とともに、ＴＣＲ及び／又はＩＧ配列が含まれる。本明細書に記載のように、特定の好ましい実施形態では、配列のデータセットを、組み合わせ論アプローチにより分析してもよく、それにより、適応免疫受容体ヘテロ二量体サブユニットコード配列の特定の対をマッチングさせて、それらが同じリンパ系細胞由来であるとして同定することができる。

【０１０６】

非限定的な例示としては、リンパ系細胞懸濁液を分配した１００ウェルのセットから、仮定的な配列データセットを得てもよい。それぞれのウェルにおいて、細胞のｍＲＮＡ

ｃＤＮＡは、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢコード配列の部分と特異的な、第１及び第２のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットをそれぞれ用いて、逆転写される。オリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットはまた、それぞれの異なるウェル中のｃＤＮＡ産物に、異なるオリゴヌクレオチドバーコード配列を導入する。仮定的ではあるが、単一の、共通のクローン起源を有するＴ細胞（例えば、同一のＴＣＲＡ／Ｂ配列を発現するＴ細胞）を、１００ウェル中の５つの異なるウェルにランダムに分配した場合、配列データセットには、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列のユニークな対が、同一のバーコード配列を共有するＤＮＡ増幅産物中に存在する５つの別々の例が含まれるであろう。言い換えると、５つの別々のウェルのそれぞれにおいて、オリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットは、同一の再構成されたＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列を有するｃＤＮＡｓの生成を促進するが、それぞれのウェルのｃＤＮＡ産物は、異なる、ウェルに特異的なバーコード配列を含む。非限定的な理論によると、蓋然性に基づき、そのメンバーが５つの異なるウェルにランダムに分配されるユニークなＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ配列の対は、同じＴ細胞クローンに由来する可能性が非常に高い。

【０１０７】

特定の実施形態では、１つのリンパ系細胞中の、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチド配列をコードする再構成されたＤＮＡ配列を決定するこのハイスループットな方法のより詳細な説明は、以下の通りである。

【０１０８】

リンパ系細胞を、密度勾配遠心分離（例えばＦｉｃｏｌｌＰａｑｕｅ（登録商標）、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いて、又は抗体でコーティングした磁気ビーズ（例えばＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ（Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）社製のＣＤ４５ビーズ）に結合させることにより、抗凝固全血サンプルから単離する。あるいは、Ｔリンパ球を、ＣＤ３＋磁気ビーズとの結合により全血サンプルから精製してもよく、Ｂリンパ球を、ＣＤ１９＋磁気ビーズとの結合により全血サンプルから精製してもよい。単離された細胞集団を、生存率に関してチェックしてもよい。死細胞を、フィルター、例えばＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ死細胞除去キットを用いてサンプルから除去してもよい。用途に応じて、単離された生存リンパ系細胞（例えば、非ソーティング末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に存在し得るか、又は、特定の細胞サブセットの調製物として）を、短期間、細胞培養してもよく、また特定の実施形態では、細胞を、既知の多くの活性化方法のいずれか（例えば、１つ以上のサイトカイン、ケモカイン、特異抗体、有糸分裂促進剤、ポリクローナルアクチベーター等への曝露）を用いて活性化してもよい。最終的な細胞サンプルは、細胞を、細胞の凝集防止剤（例えば０．１％ ＢＳＡ、１％ Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ－６８）を添加した培養培地（例えば、１０％ウシ胎児血清添加ＲＰＭＩ培地）又は適切な等張緩衝液（例えば、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ））中に再懸濁して調製してもよい。あるいは、全血又はＰＢＭＣをソーティングせずに利用してもよい。最も一般的な場合、Ｂ細胞又はＴ細胞を水溶液中に含む懸濁液として存在する任意の細胞セットが用いられ得る。

【０１０９】

複数のリンパ系細胞を含む細胞調製物は、例えば細胞懸濁液を、細胞を含むことができる複数の容器又は区画に分配することにより、複数の物理的に分離されたサブセットに分け、それぞれがリンパ系細胞の部分集団を含む複数の容器又は区画を得るが、それぞれの部分集団は、１つのリンパ系細胞又は複数のリンパ系細胞を含み、それぞれの容器又は区画は、内容物が相互に流体連通しないよう、物理的に分けられている。それぞれの容器が実質的に同等数の細胞を含むように、複数の容器に細胞を分配又は分割するのが好ましく、それによって、それぞれの容器中に同数の細胞が存在してもよく、又は、それぞれの容器中の細胞数が、他の任意の容器中の細胞数の、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１３０、３１～５０、５１～７０、７１～８０又は８１～１００％以内で存在してもよい。典型的な容器は、マルチウェルの培養若しくはアッセイ用プレート（６、１２、２４、４８、９６、

３８４、又は、１５３６ウェルのマルチウェルプレート）であり得るが、又は他の任意のマルチウェルプレートのフォーマット、チューブアレイ、フィルタ、ミクロ加工されたウェルアレイ、レーザ生成マトリックス又は細胞を含むことができる他の任意の適した容器も同様に企図される。特定の典型的な実施形態では、蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）により、細胞を複数の容器に分配してもよい。予め定められた数の細胞を単離し、ＦＡＣＳを用いてソーティングして、マルチウェル（例えば９６、３８４又は１５３６ウェルの）反応プレートに添加してもよい。任意の方法論及び装置を用いて、マルチウェルプレート（例えばＢｅｃｋｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳＡｒｉａ（登録商標）ＩＩＩ，Ｂｅｃｋｍａｎ ＭｏＦｌｏ（商標）ＸＤＰ等）上への細胞の調製的ソーティングができるフローサイトメトリを実施してもよい。ＦＡＣＳにより、細胞の特定のサブセットを、抗体染色、生細胞染色又は特異的な細胞染色試薬の多色組合せを通じて単離することが可能となる。セルソーターを用いて、標的細胞を計数し、マルチウェルプレートのそれぞれのウェルに指定された数の細胞を堆積（１０～２０％ＣＶ）させてもよい。あるいは、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ ＢｉｏＲＡＰＴＲ ＦＲＤ（商標）、ＬａｍｂｄａＪｅｔ（商標）ＩＩＩＭＴ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）（ＣｙＢｉ）（商標）Ｄｒｏｐ（Ｊｅｎａ ａｎａｌｙｔｉｋ社製）、Ｆｕｒｕｋａｗａ Ｐｅｒｆｌｏｗ（商標）又は同様の装置など、高密度マイクロウェルプレート（３８４、１５３６、３４５６ウェル）上へ均一な細胞懸濁液を好ましくは非接触で分配できる、自動化された低用量（ウェル当たりｎＬ～μＬ量）ディスペンサーを用いて、高い精度及び再現性（１０～２０％ＣＶ）で、回収用マルチウェルプレートのそれぞれのウェルに指定された数の細胞を堆積させてもよい。

【０１１０】

適応免疫受容体をコードするポリヌクレオチド配列を、次に、全てのサンプルに付されたユニークな、ウェル特異的バーコードオリゴヌクレオチドを用いて、各ウェルから増幅される。これを行う１つの方法は、逆転写により細胞内のｍＲＮＡをｃＤＮＡに変換し、逆転写工程の間、オリゴヌクレオチドバーコードの形の分子標識をｃＤＮＡ産物に添加することである。ウェル中のそれぞれのヘテロ二量体適応免疫受容体分子の両方の鎖（例えば、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ鎖、ＴＣＲＧ及びＴＣＲＤ鎖）をコードするｍＲＮＡと相補的なｃＤＮＡｓに、同じバーコードが添加されうる。この、及びこれと関連する実施形態では、抗原受容体コード配列は、ｍＲＮＡから逆転写により合成されるｃＤＮＡから増幅され、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）は増幅されない。これを行うため、マイクロウェルプレート中のそれぞれのウェルは、ＲＮａｓｅインヒビターを含有する試薬、並びに、細胞内のＲＮＡを保護するるように設計された媒体（Ｑｉａｇｅｎ ＲＮＡｌａｔｅｒ（商標）、Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）又は、細胞を溶解させてＲＮＡを単離するための媒体（Ｔｒｉｚｏｌ，ｇｕａｎｉｄｉｕｍ ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ－Ｑｉａｇｅｎ ＲＮｅａｓｙ（商標）等）を含み得る。次に、抽出された全細胞ＲＮＡを、ロボット操作のリキッドハンドラーを用いて、逆転写反応のために、別のマルチウェルプレートに移してもよい。あるいは、ソートされた細胞を、ＲＮａｓｅインヒビターを含む逆転写反応ミックス中で直接溶解してもよい。逆転写反応（ＲＴ）は、細胞ＲＮＡを、適切なバッファー、ｄＮＴＰｓ、酵素（逆転写酵素）及び一組のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーを含有する反応ミックスに曝露することにより開始されうる。これらのプライマーは通常、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、Ｉｇκ、Ｉｇλ、ＴＣＲα、β、γ及びδの定常領域（Ｃ－セグメント）の遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド配列とアニールし得る多数のプライマーのサブセット、並びに、ユニバーサルテンプレートスイッチオリゴヌクレオチド（例えば、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｓｍａｒｔｅｒ（商標）ＵＡＩＩ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ，Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を含む。例えば、Ｃ－セグメント遺伝子特異的プライマー、又はＣｌｏｎｔｅｃｈ Ｓｍａｒｔｅｒ（商標）ＵＡＩＩオリゴヌクレオチド、又はその両方は、長さが６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５．．．その他の塩基対のユニークな配列である、ＤＮＡバーコードでユニークにタグ付けされる。ＲＴ反

応プレート中のそれぞれのウェルは、同数のプライマーを含み、混合物中の中のそれぞれのプライマーは、同じＤＮＡバーコードをタグ付けされるが、それぞれのウェルでは異なるバーコードが用いられる。このように、逆転写反応が終了したとき、所定のウェル中のそれぞれの第１鎖ｃＤＮＡ分子は、同一のＤＮＡバーコード配列でバーコード標識される。

【０１１１】

【表２】

第１鎖ｃＤＮＡ合成用の、ＢＣＲ／ＴＣＲ　Ｃセグメントのプライマーのリスト：

| 名称 | | 配列番号: |
|---|---|---|
| Ck | GATGAAGACAGATGGTGCAGC | 5579 |
| Cl－1 | GGCGGGAACAGAGTGAC | 5580 |
| Cl－2 | AGGGTGGGAACAGAGTGAC | 5581 |
| Cl－3 | GCTTGAAGCTCCTCAGAGG | 5582 |
| Cl－4 | GGCGGGAACAGAGTGAC | 5583 |
| IgA | AGGCTCAGCGGGAAGAC | 5584 |
| IgD | GAACACATCCGGAGCCTTG | 5585 |
| IgE | GGTGGCATTGGAGGGAATG | 5586 |
| IgG－1 | AAGACCGATGGGCCCTTG | 5587 |
| IgG－2 | CTCTCGGAGGTGCTCCTG | 5588 |
| IgM | AATTCTCACAGGAGACGAGGG | 5589 |
| TCRa | TGGTACACGGCAGGGTC | 5590 |
| TCRA RACE JB2 | AGTCTCTCAGCTGGTACACGGCAGGGTC5’－AGT CTCTCA GCTGGTACAC GGCAGGGTC－3’ | 5591 5591 |
| TCRA_50 | 5’－ACA GAC TTG TCA CTG GAT TTA GAG TCT CTC AGC TGG TAC ACG GCA GGG TC－3’ | 5592 |
| TCRB_50 | 5’－GAG ATC TCT GCT TCT GAT GGC TCA AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG AAC AC－3’ | 5593 |
| TCRb－1 | CAAACACAGCGACCTCGG | 5594 |
| TCRb－2 | ATGGCTCAAACACAGCGAC | 5595 |
| TRCd－1 | GAT GGTTT GGT AT G AGGCTGAC | 5596 |
| TCRd－2 | CCTT C ACC AG AC AAGCG AC | 5597 |
| TCRg－1 | GAAAAAT AGT GGGCTT GGGGG | 5598 |
| | Bolotinらのプライマー（Eur. J. Immunol. 2012） | |
| TCRb_BC1R | CAGTATCTGGAGTCATTGA | 5599 |
| TCRb_BC2R | TGCTTCTGATGGCTCAAACAC | 5600 |
| | Glanvilleらのプライマー（PNAS 2011） | |
| IgM_RACE | 5’－GATGGAGTCGGGAAGGAAGTCCTGTGCGAG－3’ | 5601 |
| IgG_RACE | 5’－GGGAAGACSGATGGGCCCTTGGTGG－3’ | 5602 |
| IgA_RACE | 5’－CAGGCAKGCGAYGACCACGTTCCCATC－3’ | 5603 |
| Igκ_RACE | 5’－CATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGC－3’ | 5604 |
| Igλ_RACE | 5’－CCTCAGAGGAGGGTGGGAACAGAGTGAC－3’ | 5605 |
| TCRB_RACE | 5’－GCTCAAACACAGCGACCTCGGGTGGGAACAC－3’ | 5606 |
| | Clontech社スマーター（Smarter）プライマー | |
| スマーターUAII | 5－AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACrGrGrGrGrG－P－3 | 5607 |
| Islam UAII | 5’AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGCAGUGCUXXXXXXr GrGrG－3’ | 5608 |
| スマーターCDS | 5’－Bio－AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT（30） N－1N－3’ | 5609 |
| スマーターIS PCR | 5’－Bio－AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT－3’ | 5610 |
| 5’RACEロング | 5’－CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAAC GCAGAGT－3’ | 5611 |
| 5’RACEショート | 5’－CTAATACGACTCACTATAGGGC－3’ | 5612 |

【０１１２】

したがって、細胞を複数の容器に分配する工程の後で、容器のそれぞれに、複数の容器

においてリンパ系細胞中のｍＲＮＡの逆転写を促進するのに十分な条件及び時間で、第１及び第２のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットを接触させ、（Ａ）第１のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットは、適応免疫受容体ヘテロ二量体の複数の第１のポリペプチドをコードする複数の第１のｍＲＮＡ配列を逆転写でき、（Ｂ）第２のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットは、適応免疫受容体ヘテロ二量体の複数の第２のポリペプチドをコードする複数の第２のｍＲＮＡ配列を逆転写でき、（Ｉ）第１のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットは、一般式：

Ｕ１／２－Ｂ１－Ｘ１

の複数のオリゴヌクレオチド配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を含み、Ｕｌ／２　Ｂ１は、Ｂ１が存在する場合、第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドを、又はＢ１が存在しない場合、第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドを、含み、Ｂ１は、何も含まないか、又は６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の連続するヌクレオチドの第１のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドを含み、Ｘ１は、以下のうちの１つであるオリゴヌクレオチドを含み：（ａ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドのための、適応免疫受容体の可変（Ｖ）領域コード遺伝子配列、又はその相補配列の、少なくとも２０、３０、４０又は５０で、かつ、１００、９０、８０、７０又は６０個を超えない、連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ１／２－Ｂ１－Ｘ１の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ１はユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド；（ｂ）（ｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドのための、適応免疫受容体の連結（Ｊ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配列、又は、（ｉｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドのための、適応免疫受容体一定の（Ｃ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配列のいずれかの、少なくとも１５～３０又は３１～５０で、かつ、８０、７０、６０若しくは５５個を超えない連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ１／２－Ｂ１－Ｘ１の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ１はユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド、並びに（ＩＩ）第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットは、一般式：

Ｕ３／４－Ｂ２－Ｘ２

の複数のオリゴヌクレオチド配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を含み、式中、Ｕ３／４は、Ｂ２が存在する場合には、第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含み、Ｂ２が存在しない場合には、第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドを含み、Ｂ２は、何も含まないか、又は、複数の容器の１つと接触する第１及び第２の逆転写プライマーセットのそれぞれについて、Ｂ１と同じである６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９若しくは２０個の連続するヌクレオチドの第２のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドを含み、Ｘ２は、以下のうちの１つであるオリゴヌクレオチドを含み：（ａ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドのための、適応免疫受容体の可変（Ｖ）領域コード遺伝子配列、又はその相補配列の、少なくとも２０、３０、４０又は５０で、かつ、１００、９０、８０、７０又は６０個を超えない、連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ３／４－Ｂ２－Ｘ２の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ２はユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド；（ｂ）（ｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドのための、適応免疫受容体の連結（Ｊ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配列、又は、（ｉｉ）適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドのための、適応免疫受容体一定の（Ｃ）領域をコードする遺伝子配列若しくはその相補配列のいずれかの、少なくとも１５～３０又は３１～５０で、かつ、８０、７０、６０若しくは５５個を超えない連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、一般式Ｕ３／４－Ｂ２－Ｘ２の複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｘ２は

ユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド、前記の接触させる工程は、１つ以上の前記複数の容器のそれぞれにおいて、以下を得るのに十分な条件及び時間にて行われ：少なくとも１つの第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、少なくとも１つの第１のオリゴヌクレオチドバーコード配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドの少なくとも１つのＸ１オリゴヌクレオチドＶ領域コード遺伝子配列と、少なくとも１つの第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第１のポリペプチドの少なくとも１つのＸ１オリゴヌクレオチドＪ領域又はＣ領域コード遺伝子配列と、を含む、第１の逆転写された相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）産物；並びに更に、１つ以上の前記複数の容器のそれぞれで、以下を得るのに十分な条件及び時間にて行われる：少なくとも１つの第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、少なくとも１つの第２のオリゴヌクレオチドバーコード配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドの少なくとも１つのＸ２オリゴヌクレオチドＶ領域コード遺伝子配列と、少なくとも１つの第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列と、適応免疫受容体ヘテロ二量体の前記第２のポリペプチドの少なくとも１つのＸ２オリゴヌクレオチドＪ領域又はＣ領域コード遺伝子配列と、を含む、第２の逆転写されたｃＤＮＡ産物。

【０１１３】

接触させる工程の後、複数の容器から第１及び第２の逆転写されたｃＤＮＡ産物を混合する工程を実施して、逆転写されたｃＤＮＡ産物の混合物を得る。

【０１１４】

混合する工程の後に、第１及び第２の逆転写されたｃＤＮＡ産物の混合物と、第１の増幅プライマーセット及び第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットと、を接触させる工程が続き、第１の増幅プライマーセットは、（ｉ）第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれが含む、複数の第１のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第１のシークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列と、（ｉｉ）第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれが含む、複数の第２のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第２のシークエンシングプラットホームに特異的オリゴヌクレオチド配列と、を含み、第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセットは、（ｉ）第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれが含む、複数の第３のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第３のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第３のシークエンシングプラットホームに特異的なオリゴヌクレオチド配列と、（ｉｉ）第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列をそれぞれが含む、複数の第４のシークエンシングプラットホームタグ含有オリゴヌクレオチドと、第４のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第４のシークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列と、を含み、前記接触させる工程は、シークエンシング用にＤＮＡライブラリを得るために、第１及び第２の逆転写されたｃＤＮＡ産物の両方を増幅するのに十分な条件及び時間にて行う。

【０１１５】

シークエンシングのためのＤＮＡライブラリが得られた場合、後に続く工程では、ＤＮＡライブラリのシークエンシングが行われ、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチド配列をコードする配列のデータセットが得られる。

【０１１６】

配列のデータセットの分析は、本質的に本明細書で記載されるように実施されてもよく、単一の（すなわち同じ）リンパ系細胞に由来する適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及

び第２のポリペプチドをコードする再構成されたＤＮＡ配列が決定される。手短に言えば、前記方法は、以下の工程を更に含んでもよい：（ａ）その中で同定されるオリゴヌクレオチドバーコード配列により配列のデータセットをソーティングして、それぞれがユニークなバーコードを有する複数のバーコード配列セットを得る工程と、（ｂ）（ａ）のそれぞれのバーコード配列セットをソーティングして、Ｘ１配列含有サブセットとＸ２配列含有サブセットに分類する工程と、（ｃ）Ｘ１及びＸ２の配列に従い、Ｘ１及びＸ２配列含有サブセットのそれぞれのメンバーをクラスタリングして、１つ又は複数のＸ１配列クラスターセットと、１つ又は複数のＸ２配列クラスターセットとをそれぞれ得て、１つ以上の前記Ｘ１及びＸ２配列クラスターセット内の１ヌクレオチドのバーコード配列ミスマッチのエラーを修正する工程と、（ｄ）既知のＸ１及びＸ２の配列に基づき、第１及び第２の適応免疫受容体ヘテロ二量体ポリペプチドコード配列のそれぞれを同定する工程であって、それぞれのＸ１配列とそれぞれのＸ２配列が、１つ又は複数のユニークなＢ配列と会合して、それぞれのＢ配列関連のＸ１配列とそれぞれのＢ配列関連のＸ２配列が由来する容器を同定する工程と、（ｅ）共通の、第１及び第２の適応免疫受容体ヘテロ二量体ポリペプチドコード配列と一致するＢ配列の確率に基づき、共通のクローンに由来するものとして、（ｄ）のＢ配列関連のＸ１及びＸ２配列を組み合わせてマッチングさせることにより、１つのリンパ系細胞に由来する、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１及び第２のポリペプチド配列をコードする再構成されたＤＮＡ配列を決定する工程。

【０１１７】

以上を要約すると、本発明の特定の実施形態では、シークエンシングアダプターは、例えば、ウェル特異的なバーコードの外側のそれぞれのｃＤＮＡ分子の各末端上でユニバーサルアダプター配列を合成することにより、全ての逆写された／増幅されたＴＣＲ及び／又はＩＧコードセグメントのそれぞれの末端上に配置され得る。その後、当該アダプターは、テーリングＰＣＲ反応において、それぞれの分子上にて合成され得る。かかる実施形態では、融合ＲＴプライマーが合成され、第１のｃＤＮＡ鎖の合成のために用いられ得る。これらのプライマーは全て、同じユニークなＤＮＡバーコードと、ユニバーサルな（例えば、ｐＧＥＸ）プライミング部位を含む。逆転写による第１鎖ｃＤＮＡの合成終了後、プレートの全てのウェルの内容物を定量的に回収して、プールして（例えば、底を上にした逆向き遠心分離により）、精製して、次に、次世代配列分析システム（例えば、Ｉｌｌｕｍｉｎａ、サンディエゴ、ＣＡ）を用いる増幅及びシークエンシングに用いられる配列を組み込むように設計された「テール」配列を含むユニバーサルアダプタープライマー（ｐＧＥＸ）によるＰＣＲを行うために、多数のウェルに分割する。あるいは、シークエンシングプラットホーム特異的アダプターを、タグ付けされた分子の末端へライゲーションすることができる（例えばＩｌｌｕｍｉｎａ　ＴｒｕｅＳｅｑ（商標）によるサンプル調製方法）。全てのウェルから得た分子はプールされ、それにより、ユニークにタグ付けされたＢＣＲ又はＴＣＲのｄｓ－ｃＤＮＡ産物の、高複雑度のシークエンシングライブラリが生成される。分子は全て、ハイスループットシークエンシングにより配列決定される。

【０１１８】

シークエンシングプラットホーム特異的なアダプターに相補的なユニバーサルシークエンシングプライマーが、望ましくは用いられる。これにより、複数のサンプルのサンプル指標付与が可能となり、その際、サンプル特異的指標は、９６、３８４、１５３６等のウェル数の当初のＲＴ反応ウェルに由来する、ユニークにタグ付けされたＩＧＨ／ＴＣＲ産物のプールごとに用いられる。又は、ユニバーサルＵＡＩＩ－フォワード／多重Ｖ、Ｊ又はＣリバースプライマーの混合物による多重ＰＣＲを用いて、元の細胞の転写物バーコード付けを保存しつつ、特定の標的断片を増幅してもよい。Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシングプラットホーム（ＭｉＳｅｑ（商標））を用いた場合、２×２５０ｂｐのペアードエンドシークエンシングにより、ＢＣＲ／ＴＣＲの重鎖及び軽鎖（α／β；γ／δ）の配列の大部分が網羅され、それにより、それぞれの受容体ドメインの全コード配列の回収が可能となる。あるいは、長い解読長のシークエンシングプラットホーム（Ｒｏｃｈｅ　４５４，Ｌｉｆｅ　Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ，ＯＧＴ等）を用いて、全てのライブラリ断片を

１方向の１回のシークエンシングリードで読んでもよい。シークエンシングの後、１つより多くのサンプルが同じシークエンシングレーンに存在する場合、それぞれのサンプルからのリードを逆多重化してもよい。逆多重化は、シークエンシングリードを、ユニバーサルシークエンシングアダプターの一部として用いられる複数の指標のうちの１つに割り当てることにより実施されうる。それぞれのサンプルの逆多重化配列リードに関して、全てのリードを、ウェルに特異的なバーコードにより分割してもよい。特定のバーコードを有するそれぞれのリードセットを、ＰＣＲ及びシークエンシングエラーを修正するためにで別々にクラスタリングし、それぞれのバーコードについてユニークな配列を決定してもよい。

【０１１９】

バーコードにより、及びＴＣＲ又はＩＧ鎖によりソーティングされた配列を更に、公知の多様な任意のクラスタリングアルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴＣｌｕｓｔ、ＵＣＬＵＳＴ、ＣＤ－ヒット）を用いるクラスター分析に供してもよく、及び共有のバーコード配列を有する他の配列とクラスターを形成できないが、その代わりに、１ヌクレオチドが異なるバーコードを有する配列とクラスターを形成する配列の場合には、エラー修正に供してもよい。ユニーク配列は、既知の受容体配列との配列マッチにより、ＩＧ重鎖若しくは軽鎖（κ又はλ）として、又はＴＣＲ（α又はβ；γ又はδ）鎖として同定され得る。それぞれの重鎖及び軽鎖の配列は、このように、最初のサンプルのウェル位置と一致するバーコードのリストと関係し得る。次にデータを、配列毎に再整理することができる。それぞれのユニーク配列に関連するものは、その配列が見出されるセット内のマルチウェルプレートのウェル特異的バーコードのセットである。あらゆるＢ細胞又はＴ細胞クローンに関して、重鎖及び軽鎖の配列は、１つ以上のクローンが存在する全てのウェルからのバーコードと関係し得る。次に組み合わせ論を用いて、同じクローンに由来する重鎖及び軽鎖をマッチさせてもよい。例えば、９６ウェルプレートにおいて、特定の重鎖及び軽鎖の配列の両方が、同じ１２個のバーコードに関係している場合、２つの配列が９６個中全く同じ１２個のバーコードをランダムに有する確率が極端に小さい限り、重鎖及び軽鎖のこの特定の一対は、同じクローンに由来すると仮定され得る。

【０１２０】

例示的なアルゴリズム：

非限定的な理論によれば、同じバーコード配列のセットで出現する第１及び第２の適応免疫受容体鎖コード配列は、同じプレートのウェルにから、したがって同じソース細胞に由来する確率が高いと認識される。例えば、$10^3$の異なるバーコードが第１及び第２のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセットの構築において用いられる場合に、同じバーコード配列を有する２つの独立した（すなわち、異なる細胞に由来する）二本鎖ｃＤＮＡの第１及び第２の産物が得られる確率は、それぞれのプレートのウェルあたりの１つの細胞をソーティングした場合、１０６分の１である。

【０１２１】

それゆえに、本明細書に記載される方法に従って、第１及び第２の適応免疫受容体ポリペプチドコード配列（例えば、Ｘ１及びＸ２）の所定のセットの３つ以上のコピーが、共通のバーコード配列（例えば、同じバーコード配列セットに属する）を共有する場合、配列が独立した細胞起源の配列である確率は、ゼロに近づく。

【０１２２】

特定の実施形態では、バーコードオリゴヌクレオチドＢ（Ｂ１、Ｂ２）は、任意に第１及び第２のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み得て、その場合、第１のバーコード配列は、特定のＶオリゴヌクレオチド配列をユニークに同定するために選択され、第２のバーコード配列は、特定のＪオリゴヌクレオチド配列をユニークに同定するために選択される。バーコードオリゴヌクレオチドＢ１及びＢ２とユニバーサルアダプター（Ｕ）が相対的に位置することにより、自動ＤＮＡシーケンサーでの短い配列のリードとペアードエンドシークエンシングによる、所定のユニークなテンプレートオリゴヌクレオチドの増幅産物の迅速な同定及び定量が有利に可能となる（例えばＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ（

商標）、又はＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳＥＱ（登録商標）、又はＧｅｎｅＡｎａｌｙｚｅｒ（商標）－２、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｃｏｒｐ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）。特に、これらの、及びこれらと関連する実施形態により、増幅産物中に存在するＶ及びＪ配列の特異的組み合わせの迅速なハイスループットな決定を可能にし、それにより、再構成されたＴＣＲ又はＢＣＲコードＤＮＡを含むサンプルなどのサンプル中に存在しうるＶ－特異的なプライマーとＪ特異的なプライマーのそれぞれの組合せに関して、例えばアニーリング標的の相対的な表示を特徴づけることができる。増幅産物の同一性及び／又は量の確認は、より長い配列のリードによって達成され得る。

【０１２３】

多数の適応免疫受容体可変（Ｖ）領域及び連結（Ｊ）領域の遺伝子配列は、ＴＣＲ及びＩｇ遺伝子座の非－再構成のゲノムＤＮＡ配列、並びにかかる遺伝子座の生産的に再構成されたＤＮＡ配列及びそれらがコードする産物等の、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列として公知である。米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２を参照。当技術分野で公知のこれらの及び他の配列は、本発明の開示に従い、本発明の提供する組成物及び方法に含まれるオリゴヌクレオチドの設計及び生成に使用され得る。

【０１２４】

Ｖ領域特異的オリゴヌクレオチドは、適応免疫受容体（例えば、ＴＣＲ又はＢＣＲ）の可変（Ｖ）領域の遺伝子配列又はその相補配列の、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００又は４５０個であり、かつ、１０００、９００、８００、７００、６００又は、５００以下の連続するヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を含んでもよく、複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｖは、ユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む。ヒト及び他の種のＴＣＲ及びＢＣＲのＶ領域遺伝子のゲノム配列は公知であり、Ｇｅｎｂａｎｋのような公共データベースから入手可能である。Ｖ領域遺伝子配列は、発現され、再構成されたＴＣＲ及びＢＣＲ遺伝子の産物をコードするポリヌクレオチド配列を含み、また、Ｖ領域遺伝子座にて同定されている偽遺伝子のポリヌクレオチド配列も含む。本明細書で開示するオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る多様なＶポリヌクレオチド配列は、長さ、ヌクレオチド組成（例えばＧＣ含量）が広く異なり得るが、実際は線形ポリヌクレオチド配列であり、例えば、特定の配列多様性を示す「ホットスポット」又は超可変領域を含むことが公知である。

【０１２５】

このように、ポリヌクレオチドＶは、ＴＣＲ又はＢＣＲ遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーセットのメンバーが特異的にアニールできる配列を含む。複数のＴＣＲを又はＢＣＲコードする再構成されたＤＮＡを増幅できるプライマーセットは、例えば、米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３、又はＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２等に記載されており、あるいは、その中に記載されるように、特定のＴＣＲ又はＢＣＲの遺伝子座に存在するユニークなそれぞれのＶ遺伝子及びそれぞれのＪ遺伝子（例えば、ＴＣＲＡ、ＴＣＲＢ、ＴＣＲＧ、ＴＣＲＤ、ＩＧＨ、ＩＧＫ又はＩＧＬ）とハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列を含むように設計され得る。例えば、説明のみを目的とし、限定する訳ではないが、１つ又は複数のＴＣＲ又はＢＣＲをコードする再構成されたＤＮＡを増幅できるオリゴヌクレオチドプライマー増幅セットのオリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、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若しくは４０個又はそれ以上の連続するヌクレオチドのヌクレオチド配列を含んでもよく、本発明に記載のＶ又はＪポリヌクレオチドの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又は４０個の連続するヌクレオチドの相補的な配列とアニールしてもよい。特定の実施形態では、プライマーは少なくとも１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９又は３０個のヌクレオチドを含んでもよく、また特定の実施形態では、プライマーは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又は４０個以下の連続するヌクレオチドの配列を含んでもよい。本明細書に開示されるように、他の長さのプライマー及びプライマーアニーニング部位も同様に明白に企図される。

【０１２６】

このように、Ｖポリヌクレオチドは、特定の実施形態では、その開始コドンからＣＤＲ３コード領域までの長さよりも、短いか、同じか、又は類似の長さを有するヌクレオチド配列を含むことができ、また、ＣＤＲ３領域をコードするヌクレオチド配列を含み得るが、含む必要はない。特定の好ましい実施形態では、ＶポリヌクレオチドはＣＤＲ３コードポリヌクレオチド配列又はその相補体の全体又は一部を含み、ＣＤＲ３配列の長さはかなり変化させることができ、幾つかの異なるスキームにより特徴が調べられている（例えば、Ｌｅｆｆａｎｃ，１９９９ Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｓｔ ７：１３２；Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｉｎ：Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１～３２４２；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，１９８７ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，１９８９ Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７；Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９７ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７３：９２７；ｓｅｅ ａｌｓｏ，ｅ．ｇ．，Ｒｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：３２３；Ｓａａｄａ ｅｔ ａｌ．，２００７ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．８５：３２３を参照）。

【０１２７】

簡潔には、ＣＤＲ３領域は、典型的に、Ｖセグメントの高度に保存されたシステイン残基（トリヌクレオチドコドンＴＧＹによりコードされる、Ｙ＝Ｔ又はＣ）から、ＴＣＲのＪセグメントの高度に保存されたフェニルアラニン残基（ＴＴＹでコードされる）又はＩＧＨの高度に保存されたトリプトファン（ＴＧＧによりコードされる）まで伸びるポリペプチド部分に及ぶ。ＴＣＲＢ遺伝子座の９０％以上の天然の、生産的な再構成は、この基準により、９～１７個のコードアミノ酸に対応する２４～５４のヌクレオチドのＣＤＲ３コード長を有し、それは。上記のＣＤＲ３をコードする領域のナンバリングのスキームは、保存されたシステイン、フェニルアラニン及びトリプトファンコドンの位置を意味し、これらのナンバリングのスキームは、これらの保存されたアミノ酸をコードする１つ以上のコドンが、異なるアミノ酸をコードするコドンで置換されている偽遺伝子にも適用され得る。これらの保存されたアミノ酸を使わない偽遺伝子の場合、ＣＤＲ３長は、上記で引用した、確立されたＣＤＲ３配列位置ナンバリングのスキームのうちの１つを用いて、保存された残基が、置換なしで観察されている対応する位置と比較して定められ得る。

【０１２８】

ポリヌクレオチドＪは、適応免疫受容体の結合（Ｊ）領域コード遺伝子配列又はその相補配列の少なくとも１５～３０、３１～５０、５１～６０、６１～９０、９１～１２０又は１２０～１５０個であって、６００、５００、４００、３００又は２００個以下の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含んでもよく、複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｊはユニークオリゴヌクレオチド配列を含む。ポリヌクレオチドＪ（又はその相補鎖）は、ＴＣＲ又はＢＣＲ遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーセットのメンバーが特異的にアニールできる配列を含む。複数のＴＣＲ又はＢＣＲをコードする再構成されたＤＮＡを増幅できるプライマーセットは、例えば、米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３又はＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２等に記載され、あるいは、

その中に記載されるように、特定のＴＣＲ又はＢＣＲ遺伝子座（例えばＴＣＲ　α、β、γ若しくはδ、又はＩｇＨ　μ、γ、δ、α若しくはε、又はＩｇＬ　κ若しくはλ）におけるそれぞれのユニークなＶ遺伝子及びそれぞれのユニークなＪ遺伝子と特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド配列を含むよう設計され得る。

【０１２９】

特定の実施形態においては、本明細書に記載されたプライマー組成物中に存在する複数のＪポリヌクレオチドは、既知の、天然に生じるＪ遺伝子ヌクレオチド配列の全長をシミュレーションする長さを有することが好ましくなり得る。本明細書に記載されたテンプレート中のＪ領域の長さは、天然に存在するＪ遺伝子配列の長さと、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０パーセント以下の割合で異なり得る。このように、Ｊポリヌクレオチドは、特定の実施形態では、典型的な、天然に存在するＪ遺伝子の長さと同じか、類似の長さのヌクレオチド配列を含んでもよく、また、必要ではないが、前記のように、ＣＤＲ３領域をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【０１３０】

ヒト及び他の種の、ＴＣＲ及びＢＣＲのＪ領域遺伝子のゲノム配列は公知であり、Ｇｅｎｂａｎｋなどの公共データベースから入手可能である。Ｊ領域遺伝子配列は、発現された及び発現されない再構成されたＴＣＲ及びＢＣＲ遺伝子産物をコードするポリヌクレオチド配列を含む。本明細書で開示されるプライマーに組み込まれ得る多様なＪポリヌクレオチド配列は、長さ、ヌクレオチド組成（例えばＧＣ含量）が広く異なり得るが、実際には、線形のポリヌクレオチド配列である。

【０１３１】

当業者は、本明細書に記載されたＶ－セグメント及びＪ－セグメントのオリゴヌクレオチドプライマーの構築において用いるための、本明細書に記載のＶ及びＪ配列の代替物を、本発明の開示に基づき、それぞれのＴＣＲ及びＩｇサブユニットの遺伝子のＶ及びＪコード領域の公知の遺伝子配列に関する当技術分野における知識を用いて、選択することができる。ヒトの適応免疫受容体の配列に関する参照となるＧｅｎｂａｎｋエントリーとしては、以下のものが挙げられる：ＴＣＲα：（ＴＣＲＡ／Ｄ）：ＮＣ＿０００００１４．８（ｃｈｒ１４：２２０９００５７．．２３０２１０７５）；ＴＣＲβ（ＴＣＲＢ）：ＮＣ＿０００００７．１３（ｃｈｒ７：１４１９９８８５１．．１４２５１０９７２）；ＴＣＲγ：（ＴＣＲＧ）：ＮＣ＿０００００７．１３（ｃｈｒ７：３８２７９６２５．．３８４０７６５６）；免疫グロブリン重鎖、ＩｇＨ（ＩＧＨ）：ＮＣ＿０００００１４．８（ｃｈｒｌ４：１０６０３２６１４．．１０７２８８０５１）；免疫グロブリン軽鎖－カッパ、ＩｇＬκ（ＩＧＫ）：ＮＣ＿０００００２．１１（ｃｈｒ２：８９１５６８７４．．９０２７４２３５）；及び免疫グロブリン軽鎖－ラムダ、ＩｇＬλ（ＩＧＬ）：ＮＣ＿０００００２２．１０（ｃｈｒ２２：２２３８０４７４．．２３２６５０８５）。マウスの適応免疫受容体座の配列に関する参照Ｇｅｎｂａｎｋエントリーとしては、以下のものが挙げられる：ＴＣＲβ（ＴＣＲＢ）：ＮＣ＿０００００７２．５（ｃｈｒ６：４０８４１２９５．．４１５０８３７０）、及び免疫グロブリン重鎖（ＩｇＨ（ＩＧＨ））：ＮＣ＿０００００７８．５（ｃｈｒｌ２：１１４４９６９７９．．１１７２４８１６５）。

【０１３２】

例えば、プライマーの設計解析及び標的部位選定の検討は、例えば、ＯＬＩＧＯプライマー分析ソフトウェア及び／又はＢＬＡＳＴＮ　２．０．５アルゴリズムソフトウェア（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９９７，２５（１７）：３３８９～４０２）又は当技術分野において利用可能な他の同様なプログラムを使用して実施できる。

【０１３３】

したがって、本発明の開示に基づき、また、これらの既知の適応免疫受容体遺伝子配列及びオリゴヌクレオチド設計の方法論を考慮し、本発明のオリゴヌクレオチドに含めるために、当業者は、所定のＶ及びＪ遺伝子にそれぞれ特有であるオリゴヌクレオチド配列を

それぞれが独立して含む、複数のＶ領域特異的及びＪ領域特異的なポリヌクレオチド配列を設計することができる。同様に、本発明の開示から、及び、既知の適応免疫受容体配列を考慮し、当業者は、所定のＶ及びＪ遺伝子にそれぞれユニークな特異的な配列にそれぞれが独立してアニールできる複数のＶ領域特異的及びＪ領域特異的オリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーセットを設計することもできる。それにより、複数のプライマーが、所定の適応免疫受容体コード座（例えば、ヒトのＴＣＲ又はＩＧＨ座）における、実質的に全てのＶ遺伝子及び実質的に全てのＪ遺伝子を増幅できる。多重（例えば、複数のフォワード及びリバースプライマー対を用いた）ＰＣＲにおいて、かかるプライマーセットにより、再構成されたＶ領域コード遺伝子セグメントによりコードされる第１末端と、Ｊ領域コード遺伝子セグメントによりコードされる第２末端を有する増幅産物の生成が可能となる。

【０１３４】

典型的には、また特定の実施形態では、かかる増幅産物には、ＣＤＲ３コード配列が含まれ得るが、本発明はそのように限定されるものではなく、ＣＤＲ３コード配列を含まない増幅産物を企図する。プライマーは好ましくは、Ｖ及びＪ配列の大部分を有する、また特定の好ましい実施形態では本明細書に記載のバーコード（Ｂ）配列の十分な部分を有する増幅産物を産生できるよう設計され、産物（アンプリコン）をシークエンシングすることにより、それぞれの遺伝子セグメント：（ｉ）特定のＶ遺伝子、及び（ｉｉ）その付近にて、Ｖ遺伝子が再構成を経て、再構成された適応免疫受容体をコードする遺伝子を産する特定のＪ遺伝子、にユニークな配列に基づいて同定することが可能となる。典型的には、また好ましい実施形態では、ＰＣＲ増幅産物のサイズは６００塩基対を超えず、非制限的な理論に従って、再構成されない適応免疫受容体遺伝子から、増幅産物は除外される。特定の他の好ましい実施形態では、増幅産物のサイズは、５００、４００、３００、２５０、２００、１５０、１２５、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０又は２０塩基対を超えず、それにより、短い配列のリードにより、配列特異的なアンプリコンの急速な、ハイスループットな定量化が有利にもたらされ得る。

【０１３５】

プライマー：

本発明の開示において、オリゴヌクレオチドプライマーは、複数のＶ－セグメントプライマーと複数のＪ－セグメントプライマーとを含むオリゴヌクレオチドプライマーセットで提供され、プライマーセットは、リンパ系細胞ＤＮＡを含む生物学的サンプル中で、適応免疫受容体をコードする再構成されたＤＮＡを増幅できる。適当なプライマーセットは当技術分野で公知であり、また本明細書においても開示され、例えば、米国特許出願公開第２０１２／００５８９０２号、米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３又はＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２等のプライマーセット、又は表１で示されるプライマーセットが挙げられる。特定の実施形態では、当該プライマーセットは、サンプル中のユニークなＶ領域遺伝子（偽遺伝子を含む）ごとに、ユニークなＶ領域配列に特異的にアニールできる少なくとも１つのプライマーを含む複数のＶ配列特異的プライマーと、サンプル中のユニークなＪ領域遺伝子ごとに、ユニークなＪ領域配列に特異的にアニールできる少なくとも１つのプライマーと、を含めるように設計される。

【０１３６】

プライマーの設計は、公知のＴＣＲ及びＢＣＲゲノム配列を考慮して、ルーチンの方法論により実施できる。したがって、プライマーセットは好ましくは、ＴＣＲ又はＢＣＲ部位でＤＮＡ再構成により生じる可能性がある、あらゆるＶ－Ｊの組合せを増幅することができる。以下にも記載するが、特定の実施形態では、１つ以上のＶプライマーが、２つ以上のＶ領域により共有されうるが、全てのＶ領域に共通ではない「ユニークな」配列と特異的にアニールしうる、及び／又は、２つ以上のＪ領域により共有されうるが、全てのＪ領域に共通ではない「ユニークな」配列と特異的にアニールしうる、プライマーセットを企図する。

【０１３７】
特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法に用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは、標的Ｖ又はＪセグメント（すなわち、Ｖ－領域又はＪ－領域ポリペプチドをコードするゲノムポリヌクレオチドの部分）の長さ１５ヌクレオチドの連続する配列と同じ配列を有するか若しくはそれと相補的な、長さが少なくとも約１５ヌクレオチドの核酸を含み得る、又はそれからなり得る。標的Ｖ又はＪ領域コードポリヌクレオチドセグメントの連続する配列と同じ配列又は相補的な配列を有する、より長いプライマー、例えば長さが約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、４５又は５０ヌクレオチドのプライマーもまた、特定の実施形態では有用である。本明細書に記載の全ての中間の長さを有するオリゴヌクレオチドプライマーも、本発明で使用するために企図される。当業者に理解されるように、プライマーに、更なる配列（例えば、標的Ｖ－又はＪ－領域コードポリヌクレオチドセグメントと同じでないか又はそれと相補的でないヌクレオチド）、例えば、制限酵素認識部位、シークエンシングのためのアダプター配列、バーコード配列などを追加してもよい（例えば、本明細書の表及び配列表に記載のプライマー配列を参照）。したがって、特定の用途又は必要性に応じて、プライマーの長さは、例えば、長さが約５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、８０、８５、９０、９５、１００個又はそれ以上のヌクレオチドなどのように、より長くてもよい。

【０１３８】
また、特定の実施形態での使用が企図されるのは、ヌクレオチド配列が本明細書に示されるオリゴヌクレオチドプライマー（配列表に記載のものを含む）と高度な配列同一性を共有し得る適応免疫受容体のＶ－セグメント又はＪ－セグメントのオリゴヌクレオチドプライマー変異体である。このように、これらの、及びそれらと関連する実施形態では、適応免疫受容体のＶ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー変異体は、本明細書に記載の適応免疫受容体Ｖ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー配列に対して実質的な同一性を有し得る。例えば、かかるオリゴヌクレオチドプライマー変異体は、本明細書に記載の方法（例えば、標準的なパラメータを用いたＢＬＡＳＴ分析）を用いて、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプライマー配列などの参照ポリヌクレオチド配列と比較して、少なくとも７０％の配列同一性、好ましくは、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％以上の配列同一性を含み得る。当業者は、コドンの縮重、読み枠の位置等を考慮することにより、これらの値を適切に調節して、適応免疫受容体セグメントコードポリヌクレオチドにアニールするオリゴヌクレオチドプライマー変異体の対応する能力を決定することができることを認識するであろう。

【０１３９】
一般的に、オリゴヌクレオチドプライマー変異体は、好ましくは、オリゴヌクレオチド変異体のアニール能が、本明細書に具体的に記載される適応免疫受容体Ｖ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー配列のそれと比較して実質的に低下しないように、１つ以上の置換、付加、削除又は挿入を含む。

【０１４０】
表２は、非限定的な例として、患者のリンパ系細胞からのＤＮＡを含む生物学的サンプル中の、ＴＣＲ　β（ＴＣＲＢ）鎖をコードする生産的に再構成されたＤＮＡを増幅できるオリゴヌクレオチドプライマーセットを提示する。このプライマーセットにおいて、Ｊセグメントプライマーは実質的な配列相同性を共有し、したがって、複数の標的Ｊポリヌクレオチド配列との間で交叉プライミングが起こり得るが、Ｖセグメントプライマーは、ＶのＣＤＲ２領域内の標的配列と特異的にアニールするよう設計され、したがって、それぞれのＶセグメントにユニークである。しかしながら、密接に関連した標的遺伝子のファミリー内で配列が同一である、幾つかのＶのプライマーの場合（例えば、Ｖ６－２とＶ６

－３は、Ｖセグメントのコード配列全体を通じて、ヌクレオチドレベルで同一で、したがって、１つのプライマー（ＴＲＢ２Ｖ６－２／３）を有しうる）、例外が存在する。

【０１４１】

【表３－１】

表２．典型的なオリゴヌクレオチドプライマーセット（ｈｓＴＣＲＢ　ＰＣＲプライマー）

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|---|---|---|
| TRBJ1－1 | TTACCTACAACTGTGAGTCTGGTGCCTTGTCCAAA | 1631 |
| TRBJ1－2 | ACCTACAACGGTTAACCTGGTCCCCGAACCGAA | 1632 |
| TRBJ1－3 | ACCTACAACAGTGAGCCAACTTCCCTCTCCAAA | 1633 |
| TRBJ1－4 | CCAAGACAGAGAGCTGGGTTCCACTGCCAAA | 1634 |
| TRBJ1－5 | ACCTAGGATGGAGAGTCGAGTCCCATCACCAAA | 1635 |
| TRBJ1－6 | CTGTCACAGTGAGCCTGGTCCCGTTCCCAAA | 1636 |
| TRBJ2－1 | CGGTGAGCCGTGTCCCTGGCCCGAA | 1637 |
| TRBJ2－2 | CCAGTACGGTCAGCCTAGAGCCTTCTCCAAA | 1638 |
| TRBJ2－3 | ACTGTCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAA | 1639 |
| TRBJ2－4 | AGAGCCGGGTCCCGGCGCCGAA | 1640 |
| TRBJ2－5 | GGAGCCGCGTGCCTGGCCCGAA | 1641 |
| TRBJ2－6 | GTCAGCCTGCTGCCGGCCCCGAA | 1642 |
| TRBJ2－7 | GTGAGCCTGGTGCCCGGCCCGAA | 1643 |
| TRB2V10－1 | AACAAAGGAGAAGTCTCAGATGGCTACAG | 1644 |
| TRB2V10－2 | GATAAAGGAGAAGTCCCCGATGGCTATGT | 1645 |
| TRB2V10－3 | GACAAAGGAGAAGTCTCAGATGGCTATAG | 1646 |
| TRB2V6－2／3 | GCCAAAGGAGAGGTCCCTGATGGCTACAA | 1647 |
| TRB2V6－8 | CTCTAGATTAAACACAGAGGATTTCCCAC | 1648 |
| TRB2V6－9 | AAGGAGAAGTCCCCGATGGCTACAATGTA | 1649 |
| TRB2V6－5 | AAGGAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTC | 1650 |
| TRB2V6－6 | GACAAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTACAAC | 1651 |
| TRB2V6－7 | GTTCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATC | 1652 |
| TRB2V6－1 | GTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATT | 1653 |
| TRB2V6－4 | GTCCCTGATGGTTATAGTGTCTCCAGAGC | 1654 |
| TRB2V24－1 | ATCTCTGATGGATACAGTGTCTCTCGACA | 1655 |
| TRB2V25－1 | TTTCCTCTGAGTCAACAGTCTCCAGAATA | 1656 |
| TRB2V27 | TCCTGAAGGGTACAAAGTCTctcgaaaag | 1657 |
| TRB2V26 | CTCTGAGAGGTATCATGTTTCTTGAAATa | 1658 |
| TRB2V28 | TCCTGAGGGGTACAGTGTCTCTagagaga | 1659 |
| TRB2V19 | TATAGCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGG | 1660 |
| TRB2V4－1 | CTGAATGCCCCAACAGCTCTCTCTTAAAC | 1661 |
| TRB2V4－2／3 | CTGAATGCCCCAACAGCTCTCACTTATTC | 1662 |

【０１４２】

【表３－２】
（表２の続き）

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|---|---|---|
| TRB2V2P | CCTGAATGCCCTGACAGCTCTCGCTTATA | 1663 |
| TRB2V3－1 | CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCACTTAAA | 1664 |
| TRB2V3－2 | CTCACCTGACTCTCCAGACAAAGCTCAT | 1665 |
| TRB2V16 | TTCAGCTAAGTGCCTCCCAAATTCACCCT | 1666 |
| TRB2V23－1 | GATTCTCATCTCAATGCCCCAAGAACGC | 1667 |
| TRB2V18 | ATTTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC | 1668 |
| TRB2V17 | ATTCACAGCTGAAAGACCTAACGGAACGT | 1669 |
| TRB2V14 | TCTTAGCTGAAAGGACTGGAGGGACGTAT | 1670 |
| TRB2V2 | TTCGATGATCAATTCTCAGTTGAAAGGCC | 1671 |
| TRB2V12－1 | TTGATTCTCAGCACAGATGCCTGATGT | 1672 |
| TRB2V12－2 | GCGATTCTCAGCTGAGAGGCCTGATGG | 1673 |
| TRB2V12－3／4 | TCGATTCTCAGCTAAGATGCCTAATGC | 1674 |
| TRB2V12－5 | TTCTCAGCAGAGATGCCTGATGCAACTTTA | 1675 |
| TRB2V7－9 | GGTTCTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCT | 1676 |
| TRB2V7－8 | GCTGCCCAGTGATCGCTTCTTTGCAGAAA | 1677 |
| TRB2V7－4 | GGCGGCCCAGTGGTCGGTTCTCTGCAGAG | 1678 |
| TRB2V7－6／7 | ATGATCGGTTCTCTGCAGAGAGGCCTGAGG | 1679 |
| TRB2V7－2 | AGTGATCGCTTCTCTGCAGAGAGGACTGG | 1680 |
| TRB2V7－3 | GGCTGCCCAACGATCGGTTCTTTGCAGT | 1681 |
| TRB2V7－1 | TCCCCGTGATCGGTTCTCTGCACAGAGGT | 1682 |
| TRB2V11－123 | CTAAGGATCGATTTTCTGCAGAGAGGCTC | 1683 |
| TRB2V13 | CTGATCGATTCTCAGCTCAACAGTTCAGT | 1684 |
| TRB2V5－1 | TGGTCGATTCTCAGGGCGCCAGTTCTCTA | 1685 |
| TRB2V5－3 | TAATCGATTCTCAGGGCGCCAGTTCCATG | 1686 |
| TRB2V5－4 | TCCTAGATTCTCAGGTCTCCAGTTCCCTA | 1687 |
| TRB2V5－8 | GGAAACTTCCCTCCTAGATTTTCAGGTCG | 1688 |
| TRB2V5－5 | AAGAGGAAACTTCCCTGATCGATTCTCAGC | 1689 |
| TRB2V5－6 | GGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCA | 1690 |
| TRB2V9 | GTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAAC | 1691 |
| TRB2V15 | GCCGAACACTTCTTTCTGCTTTCTTGAC | 1692 |
| TRB2V30 | GACCCCAGGACCGGCAGTTCATCCTGAGT | 1693 |
| TRB2V20－1 | ATGCAAGCCTGACCTTGTCCACTCTGACA | 1694 |
| TRB2V29－1 | CATCAGCCGCCCAAACCTAACATTCTCAA | 1695 |

【０１４３】
特定の好ましい実施形態では、本明細書に記載のＶ－セグメント及びＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマーは、再構成された適応免疫受容体遺伝子座における増幅産物を生じる特異的Ｖ及び特異的Ｊ遺伝子の両方をユニークに同定するために、再構成された適応免疫受容体（ＴＣＲ又はＩｇ）遺伝子の増幅産物の配列内に適切な情報が存在するようにヌクレオチド配列を含むよう設計されている（例えば、Ｖ遺伝子組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）の上流の、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０の塩基対の配列、好ましくは、Ｖ遺伝子組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）の上流の、少なくとも約２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３５、３６、３７、３８、３９又は４０の塩基対の配列、及び特定の好ましい実施形態では、Ｖ遺伝子組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）の上流の、４０

超の塩基対の配列と、Ｊ遺伝子ＲＳＳの下流の、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０の塩基対、好ましくは、Ｊ遺伝子ＲＳＳの下流の、少なくとも約２２、２４、２６、２８又は３０塩基対、及び特定の好ましい実施形態では、Ｊ遺伝子ＲＳＳの下流の、３０超の塩基対）。

【０１４４】

この特徴は、主に、Ｖ及びＪセグメントの適当なサイズの産物の有無を単に検出する増幅反応に依存する、ＴＣＲコード又はＩｇコード遺伝子配列の増幅用の当技術分野において記述されるオリゴヌクレオチドプライマー産物とは対照的である（例えば、特定のサイズのアンプリコンがＰＣＲ反応産物に存在することにより、Ｖ又はＪセグメントの存在を示すが、増幅されたＰＣＲ産物の配列を提供することができず、ゆえに、その同一性を確かめること（例えば通常行われるスペクトラタイピング（spectratyping））ができない）。

【０１４５】

オリゴヌクレオチド（例えばプライマー）は、任意の適切な方法により調製できる（例えば、Ｎａｒａｎｇら、１９７９，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：９０～９９による、直接化学合成、Ｂｒｏｗｎら、１９７９，Ｍｅｔｈ．ＥｎｚｙｍｏＬ　６８：１０９～１５１のリン酸ジエステル法、Ｂｅａｕｃａｇｅら、１９８１，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．２２：１８５９～１８６２のジエチルホスホロアミダイト法、及び米国特許第４，４５８，０６６号の固相支持方法（それぞれ、参照により本発明に援用する））。オリゴヌクレオチドと修飾ヌクレオチドのコンジュゲートの合成方法は、Ｇｏｏｄｃｈｉｌｄ，１９９０，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１（３）：１６５～１８７に記載され、参照により本発明に援用する。

【０１４６】

本発明で用いられる「プライマー」という語は、適切な条件下で、ＤＮＡ合成開始点の機能を発揮できるオリゴヌクレオチドのことを指す。

【０１４７】

かかる条件としては、核酸鎖と相補的なプライマー伸長産物の合成が、適切なバッファー及び適した温度にて、４つの異なるヌクレオシド三リン酸塩及び伸長用試薬（例えば、ＤＮＡポリメラーゼ又は逆転写酵素）の存在下で誘導される条件が挙げられる。

【０１４８】

プライマーは、好ましくは一本鎖ＤＮＡである。プライマーの適切な長さは、プライマーの意図される使用に依存するが、一般的には、６～５０ヌクレオチドの範囲、又は、特定の実施形態では１５～３５ヌクレオチドの範囲である。短いプライマー分子は、一般に、テンプレートと十分に安定な複合体を形成するために低い温度を必要とする。プライマーはテンプレート核酸の正確な配列を反映する必要はないが、テンプレートとハイブリダイズするために十分な相補性を有しなければならない。所定の標的配列の増幅用の適切なプライマーの設計は、当技術分野において周知であって、本明細書に引用する文献に記載されている。

【０１４９】

本明細書において記載されるように、プライマーは、プライマーの検出又は固定化を可能にするが、プライマーの基本的な特性（ＤＮＡ合成開始点の働きをすること）を変えない更なる特徴を取り入れることができる。例えば、プライマーは、標的核酸とハイブリダイズしないが、増幅産物のクローニング、検出又はシークエンシングを容易にする更なる核酸配列を、５’末端に含んでもよい。テンプレートがハイブリダイズするために十分に相補的なプライマーの領域は、本明細書においてハイブリダイズ領域と称する。

【０１５０】

本明細書において用いられるように、十分にストリンジェントな条件下での増幅反応で用いられるときに、プライマーが主に標的核酸とハイブリダイズするならば、プライマーは標的配列に対して「特異的」である。典型的に、プライマー－標的二重鎖の安定性が、

プライマーとサンプル中で見出される他の配列との間で形成された二重鎖の安定性より大きい場合には、プライマーは標的配列に特異的である。当業者は、様々な要因（塩濃度、プライマーの塩基組成及びミスマッチの位置等）がプライマーの特異性に影響を及ぼし、プライマー特性を確認するためのルーチン実験が多くの場合必要であることを認識している。プライマーが標的配列とのみ安定な二重鎖を形成できるハイブリダイズ条件を選択できる。このように、適当なストリンジェントな増幅条件下での標的特異的なプライマーの使用により、標的プライマー結合部位を含むそれらの標的配列の選択的な増幅が可能となる。

【０１５１】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法に用いられるプライマーは、標的Ｖ又はＪセグメントの長さ１５ヌクレオチドの連続する配列と同じ配列を有するか又はそれと相補的である、長さが少なくとも約１５ヌクレオチドの核酸を含むか、又はそれからなる。標的Ｖ又はＪセグメントの連続する配列と同じ配列を有するか又はそれと相補的な配列を有する、より長いプライマー（例えば、長さ約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、４５又は５０ヌクレオチド）もまた、特定の実施形態において有用である。前記の中間の長さを有する全てのプライマーも、本発明において使用可能である。当業者に自明なように、プライマーに更なる配列（例えば、標的Ｖ又はＪセグメントと同じでも相補的でもないヌクレオチド）、例えば、制限酵素認識部位、シークエンシングのためのアダプター配列、バーコード配列等を追加してもよい（例えば、本明細書及び配列表に記載のプライマー配列を参照）。したがって、特定の用途又は必要性に応じて、プライマーの長さは、長さが５５、５６、５７、５８、５９、６０、６５、７０、７５ヌクレオチド又はそれ以上のように、より長くてもよい。例えば、一実施形態では、フォワード及びリバースプライマーはいずれも、ＤＮＡシーケンサーと適合性を有するユニバーサルなフォワードプライマー配列で５’’末端を修飾される。

【０１５２】

また、特定の実施形態での使用が企図されるのは、ヌクレオチド配列が本明細書に示されるオリゴヌクレオチドプライマー（配列表に記載のものを含む）と高度な配列同一性を有し得る適応免疫受容体Ｖ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー変異体である。このように、これらの、及びそれらと関連する実施形態では、適応免疫受容体Ｖ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー変異体は、本明細書に開示の適応免疫受容体Ｖ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー配列に対する実質的な同一性を有し得る。例えば、かかるオリゴヌクレオチドプライマー変異体は、本明細書に記載の方法（例えば、標準的なパラメータを用いたＢＬＡＳＴ分析）を用いて本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドプライマー配列のような参照ポリヌクレオチド配列と比較して、少なくとも７０％の配列同一性、好ましくは、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％以上の配列同一性を有し得る。当業者は、コドン縮重、読み枠の位置等を考慮することにより、これらの値を適切に調節して、適応免疫受容体セグメントをコードするポリヌクレオチドにアニールするオリゴヌクレオチドプライマー変異体の対応する能力を決定することができることを認識するであろう。典型的に、オリゴヌクレオチドプライマー変異体は、好ましくは、オリゴヌクレオチド変異体のアニール能が、本明細書に具体的に記載の適応免疫受容体Ｖ－セグメント又はＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー配列のそれと比較し実質的にに低下しないように、１つ以上の置換、付加、削除又は挿入を含む。本明細書で注記するように、好ましい実施形態では、適応免疫受容体Ｖ－セグメント及びＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマーは、ＣＤＲ３のコード領域を含む再構成されたＴＣＲ又はＩＧＨ配列を増幅できるように設計されている。

【０１５３】

本発明において企図される特定の実施形態では、本開示の多重ＰＣＲ法に用いられるプ

ライマーは、非Ｔ細胞又は非Ｂ細胞配列の非特異性なプライミングを防止するために機能的にブロックされ得る。例えば、プライマーは、米国特許公開第２０１０／０１６７３５３号で規定する化学的修飾によりブロックされうる。本明細書に開示の特定の実施形態では、本発明の多重ＰＣＲ反応におけるかかるブロックされたプライマーを使用する場合、ＤＮＡ複製（すなわちプライマー伸長）が妨げられる不活性な立体配置と、ＤＮＡ複製が進行する活性化された立体配置と、を有し得るプライマーが必要である。プライマーの不活性な立体配置が存在するのは、プライマーが一本鎖のときか、又は、プライマーが関心対象の標的ＤＮＡ配列と特異的にハイブリダイズするが、プライマーの３’末端又はその付近に結合した化学部分によりプライマー伸長がブロックされているときである。

【０１５４】

プライマーの活性化した立体配置が存在するのは、プライマーが関心対象の標的核酸配列にハイブリダイズし、その後ＲＮａｓｅ　Ｈ又は他の分解剤の作用を受けて３’側のブロッキング基が除去され、それにより酵素（例えばＤＮＡポリメラーゼ）が増幅反応においてプライマー伸長を触媒するときである。特定の理論に拘束されないが、かかるプライマーのハイブリダイゼーションの動力学は、二次反応と同様であり、したがって、混合物中のＴ細胞又はＢ細胞の遺伝子配列濃度の関数であると考えられる。ブロックされたプライマーは、プライマー伸長が進行することができる前に、標的にハイブリダイズした後に切断される必要があることにより、非特異的反応を最小限にする。望ましい標的配列に関連するが、塩基対のミスマッチが起こる１つ以上の非相補的ヌクレオチドが異なる配列に、プライマーが誤ってハイブリダイズする場合には、特に切断部位又はその付近にミスマッチが存在するとき、プライマーの切断が阻害される。増幅のフィデリティを改善するこのストラテジーにより、かかる部位での間違ったプライミングの頻度が減少し、それにより反応の特異性が増加する。当業者に自明のように、反応条件、特にＲＮａｓｅ　Ｈの濃度と、各サイクル中のハイブリダイゼーション及び伸長に必要な時間とを最適化して、本来の標的配列に正しくハイブリダイズするときのプライマーの非常に効率的な切断と、プライマーとテンプレート配列のあいだにミスマッチが存在して、不完全なアニールが起こり得るときのプライマーの不良な切断との間の切断効率の違いを最大化することができる。

【０１５５】

米国特許出願公開第２０１０／０１６７３５３号に記載されるように、オリゴヌクレオチド（例えばプライマー）の３’末端又はその付近に配置することにより伸長を防止することができる幾つかのブロッキング基が当技術分野で公知である。プライマー又は他のオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ合成の開始を防止若しくは阻害するために３’末端のヌクレオチドで、修飾されてもよく、例えば、３’デオキシリボヌクレオチド残基（例えばｃｏｒｄｙｃｅｐｉｎ）、２’，３’－ジデオキシリボヌクレオチド残基、非ヌクレオチド連結又はアルカンジオールによる修飾（米国特許第５，５５４，５１６号）を付加することにより修飾されうる。プライマー伸長の阻害又は妨害に使用できるアルカンジオール修飾は、Ｗｉｌｋら（１９９０　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８（８）：２０６５）及びＡｒｎｏｌｄら（米国特許第６，０３１，０９１号）に記載されている。適切なブロッキング基の更なる例としては、３’ヒドロキシル基の置換（例えば、３’－リン酸、３’－三リン酸、又は３’－ヒドロキシプロピル基などのアルコールとの３’－リン酸ジエステル）、２’３’－サイクリックリン酸、末端のＲＮＡ塩基の２’－ヒドロキシル基置換（例えば、ホスフェート又は立体的に大きな基（例えばトリイソプロピルシリル（ＴＩＰＳ）基又はｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル（ＴＢＤＭＳ）基）が挙げられる。オリゴヌクレオチドの３’末端で置換される２’－アルキルシリル基（例えばＴＩＰＳ及びＴＢＤＭＳ）は、Ｌａｉｋｈｔｅｒらの米国特許出願第１１／６８６，８９４号に記載されており、その内容を参照により本発明に援用する。プライマー伸長をブロックするために、大きな置換基も、オリゴヌクレオチドの３’－末端残基の塩基に導入することができる。

【０１５６】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、プライマー伸長を阻害するのに用いられるブロッキング基の上流（例えば５’側）に位置する切断領域を含み得る。例えば、切断領域は、ＲＮａｓｅ　Ｈ切断ドメインであってもよく、又は、切断ドメインは、単一のＲＮＡ残基を含むＲＮａｓｅ　Ｈ２切断領域であってもよく、又は、オリゴヌクレオチドは、１つ以上の代替ヌクレオシドによるＲＮＡ塩基の置換を含み得る。更なる切断ドメインの例は、米国特許出願公開第２０１０／０１６７３５３に記載される。

【０１５７】

このように、多重ＰＣＲシステムは４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５個又はそれ以上のフォワードプライマーであってそれぞれが、１つの機能的なＴＣＲ若しくはＩｇ　Ｖセグメント、又は機能的なＴＣＲ若しくはＩｇ　Ｖセグメントの小ファミリー、例えば、ＴＣＲのＶβセグメント（例えば表２で示されるＴＣＲＢＶプライマー（配列番号：１６４４～１６９５）を参照）と相補的であるフォワードプライマーと、例えば、それぞれがＴＣＲ又はＩｇ　Ｊセグメントに対して特異的な１３個のリバースプライマー（例えばＴＣＲβのＪセグメント（例えば表２のＴＣＲＢＪプライマー（配列番号：１６３１～１６４３）を参照）とを使用してもよい。他の実施形態では、多重ＰＣＲ反応では、それぞれが１つ以上の機能的なＴＣＲγのＶセグメントに特異的な４個のフォワードプライマーと、それぞれが１つ以上のＴＣＲγのＪセグメントに特異的な４個のリバースプライマーを用いてもよい。他の実施形態では、多重ＰＣＲ反応では、それぞれが１つ以上の機能的なＶセグメントに特異的な８４個のフォワードプライマーと、それぞれが１つ以上のＪセグメントに特異的な６個のリバースプライマーを用いてもよい。

【０１５８】

サーマルサイクルの条件は、当業者に公知の方法に従い得る。例えば、ＰＣＲ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）サーマルサイクラー（Ｈｙｂａｉｄ、アッシュフォード、英国）を使用する場合、以下のサイクリング条件が用いられ得る：９５℃で１５分間を１サイクル、９４℃で３０秒間、５９℃で３０秒間及び７２℃で１分間を２５～４０サイクル、次に７２℃で１０分間を１サイクル。当業者に自明なように、サーマルサイクリング条件は、例えば、アニーリング温度、アニーリング時間、サイクル数及び伸長時間を調整することにより最適化され得る。当業者に自明なように、用いられるプライマー及び他のＰＣＲ試薬の量、並びにＰＣＲパラメータ（例えば、アニーリング温度、伸長時間及びサイクル数）は、望ましいＰＣＲ増幅効率を得るために最適化され得る。

【０１５９】

あるいは、本発明において企図される特定の関連する実施形態において、「デジタルＰＣＲ」法は、検量線の必要なく、サンプル中の標的ゲノム数の定量に使用できる。デジタルＰＣＲにおいて、１つのサンプルのためのＰＣＲ反応は１００以上のマイクロセル又は小滴で実施され、それにより、それぞれの小滴が増幅する場合、例えば、増幅産物の生成は、マイクロセル又は小滴中に少なくとも１つのテンプレート分子が存在する証拠となり、又は増幅できない場合、テンプレートが所定のマイクロセル又は小滴に存在しない証拠となる。単に陽性のマイクロセルの数を数えることにより、投入サンプル中に存在する標的ゲノムの数を直接数えることも可能である。デジタルＰＣＲ法は、典型的に、サーマルサイクリング反応で各サイクルの後に測定される従来の定量的ＰＣＲシグナルよりもむしろ、エンドポイント表示を用いる（例えばＰｅｋｉｎら、２０１１　Ｌａｂ．Ｃｈｉｐ　１１（１３）：２１５６；Ｚｈｏｎｇら、２０１１　Ｌａｂ．Ｃｈｉｐ　１１（１３）：２１６７；Ｔｅｗｈｅｙら、２００９　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２７：１０２５；２０１０　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２８：１７８を参照）。したがって、本明細書に記載の組成物（例えば、適応免疫受容体遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーセット）及び方法は、例えばＡＢＩ　ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ（商標）１２Ｋ　Ｆｌｅｘ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、ＱｕａｎｔａＬｉｆｅ（商標）ｄｉｇｉｔａｌ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）又はＲａｉｎＤａｎｃｅ（商標）ｍｉｃｒｏｄｒｏｐｌｅｔ　ｄｉｇｉｔａｌ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（ＲａｉｎＤａｎｃｅ　Ｔｅｃ

ｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）などのデジタルＰＣＲ方法論での使用のために応用され得る。

【０１６０】

アダプター：

本発明に記載のオリゴヌクレオチドは、特定の実施形態において、第１（Ｕ１）及び第２（Ｕ２）（並びに任意に第３（Ｕ３）及び第４（Ｕ４））のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列を含むか、又は、Ｕ１若しくはＵ２（又はＵ３若しくはＵ４）の一方若しくは両方を含まなくともよい。ユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチドＵは、このように、何も含まないか、又は以下から選択される配列を有するオリゴヌクレオチドを含み得る：（ｉ）第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列、及び（ｉｉ）第１のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第１のシークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチド配列。また、Ｕ２は、何も含まないか、又は以下から選択される配列を有するオリゴヌクレオチドを含み得る：（ｉ）第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列、及び（ｉｉ）第２のユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列の５’側に結合して位置する第２のシークエンシングプラットホーム特異的なオリゴヌクレオチド配列。類似した関係は、Ｕ３及びＵ４にも該当する。

【０１６１】

Ｕ１及び／又はＵ２は、例えば、使用される一分子シークエンシング技術（例えばＨｉＳｅｑ（商標）又はＧｅｎｅＡｎａｌｙｚｅｒ（商標）－２（ＧＡ－２）システム（Ｉｌｌｕｍｉｎａ社、サンディエゴ、ＣＡ）又は他の適切な装置、試薬及びソフトウェアのシークエンシングスイート）に特異的な、ユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列及び／又はシークエンシングプラットホームに特異的なオリゴヌクレオチド配列を含み得る。かかるプラットホーム特異的アダプター配列を含めることにより、ＨｉＳｅｑ（商標）若しくはＧＡ２、又は同等物などのヌクレオチドシークエンシング法を使用して、本明細書の記載のようにＵが組み込まれている本明細書に記載のｄｓＤＮＡ増幅産物の直接の定量的シークエンシングが可能となる。したがって、この特徴は、有利に、ｄｓＤＮＡ組成物の定性的及び定量的な解析を可能とする。

【０１６２】

例えば、両端にユニバーサルアダプター配列を有するｄｓＤＮＡ増幅産物が生じることもあり、そのため、当該アダプター配列は、それぞれのテンプレートのそれぞれの末端に、更に、シークエンシングプラットホーム特異的オリゴヌクレオチドを組み入れるのに使用できる。

【０１６３】

理論に拘束されないが、ｄｓＤＮＡ組成物中のそれぞれの成分ｄｓＤＮＡの相対的表示に定量的変化が生じないように、プラットホーム特異的オリゴヌクレオチドを、変性、アニーリング及び伸長の３サイクル中で、５’（５’－プラットホーム配列－ユニバーサルアダプター－１配列－３’）及び３’（５’プラットホーム配列－ユニバーサルアダプター－２配列－３’）のオリゴヌクレオチドを用いてかかるｄｓＤＮＡの末端に付加してもよい。存在するそれぞれのユニーク配列の相対量を基準に、ＤＮＡ集団を特徴づけるために、ユニークな識別子配列（例えば、個々のＶ及び／又はＪ領域と結合し、それを特定するバーコード配列Ｂ、又は本明細書に記載のサンプル識別子バーコード）を、アダプター配列に隣接して配置することにより、短い配列のリードでの定量的シークエンシングが可能となる。

【０１６４】

実施例に記載され、配列表の例示的なテンプレート配列（例えば、配列番号１－１６３０の５’及び３’末端）に含まれるアダプター配列に加えて、ユニバーサルアダプター配列として用いられうる他のオリゴヌクレオチド配列も、本発明の開示を考慮して、当業者に公知となるあろう。更なるアダプター配列の非限定的な例を、表３に示し、配列番号１７１０～１７３１として記載する。

【０１６５】
【表４】
表３．典型的なアダプター配列

| アダプター（プライマー）名 | 配列 | 配列番号： |
|---|---|---|
| T7プロモーター | AATACGACTCACTATAGG | 1710 |
| T7ターミネーター | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | 1711 |
| T3 | ATTAACCCTCACTAAAGG | 1712 |
| SP6 | GATTTAGGTGACACTATAG | 1713 |
| MBF（－21） | TGTAAAACGACGGCCAGT | 1714 |
| M13F（－40） | GTTTTCCCAGTCACGAC | 1715 |
| M13Rリバース | CAGGAAACAGCTATGACC | 1．716 |
| AOX1フォワード | GACTGGTTCCAATTGACAAGC | 1717 |
| AOX1リバース | GCAAATGGCATTCTGACATCC | 1718 |
| pGEXフォワード（GST 5，pGEX 5’） | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG | 1719 |
| pGEXリバース（GS'F 3，pGEX 3’） | CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG | 1720 |
| BGFIリバース | AACTAGAAGGCACAGTCGAGGC | 1721 |
| GFP（C’末端、CFP、YFP又はBFP） | CACTCTCGGCATGGACGAGC | 1722 |
| GFPリバース | TGGTGCAGATGAACTTCAGG | 1723 |
| GAG | GTTCGACCCCGCCTCGATCC | 1724 |
| GAGリバース | TGACACACATTCCACAGGGTC | 1725 |
| CYC1リバース | GCGTGAATGTAAGCGTGAC | 1726 |
| pFastBacF | 5’－d（GGATTATTCATACCGTCCCA）－3’ | 1777 |
| pFastBacR | 5’－d（CAAATGTGGTATGGCTGATT）－3’ | 1728 |
| pBADフォワード | 5’－d（ATGCCATAGCATTTTTATCC）－3’ | 1729 |
| pBADリバース | 5’－d（GATTTAATCTGTATCAGG）－3’ | 1730 |
| CMV－フォワード | 5’－d（CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG）－3’ | 1731 |

【０１６６】
バーコード
本明細書に記載のように、特定の実施形態は、それらが組み込まれるポリヌクレオチド配列の明白な識別を可能にし、それにより、全増幅産物をシークエンシングすることなく、その産物の増幅に寄与する少なくとも１つのプライマーの識別が可能となる短いサシグネチャー配列を含むよう、オリゴヌクレオチド配列を設計することを企図する。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの、かかるバーコードＢ（例えば、Ｂ１、Ｂ２）は、それぞれ、存在しないか、又はそれぞれが、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０個若しくはそれ以上の連続するヌクレオチド（その間の全ての整数値を含む）のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドＢを含み、複数のオリゴヌクレオチド配列のそれぞれにおいて、Ｂは、特定のＶ及び／又はＪオリゴヌクレオチドプライマー配列をユニークに同定するユニークなオリゴヌクレオチド配列を含む。
【０１６７】
例示的なバーコードは、プライマー組成中のそれぞれのオリゴヌクレオチドプライマー（例えば、Ｖ又はＪプライマー）をユニークに特定する、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６ヌクレオチドの第１のバーコードオリゴヌクレオチド、並びに、任意に、特定の実施形態では、プライマーセット中のそれぞれのパートナープライマー（例えば、Ｊ又はＶプライマー）をユニークに特定する、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６ヌクレオチドの第２のバーコードオリゴヌクレオチド、を含み、それにより、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１

４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１又は３２ヌクレオチドのバーコードが提供され得るが、これらの及びこれらと関連する実施形態は、そのように限定されないと意図される。バーコードオリゴヌクレオチドは、そうでなければ異なる配列（例えばＶ及びＪ配列）を有する２つ以上の産物ポリヌクレオチド中における、所定のバーコード配列の出現を排除する最小限のバーコード長が得られる限り、任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を含み得る。

【０１６８】

このように、異なるＶ－Ｊ配列の対形成をユニークに特定するのに用いられるバーコードにおいてかかる冗長性を避けるための最小限のバーコード長は、Ｘヌクレオチドであり、$4^X$は、同一でない配列を有することに基づいて差別化される異なるテンプレート種の数より大きい。実際には、バーコードオリゴヌクレオチド配列のリード長は、用いられるヌクレオチドシークエンシング装置の配列のリード長の限界のみにより制限され得る。特定の実施形態では、テンプレートオリゴヌクレオチドの個々の種を識別する異なるバーコードオリゴヌクレオチドは、バーコードオリゴヌクレオチド配列中の特定の位置でマッチするヌクレオチドの数を最大にするように整列させた場合、少なくとも２つのヌクレオチドミスマッチ（例えば、最低２のハミング距離）を有するはずである。

【０１６９】

当業者は、例えば、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、３０、３５個又はそれ以上（その間で全ての整数値を含む）の連続するヌクレオチドのオリゴヌクレオチドバーコード配列の、設計、合成、及びより大きなオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構築物への組み込みについて熟知している。オリゴヌクレオチドバーコード配列の同定ストラテジーの設計及び実施のための非限定的な例については、例えば、ｄｅ Ｃａｒｅｅｒら、２０１１ Ａｄｖ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７７：６３１０；Ｐａｒａｍｅｓｗａｒａｎら、２００７ ＮｕｃＬ Ａｃ．Ｒｅｓ．３５（１９）：３３０；Ｒｏｈら、２０１０ Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２８：２９１を参照されたい。

【０１７０】

典型的に、バーコードは、天然で見出されない位置でオリゴヌクレオチドに配置される。すなわち、バーコードは、バーコードが存在する位置に隣接する配列の付近に認められ得るいかなる天然に存在するオリゴヌクレオチド配列（例えば、Ｖ及び／又はＪ配列）とも異なるヌクレオチド配列を含む。かかるバーコード配列は、本明細書に記載の特定の実施形態により、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドの要素Ｂ１及び／又はＢ２として含まれ得る。したがって、本発明に記載の特定のオリゴヌクレオチド組成物は、特定の実施形態において１つ、２つ又はそれ以上のバーコードを含み得るが、また別の特定の実施形態においては、これらのバーコードの一部もしくは全部が存在しなくともよい。特定の実施形態では、全てのバーコード配列は、同一若しくは類似のＧＣ含量（例えば、２０％以下、又は１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１又は１０％以下のＧＣ含量の相違）を有する。

【０１７１】

シークエンシング：

シークエンシングは、利用できる様々なハイスループットの一分子シークエンシング装置及びシステムのいずれを使用して、実施してもよい。例示的なシークエンシングシステムとしては、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ及び関連する装置（Ｉｌｌｕｍｉｎａ社、サンディエゴ、ＣＡ）、Ｈｅｌｉｃｏｓ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｈｅｌｉｃｏｓ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ社、ケンブリッジ、ＭＡ）、Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ＰａｃＢｉｏ ＲＳ （Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，ＣＡ）又は同様の機能を有する他のシステムなどの、合成時解読システムが挙げられる。シークエンシングは、増幅されたＤＮＡ分子内の規定の領域とハイブリダイズする一組のシークエンシングオリゴヌクレ

オチドを用いて実施できる。シークエンシングオリゴヌクレオチドは、本発明の開示、及び一般公開されているデータベースに存在する既知の適応免疫受容体遺伝子配列をベースに、Ｖ及びＪコード遺伝子セグメントが、生成される配列によってユニークに特定され得るように設計される。例えば、米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３又はＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２を参照。典型的なＴＣＲＢ　Ｊ－領域シークエンシングプライマーを表４に示す：

【０１７２】

【表５】

表４：ＴＣＲＢＪシークエンシングプライマー

| プライマー | 配列 | 配列番号: |
|---|---|---|
| ＞Jseq1－1 | ACAACTGTGAGTCTGGTGCCTTGTCCAAAGAAA | 1696 |
| ＞Jseq1－2 | ACAACGGTTAACCTGGTCCCCGAACCGAAGGTG | 1697 |
| ＞Jseq1－3 | ACAACAGTGAGCCAACTTCCCTCTCCAAAATAT | 1698 |
| ＞Jseq1－4 | AAGACAGAGAGCTGGGTTCCACTGCCAAAAAAC | 1699 |
| ＞Jseq1－5 | AGGATGGAGAGTCGAGTCCCATCACCAAAATGC | 1700 |
| ＞Jseq1－6 | GTCACAGTGAGCCTGGTCCCGTTCCCAAAGTGG | 1701 |
| ＞Jseq2－1 | AGCACGGTGAGCCGTGTCCCTGGCCCGAAGAAC | 1702 |
| ＞Jseq2－2 | AGTACGGTCAGCCTAGAGCCTTCTCCAAAAAAC | 1703 |
| ＞Jseq2－3 | AGCACTGTCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAAATAC | 1704 |
| ＞Jseq2－4 | AGCACTGAGAGCCGGGTCCCGGCGCCGAAGTAC | 1705 |
| ＞Jseq2－5 | AGCACCAGGAGCCGCGTGCCTGGCCCGAAGTAC | 1706 |
| ＞Jseq2－6 | AGCACGGTCAGCCTGCTGCCGGCCCCGAAAGTC | 1707 |
| ＞Jseq2－7 | GTGACCGTGAGCCTGGTGCCCGGCCCGAAGTAC | 1708 |

【０１７３】

「遺伝子」という語は、ＴＣＲ又はＩｇポリペプチド（例えばＣＤＲ３を含有するポリペプチド）の全体又は一部のようなポリペプチド鎖の産生に関係するＤＮＡのセグメントを意味する。これには、コード領域の前及び後の領域「リーダー及びトレーラー」、並びに、個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含み、また、制御エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー、リプレッサー結合部位など）が含まれてもよく、また、本明細書に記載の組み換えシグナル配列（ＲＳＳｓ）が含まれてもよい。

【０１７４】

本発明の実施形態の核酸（また、ここではポリヌクレオチドと称する）は、ＲＮＡの形でもよく、又はＤＮＡの形でもよく、ＤＮＡにはｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ及び合成ＤＮＡが含まれる。ＤＮＡは、二本鎖又は一本鎖であってもよく、一本鎖の場合、コード鎖又は非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。本発明の実施形態により使用されるＴＣＲ又は免疫グロブリン又はその領域をコードするコード配列（例えばＶセグメント、Ｄセグメント、Ｊ領域、Ｃ領域など）は、任意の所定のＴＣＲ若しくは免疫グロブリン遺伝子領域若しくはポリペプチドドメイン（例えばＶ－セグメントドメイン、ＣＤＲ３ドメインなど）に関して当技術分野で公知のコード配列と同一であってもよく、又は、遺伝暗号の冗長性又は縮重の結果としての、同じＴＣＲ又は免疫グロブリン領域又はポリペプチドをコードする異なるコード配列であってもよい。

【０１７５】

特定の実施形態では、増幅された、Ｊ－領域コード遺伝子セグメントは、それぞれ、ＲＳＳ部位に対して規定の位置に存在する、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又は約１５、２０個又はそれ以上のヌクレオチドの、ユニーク配列規定識別子タグを有し得る。

例えば、増幅されたＴＣＲβ　ＣＤＲ３コード領域のＪβ領域コードセグメントでは、ＲＳＳ部位の下流の＋１１～＋１４の位置に、４塩基のタグを用いてもよい。しかし、これらの及びこれらと関連する実施形態は、そのように限定される必要はなく、Ｊ－領域コード遺伝子セグメントにおいて検出され、ＲＳＳ部位と比較した位置に基づいて定められ得る、他の比較的短いヌクレオチド配列規定識別子タグも企図される。これらは、異なる適応免疫受容体コード座のあいだで変化し得る。

【０１７６】

組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）は、１２＋／－１塩基対（「１２－シグナル」）又は２３＋／－１塩基対（「２３－シグナル」）のスペーサーで隔てられた、２つの保存された配列（７量体、５’－ＣＡＣＡＧＴＧ－３’及び９量体、５’－ＡＣＡＡＡＡＡＣＣ－３’）を含む。７量体中の１位及び２位のＣＡジヌクレオチドを含む多数のヌクレオチド位置が、組み換えにとって重要であるとして同定されており、また、７量体の３位のＣもまた、７量体の５、６、７位のＡヌクレオチドとと同様に、非常に好ましいことが示されている（Ｒａｍｓｄｅｎら、１９９４；Ａｋａｍａｔｓｕら、１９９４；Ｈｅｓｓｅら、１９８９）。他のヌクレオチドの変異は、ほとんどないか又は一貫しない効果を有する。スペーサーもまた、より変化しやすいが、組み換えに影響を及ぼし、１ヌクレオチドの置換は、組み換え効率に有意に影響を与えることが示されている（Ｆａｎｎｉｎｇら、１９９６；Ｌａｒｉｊａｎｉら、１９９９；Ｎａｄｅｌら、１９９８））。有意に異なる組み換え効率を有するＲＳＳポリヌクレオチド配列を同定するための基準が記載されている（Ｒａｍｓｄｅｎら、９９４；Ａｋａｍａｔｓｕら、１９９４；Ｈｅｓｓｅら、１９８９及びＣｏｗｅｌｌら、１９９４）。したがって、シークエンシングオリゴヌクレオチドは、ＲＳＳ部位の下流の＋１１～＋１４位の増幅されたＪコード遺伝子セグメントにおける４塩基のタグに隣接してハイブリダイズし得る。例えば、ＴＣＲＢのためのシークエンシングオリゴヌクレオチドを、この「タグ」のすぐ下流に存在するコンセンサスヌクレオチドのモチーフにアニールするよう設計してもよく、それにより配列リードの最初の４塩基は、Ｊコード遺伝子セグメントをユニークに特定する（国際公開第２０１２／０２７５０３号参照）。

【０１７７】

ＣＤＲ３コード領域は、ＴＣＲの場合、Ｖセグメントの第２の保存されたシステインとＪセグメントの保存されたフェニルアラニンの間のＴＣＲポリペプチドをコードするヌクレオチドと定義され、その平均長は３５＋／－３ヌクレオチド長である。したがって、また特定の実施形態では、Ｖ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマーと、特定のＴＣＲ又はＩｇＨ　Ｊ領域（例えば本明細書に記載のＴＣＲ　Ｊβ、ＴＣＲ　Ｊγ又はＩｇＨ　ＪＨ）のＪセグメントタグから始まるＪ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマーとを用いたＰＣＲ増幅は、５０の塩基対のリードで、完全なＶ－Ｄ－Ｊ結合部をほとんど常に捕捉する。ＩｇＨ　ＣＤＲ３領域（Ｖセグメント中の保存されたシステインとＪセグメント中の保存されたフェニルアラニンとの間のヌクレオチドと定義）の平均長は、ＴＣＲβ座よりも限定されないが、典型的に、約１０～約７０ヌクレオチドであろう。したがって、特定の実施形態では、ＩｇＨ　Ｊセグメントタグから始まる、Ｊ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマー及びＶ－セグメントオリゴヌクレオチドプライマーを用いたＰＣＲ増幅は、１００塩基対のリードで、完全なＶ－Ｄ－Ｊ結合部を捕捉する。

【０１７８】

ミスマッチなテンプレート配列上でアニールし、ポリヌクレオチド伸長を支えるＰＣＲプライマーは、雑多な（promiscuous）プライマーと呼ばれる。特定の実施形態では、ＴＣＲ及びＩＧ　Ｊ－セグメントのリバースＰＣＲプライマーは、多重ＰＣＲ状況において、雑多なプライミングを最小限にするため、シークエンシングオリゴヌクレオチドとの重複が最小となるように設計され得る。一実施形態では、ＴＣＲ及びＩＧ　Ｊ－セグメントリバースプライマーは、シークエンシングプライマーとの重複が最小となるように、コンセンサススプライス部位モチーフにアニールすることにより、３’末端に固定され得る。通常、ＴＣＲ及びＩｇのＶ及びＪ－セグメントプライマーは、デフォルトパラメータ下で

、既知の配列／プライマー設計及び解析プログラムを使用して、一貫したアニール温度でのＰＣＲにおいて機能するように選択される。

【０１７９】

シークエンシング反応のための例示的なＩＧＨＪシークエンシングプライマーは、国際公開第２０１２／０２７５０３号に記載のように、保存されたＣＡＧ配列全体で３ヌクレオチド伸長させる。

【０１８０】

サンプル：

生物学的試験サンプルが得られる対象又は生物学的ソースは、ヒト若しくはヒト以外の動物、又はトランスジェニックの、クローン化、若しくは組織工学操作された（幹細胞の使用を含む）生物であってもよい。本発明の特定の好ましい実施形態では、対象又は生物学的ソースは、血液腫瘍若しくは固形腫瘍、又は他の悪性状態、又は自己免疫疾患、又は炎症状態を有することがわかっているか、有する疑いがあるか、又は有するリスクがあり、本発明の特定の好ましい実施形態では、対象又は生物学的ソースは、かかる疾患のリスク又は存在がないことがわかっていてもよい。

【０１８１】

特定の好ましい実施形態では、当技術分野で容認された臨床診断基準にしたがい、癌を有すると診断されたか、又は癌の発生若しくは罹患のリスクを有する患者などのヒト対象である、対象又は生物学的ソースが企図され、そのような基準の例には、米国立癌研究所（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，ＵＳＡ）の基準、又はＤｅＶｉｔａ，Ｈｅｌｌｍａｎ，ａｎｄ Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ’ｓ Ｃａｎｃｅｒ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２００８，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ／Ｏｖｉｄ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）；Ｐｉｚｚｏ ａｎｄ Ｐｏｐｌａｃｋ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（Ｆｏｕｒｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ／Ｏｖｉｄ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）；及びＶｏｇｅｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｋｉｎｚｌｅｒ，Ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｃａｎｃｅｒ（Ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００２，ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）に記載される基準が挙げられる。特定の実施形態では、かかる基準に照らし、癌を有するか、癌を発症するか、又は癌に罹患するリスクを有さないことがわかっているヒト対象が企図される。

【０１８２】

特定の他の実施形態では、非ヒト対象又は生物学的ソース（例えばヒト以外の霊長類（例えばマカーク、チンパンジー、ゴリラ、ベルベットモンキー、オランウータン、ヒヒ、又は他の非ヒト霊長類））が企図され、それらには、固形腫瘍及び／又は他の癌の臨床前モデルを含む、前臨床モデルとして当技術分野で公知であり得る非ヒト対象が含まれる。特定の他の実施形態では、非ヒト被験者としては、哺乳動物（例えば、マウス、ネズミ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ヤギ、スナネズミ、ハムスター、モルモット又は他の哺乳動物）である非ヒト対象が企図され、かかる多くの哺乳動物は、血液腫瘍又は固形腫瘍及び／又は他の癌を含む、特定の疾患又は障害の前臨床モデルとして当技術分野において公知の対象であり得る（例えば、Ｔａｌｍａｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，２００７ Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１７０：７９３；Ｋｅｒｂｅｌ，２００３ Ｃａｎｅ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒａｐ．２（４ Ｓｕｐｐｌ １）：Ｓ１３４；Ｍａｎｅｔ ａｌ．，２００７ Ｃａｎｅ．Ｍｅｔ．Ｒｅｖ．２６：７３７；Ｃｅｓｐｅｄｅｓｅｔ ａｌ．，２００６ Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｉ．Ｏｎｃｏｌ．８：３１８を参照）。しかし、実施形態の範囲は上記に限定されないと意図され、対象又は生物学的ソースが、非哺乳動物の脊椎動物、例えば他の高等脊椎動物、又は鳥類、両生類、若しくは爬虫類種、又はその他の対象若しくは生物学的ソースであり得る他の実施形態も同様に企図される。

【０１８３】

生物学的サンプルは、対象又は生物学的ソースからの血液サンプル、生検標本、組織外植片、臓器培養物、体液又は他のあらゆる組織若しくは細胞調製物を得ることにより提供され得る。好ましくは、サンプルは、対象又は生物学的ソースのリンパ系細胞由来のＤＮＡを含み、説明のみを目的とし、限定するわけではないが、１つ以上のＴＣＲ又はＢＣＲ座で再構成されたＤＮＡを含み得る。特定の実施形態では、生物学的試験サンプルは、固体組織（例えば固形腫瘍）から、例えば外科的切除、針生検、又は細胞混合物を含む生物学的試験サンプルを得るための他の手段から得てもよい。

【０１８４】

特定の実施形態では、多数の確立した方法論のいずれかにより、リンパ系細胞（例えば、Ｔ細胞及び／又はＢ細胞）を単離することが望ましく、その場合、単離されたリンパ系細胞とは、それらが天然に存在する組織又は環境又は周囲から除去又は分離されている細胞である。Ｂ細胞及びＴ細胞はこのように、生物学的サンプル（例えば骨髄、胸腺、リンパ腺、リンパ節、末梢の組織及び血液を含む様々な組織及び体液サンプル）から得ることができるが、末梢血は最も容易に入手できる。如何なる末梢組織も、Ｂ及びＴ細胞が存在するため、サンプルを採取でき、したがって、本明細書に記載の方法での使用が企図される。適応的免疫細胞が得られ得る組織及び体液としては、限定されないが、皮膚、上皮組織、大腸、脾臓、粘膜分泌、口腔粘膜、腸管粘膜、膣粘膜又は膣分泌腺、子宮頸部組織、神経節、唾液、脳脊髄液（ＣＳＦ）、骨髄、臍帯血、血清、漿液、血漿、リンパ液、尿、腹水、胸水、心嚢液、腹膜液、腹部液、培養培地、条件培養培地又は洗浄液が挙げられる。特定の実施形態では、適応的免疫細胞は、アフェレーシスサンプルから単離してもよい。末梢血液サンプルは、静脈切開により対象から得てもよい。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、当業者に公知の技術（例えばＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（登録商標）密度勾配分離）により単離される。特定の実施形態では、全ＰＢＭＣｓが分析のために用いられる。

【０１８５】

核酸抽出の際、全ゲノムＤＮＡは、当技術分野において公知の方法及び／又は市販のキット（例えばＱＩＡａｍｐ（登録商標）ＤＮＡ ｂｌｏｏｄ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ（登録商標））を使用して、細胞から抽出され得る。１つの半数体ゲノムの質量は、約３ｐｇである。好ましくは、少なくとも１００，０００～２００，０００個の細胞（すなわち倍数体Ｔ又はＢ細胞からの約０．６～１．２μｇのＤＮＡ）が、分析に用いられる。ソースとしてＰＢＭＣｓを用いる場合、Ｔ細胞数は、全細胞数に対して約３０％であると推定され得る。Ｂ細胞数は、ＰＢＭＣ調製物中の全細胞数に対して約３０％であると推定され得る。

【０１８６】

Ｉｇ及びＴＣＲの遺伝子座は、多くの異なる可変（Ｖ）、多様（Ｄ）及び結合（Ｊ）遺伝子セグメントを含み、それは初期のリンパ分化の間、再構成プロセスを受ける。Ｉｇ及びＴＣＲのＶ、Ｄ及びＪ遺伝子セグメント配列は、当技術分野において公知であり、ＧＥＮＢＡＮＫのような公共データベースでも利用できる。Ｖ－Ｄ－Ｊ再構成は、リコンビナーゼ酵素複合体により媒介され、その際、ＲＡＧ１及びＲＡＧ２タンパク質は、Ｖ遺伝子セグメントの下流、Ｄ遺伝子セグメントの両側、及びＪ遺伝子セグメントの上流に位置する組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）において、ＤＮＡを認識し、切断することで、鍵となる役割を演ずる。不適切なＲＳＳは、再構成を減少させるか又は完全に妨害さえする。組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）は、１２＋／－１塩基対（「１２－シグナル」）又は２３＋／－１塩基対（「２３－シグナル」）のスペーサーで隔てられた、２つの保存された配列（７量体：５’－ＣＡＣＡＧＴＧ－３’及び９量体：５’－ＡＣＡＡＡＡＡＣＣ－３’）を含む。

【０１８７】

７量体の１位及び２位のＣＡジヌクレオチドを含む多数のヌクレオチド位置が、組み換えにとって重要であるとして同定されており、７量体の３位置のＣもまた、９量体の５、６、７位置でのＡヌクレオチドと同様に非常に好ましいことが示されている（Ｒａｍｓｄ

ｅｎら、１９９４ Ｎｕｃｌ．Ａｃ．Ｒｅｓ．２２：１７８５；Ａｋａｍａｔｓｕら、１９９４ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５３：４５２０；Ｈｅｓｓｅら、１９８９ Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：１０５３）。他のヌクレオチドの突然変異は、非常に小さいか又は一貫しない効果を有する。スペーサーは、より変化しやすいが、これもまた組み換えに影響を及ぼし、１つのヌクレオチドの置換が組み換え効率に有意な影響を与えることが示されている（Ｆａｎｎｉｎｇら、１９９６ Ｃｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈ．７９：１，Ｌａｒｉｊａｎｉら、１９９９ Ｎｕｃｌ．Ａｃ．Ｒｅｓ．２７：２３０４；Ｎａｄｅｌら、１９９８ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１：６０６８；Ｎａｄｅｌら、１９９８ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８７：１４９５）。有意に異なる組み換え効率を有するＲＳＳポリヌクレオチド配列を同定するための基準が記載されている（Ｒａｍｓｄｅｎら、１９９４ Ｎｕｃｌ．Ａｃ．Ｒｅｓ．２２：１７８５；Ａｋａｍａｔｓｕら、１９９４ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５３：４５２０；Ｈｅｓｓｅら、１９８９ Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：１０５３及びＬｅｅら、２００３ ＰＬｏＳ １（１）：Ｅ１）。

【０１８８】

再構成プロセスは、一般に、Ｉｇ重鎖（ＩｇＨ）、ＴＣＲβ（ＴＣＲＢ）及びＴＣＲδ（ＴＣＲＤ）遺伝子の場合、ＤからＪの再構成で始まって、ＶからＤ－Ｊへの再構成が続き、一方、Ｉｇκ（ＩｇＫ）、Ｉｇλ（ＩｇＬ）、ＴＣＲα（ＴＣＲＡ）及びＴＣＲγ（ＴＣＲＧ）遺伝子の場合、ＶからＪへの直接の再構成に関係する。再構成遺伝子セグメント間の配列は通常、ＴＣＲ環状ＤＮＡ（ＴＲＥＣ）またはＢ細胞受容体環状ＤＮＡ（ＢＲＥＣ）とも呼ばれる、切り出された環状産物の形状で欠失される。

【０１８９】

Ｖ、Ｄ及びＪ遺伝子セグメントの多くの異なる組合せは、いわゆる組合せレパートリー表し、それはＩｇ分子の場合～２×１０$^{6}$、ＴＣＲαβの場合～３×１０$^{6}$、ＴＣＲγδの場合～５×１０$^{3}$分子と推定される。Ｖ、Ｄ及びＪ遺伝子セグメントの結合部位では、ヌクレオチドの欠失及びランダムな挿入が再構成プロセスの間に起こり、それによって非常に多様な結合領域を形成し、＞１０$^{1\,2}$と推定されるＩｇ及びＴＣＲ分子の総レパートリーに有意に貢献する。

【０１９０】

成熟Ｂリンパ球は、Ｉｇ分子のアフィニティ成熟に至るプロセスである体細胞超変異プロセスを通じて、濾胞中心における抗原認識の際に、それらのＩｇレパートリーを更に広げる。体細胞超変異プロセスは、ＩｇＨ及びＩｇ軽鎖遺伝子のＶ－Ｄ－Ｊエクソンで主に起こり、ヌクレオチド突然変異及び時にはヌクレオチドの挿入又は削除に関係する。体細胞変異Ｉｇ遺伝子は、濾胞若しくはポスト濾胞起源の成熟Ｂ細胞悪性疾患でも発見される。

【０１９１】

本明細書に記載の特定の実施形態では、Ｖ－セグメント及びＪ－セグメントのプライマーをＰＣＲ反応で使用して、生物学的試験サンプル中の再構成されたＴＣＲ又はＢＣＲのＣＤＲ３コードＤＮＡ領域を増幅してもよく、その際、それぞれの機能的なＴＣＲ又はＩｇのＶコード遺伝子セグメントは、Ｖ遺伝子組み換えシグナル配列（ＲＳＳ）を含み、それぞれの機能的なＴＣＲ又はＩｇのＪコード遺伝子セグメントは、Ｊ遺伝子ＲＳＳを含む。これらの、及びこれらと関連する実施形態では、増幅されたそれぞれの再構成されたＤＮＡ分子は、（ｉ）ＴＣＲ又はＩｇのＶコード遺伝子セグメントのセンス鎖の、少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００個（その間の全ての整数値を含む）又はそれ以上の連続するヌクレオチドと、Ｖ遺伝子のＲＳＳの５’に位置する少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００個又はそれ以上の連続するヌクレオチドを含んでもよく、及び／又は、増幅されたそれぞれの再構成されたＤＮＡ分子は、（ｉｉ）ＴＣＲ又はＩｇのＪコード遺伝子セグメントのセンス鎖の、少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、

３００、４００、５００個（その間の全ての整数値を含む）又はそれ以上の連続するヌクレオチドと、Ｊ遺伝子ＲＳＳの３’に位置する少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００個又はそれ以上の連続するヌクレオチドと、を含んでもよい。

【０１９２】

本発明の特定の実施形態を実施する際、特にことわりのない限り、当業者の技術の範囲内である細菌学、分子生物学、生化学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学及び免疫学的技術における従来法を使用し、説明目的でその幾つかを以下に参照する。かかる技術は、以下の文献で完全に説明される。例えば、以下の文献を参照のこと：Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３rd Ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１）；Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２nd Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）；Ｍａｎｉａｔｉｓら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８２）；Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，ｕｐｄａｔｅｄ Ｊｕｌｙ ２００８）；Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｒｏｍ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ；Ｇｌｏｖｅｒ，ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ｖｏｌ．Ｉ ＆ ＩＩ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖ．Ｐｒｅｓｓ ＵＳＡ，１９８５）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ：Ｊｏｈｎ Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ，Ａｄａ Ｍ．Ｋｒｕｉｓｂｅｅｋ，Ｄａｖｉｄ Ｈ．Ｍａｒｇｕｌｉｅｓ，Ｅｔｈａｎ Ｍ．Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｗａｒｒｅｎ Ｓｔｒｏｂｅｒ ２００１ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ，ＮＹ）；Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｊｕｌｉｅ Ｌｏｇａｎ，Ｋｉｒｓｔｉｎ Ｅｄｗａｒｄｓ ａｎｄ Ｎｉｃｋ Ｓａｕｎｄｅｒｓ，２００９，Ｃａｉｓｔｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｏｒｆｏｌｋ，ＵＫ；Ａｎａｎｄ，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｇｅｎｏｍｅｓ，（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９２）；Ｇｕｔｈｒｉｅ ａｎｄ Ｆｉｎｋ，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９１）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｎ．Ｇａｉｔ，Ｅｄ．，１９８４）；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ．Ｈａｒｎｅｓ ＆ Ｓ．Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｅｄｓ．，１９８５）；Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ（Ｂ．Ｈａｒｎｅｓ ＆ Ｓ．Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｅｄｓ．，１９８４）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｅｄ．，１９８６）；Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）；Ｎｅｘｔ－Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（Ｊａｎｉｔｚ，２００８ Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ）；ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）（Ｐａｒｋ，Ｅｄ．，３rd Ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１０ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）；Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ Ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１９８６）；ｔｈｅ ｔｒｅａｔｉｓｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ Ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｈ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ ｅｄｓ．，１９８７，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａ

boratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998）；Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology（Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987）；Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I－IV（D.M.Weir and CC Blackwell, eds., 1986）；Riott, Essential Immunology, 6th Edition,（Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988）；Embryonic Stem Cells：Methods and Protocols（Methods in Molecular Biology）（Kursad Turksen, Ed., 2002）；Embryonic Stem Cell Protocols：Volume 1：Isolation and Characterization（Methods in Molecular Biology）（Kurstad Turksen, Ed., 2006）；Embryonic Stem Cell Protocols：Volume II：Differentiation Models（Methods in Molecular Biology）（Kurstad Turksen, Ed., 2006）；Human Embryonic Stem Cell Protocols（Methods in Molecular Biology）（Kursad Turksen Ed., 2006）；Mesenchymal Stem Cells：Methods and Protocols（Methods in Molecular Biology）（Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008）；Hematopoietic Stem Cell Protocols（Methods in Molecular Medicine）（Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001）；Hematopoietic Stem Cell Protocols（Methods in Molecular Biology）（Kevin D. Bunting Ed., 2008）Neural Stem Cells：Methods and Protocols（Methods in Molecular Biology）（Leslie P. Weiner Ed., 2008）。

【０１９３】

特に定義されない限り、本明細書に記載の、分子生物学、分析化学、合成有機化学、並びに薬学及び製薬化学に関連して利用される命名法、実験的手法及び方法論は公知であり、当業者により一般的に用いられる。組み換え技術、分子生物学的、微生物学的及び化学的合成、化学分析、医薬調製物、製剤及び輸送、並びに患者の治療のための標準的な技術を用いることができる。

【０１９４】

「単離された」という語は、材料がその元の環境（例えばそれが天然に存在する場合は自然環境）から除去されることを意味する。例えば、生存する動物の元の環境中に天然に存在する組織、細胞、核酸又はポリペプチドは、単離されていないが、同じ組織、細胞、核酸又はポリペプチドが、天然のシステムで共存している材料の一部若しくは全部から分離されたときは、単離されている。かかる核酸は、ベクターの一部であってもよく、及び／又は、かかる核酸又はポリペプチドは、組成物（例えば細胞溶解物）の一部であってもよく、また、かかるベクター又は組成物が、核酸又はポリペプチドの天然の環境の一部でないという点で、単離されている。「遺伝子」という語は、ポリペプチド鎖の生産に関係するＤＮＡのセグメントを意味する。この用語は、コード領域の前後に存在する「リーダー及びトレーラー」領域、並びに、個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）も含む。

【０１９５】

本明細書及び特許請求の範囲全体において、文脈上別段の解釈を要する場合を除き、「

を含む」という語及びそのバリエーション（例えば「ｃｏｎｐｒｉｓｅｓ」及び「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」）は、包括的に（すなわち、「～を含むが、これに限定されるものではない」と）解釈されるものとする。「～からなる」という語は、「からなる」の語に続くものを全て含み、かつ、典型的にはそれに限定されることを意味する。「本質的に～からなる」という語は、用語の後に列挙されるあらゆる要素を含み、列挙された要素の開示において明記された活性又は作用を妨害しないか、又はそれらに寄与する他の要素に限定されることを意味する。すなわち、「本質的に～からなる」という用語は、列挙された要素が必要であるが又は必須であるが、他の要素は必要でなく、それらが列挙された要素の活性又は作用に影響を及ぼすか否かに応じて存在してもしなくてもよいことを示す。

【０１９６】

本明細書及び添付の特許請求の範囲では、単数形である「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、特にことわりのない限り、その複数形も含まれる。特定の実施形態では、本明細書において数値に先行して用語「約」又は「およそ」が用いられるときは、５％、６％、７％、８％又は９％の範囲でプラスマイナスされた値を示すものとする。他の実施形態では、本明細書において数値に先行して用語「約」又は「およそ」が用いられるときは、１０％、１１％、１２％、１３％又は１４％の範囲でプラスマイナスされた値を示すものとする。更に他の実施形態では、本明細書において数値に先行して用語「約」又は「およそ」が用いられるときは、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％又は２０％の範囲でプラスマイナスされた値を示すものとする。

【０１９７】

本明細書全体における、「一実施形態」又は「１つの実施形態」又は「態様」の用語は、実施形態に関連して記載される特定の性質、構造又は特徴が、本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。このように、「一実施形態では」又は「１つの実施形態では」の用語が本明細書を通じて幾つか出現するが、それは、これらの全てが、必ずしも同じ実施形態について言及しているわけではない。更に、特定の性質、構造又は特徴は、１つ以上の実施形態において、任意の適切な方法で組み合わせてもよい。

【実施例】

【０１９８】

実施例１：単分子の標識：

単分子標識プロセスでは、ポリメラーゼ連鎖反応のアプローチを採用し、ユニークなバーコードとユニバーサルプライマーによって、適応的免疫受容体コード配列にタグを付した。個々のバーコードにタグを付すＰＣＲ反応では、ＱＩＡＧＥＮ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　ＰＣＲマスターミックス（ＱＩＡＧＥＮ　ｐａｒｔ番号２０６１４５、Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、ＣＡ）、１０％のＱ－ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＱＩＡＧＥＮ）及び３００ｎｇのテンプレートＤＮＡを用いた。プールされたプライマーを、最終的な反応液中の、総フォワードプライマーの濃度が２μＭ、総リバースプライマーの濃度が２μＭとなるように添加した。フォワードプライマーは、Ｖ遺伝子（Ｖ遺伝子にアニールするセグメントを表２で示す）にアニールするヌクレオチド配列部分と、５’末端でユニバーサルプライマー（ｐＧＥＸ　ｆ、表３）とで構成された。アグリゲートプライマーを表６に列挙する。これらのプライマーは、より高い特異性のため、Ｖプライマーの３’末端とユニバーサルプライマー配列の５’末端との間にランダムなヌクレオチド挿入を有してもよい。リバースプライマーは、Ｊ遺伝子領域（表２）にアニールできるヌクレオチドの部分と、Ｊプライマーの５’末端上の、ランダムなヌクレオチドで構成される８塩基対バーコードと、８塩基対のランダムなバーコードの５’末端にユニバーサルプライマー（ｐＧＥＸｒ、表３）と、を有する。これらのプライマーの例を、表５に列挙する。ランダムなヌクレオチドから構成される８塩基対のバーコードは、より短くてもよく、又はより長くてもよく、塩基対の追加、によりユニークなバーコードの数が増加する。

【０１９９】

７サイクルのＰＣＲ反応で、ヌクレオチドタグが分子に組み込まれた。サーマルサイクル条件は、以下の通りであった：９５℃で５分間、次に、９５℃で３０秒間、６８℃で９

０秒間、及び７２℃で３０秒のサイクルを７サイクル。７サイクルの後、ｒｘｎを７２℃で１０分間維持する。

【０２００】

抗原受容体分子を、ランダムな８塩基対タグを有するプライマーによりタグ付けしたのち、残っているあらゆるプライマーを、ＥｘｏＳＡＰ－ＩＴ（製品番号：７８２００、アフィメトリクス、サンタクララ、ＣＡ）を使用して分解した。ＥｘｏＳＡＰ－ＩＴは、エキソヌクレアーゼＩ及びエビアルカリホスファターゼの活性を利用するアフィメトリクス社の製品であり、エキソヌクレアーゼＩは一本鎖ＤＮＡを分解し、またＳＡＰはｄＮＴＰｓを分解する。本実施例では、１０μＬのＰＣＲ試薬と４μＬのｅｘｏＳＡＰ－ＩＴを用いた。反応物を、３７℃で１５分間インキュベートし、更に８０℃で１５分間インキュベートすることによりｅｘｏＳＡＰ－Ｉｔを不活性化した。このとき、分子はバーコードとユニバーサルプライマーとによりユニークにタグ付けされた。タグ付けされた産物を増幅するために、ユニバーサルｐＧＥＸプライマーで次のＰＣＲ反応を実施した。この反応では、ＱＩＡＧＥＮ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　ＰＣＲマスターミックス（ＱＩＡＧＥＮ番号２０６１４５、Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、ＣＡ）、１０％のＱ－ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＱＩＡＧＥＮ）及びテンプレートとして６μＬの精製後のＰＣＲ反応物を用いた。フォワードユニバーサル（ｐＧＥＸｆ）プライマーを、最終濃度が２μＭとなるように混合物に添加して、リバースユニバーサルプライマー（ｐｇＥＸｒ）を、その最終濃度が２μＭとなるように反応に添加した。これらの分子をシークエンシングするため、ｐＧＥＸプライマーを用いてＩｌｌｕｍｉｎａアダプターを組み入れた。反応条件は、プライマーを、テーリングプライマーと入れ替えたことを除き、前記と同じであった（下記の配列番号：５６８６～５８７７、表７）。７サイクルのＰＣＲ反応で、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプター（８塩基対のタグと６塩基対のヌクレオチドのランダムなセットを含む）が分子に組み込まれた。サーマルサイクル条件は、以下の通りであった：９５℃で５分間、次に、９５℃で３０秒間、６８℃で９０秒間、及び７２℃で３０秒のサイクルを７サイクル。７サイクルの後、ｒｘｎを７２℃で１０分間維持する。

【０２０１】

標識された分子を、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプターにより「テール付加」した後、それらをシークエンシングに供した。本実施例では、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨＩＳＥＱ（商標）シークエンシングプラットホームを用いて、８塩基対のランダム配列を通して適応的免疫受容体をコードする配列へ、シークエンシングを実施した。シークエンシングされた分子は、８塩基対のランダムなタグを含んでいた。同一のＣＤＲ３及び８塩基対のランダムタグ配列を有する全てのシークエンシングされた分子は、単一の細胞の適応的免疫受容体をコードするポリヌクレオチド配列から増幅された。

【０２０２】

表５は、単分子のシークエンシング用のＪプライマー（リバースプライマー）を示し、表６は、Ｖプライマー（フォワードプライマー）を示す。ＰＣＲプロトコルは短い：１回目のＰＣＲ（５サイクル）では、前記のプライマーによりユニークにそれぞれの分子にタグ付けを行い、次の２回目のＰＣＲ（３５サイクル）では、ユニバーサルプライマー（ＰＧＥＸ）により分子を増幅する。これらの反応後、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプターにテールを付加するためのＰＣＲ反応を行う。

【０２０３】

【表６】

表５

| Jプライマー名 | 塩基数 | 配列番号: | 配列 |
|---|---|---|---|
| pGEXr_TCRBJ1－1_vD12 | 60 | 5613 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NGT CTT ACC TAC AAC TGT GAG TCT GGT GCC |
| pGEXr_TCRBJ1－2_vD12 | 59 | 5614 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCC TTA CCT ACA ACG GTT AAC CTG GTC CC |
| pGEXr_TCRBJ1－3_vD12 | 62 | 5615 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCT TAC TCA CCT ACA ACA GTG AGC CAA CTT CC |
| pGEXr_TCRBJ1－4_vD12 | 57 | 5616 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NAT ACC CAA GAC AGA GAG CTG GGT TCC |
| pGEXr_TCRBJ1－5_vD12 | 60 | 5617 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NAA CTT ACC TAG GAT GGA GAG TCG AGT CCC |
| pGEXr_TCRBJ1－6_vD12 | 53 | 5618 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCT GTC ACA GTG AGC CTG GTC CC |
| pGEXr_TCRBJ2－1_vD12 | 49 | 5619 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCA CGG TGA GCC GTG TCC C |
| pGEXr_TCRBJ2－2_vD12 | 53 | 5620 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCC AGT ACG GTC AGC CTA GAG CC |
| pGEXr_TCRBJ2－3_vD12 | 49 | 5621 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCA CTG TCA GCC GGG TGC C |
| pGEXr_TCRBJ2－4_vD12 | 49 | 5622 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCA CTG AGA GCC GGG TCC C |
| pGEXr_TCRBJ2－5_vD12 | 48 | 5623 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NAC CAG GAG CCG CGT GCC |
| pGEXr_TCRBJ2－6_vD12 | 49 | 5624 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NCA CGG TCA GCC TGC TGC C |
| pGEXr_TCRBJ2－7_vD12 | 49 | 5625 | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GGN NNN NNN NGA CCG TGA GCC TGG TGC C |

【０２０４】

【表７－１】

表６

| プライマー名 | 配列番号: | 配列 |
|---|---|---|
| pGEXf_TCRB V10_verD10 | 5626 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGAATGCCCTGACAGCTCTCGCTTATA |
| pGEXf_TCRB V02_verD10 | 5627 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCTCAGAGAAGTCTGAAATATTCGATGATCAATTCTCAGTTG |
| pGEXf_TCRB V03－1_verD10 | 5628 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCCAAATCGMTTCTCACCTAAATCTCCAGACAAAG |
| pGEXf_TCRB V03－2_verD10 | 5629 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCACCTGACTCTCCAGACAAAGCTCAT |
| pGEXf_TCRB V04－1／2／3_verD10 | 5630 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGCCTGAATGCCCCA ACAGCTCTC |
| pGEXf_TCRB V05－1_verD10 | 5631 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGGATTCTCAGGGC GCCAGTTCTCTA |
| pGEXf_TCRB V05－2_verD10 | 5632 | GGGCT GGC AAGCC ACGTTTGGT GCCT AATT GATT CT CAGCTCACCACGTCCATA |
| pGEXf_TCRB V05－3_verD10 | 5633 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGTCAGGGCGCCAGTTCCATG |
| pGEXf_TCRB V05－4_verD10 | 5634 | GGGCT GGC AAGCC ACGTTT GGTGT CCT AGATT CTCAGGTCTCCAGTTCCCTA |
| pGEXf_TCRB V05－5_verD10 | 5635 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGAGGAAACTTCCCTGATCGATTCTCAGC |
| pGEXf_TCRB V05－6_verD10 | 5636 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCA |
| pGEXf_TCRB V05－7_verD10 | 5637 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGAGGAAACTTCCCTGATCAATTCTCAGGTCA |
| pGEXf_TCRB V05－8_verD10 | 5638 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGGAAACTTCCCTCCTAGATTTT CAGGTCG |
| pGEXf_TCRB V06－1_verD10 | 5639 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCCCCAATGGCTACAATGTCTCC AGATT |
| pGEXf_TCRB V06－2／3_verD10 | 5640 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGGAGAGGTCCCTGATGGCTACAA |
| pGEXf_TCRB V06－4_verD10 | 5641 | GGGCTGGC AAGC C ACGTTT GGT GT CCCT GAT GGTT ATAGTGTCTCCAGAGC |
| pGEXf_TCRB V06－5_verD10 | 5642 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGGAGAAGTCCCCAAT GGCT ACAAT GT C |
| pGEXf_TCRB V06－6_verD10 | 5643 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGAAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTACAA |
| pGEXf_TCRB V06－7_verD10 | 5644 | GGGCT GGC AAGCC ACGTTTGGT GGTT CCCAAT GGCTACAATGTCTCCAGATC |
| pGEXf_TCRB V06－8vcrD10 | 5645 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCT AGATT |
| pGEXf_TCRB V06－9_verD10 | 5646 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGGAGAAGTCCCCGATGGCTACAATGTA |
| pGEXf_TCRB V07－1_verD10 | 5647 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGATCGGTTCTCTGCACAGAGGT |
| pGEXf_TCRB V07－2_verD10 | 5648 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCGCTTCTCTGCAGAGAGGACTGG |
| pGEXf_TCRB V07－3_verD10 | 5649 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGGTTCTTTGCAGTCAGGCCTGA |
| pGEXf_TCRB V07－4_verD10 | 5650 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCAGTGGTCGGTTCTCTGCAGAG |
| pGEXf_TCRB V07－5_verD10 | 5651 | GGGCTGGC AAGC C ACGTTT GGT GGCT CAGT GAT CAATTCTCCACAGAGAGGT |
| pGEXf_TCRB V07－6／7_verD10 | 5652 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGTTCTCTGCAGAGAGGCCTGAGG |
| pGEXf_TCRB V07－8_verD10 | 5653 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCCCAGTGATCGCTTCTTT GCAGAAA |
| pGEXf_TCRB V07－9_verD10 | 5654 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCT |
| pGEXf_TCRB V08－1_verD10 | 5655 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGAAGGGTACAATGTCTCTGGAAACAAACTCAAG |

【０２０５】

【表７－２】

（表６の続き）

| プライマー名 | 配列番号: | 配列 |
|---|---|---|
| pGEXf_TCRB V08－2_verD10 | 5656 | GGGCTGGC AAGCC ACGTTTGGT GGGGGTACTGT GTTT CTT GAAAC AAGCTT GAG |
| pGEXf_TCRB V09_verD10 | 5657 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGCAGTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAAC |
| pGEXf_TCRB V10－IverD10 | 5658 | GGGCTGGC AAGCC ACGTTT GGT GACT AAC AAAGG AGAAGT CTCAGAT GGCT ACAG |
| pGEXf_TCRB V10－2_verD10 | 5659 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGAGATAAAGGAGAAGTCCCCGATGGCTA |
| pGEXf_TCRB V10－3_verD10 | 5660 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGGATACTGACAAAGGAGAAGT CTCAGAT GGCT AT AG |
| pGEXf_TCRB V11－I／2／3_verD10 | 5661 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCTAAGGATCGATTTTCTGCAGAGAGGCTC |
| pGEXf_TCRB V12－I_verD10 | 5662 | GGGCT GGC AAGCC ACGTTTGGT GTT GATT CT CAGCACAGAT GCCT GAT GT |
| pGEXf_TCRB V12－2_verD10 | 5663 | GGGCT GGC AAGCC ACGTTTGGT GATT CT CAGCT GAGAGGCCTGATGG |
| pGEXf_TCRB V12－3／4_verD10 | 5664 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGGATCGATTCTCAGCTAAGATGCCT AATGC |
| pGEXf_TCRB V12－5_verD10 | 5665 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCTCAGCAGAGATGCCT GAT GC AACTTT A |
| pGEXf_TCRB V13_verD10 | 5666 | GGGCTGGC AAGC C ACGTTT GGT GCT G ATCG ATT CTCAGCTCAACAGTTCAGT |
| pGEXf_TCRB V14_verD10 | 5667 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGTAGCTGAAAGGACTGGAGGGACGTAT |
| pGEXf_TCRB V15_verD10 | 5668 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCCAGGAGGCCGAACACTT CTTTCT |
| pGEXf_TCRB V16_verD10 | 5669 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGGCTAAGTGCCTCCCAAATTCACCCT |
| pGEXf_TCRB V17_verD10 | 5670 | GGGCT GGC AAGCC ACGTTTGGT GC AC AGCT GAAAGACCTAACGGAACGT |
| pGEXf_TCRB V18_verD10 | 5671 | GGGCTGGC AAGCC ACGTTT GGT GCT GCTGAATTT CCCAAAGAGGGCC |
| pGEXf_TCRB V19_verD10 | 5672 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGAGGGTACAGCGTCTCTCGGG |
| pGEXf_TCRB V20_verD10 | 5673 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGGCCTGACCTTGTCCACTCTGACA |
| pGEXf_TCRB V21_verD10 | 5674 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGATGAGCGATTTTTAGCCCAATGCTCCA |
| pGEXf_TCRB V22_verD10 | 5675 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGTGAAGGCTACGTGTCTGCCAAGAG |
| pGEXf_TCRB V23_verD10 | 5676 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGCTCATCTCAATGCCCCAAGAACGC |
| pGEXf_TCRB V24_verD10 | 5677 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGAGATCTCTGATGGATACAGTGTCTCTCGACA |
| pGEXf_TCRB V25_verD10 | 5678 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGAGATCTTTCCTCT GAGT CAACAGT CTC CAGAATA |
| pGEXf_TCRB V26_verD10 | 5679 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGCACTGAAAAAGG AGAT ATCTCT G AGGGGT AT CAT G |
| pGEXf_TCRB V27_verD10 | 5680 | GGGCTGGC AAGCC ACGTTT GGT GGTT CCT GAAGGGT ACAAAGTCTCTCGAAAAG |
| pGEXf_TCRB V28_verD10 | 5681 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGCTGAGGGGTACA GT GT CTCT AGAGAGA |
| pGEXf_TCRB V29_verD10 | 5682 | GGGCTGGC AAGCCACGTTTGGTGAGCCGCCCAAAC CTAACATTCTCAA |
| pGEXf_TCRB V30_verD10 | 5683 | GGGCTGGC AAGCC ACGTTT GGT GCCC AGG ACCGGC AGTTCA |
| pGEXf_TCRB VA_verD10 | 5684 | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGT GTT GATTAG AGAC ATATCCCTATTGAAAATATTTCCTGGCA |
| pGEXf_TCRB VB_verD10 | 5685 | GGGCTGGC AAGCC ACGTTTGGT GAGATGCCCT GAG TCAGCAT AGTCATTCTAAC |

【０２０６】

【表８－１】

表７．例示的なテール付加プライマー

| 配列 | 配列番号: |
|---|---|
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAA GGT CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5686 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GCA TAA CTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5687 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTC TGA TTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5688 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAC GTA CGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5689 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAC GCG TTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5690 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTC AGT GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5691 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCT GAT ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5692 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAT ATG CTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5693 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CGT AAT TAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5694 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACG TAC TCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5695 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTT CTA AGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5696 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACT ATG ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5697 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAC GTT AAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5698 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACA AGA TAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5699 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAC TAA GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5700 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTG TCT ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5701 |

【０２０７】
【表８－２】
（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTC ACT AGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5702 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AAT CGG ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5703 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGT ACC GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5704 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTG CCT CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5705 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCG TTA GCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5706 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAT AGT TCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5707 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGG CGT ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5708 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGG ACA TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5709 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGG TTG CTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5710 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATA TGC TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5711 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTA CAG TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5712 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATC CAT GGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5713 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGA TGC GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5714 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTA GCA GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5715 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GGA TCA TCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5716 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTG AAC GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5717 |

【０２０８】

【表８－３】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATT AAG CGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5718 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAT TGG CGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5719 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CGA TTA CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5720 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGT CAT CGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5721 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAT CAA GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5722 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGG CTT GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5723 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAT AAC CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5724 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AAT CCT GCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5725 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTT ATA TCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5726 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACA CAC GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5727 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATA CGA CTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5728 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATC TTC GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5729 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACA TGT ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5730 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCC ACA GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5731 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAG TCT GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5732 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCC ATG TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5733 |

【０２０９】

【表８－４】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCA CTG CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5734 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATG GTC AAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5735 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAA GTC ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5736 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAG ACG GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5737 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAG CTC TTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5738 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAG CGA TAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5739 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTC GAG AAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5740 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATG ACA CCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5741 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTT CAC GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5742 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTA TAA GGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5743 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CGT AGA GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5744 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ATA GAT ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5745 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCG TCG ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5746 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAA GAA TCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5747 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AAT GAC AGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5748 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGC TAG TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5749 |

【０２１０】
【表８－５】
（表７の続き）

| 配列 | 配列番号: |
|---|---|
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGA GAC CTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5750 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGC GTA ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5751 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TAA CCA AGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5752 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAT GGC TTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5753 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GCA TCT GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5754 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTC CGG TAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5755 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAC ACT CTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5756 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTA AGC ATC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5757 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGC TAC ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5758 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCA GCT TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5759 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAT GTA GAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5760 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTC GGA ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5761 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GCA ATT CGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5762 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CAA GAG GTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5763 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TCG ATT AAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5764 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GAA TGG ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5765 |

【０２１１】

【表８－６】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGA ATC AGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5766 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AAC TGC CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5767 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AAG TAA CGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5768 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN ACT CAA TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5769 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CCT AGT AGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5770 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTG ACG TTC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5771 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGC AGA CAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5772 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGT TGA CCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5773 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GTC TCC TAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5774 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CTG CAA TCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5775 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TGA GCG AAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5776 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTG GAC TGC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5777 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN AGC AAT CCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5778 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN CGA ACT ACC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5779 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN TTA ATG GCC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5780 |
| AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACC GGT CTC GGC ATT CCT GCT GAA CCG CTC TTC CGA TCT NNN NNN GCT TAG TAC CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG G | 5781 |

【０２１２】

【表８－７】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAA GGT CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5782 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GCA TAA CTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5783 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTC TGA TTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5784 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAC GTA CGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5785 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAC GCG TTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5786 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTC AGT GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5787 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCT GAT ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5788 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAT ATG CTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5789 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CGT AAT TAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5790 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACG TAC TCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5791 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTT CTA AGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5792 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACT ATG ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5793 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAC GTT AAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5794 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACA AGA TAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5795 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAC TAA GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5796 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTG TCT ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5797 |

【０２１３】
【表８－８】
（表７の続き）

| 配列 | 配列番号: |
|---|---|
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTC ACT AGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5798 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAT CGG ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5799 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGT ACC GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5800 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTG CCT CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5801 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCG TTA GCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5802 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAT AGT TCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5803 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGG CGT ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5804 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGG ACA TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5805 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGG TTG CTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5806 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATA TGC TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5807 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTA CAG TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5808 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATC CAT GGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5809 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGA TGC GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5810 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTA GCA GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5811 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GGA TCA TCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5812 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTG AAC GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5813 |

【０２１４】

【表８－９】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATT AAG CGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5814 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAT TGG CGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5815 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CGA TTA CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5816 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGT CAT CGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5817 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAT CAA GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5818 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGG CTT GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5819 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAT AAC CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5820 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAT CCT GCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5821 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTT ATA TCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5822 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACA CAC GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5823 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATA CGA CTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5824 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATC TTC GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5825 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACA TGT ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5826 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCC ACA GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5827 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAG TCT GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5828 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCC ATG TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5829 |

【０２１５】

【表８－１０】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号： |
|---|---|
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCA CTG CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5830 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATG GTC AAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5831 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAA GTC ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5832 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAG ACG GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5833 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAG CTC TTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5834 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAG CGA TAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5835 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTC GAG AAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5836 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATG ACA CCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5837 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTT CAC GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5838 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTA TAA GGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5839 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CGT AGA GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5840 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ATA GAT ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5841 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCG TCG ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5842 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAA GAA TCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5843 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAT GAC AGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5844 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGC TAG TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5845 |

【０２１６】
【表８－１１】
（表７の続き）

| 配列 | 配列番号: |
|---|---|
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGA GAC CTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5846 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGC GTA ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5847 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAA CCA AGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5848 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAT GGC TTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5849 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GCA TCT GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5850 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTC CGG TAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5851 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAC ACT CTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5852 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTA AGC ATN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5853 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGC TAC ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5854 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCA GCT TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5855 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAT GTA GAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5856 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTC GGA ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5857 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GCA ATT CGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5858 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CAA GAG GTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5859 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCG ATT AAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5860 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GAA TGG ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5861 |

【０２１７】

【表８－１２】

（表７の続き）

| 配列 | 配列番号: |
|---|---|
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGA ATC AGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5862 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAC TGC CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5863 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAG TAA CGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5864 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACT CAA TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5865 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CCT AGT AGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5866 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTG ACG TTN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5867 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGC AGA CAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5868 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGT TGA CCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5869 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTC TCC TAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5870 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CTG CAA TCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5871 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TGA GCG AAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5872 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTG GAC TGN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5873 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AGC AAT CCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5874 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT CGA ACT ACN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5875 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TTA ATG GCN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5876 |
| CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GCT TAG TAN NNN NNG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGTG | 5877 |

【０２１８】

実施例２：適応的免疫受容体をコードする配列の単細胞標識化

本実施例では、ＲＴ－ＰＣＲによる、免疫グロブリン並びにＴ細胞受容体の重鎖及び軽鎖コード配列の、単細胞標識化を記載する。健康なヒトボランティアから新しく採取した血液を、白血球のソースとして用いる。１００，０００～３００，０００個の白血球を得るのに必要な全血量は１ｍＬ未満であり、１～３ｍＬの血液を血球の単離のために用いる。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標）－１０７７（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を用い、メーカーの説明書に従い、密度勾配遠心分離により血液から分離する。メーカーの説明書により、及び基本的にＫｏｅｈｌら（２００３　Ｌｅｕｋｅｍｉａ　１７：２３２）に記載のように、Ｗｈｏｌｅ　Ｂｌｏｏｄ　ＣＤ４５マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、オーバーン、ＣＡ）を用いて、抗ＣＤ４５コーティング磁気ビーズと結合させることにより、ＣＤ４５$^{+}$造血細胞を単離する。白血球細胞懸濁液を、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、１×１０$^{6}$細胞／ｍｌの濃度に調節する。１～３μＬ（１～３×１０$^{3}$細胞）のアリコートを、予め冷却したプレートラックの氷上に置いた９６穴ＰＣＲマルチウェルプレートのウェルに分配する。プレートの全てのウェルが満たされた直後、プレートを密封し、ドライアイス上に置いて凍させ、細胞を溶解させる。以下の逆転写準備工程の間、プレートをドライアイス上に保持する。

【０２１９】

ＳＭＡＲＴｅｒ（商標）Ｕｌｔｒａ　Ｌｏｗ　ＲＮＡ　ｋｉｔ　ｆｏｒ　Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を用い、基本的にメーカーの説明書に従い、逆転写反応を実施する。３８０μＬの希釈緩衝液（Dilition Buffer）と２０μＬのＲＮａｓｅインヒビター（４０Ｕ／μＬ）とを混合して、反応緩衝液保存液（Stock Reaction Buffer）を調製する。次に、２５０μＬの反応緩衝液を、１２μＭの３’Ｓｍａｒｔｅｒ（商標）ＣＤＳ　ＩＩオリゴヌクレオチド（５’－Ｂｉｏ－ＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴＡＣＴ$_{(30)}$ＮＮ

－３’（配列番号５８７８）溶液１００μＬと混合する。Ｂｉｏはビオチン部分であり、ＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴＡＣ（配列番号５８７９）はユニバーサルアダプター配列であり、Ｔ（３０）（配列番号５８８０）はチミン残基の３０量体であり、Ｎは任意のヌクレオチド（Ａ、Ｃ、Ｇ又はＴ）である。

【０２２０】

３’Ｓｍａｒｔｅｒ（商標）ＣＤＳ　ＩＩオリゴヌクレオチドプライマーを含む反応緩衝液３．５μＬを、溶解させた細胞を含む９６穴プレートの各ウェルに添加して、プレートを密封し、７２℃で３分間それをインキュベートした後に、氷上の冷却したラックに戻すことにより、逆転写の第１段階アニーリング反応を開始させる。

【０２２１】

２００μＬの５ｘ第１鎖緩衝液、２５μＬの１００ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ）、１００μＬのｄＮＴＰｓ（１０ｍＭ）、２５μＬのＲＮａｓｅインヒビター（４０Ｕ／μＬ）及び１００μＬの逆転写酵素を混合して、逆転写マスターミックス（１００ｒｘｎｓで４５０μＬｌ）を調製する。ウェル当たり、１．０μＬのバーコード付３’－Ｓｍａｒｔ（商標）ＣＤＳＩＩオリゴヌクレオチドを含む９６穴のワーキングプレートを調製する。３’－Ｓｍａｒｔ　ＣＤＳＩＩオリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである：５’－ＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴＡＣＢＢＢＢＢＢＢＢｒＧｒＧｒＧ－Ｐ－３’（配列番号５８８１）；（式中、ＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴＡＣ（配列番号５８７９）は、ユニバーサルアダプター配列であり、ＢＢＢＢＢＢＢＢは、８－ヌクレオチドのバーコードであり（バーコードの例については下記のリスト参照）、ｒＧはリボグアニンであり、Ｐは３’リン酸塩ブロック基である。

【０２２２】

【表９－１】

表８．バーコードリスト（９６のＪＳバーコード）

| 名称 | 配列 |
|---|---|
| JS01 | CAAGGTCA |
| JS02 | GCATAACT |
| JS03 | CTCTGATT |
| JS04 | TACGTACG |
| JS05 | TACGCGTT |
| JS06 | CTCAGTGA |
| JS07 | TCTGATAT |
| JS08 | CATATGCT |
| JS09 | CGTAATTA |
| JS10 | ACGTACTC |
| JS11 | CTTCTAAG |
| JS12 | ACTATGAC |
| JS13 | GACGTTAA |
| JS14 | ACAAGATA |
| JS15 | GACTAAGA |
| JS16 | GTGTCTAC |
| JS17 | TTCACTAG |
| JS18 | AATCGGAT |
| JS19 | AGTACCGA |

【０２２３】

【表９－２】

| | |
|---|---|
| JS20 | TTGCCTCA |
| JS21 | TCGTTAGC |
| JS22 | TATAGTTC |
| JS23 | TGGCGTAT |
| JS24 | TGGACATG |
| JS25 | AGGTTGCT |
| JS26 | ATATGCTG |
| JS27 | GTACAGTG |
| JS28 | ATCCATGG |
| JS29 | TGATGCGA |
| JS30 | GTAGCAGT |
| JS31 | GGATCATC |
| JS32 | GTGAACGT |
| JS33 | ATTAAGCG |
| JS34 | TATTGGCG |
| JS35 | CGATTACA |
| JS36 | TGTCATCG |
| JS37 | TATCAAGT |
| JS38 | AGGCTTGA |
| JS39 | GATAACCA |
| JS40 | AATCCTGC |
| JS41 | GTTATATC |
| JS42 | ACACACGT |
| JS43 | ATACGACT |
| JS44 | ATCTTCGT |
| JS45 | ACATGTAT |
| JS46 | TCCACAGT |
| JS47 | CAGTCTGT |
| JS48 | TCCATGTG |
| JS49 | TCACTGCA |
| JS50 | ATGGTCAA |
| JS51 | CAAGTCAC |

| | |
|---|---|
| JS52 | TAGACGGA |
| JS53 | CAGCTCTT |
| JS54 | GAGCGATA |
| JS55 | CTCGAGAA |
| JS56 | ATGACACC |
| JS57 | CTTCACGA |
| JS58 | CTATAAGG |
| JS59 | CGTAGAGT |
| JS60 | ATAGATAC |
| JS61 | TCGTCGAT |
| JS62 | TAAGAATC |
| JS63 | AATGACAG |
| JS64 | AGCTAGTG |
| JS65 | TGAGACCT |
| JS66 | AGCGTAAT |
| JS67 | TAACCAAG |
| JS68 | GATGGCTT |
| JS69 | GCATCTGA |
| JS70 | TTCCGGTA |
| JS71 | GACACTCT |
| JS72 | TTAAGCAT |
| JS73 | TGCTACAC |
| JS74 | TCAGCTTG |
| JS75 | CATGTAGA |
| JS76 | TTCGGAAC |
| JS77 | GCAATTCG |
| JS78 | CAAGAGGT |
| JS79 | TCGATTAA |
| JS80 | GAATGGAC |
| JS81 | AGAATCAG |
| JS82 | AACTGCCA |
| JS83 | AAGTAACG |

| | |
|---|---|
| JS84 | ACTCAATG |
| JS85 | CCTAGTAG |
| JS86 | CTGACGTT |
| JS87 | TGCAGACA |
| JS88 | AGTTGACC |
| JS89 | GTCTCCTA |
| JS90 | CTGCAATC |
| JS91 | TGAGCGAA |
| JS92 | TTGGACTG |
| JS93 | AGCAATCC |
| JS94 | CGAACTAC |
| JS95 | TTAATGGC |
| JS96 | GCTTAGTA |

【０２２４】
バーコード付の３’－Ｓｍａｒｔ（商標）ＣＤＳＩＩオリゴヌクレオチド１．０μＬを含む９６穴のワーキングプレートのそれぞれのウェルに、マスターミックスを４．５μＬ添加し、アニーリング反応の完了後、バーコード付の３’－Ｓｍａｒｔ（商標）ＣＤＳＩＩオリゴヌクレオチドを含む５．５μＬのマスターミックスを、９６穴ワーキングプレートの各ウェルから、逆転写アニーリングプレートの対応する位置の（それぞれの）ウェルに移す。逆転写アニーリングプレートをサーマルサイクラーの上に置き、４２℃で９０分間、続いて７０℃で１０分間のプログラムを実行させた。この温度プロフィールにより、各ウェルで、白血球から放出された全てのポリＡ　ｍＲＮＡ転写分子上で、第１鎖ｃＤＮＡ合成が実施される。非限定的な理論によると、第１鎖ｃＤＮＡ合成の後、ウェルの中のそれぞれのｃＤＮＡ分子は、５’及び３’末端の両方にユニバーサルアダプター配列を含み、５’末端で８ヌクレオチドのバーコードによりユニークにタグ付けされる。
【０２２５】
任意に、全９６の反応からのバーコード付のｃＤＮＡ分子を、この工程でプールして、免疫グロブリン又はＴ細胞受容体ｃＤＮＡのＰＣＲ増幅が行われるＰＣＲプレート上へ再度分配することができる。混合及び分割工程を行うことにより、実質的に全てのバーコード付のｃＤＮＡ分子を、適応的免疫受容体コード（例えば、Ｉｇ又はＴＣＲ）Ｃ－セグメント遺伝子特異的プライマーによる以降のＰＣＲ増幅反応において、実質的に均一に表示することが可能となる。
【０２２６】
逆転写／ｃＤＮＡの第１鎖合成の産物を、次に逆転写反応プレートからの各ウェルの内容物とＡｍｐｕｒｅ（商標）ＸＰ　ＳＰＲＩ磁気ビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ）懸濁液２５μＬと混合し、室温で８分間インキュベートした後、メーカーの説明書に従い、室温で、ＭａｇｎａＢｏｔ（商標）磁気分離装置（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いてビーズを分離することによって、固相可逆的固定化精製（ＳＰＲＩ）によって単離する。
【０２２７】
ＳＰＲＩビーズを固定したｃＤＮＡの第１鎖を、Ａｄｖａｎｔａｇｅ　２（商標）ＰＣＲ試薬（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用い、メーカーの指示に従い、５’ＲＡＣＥ（ｃＤＮＡ末端の迅速増幅法）ＰＣＲ増幅反応に即座に添加する。反応ごとに、ｄＮＴＰｓ、ＵＰＭプ

ライマーミックス、本明細書に記載のＩｇ／ＴＣＲプライマーミックス、及びＡｄｖａｎｔａｇｅ　２（商標）ポリメラーゼ及びＰＣＲ緩衝液を含む、５０μＬのＰＣＲマスターミックスを添加する。サーマルサイクラーの条件は、以下の通りである：９５℃で１分間；９５℃で３０秒間、６３℃で３０秒間、及び７２℃で３分間、を３０サイクル；７２℃で７分間；更に、Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシングの準備前に、１０℃で反応液を維持する。ＰＣＲプライマーの配列は、以下の通りである：

【０２２８】

【表１０】

| | |
|---|---|
| 5'RACE UPM long | 5'－CTAAT ACGACT CACT AT AGGGC AAGC AGT GGT AT C AACGC AGA GT－3'（SEQ ID NO:5611） |
| 5'RACE UPM short | 5'－CTAATACGACTCACTATAGGGC－3'（SEQ ID NO:5612） |
| IgM_RACE | 5'－GATGGAGTCGGGAAGGAAGTCCTGTGCGAG－3'（SEQ ID NO:5612） |
| IgG_RACE | 5'－GGGAAGACSGATGGGCCCTTGGTGG－3'（SEQ ID NO:5612） |
| IgA_RACE | 5'－CAGGCAKGCGAYGACCACGTTCCCATC－3'（SEQ ID NO:5612） |
| IgK_RACE | 5'－CATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGC－3'（SEQ ID NO: |
| Igk_RACE | 5'－CCTCAGAGGAGGGTGGGAACAGAGTGAC－3'（SEQ ID NO:5612） |
| TCRB_RACE | 5'－GCTCAAACACAGCGACCTCGGGTGGGAACAC－3'（SEQ ID NO:5612） |
| TCRA RACE JB2 | 5'－AGTCTCTCAGCTGGTACACGGCAGGGTC－3'（SEQ ID NO:5591） |
| TCRA50 | 5'－ACA GAC TTG TCA CTG GAT TTA GAG TCT CTC AGC TGG TAC ACG GCA GGG TC－3'（SEQ ID NO:5592） |
| TCRB50 | 5'－GAG ATC TCT GCT TCT GAT GGC TCA AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG AAC AC－3'（SEQ ID NO:5593） |
| S | G又はC |
| K | G又はT |
| Y | C又はT |

【０２２９】

Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシングのライブラリの調製：

９６穴プレートの逆向き（inverted）遠心分離によりＰＣＲ産物をプールし、プールした産物を、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ａｍｐｕｒｅ（商標）ＸＰビーズを用いてメーカーの説明書に従い精製し、２００～３００ｂｐ以下のＤＮＡ断片を除去する。Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、ノーウォーク、ＣＴ）を用いてキャピラリー電気泳動によりＤＮＡ純度を解析し、大部分のｄｓＤＮＡ産物が６００～７００ｂｐのサイズ範囲であることを確認する。ｄｓＤＮＡの産物を、蛍光により、又はＡ２６０におけるＵＶ吸光度により定量する。

【０２３０】

Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＴｒｕＳｅｑ（登録商標）ＤＮＡサンプル調製ガイド（Ｐａｒｔ　ｎｕｍｂｅｒ　１５０２６４８６　Ｒｅｖ．Ｃ，Ｊｕｌｙ　２０１２，Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）に従って、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＴｒｕＳｅｑ（登録商標）サンプル調製プロトコル（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、サンディエゴ、ＣＡ）の投入量として１μｇの精製ＤＮＡを用いて、シークエンシングライブラリーの構築を行う。このプロトコルにより、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ（登録商標）、ＨｉＳｅｑ（登録商標）２０００及びＨｉＳｅｑ（登録商標）２５００のシーケンサーのペアードエンドのフローセルを用いて配列決定できるシークエンシングライブラリーが生成される。

【０２３１】

ＭｉＳｅｑ（登録商標）試薬キットｖ２を用い、５００サイクルにて、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ（登録商標）シーケンサーのシークエンシングプロトコルに従い、Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシングを実施する。この化学メーカーは、最高５２５サイクルのシ

ークエンシングが可能なＭｉＳｅｑ（登録商標）装置用の試薬と、２５１サイクルのペアードエンドラン及び２つの８サイクルのインデックスリードのために十分な試薬を提供する。Ｉｌｌｕｍｉｎａシークエンシングのプロトコルは、ＭｉＳｅｑ（商標）ＲｅａｇｅｎｔＫｉｔ ｖ２ ＲｅａｇｅｎｔＰｒｅｐＧｕｉｄｅ，Ｐａｒｔ ｎｕｍｂｅｒ １５０３４０９７ Ｒｅｖ．Ｂ，Ｏｃｔｏｂｅｒ ２０１２（Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）に記載されている。シークエンシングされる標的ＤＮＡの構造の概略図を、図６に示す（Ｉｇ重鎖を例として用いる）。

【０２３２】

実施例３：Ｔ細胞受容体α及びβの配列のハイスループット対形成：

本発明のハイスループット対形成方法を、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質のα及びβポリペプチド鎖の対形成に適用する例を以下に提供する。Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αβタンパク質（αβＴ細胞の抗原性特性を決定する）は、長いβ鎖（ＴＣＲＢ）と短いα鎖（ＴＣＲＡ）の２つのペプチドから構成されるヘテロ二量体である（１－６）。近年、ＴＣＲα及びβ鎖並びに免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のプロファイリングのためのハイスループットシークエンシングアッセイが開発されており、癌クローンの検出のための臨床診断、及びリンパ系悪性疾患における微小残存病変の測定（１３、１６～２０）などの多数の診断用途に用いられている（７～１５）。しかしながら、現在のハイスループット法では、一度にＴＣＲの１つの鎖しかシークエンシングすることができない。Ｔ細胞受容体を機能解析用、治療用、又は受容体－抗原結合のモデリング用に再構成するため、完全なＴＣＲからα及びβ鎖を、一対として同定しなければならない。

【０２３３】

単一の細胞に基づく技術を使用して、α及びβ鎖の対を形成させる数々の数の試みが行われている。１つのアプローチでは、個々のＢ又はＴ細胞を単離し、ブリッジＰＣＲにより物理的に重鎖及び軽鎖を結合させた後にシークエンシングを行う（下記の参考文献２１～２６を参照）。あるいは、重鎖及び軽鎖に、単一の細胞レベルでバーコード付与することも可能である（参考文献２５、２７～３１を参照）。単一の細胞に基づく方法はかなり改善されたものの、それらは未だ、技術的に途上であり、スループットの点で制限がある。それらはまた、無傷の単一細胞を必要とし、それにより、組織又は固形腫瘍へのＴ細胞の浸潤を評価することが困難になる。本発明は、対を形成するために、物理的な単離よりも組み合わせ論アプローチを用いる、単一細胞に基づく方法の必要がない、ハイスループットでのα及びβ鎖配列の対形成方法を提供する。第１の証明として、本出願人は、健康なドナーからの末梢血に対して、本技術を適用して、一回の実験で３５，０００対のα及びβ　ＴＣＲ遺伝子配列を同定している。方法は、対象からの組織サンプル、又は血液及び組織サンプルの両方に適用することもできる。

【０２３４】

本発明の方法は、再構成されたＴＣＲＡ及びＴＣＲＢヌクレオチド配列が、Ｔ細胞のそれぞれのクローン集団に関してほぼユニークであるという知見に依存する。特徴的なＴＣＲ配列は、リンパ球の発達の間における、体細胞のＶ－Ｊ、Ｖ－Ｄ及びＤ－Ｊ結合部における遺伝子セグメントの組み換え、テンプレートに依存しないヌクレオチドの欠失又は挿入を通して生じる（３２）。この驚異的な多様性は、特異的Ｔ細胞クローンのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ鎖をコードするｍＲＮＡが通常、そのクローンを含む細胞セットにのみ存在することを意味する。本出願人は、Ｔ細胞のサンプルを複数のサブセットに分け、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのｍＲＮＡ分子をシークエンシングし、それぞれのサブセットにおけるそれぞれのＴＣＲ鎖の有無を決定することにより、この極端な多様性を高めるものである。１クローンからのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列は、同じＴ細胞のサブセットに認められるはずであるが、それらのサブセットでのみ認められなければならない。

【０２３５】

幾つかの実施形態では、特定の適応的免疫受容体のヘテロ二量体のポリペプチド鎖を増幅するために、方法は、サンプル中の細胞由来のｍＲＮＡよりもゲノムＤＮＡを抽出することを必要とし得る。

【０２３６】
次に、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ鎖を対形成させることは、統計的な問題である。すなわち、ユニークな対形成と断言するためには、所定のクローンが別のクローンと同じＴ細胞サブセットのコレクションを占めることがほとんどあり得ないことを示さなければならない。所定のクローンが別のクローンと同じＴ細胞サブセットのコレクションを占める確率は、本発明の方法を使用した実験で、何千ものクローンにおいてもゼロに近い。
【０２３７】
図７は、Ｔ細胞サブセットの占める数対共有サブセットの確率を示すグラフである。Ｔ細胞をそれぞれ７０，０００個のＴ細胞を含む９６のサブセットに分割する本発明の方法を使用したシミュレーション実験に関して、このプロットは、所定の数のサブセット（ｘ軸）に存在するいかなるクローンも、正確に同じサブセットに出現する確率（ｙ軸）を示す。
【０２３８】
本発明の方法は、元のサンプル中のクローンの頻度、それぞれのサブセットにおけるＴ細胞の総数、及び作製されるサブセットの数、の関数として、クローンのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列を対にする方法を提供する。最後の２つのパラメータは、実験の設計の一部であり、それらを調節することにより、Ｔ細胞クローンの頻度のいかなる範囲が、正確に対を形成するかを選択することができる。
【０２３９】
本発明の実施形態に係る図８は、本発明の方法の概略図を表す。図８Ａでは、一定の数のＴ細胞（例えば７０，０００個の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣｓ））を９６穴プレートのそれぞれのウェルにランダムに割り当て、９６の異なるサブセットを形成する。全細胞ＲＮＡを抽出し、ウェル中でＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写する。ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列をそれぞれのウェル中でＰＣＲ増幅し、ウェルに特異的なオリゴヌクレオチドＤＮＡバーコードを、増幅された受容体分子に付する。図８Ｂでは、バーコード付のＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのアンプリコンを一緒にプールする。図８Ｃでは、同じライブラリにおいて一貫して観察されるＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ配列の対は、同じ細胞のクローンが有する配列を表す。
【０２４０】
次に、増幅された分子をプールし、ハイスループットＤＮＡシークエンスを実施し、それぞれの鎖に関して受容体配列及びバーコードの両方を解読する。シークエンシングされたバーコードを用いて、起源のウェルに受容体配列を割り当て、偶然に予想されるより多くのウェルを特異的ＴＣＲＢ配列と共有するＴＣＲＡ配列を見つけることにより、推定の対を同定する。これは、コンピュータによる逆多重化を必要として、ＴＣＲ配列が由来するウェルへ各ＴＣＲ配列を再度マッピングにすることを含む。免疫レパートリーは非常に多様であり、２つのクローンが１つのウェルパターンを共有する確率は非常に小さいため、ウェルパターンを共有するあらゆるＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ対が、同じクローンに由来することと推論できる。
【０２４１】
出願人の方法の、先例のない処理能力を示すために、９６０万個のヒトのＰＢＭＣｓをサンプルとして採取して、９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルに、等しくそれらを再分配した。このため、それぞれのウェルは１００，０００個のＰＢＭＣｓを含み、そのうち～７０，０００個はＴ細胞であることが予想された。ＲＮＡ抽出及びｃＤＮＡ合成の後、シークエンシングの実行により、２億９８００万個のリードを得、フィルタリング後のＴ細胞あたりの平均カバー率は１５リードであった。（詳細は補足資料を参照）。
【０２４２】
あらゆるＴＣＲＢ配列に対するあらゆるＴＣＲＡ配列のウェル占有パターンを比較することにより、推定の同族対を同定した。ウェル占有パターンは、容器占有パターンとも称される。幾つかの実施形態では、あらゆるＴＣＲＢ配列のウェル占有パターンを、あらゆるＴＣＲＡ配列のそれに対して比較する。所定のＴＣＲＡとの間で最も少ないｐ値を与えたＴＣＲＢは、可能な対形成パートナーとして印をつけた。

【０２４３】
次に、コンピュータを用いて、観察されたウェルパターンの順序を変えることにより、推定された対のセットの偽発見率（ＦＤＲ）を推定した。この手順は、実験の非効率性を考慮に入れて、対形成の確実性を定量化し、これを以下に更に詳細に記載する。ＦＤＲの算出に関する説明を、以下に示す。
【０２４４】
実験結果を、図９Ａ及び９Ｂに示す。１％のＦＤＲでは（図９Ａ（点線）に示す）、２５，０００個の異なるクローンからＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列の３４，７６３対を発見した。図９Ａは、９６ウェルプレートとウェルあたり７０，０００個のＴ細胞を用いた実験の偽発見率曲線を表す。ＦＤＲ曲線はＬ字型であり、それは大部分のＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ対が、明らかにバックグラウンドノイズより突出したことを意味する。これらの対の大部分は、極めて高い信頼度で得られた。
【０２４５】
図９Ｂは、この対形成実験が完全であることを例示する。灰色（淡い陰影）のバーは、ウェル占有の関数として、観察されたＴＣＲＢ配列の総数を示し、暗い陰影のバーは、これらの中で何個が＜１％のＦＤＲで対を形成したかを示す。本発明者らは、１５～７０のウェルを占有したＴＣＲＢ配列の８５％以上を対形成させることに成功した。おそらく、低いＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのｍＲＮＡレベルでは配列ドロップアウトが起こり得ることから、残りの配列は、高い信頼度で対を形成できなかった。
【０２４６】
図１０は、本実験に用いられたワークフロー例を表す。ワークフロー例では、抗凝固処理した血液から開始し（１）、フィコール勾配によりＰＢＭＣｓを分離し（２）、９６穴プレートのウェルへの細胞の均等数を分配し（３）、９６穴プレートでＲＮＡを単離し（４）、ｃＤＮＡを合成し（５）、遺伝子特異的ＰＣＲプライマーによってＴＣＲＡ配列を増幅し（６）、遺伝子特異的ＰＣＲプライマーによってＴＣＲＢ配列を増幅し（７）、ネステッドＰＣＲを実行して、シークエンシングアダプター及びウェル特異的バーコードをＴＣＲＡ配列に付加し（８）、ネステッドＰＣＲを実行して、シークエンシングアダプター及びウェル特異的バーコードをＴＣＲＡ配列に付加し（９）、並びにアンプリコンを混合し、シークエンシングライブラリーを形成する（１０）。
【０２４７】
図１１は、ウェル占有率対対形成ＴＣＲＢ配列の分画の関係を例示する。図１１は、９６ウェルプレートとウェルあたり７０，０００個のＴ細胞を用いた実験から得られた、ＴＣＲＢクローンの対形成収率（対形成した配列の分画）を表す。本発明者らは、ＴＣＲＢクローンを、観察されたウェルの数（ｘ軸）により群分けして、ＦＤＲ＜１％で対を形成したこれらの配列の分画（ｙ軸）を算出した。
【０２４８】
実験の設計と統計学的フレームワークを評価するため、本発明者らは、図１２で概説されるサンプル混合実験を実施することによって、ＦＤＲを直接測定した。図１２は、２人の対象によるバリデーション実験の概要を表す。２人の健常な成人対象から末梢血を採取し、「Ｘ」及び「Ｙ」とラベルを付した。ディープイムノシークエンシング（Deep immunosequencing）を用い、それぞれの対象のＴＣＲＡ及びＴＣＲＢレパートリーの特徴づけを行った（１４、１５、３３）。次に２人の対象からのＰＢＭＣｓを混合し、得られた混合物を用いて本発明の方法を実施した。真の陽性対は、同じ対象からのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢを含まなければならない一方、偽陽性の結果のおよそ半分は、交叉対象ＴＣＲＡ／ＴＣＲＢ対となる。
【０２４９】
これらのデータから、対象Ｘに特有の６５２，０２７個のＴＣＲＡと７０３，９０９個のＴＣＲＢの配列を同定し、対象Ｙに特有の３９５，４７６個のＴＣＲＡと４３３，０８６個のＴＣＲＢ配列を同定した。次に、我々は２人の対象のそれぞれからの１２０万のＰＢＭＣｓを混合し、９６ウェルプレートで、ウェルあたり２５，０００個のＰＢＭＣ（～

１７，５００個のＴ細胞）に分配して、混合サンプルについて本発明の方法を実施した。真の対形成では、１つの対象のユニークなレパートリーからのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢを含まなければならず、間違った対形成のおよそ半分は、１人の対象のＴＣＲＡ配列と他の患者のＴＣＲＢ配列とを含まなければならない。ゆえにこの実験は、同定された対の信憑性と、間違った対形成が生じる率をコントロールする本発明の方法の能力とを、直接評価するものである。

【０２５０】

サンプル混合実験のＦＤＲ解析を図１３に示す。その際、対を以下の３つのカテゴリーに分けた：（ｉ）両方のＴＣＲ配列が対象Ｘ由来のみである対（「Ｘ／Ｘ」）；（ｉｉ）両方のＴＣＲ配列が対象Ｙ由来のみである対（「Ｙ／Ｙ」）；及び（ｉｉｉ）１つの配列が対象Ｘ由来であり、他の配列が対象Ｙ由来である対（「Ｘ／Ｙ」）。図１３Ａ中の垂直方向の点線は、推定ＦＤＲ＜１％のカットオフを示す。１％の予測ＦＤＲで、１，１１５個のＸ／Ｘ対、７０６個のＹ／Ｙ対及び７個のＸ／Ｙ対を観察した。

【０２５１】

この実験では、少ないＴ細胞をそれぞれのウェルに分配したため、最初の実験と比較して少ないＴＣＲＡ及びＴＣＲＢの対が検出されたが、それによって感度範囲は、より一般的なクローンの方へシフトする。

【０２５２】

ドナーが交叉した対が、間違った対形成の半分を表すならば、予想されるように、この対形成のＦＤＲの閾値は１．０６％と考えられ、このことは、本発明の方法による予測との優れた一致を示す。図１３Ｂは、この間違った対形成の解析を、０．１％～２０％の範囲の予測ＦＤＲ値まで拡張したものである。予測値は、この範囲での経験値と厳密に整合しており、このことは、本発明の解析フレームワークが、異なる用途の特異性と感度とのバランスをとるために調整され得る有効なＦＤＲ推定値を提供すことを示す。

【０２５３】

図１４Ａ～Ｄでは、ｍＲＮＡサブサンプルのウェルドロップアウト率、及び対内のウェルドロップアウト率を示す。図１４Ａは、ウェルあたり７０，０００個のＴ細胞を用いて本発明の方法を用いた実験の、ｍＲＮＡの第１のサブサンプルにおけるウェルドロップアウト率を表す。ドロップアウト率の中央値（垂直点線）は、ＴＣＲＡでは２０％、ＴＣＲＢでは１４％である。図１４Ｂは、本発明の方法を用いた実験の、ｍＲＮＡの第２のサブサンプルにおけるウェルドロップアウト率を表す。ドロップアウト率の中央値は、ＴＣＲＡでは２４％、ＴＣＲＢでは２１％である。図１４Ｃは、ｍＲＮＡの第１のサブサンプルにおける、確実に対を形成した配列（ＦＤＲ＜１％）から推定されるウェルドロップアウト率を表す（図１４Ａの場合と同様のデータ）。ドロップアウト率の中央値はＴＣＲＡでは１４％、ＴＣＲＢでは１０％であり、それはパネルＡの推定値から下方向に偏っている。図１４Ｄは、完全に混合したｍＲＮＡサンプルにおける確実に対形成した配列（ＦＤＲ＜１％）から推定されるドロップアウト率（すなわち、～３５，０００対の発見において用いられたデータ）を表す。ドロップアウト率のメジアン値は、ＴＣＲＡでは７％、ＴＣＲＢでは３％である。バイアスを考慮すると、真のドロップアウト率の中央値はそれぞれ１０％、５％と予想される。

【０２５４】

図１５は、クローン頻度及び投入Ｔ細胞数の関数としての、シミュレーションされたウェル占有率を表す。本発明の方法を用いた実験の鍵となる設計パラメータは、各ウェルに割り当てられるＴ細胞の数である。図１５は、９６穴プレートを用い、ウェルあたり１００～１００，０００個の範囲のＴ細胞投入量（ｘ軸）を用いた、シミュレーションされた実験結果を表す。異なる色は、異なるレパートリー頻度のクローンを表し、そのプロットはシミュレーションにおいて占有されたウェルの数を示す。様々な頻度帯からのクローンを捉えるためには、単に、本発明の方法を用いる実験において投入Ｔ細胞数を変更するだけでよい。プレート上のウェル全域で投入Ｔ細胞数を変更することにより、一回の実験で複数の頻度帯を捉えることも可能である。

【０２５５】
最終的に、Ｊｕｒｋａｔ　Ｅ６－１のＴ－ＡＬＬ細胞株（ＴＣＲＢのＶ、Ｄ、Ｊ及びＣＤＲ３配列が公知である（３４））でスパイクイン（spike-in）実験を実施することにより、本発明の方法が、既知のクローン性のサンプルからのＴＣＲ鎖を正しく対形成させることができることが確認された。７０，０００個のＰＢＭＣ（～１／１５０，０００で測定）あたり標的頻度＜１でバルクＰＢＭＣサンプルにＪｕｒｋａｔ細胞を添加し、ウェルあたり～５０，０００個のＰＢＭＣｓ細胞を９６穴マイクロタイタープレートに分配し、ＰＢＭＣ及び添加した配列の盲検対形成解析を行った。既知のＪｕｒｋａｔ配列が２１のウェルで観察され、そのうち１４はＪｕｒｋａｔ細胞のＴＣＲＡ及びＴＣＲＢの両方を含んだ。この重複レベルから、本発明のＦＤＲ閾値よりもはるかに低い２．６×１０$^{-11}$のｐ値が得られ、それは、いずれの配列も非Ｊｕｒｋａｔ配列との間ではるかに強い対形成を示すことを裏付けるものである（次の試験では、最小のｐ値は５．２×１０$^{-5}$であった）。

【０２５６】
患者及びサンプル調製：
本実施例では、試験ドナーとして、２人の健康な男性（４４歳及び５１歳）を用いた。インフォームドコンセントを得た後、１０ｍｌのＥＤＴＡ採血チューブ（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）に、それぞれのドナーから静脈血を採取した。抗凝固処理された新鮮な血液を、フィコールヒストパック（Ficoll Histopaque）勾配（シグマ、セントルイス、ＭＯ）により分離して、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）層を吸引した。１×ＲＢＣ溶解試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、オーバーン、ＣＡ）を用い、赤血球を溶解させた。細胞を１×ＰＢＳ（ｐＨ　７．２）（Ａｍｂｉｏｎ－Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）で洗浄し、ＲＮＡｌａｔｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、ＣＡ）中に再懸濁させた。ＴＣ－２０セルカウンター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を用いて細胞数を計測し、細胞懸濁液の濃度をＲＮＡｌａｔｅｒを用いて調整した。細胞懸濁液は、使用直前まで４℃で保存した。細胞をアリコートにする前に、細胞懸濁液をＲＮＡｌａｔｅｒにより５００又は２，０００細胞／μＬの濃度に調整し、５０μＬのアリコートを、Ｂｉｏｍｅｋ　ＦＸリキッドハンドラー（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）により、０．８ｍＬの深型ウェルのプレート（Ａｘｙｇｅｎ、ユニオンシティー、ＣＡ）のウェルに分配した。

【０２５７】
ロボット操作により、共通の、均一な細胞懸濁液のリザーバーから、９６穴プレートへ細胞懸濁液を等量で分配することにより、同程度の細胞数がプレートのそれぞれのウェルに確実に添加された。各ウェルに添加した単核細胞の最終的な数は、最初の対形成実験（図９の結果）では１００，０００個、サンプル混合実験（図１２のスキーム及び図１３の結果）では２５，０００個であり、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ－ＡＬＬのスパイクイン実験では５０，０００個であった。２５，０００ ｆｏｒ ｏｕｒ ｓａｍｐｌｅ－ｍｉｘｉｎｇ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ （ｓｃｈｅｍａｔｉｃ ｉｎ ＦＩＧ．１２ ａｎｄ ｒｅｓｕｌｔｓ ｉｎ ＦＩＧ．１３），ａｎｄ ５０，０００ ｆｏｒ ｏｕｒ Ｊｕｒｋａｔ Ｔ－ＡＬＬ ｓｐｉｋｅ－ｉｎ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ。

【０２５８】
ＲＮＡの単離及び逆転写：
室温で３０分間、４００μＬの溶解緩衝液ＲＬＴプラス（Ｑｉａｇｅｎ）を添加し、混合及び室温で３０分間インキュベーションし、細胞を溶解させた。ＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙラボラトリーロボット（Ｑｉａｇｅｎ）の自動化プロトコルを用い、全細胞ＲＮＡを単離した。５０μＬのＲＮａｓｅフリーの水を含む９６ウェルの深型プレートにＲＮＡを抽出し、直ぐに－８０℃で保存した。それぞれのＲＮＡサンプルの品質及び量を、Ｃａｌｉｐｅｒ　ＲＮＡ　Ｐｉｃｏ　Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙアッセイ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いて解析した。１５μＬのＲＮＡ（４～５ｎｇのＲＮＡ当

量）を、メーカーのプロトコルに従い、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＶＩＬＯ ｃＤＮＡ合成キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて一本鎖ｃＤＮＡに逆転写した。ＲＮＡ単離及び逆転写反応の間、９６の細胞懸濁液アリコートを有するオリジナルのソースプレートと比較して、ウェルの同一性を維持した。

【０２５９】

多重ＰＣＲ及びバーコード：

ＴＣＲＡ又はＴＣＲＢ遺伝子特異的なプライマーのいずれかを用い、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢに関して複数のＶ遺伝子特異的なプライマーと、各アイソタイプに関して１つのＣセグメントのリバースプライマーと、を用いてｃＤＮＡプレートの２つの９６穴プレート複製物において多重ＰＣＲを実施した（ＰＣＲプライマーのリストについては、表Ｓ１及び表Ｓ２を参照）。Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ＰＣＲ Ｐｌｕｓ試薬（Ｑｉａｇｅｎ）を５０μＬの反応液中で用い、以下の条件で、３５サイクルのＰＣＲ増幅を行った：９５℃で３００秒の変性；［９０℃で３０秒の変性、６０℃で９０秒のアニーリング、及び７２℃で９０秒の伸長］を３５サイクル。

【０２６０】

ＰＣＲ産物を、ＳＰＲ１ Ｓｅｌｅｃｔ磁性ビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて精製し、それぞれのＰＣＲ反応の５μＬアリコートをネステッドＰＣＲに用いた。第２のネステッドＰＣＲの８サイクルにより、アンプリコンのそれぞれの先端にＩｌｌｕｍｉｎａペアードエンドアダプター配列が組み入れられ、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑ又はＨｉＳｅｑシーケンサー（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、サンディエゴ、ＣＡ）でのサンプルのシークエンシングを可能にした。更に、既に記述したように（３３）、ウェル特異的な８塩基のＤＮＡバーコードが、それぞれのＰＣＲ産物に組み入れられた。バーコードの全リストについては、表Ｓ３を参照されたい。

【０２６１】

ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢに特異的なＰＣＲ及び以降の精製の間、並びにネステッドＰＣＲ反応のセットアップの間、オリジナルのソースプレートに対するプレートの方向を維持した。第２のネステッドＰＣＲにより、それぞれのプレートのそれぞれのウェル中のＤＮＡに特異的バーコードが付与された。バーコード１～９６をＴＣＲＢアンプリコンウェルに用い、バーコード９７～１９２をＴＣＲＡアンプリコンウェルに用いた。ＰＣＲ増幅の後、全９６個のＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのウェルのそれぞれについて、５μＬのアリコートをプールし、２つのＤＮＡサンプルプールを得た。それぞれのプールのＤＮＡ濃度を蛍光により測定し、アンプリコンサイズが正しいことを確認するため並びに過剰なプライマー及びプライマー二量体が存在しないことを確認するため、ＤＮＡ産物を、Ｃａｌｉｐｅｒ ＤＮＡ １Ｋアッセイ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いて分離した。２つのプール（ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ）を、最終的なシークエンシングライブラリーサンプルに対して等モル比率で混合し、これにより１９２の個々にバーコード付与されたＤＮＡ種が含まれた。

【０２６２】

ハイスループットシークエンシング：

上述の方法に従い、細胞を含む９６穴プレート１つについて、１つのシークエンシングライブラリーを調製した。シークエンシングライブラリーを希釈し、変性させ、フローセル上でのクラスタ形成及びラピッドラン（Rapid Run）フォーマットでの合成時解読のために、Ｉｌｌｕｍｉｎａプロトコルに従いＩｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ２５００シーケンサーのフローセルにロードした。このランフォーマットは、シングルリードシークエンシング（１５サイクルのインデックスリード、及びそれに続くＶ（Ｄ）ＪＣ受容体ドメインを通じた１５０サイクルのシークエンシング）を用いて、シークエンシングランごとに１人のドナーからのＤＮＡを解析した。ＴＣＲシークエンシングのリードは、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ定常領域から、それぞれＴＣＲＡ及びＴＣＲＢに特異的な２つのシークエンシングプライマーにより開始した。これらのプライマーは、Ｊ－Ｃスプライス部位からの１４塩基にアニールし、これにより、アイソタイプ及びウェル特異的ＤＮＡバーコードに加え、配列がＴＣＲＡ又はＴＣＲＢのいずれであるかの確認が可能となる。ハイスループ

ットシークエンシング法は、上記、並びに米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３又はＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２に記載され、その全内容を参照により援用する。

【０２６３】

Ｔ－ＡＬＬクローンのスパイクイン（Spike-In）：

対形成の陽性対照として、αβＴＣＲに対して陽性であることが公知のヒトＴ細胞白血病（Ｔ－ＡＬＬ）細胞株、Ｊｕｒｋａｔクローン Ｅ６－１（ＡＴＣＣ（登録商標）ＴＩＢ－１５２）を購入した（３５）。Ｊｕｒｋａｔ ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢの配列は公知であり、ディープシークエンシングによっても確認した（３４）。１０％のウシ胎児血清（Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を添加したＨｙＣｌｏｎｅ ＲＰＭＩ １６４０培地（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）中、Ｔ２５フラスコを用い、３７℃、５％ $CO_2$ の条件で、Ｊｕｒｋａｔ細胞を増殖させた。回収した細胞を希釈し、約４５０個のＪｕｒｋａｔ細胞を３０００万個のＰＢＭＣのサンプルに添加し、それによって９６穴プレートのウェルあたり、Ｊｕｒｋａｔ細胞１．５×１０$^{-5}$、または０．７５個の割合でＪｕｒｋａｔクローンがＰＢＭＣサンプル中に存在した。細胞懸濁液の濃度を、１ウェルあたり１０００細胞／μＬに調整し、ウェルあたり５０μＬを９６穴プレートに、ロボット制御により分配した。プレートのそれぞれのウェルは、細胞懸濁液サンプルの分配後、５０，０００個のＰＢＭＣｓを含んだ。次に、サンプルプレートを、図７に記載の本発明の標準的な研究ワークフローにより処理した。

【０２６４】

ポアソン統計に基づくと、このＪｕｒｋａｔクローンのスパイクインのレベルでは、５１のウェルが既知のＴＣＲ αβを含むことが予想された。ウェル中のＪｕｒｋａｔ ＴＣＲαβの配列の量は、ＴＣＲ受容体ｍＲＮＡの発現レベルと比例していなければならない。末梢血のＣＤ４＋Ｔ細胞とＪｕｒｋａｔ Ｅ６－１細胞の間でＴＣＲ転写物の数を比較した、少なくとも１つの文献の報告が存在する。その著者は、半定量的ＰＣＲを用い、Ｊｕｒｋａｔ細胞のＴＣＲ転写物が、健康な献血者から得たＣＤ４＋細胞からのＴＣＲ転写物より多くないことを示した（３６）。ＴＣＲＢ ｃＤＮＡの次世代シークエンシングを用いて、ＴＣＲＢ鎖の転写レベルをＴ細胞サブセット全体で比較したところ、細胞あたり３～１２のＴＣＲＢ転写物の範囲で、ナイーブ、活性化、及びメモリーＣＤ８ Ｔ細胞サブセットと同様であることが決定された（３７）。文献データに基づけば、Ｊｕｒｋａｔクローン配列は、ＰＢＭＣに由来するＴＣＲレパートリー配列の場合よりも低いレベルで、ウェルに存在することが予想される。ＪｕｒｋａｔクローンによるＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのｍＲＮＡの相対的発現量は、期待されるクローンのＴＣＲαβ対を回収する本発明の能力に影響を及ぼす、もう１つの生物学的特徴である。α及びβ鎖の転写活性は、Ｔ細胞の胸腺内発生の間、制御され、胸腺分化のステージに応じて著しく異なることが報告されている（３８）。胸腺の様々な発達ステージに由来する腫瘍細胞株は、相対的な発現量の相違を確認することが確認されている。Ｊｕｒｋａｔ細胞系、すなわち「ステージＩＩ Ｔ細胞」は、このように、ＴＣＲＢの発現と比較し、ＴＣＲＡの発現が低いことが予想される（３９）。

【０２６５】

２人のドナーによる実験：

本発明の対形成の偽陽性率を直接測定するために、上記の標準的な技術を用いて、２人の健康な成人の静脈血からＰＢＭＣｓを単離した。細胞懸濁液をＲＮＡｌａｔｅｒ（高塩濃度、ＲＮＡを分解から保護し、保存された組織又は細胞サンプルにおけるｍＲＮＡ発現プロファイルを保持することが知られているアンモニウムベースのＲＮＡ保存剤（４０））に保存することにより、新たに単離したＰＢＭＣの細胞ＲＮＡを保護した。ロボット操作のリキッドハンドラーを利用し、９６ウェルマイクロタイタープレート全体に細胞懸濁液のサンプルを分配した。実験上の設定に応じて、それぞれのウェルに添加する細胞数を２５，０００～１００，０００個の間で変化させた。ゆえに、プレートのウェル間の細胞

数の変動は、リキッドハンドラーのピペッティング精度に依存し、２５％未満のＣＶであると推定された。２人の健康な成人のＰＢＭＣサンプルから開始し、細胞を３枚の９６穴プレートのウェルに均一に分配した。１枚目のプレートは、ドナーＸからの細胞を含み、２枚目のプレートは、ドナーＹからの細胞を含み、３枚目のプレートは、１：１の比率で両方のドナーからのサンプルを混合して調製した細胞を含んだ。分析対象のドナー細胞サンプルを含むそれぞれの９６穴プレートを、最初の２回のワークフロー工程（細胞ＲＮＡの単離及びｃＤＮＡ合成）を通して一単位として全９６個のウェルを同時に処理した。ウェルの座標を保存しつつ、次に全９６個のｃＤＮＡプールを、２つの別々の９６穴プレート上でのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ　ｃＤＮＡの特異的ＰＣＲ増幅のために複製した。ユニバーサルアダプターに相補的な配列を含むように、Ｖ遺伝子のフォワードＰＣＲプライマー及びＣセグメントのリバースＰＣＲプライマーを設計し、それによって、以降の限られたサイクルのＰＣＲ反応において、ユニークなバーコード付のネステッドオリゴヌクレオチドアダプターをそれぞれのＤＮＡテンプレートに結合させた。２回目のＰＣＲにおいて、それぞれの９６穴プレートの全てのウェル特異的ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢアンプリコンに、１９２個の８ヌクレオチドバーコードのうちの１つをタグ付けした。更に、２回目のＰＣＲにより、Ｉｌｌｕｍｉｎａ特異的なアダプターをアンプリコンに組み入れて、ＨｉＳｅｑ　２５００によるシークエンシング用に、全１９２のウェルを１つのシークエンシングライブラリーにプールした。前記のように、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのＰＣＲ産物の設計により、増幅されたｃＤＮＡライブラリーのシークエンシングが可能となった（３３）。手短には、短い１５サイクルのリードにより、最初のユニークなウェルのバーコードを決定し、その後、Ｖ（Ｄ）ＪＣドメインに及ぶ１５０サイクルのシークエンシングリードを行った。２回目のリード用のシークエンシングプライマーを、Ｊ－Ｃスプライス結合部から１４ヌクレオチドのＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのＣセグメントに配置した。１５０塩基のリード長は、このように、全てのＶ、Ｄ（ＴＣＲＢの場合）、及びＪ遺伝子の解析を可能にした。Ｃセグメント遺伝子の残りの１４塩基は、ＴＣＲＡ又はＴＣＲＢのいずれかのアイソタイプに特異的であり、ウェルのバーコードとは無関係に、いずれかのアイソタイプに属するリードが確認された。

【０２６６】

適応的免疫受容体の対形成の統計学：

解析しようとする適応的免疫受容体の対ごとに、受容体配列が共有するウェル数に関するｐ値を算出する。例えば、ＴＣＲＡ／ＴＣＲＢの対形成の場合、Ｎα個のウェルを占有するＴＣＲＡ配列と、Ｎβ個のウェルを占有するＴＣＲＢ配列を考慮する。これらの配列がＮαβ個のウェルを共有する場合、$N^{*}\alpha = N\alpha - N\alpha\beta$個のウェルが、ＴＣＲＡ配列のみで占有され、$N^{*}\beta = N\beta - N\alpha\beta$個のウェルがＴＣＲＢ配列のみで占有される。各ウェルに同数のＴ細胞が含まれる場合、偶然にこのウェル共有量が観察される確率は、以下の式で表され：（式）

【０２６７】

【数１】

$$P(N_{\alpha\beta}|N_{\alpha},N_{\beta},N_{tot}) = \frac{\binom{N_{tot}}{N_{\alpha\beta}}\binom{N_{tot}-N_{\alpha\beta}}{N_{\alpha}^{*}}\binom{N_{tot}-N_{\alpha\beta}-N_{\alpha}^{*}}{N_{\beta}^{*}}}{\binom{N_{tot}}{N_{\alpha}}\binom{N_{tot}}{N_{\beta}}}$$

式中、$N_{tot}$はウェルの総数であり、Ｎα及びＮβは限界ウェル数である。全てのウェルの配置が、同じ限界数と、占有されたウェルの等しい若しくはより大きい重複とを有する確率を合計することにより、推定のＴＣＲ対に関するｐ値を得る。

【０２６８】

このようにｐ値を算出することは、以下の２つの目的にかなう：すなわち、異なるウェ

ル数のＴＣＲ配列は、偶然に重複する確率が異なるという事実を説明すること、並びに、占有されたウェル間の完全な重複を必要とすることなく、偶然から逸脱した対形成を捉えること、である。細胞あたりのｍＲＮＡ転写物の数が少ないと、ウェルドロップアウトが起こり得ることから（下記の「ｍＲＮＡサブサンプル及び対におけるドロップアウト率」の章を参照）、不完全なウェル重複はＴＣＲ対のメンバーの間で一般的であり、ゆえにデータのこの特徴を説明する統計量を用いることが重要である。

【０２６９】

この分析は、他のＴＣＲ又はＩｇの対形成（例えばＴＣＲＧ／ＴＣＲＤ、及びＩＧＨとＩＧＫ又はＩＧＬ）においても実施できる。

【０２７０】

ｐ値の帰無分布のシミュレーション：

生物学的データ分析における多くの用途と異なり、本発明の方法を使用した分析におけるｐ値の帰無分布は、連続的でなく、また不均一である。離散のウェル占有パターンから離散ｐ値が得られ、それぞれのＴＣＲ配列のｐ値は、可能な対形成パートナーとの多くの比較において認められる、帰無分布をより小さいｐ値へと歪曲する最小値として選択される。異なるウェル占有を有するＴＣＲクローンも、異なる帰無分布を有し、より極端なｐ値は、適度な数のウェルを占有するクローンでも観察されることができるが、かかるウェルはまた、極端なｐ値を生み出しうる比較的少ない比較に関係する傾向がある。

【０２７１】

これらの特性を説明するため、本発明の順列アルゴリズムを、本発明の方法を用いる実験構造の完全なモデリングに用いた。本発明では、１つの座（一般的にＴＣＲＡ）を「クエリー」座位と称し、その他を「標的」座と称する。最ｉウェルを占有する標的配列の数Ｔｉ（ｉ＝１～９６）を計数することにより開始する。１つの順列は、以下の工程を要する：

占有レベルｉごとに、$T_i$をランダムな数［０，１］でサンプリング。最大のサンプリング数を$\gamma_i$とする。

【０２７２】

占有レベルｊごとに、$\gamma_i$を用い、ｉ及びｊウェルを占有する配列に関する累積分布関数における、共有ウェル$N_{ij}$の数を決定する。これは、$T_i$のランダムな配置をサンプリングした後に、ｊのウェルにおける配列が、ｉのウェルにおけるベストの配列を共有するウェルの最大数を表す。

【０２７３】

$N_{ij}$を用い、占有レベルｊに関するｐ値$\delta_j$を算出する。$\delta_j$がこれまでレベルｊで見られた最小のｐ値より小さい場合、それを保存する。

【０２７４】

全てのｉ個の占有された標的ウェルごとにこれらの工程を完了させた後、可能な数のクエリーウェルｊごとに最小のｐ値である$\delta_j$を得る。これらの値は、１つの順列の結果として保存され、それらは、本発明の実験で見られるような標的配列のコレクションに対して、所定のクエリー配列を比較した場合に見られる最小のｐ値にまさに類似する。出願人により得られる結果は、１実験あたり１０，０００の順列を実行することに基づくものである。

【０２７５】

偽発見率の評価：

一例では、上述のシミュレーションされた帰無分布を、例示的な実験での偽発見率の推定に用いた。それぞれのウェル占有レベルのクローンは、異なるｐ値の帰無分布を有するため、それらはまた、別々のＦＤＲ推定を必要とする。アプローチは、連続した順列ｐ値によって偽発見率を推定する方法を開発したＢａｎｃｒｏｆｔらの方法に従う（４１）。ハイスループット対形成実験におけるｐ値と同様、連続した順列ｐ値は離散かつ不均一であるため、それらの手法は、本発明のシナリオに直接適用できる。

【０２７６】

一実施形態では、当該方法の工程は以下の通りである：
ウェル占有レベルｉ＝１～９６ごとに、帰無仮説下で少なくとも０．０５の確率を有する、可能な限り多くのビンを作製する。これは、真の帰無仮説の数の、過度に控え目な推定を生じさせる離散分布における不連続性を説明する。
【０２７７】
ウェル占有レベルｉごとに、ヒストグラムに基づく$m_0$の概算と関連する、Ｂａｎｃｒｏｆｔらの定理２による観察されたｐ値における帰無仮説の数$m_{0\ i}$を推定する。
【０２７８】
占有レベルｉでのｐ値に関して、通常の方法で、あらゆる拒絶閾値αにおけるＦＤＲを算出する。図９及び１３に示す値のような実験全体のＦＤＲ推定値を得るため、予想されるタイプ１のエラー数及び占有レベルにわたる全対形成コール（pairing calls）を合計し、後者により前者を除する。
【０２７９】
観察されたｐ値の数が少ないとき、少ないＴＣＲ配列の占有レベルで生じ得るのと同様に、推定値$m_0$は不安定であると考えられる。より良い推定値を得るため、少ない配列数及び類似の帰無分布を有する占有レベルを組み合わせた。
【０２８０】
ＦＤＲを決定する他の方法が使用できる。一実施形態では、ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列とユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の可能な間違った対形成の偽発見率の推定値の決定は、サンプルにおいて同定される複数の推定の同族対のそれぞれに関するｐ値を算出する工程と、複数の推定の同族対の全てに関するｐ値と、予想されるｐ値分布とを比較する工程であって、予想されるｐ値分布が、真の同族対が存在しない実験を表すものとして算出される工程と、推定の同族対ごとに、期待される偽陽性の結果の割合を決定する工程であって、推定の同族対のｐ値以下の全てのｐ値が、真の同族対形成を表すものとして決定される工程と、を含む。
【０２８１】
ｍＲＮＡサブサンプル及び対内におけるウェルドロップアウト率：
本発明の対形成アプローチは、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ配列が占有するそれぞれのウェルにおけるＴ細胞クローンから当該配列を信頼可能に検出することに依存する。所定のＴ細胞は、典型的には、それぞれのＴＣＲ再構成の幾つか（おそらく５～１０程度）のｍＲＮＡコピーを有し、実験の無効により、ウェルのサブセットにおいて、いずれかの座が観察されない場合がある。このウェルドロップアウト率を特徴づけるために、ウェルあたり７０，０００個のＴ細胞を、プレート上の同じＲＮＡプールからの異なる２回のドロー（draws）を含むように実験系を構築した。それぞれのＲＮＡドローを個別に処理することにより、設計による不完全なｍＲＮＡサンプリングの効果を特徴づけしたが、それは実験無効による不完全なｍＲＮＡサンプリングの代用である。
【０２８２】
下記の章では、これらのｍＲＮＡサブサンプルのウェルドロップアウト率について記載する。対形成配列間のウェル重複を用いて、シークエンシングされたｍＲＮＡの完全なセットにおけるドロップアウト率を推定しそれを本発明の主要な分析に用いた。
【０２８３】
図１３は、この実験における２つのｍＲＮＡサブサンプルのそれぞれについての、ウェルドロップアウトの推定率を表す。これらのパネルにおいて、ＴＣＲ配列ごとのウェルドロップアウト率は、当該配列が１つのＲＮＡドローにおいて占有したウェルの数と、両方のドローからの組み合わせデータとを比較することにより決定した。この分割実験におけるドロップアウト率の中央値は、ＴＣＲＡ（Ｙ／Ｙ）では２０～２４％、及びＴＣＲＢ（Ｘ／Ｘ）では１４～２１％の範囲であった。これらのサブサンプルにおけるウェルドロップアウト率が高いことは、実験において、細胞からｍＲＮＡプールを完全にサンプリングすることの重要性を強調する。ドロップアウト率は、ＴＣＲＢではＴＣＲＡより低い傾向があり、それは細胞あたりのＴＣＲＢのｍＲＮＡ分子数が多いことの反映であり得る。

【０２８４】
図１４Ａ～Ｄは、ウェルドロップアウト率の異なる概算を利用した結果を示す。所定の実験では、確実に対形成（ＦＤＲ＜１％）した配列中のウェル重複を比較することにより、ドロップアウト率を算出した。ＴＣＲの１つの対のメンバー中に認められ、その他では認められないウェルは存在しないと見なされる。図１４Ｃは、この概算を、図１４Ａで用いたｍＲＮＡサブサンプルに適用したときの結果を示す。予想通り、対形成に基づく推定値は、ウェルがドロップアウトすると、対の検出能が衰えるため、下に偏る。ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢの両方の場合、対形成配列から見かけのドロップアウト率（図１４Ｃ）は、完全なｍＲＮＡサンプルによって認められる率と比較し、３０％低かった（図１４Ａ）。

【０２８５】
対形成に基づく概算における偏りを決定した後、このアプローチを用い、ハイスループット対形成実験からのｍＲＮＡの完全サンプルにおけるウェルドロップアウト率を評価した。結果を図１４Ｄに示す。ドロップアウト率の中央値は、図１４Ｃで用いたｍＲＮＡサブセットの率よりも３０～５０％低く、それは更に、ｍＲＮＡプールを徹底的にサンプリングすることの重要性を示すものである。図１４Ｄにおける率が真の率より３０％低いと仮定すれば、最終的なドロップアウト率の中央値は、ＴＣＲＡでは１０％、ＴＣＲＢでは５％であろう。幾つかのＴＣＲ配列では未だ実質的なドロップアウト率を示すが、それにもかかわらず、この実験において確信をもって～３５，０００のＴＣＲ対を割り当てることができ、これは、本発明の方法の有用性を示すものである。

【０２８６】
実施例４：適応的免疫受容体ヘテロ二量体ポリペプチド配列への、ハイスループット対形成の適用：
前記の実施例では、本発明の方法の用途は、ハイスループットで正確にＴＣＲ配列を対形成させる能力に関するアプローチに集中していたが、本発明の方法はまた、様々な方法で免疫レパートリーの解析範囲を広げることができる柔軟なツールとして使用できる。例えば、方法を、単にウェルあたりの投入Ｔ細胞数を変化させることにより、任意の望ましい頻度範囲における同族のＴＣＲ鎖の対を形成させるように調整することができる。また、プレート上のウェルのサブセット全体で投入Ｔ細胞の数を階層化することにより、一回の実験で複数の頻度帯からの同族対をアッセイすることもできる。

【０２８７】
前記のように、当該方法は、ハイスループットで正確にＴＣＲ又はＩｇ配列を対形成させるのに使用できる。例えば、本発明の方法は、ＴＣＲ　α（ＴＣＲＡ）鎖を含む適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１ポリペプチド鎖と、ＴＣＲ　β（ＴＣＲＢ）鎖を含む適応的免疫受容体ヘテロ二量体の第２ポリペプチドと、の対を形成させるのに使用できる。更に、本発明の方法は、ＴＣＲ　γ（ＴＣＲＧ）鎖を含む適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１ポリペプチドと、ＴＣＲ　δ（ＴＣＲＤ）鎖を含む適応的免疫受容体ヘテロ二量体の第２ポリペプチドと、の対を形成させるのに使用できる。別の例では、本発明の方法は、免疫グロブリン重鎖（ＩＧＨ）を含む適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１ポリペプチドと、免疫グロブリンＩＧＬ軽鎖又はＩＧＫ鎖から選択される適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２ポリペプチドとの対を形成させるのに使用できる。

【０２８８】
上記方法は、適応免疫受容体ヘテロ二量体を形成する第１ポリペプチドと第２ポリペプチドとを含む複数の同族対を同定する工程を提供し、前記適応免疫受容体ヘテロ二量体は、サンプル中の１つのクローンに由来するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）又は免疫グロブリン（Ｉｇ）を含み、前記サンプルは哺乳動物対象に由来する複数のリンパ系細胞を含む。前記のように、方法は、複数のリンパ系細胞を複数の容器に分配する工程であって、それぞれの容器が複数のリンパ系細胞を含む工程と、複数のリンパ系細胞から得られるｍＲＮＡ分子から逆転写されているｃＤＮＡ分子の多重ＰＣＲを実施することにより複数の容器中でアンプリコンのライブラリを生じさせる工程と、を含む。アンプリコンのライブラリは、以下を含む：ｉ）第１のポリペプチドをコードする複数の第１の適応免疫受容体アンプリ

コンであって、それぞれが、ユニークな可変的な（Ｖ）領域コード配列、ユニークなＪ領域コード配列、又はユニークなＪ領域コード配列とユニークなＣ領域コード配列の両方、少なくとも１つのバーコード配列、少なくとも１つのユニバーサルアダプター配列、及びシークエンシングプラットホームタグ配列を含むアンプリコンと、ｉｉ）第２のポリペプチドをコードする複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード配列、ユニークなＪ領域コード配列、又はユニークなＪ領域コードす配列とユニークなＣ領域コード配列の両方、少なくとも１つのバーコード配列、少なくとも１つのユニバーサルアダプター配列、及びシークエンシングプラットホームタグ配列を含むアンプリコン。方法はまた、アンプリコンのライブラリのハイスループットシークエンシングを実施して、複数の第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列のデータセットを得る工程を含む。

【０２８９】

更に、方法は１つ以上の容器に、それぞれのユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれのユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の容器占有パターンを決定することと、１つ以上の容器に、それぞれのユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を割り当てることにより、それぞれのユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の容器占有パターンを決定することを含み、ユニークな第１又は第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列におけるそれぞれのバーコード配列は、特定の容器と会合する。

【０２９０】

推定の同族対を形成するための、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列のそれぞれの可能な対形成に関して、方法は、容器占有パターンを観察する統計学的確率を算出するか、又は、前記第１及び第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列がリンパ系細胞の同じクローン集団に由来しない場合に、偶然予想されるより大きい割合の共有容器を観察する工程と、所定の尤度カットオフ値より低いスコアを有する統計学的確率に基づき、複数の推定の同族対を特定する工程と、を含む。

【０２９１】

次に、同定された推定の同族対ごとに、ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列とユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列の可能な間違った対形成に関して、偽発見率の推定値を決定する。方法は、前記統計学的確率及び前記偽発見率に基づき、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体配列の複数の同族対を、前記サンプル中の前記適応免疫受容体をコードする真の同族対として同定する工程と、を含む。

【０２９２】

幾つかの実施形態では、統計スコアは、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列のそれぞれの推定の同族対の対形成に関して算出されるｐ値でありうる。一実施形態では、統計スコアの算出は、真でない同族の対形成を仮定し、前記ユニークな第１の適応免疫受容体アンプリコン配列により占められる容器の数とユニークな第２の適応免疫受容体アンプリコン配列により占められる容器の数を考慮して、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列が、それらが共同で占めるのが観察されたのと同数の又はより多くの容器を共同で占める確率を算出する工程を含む。

【０２９３】

基本的に、何らかの２つの適応免疫受容体の配列を考慮して、方法は、２つの配列が偶然に予想されるより多くの容器で同時に出現するか否かを解析する。合計Ｎ個の容器がある場合、合計Ｘ個の容器で観察される第１の適応免疫受容体の配列（Ａ）と、合計Ｙ個の容器で観察される第２の適応免疫受容体の配列（Ｂ）と、適応免疫受容体の配列（Ａ）及び（Ｂ）が観察されるＺ個の容器があり、方法は、所定の配列（Ａ）がＮ個の容器のうちＸ個で見出され（Ｘ／Ｎ）、また配列（Ｂ）がＮ個の容器のうちＹ個で見出され（Ｙ／Ｎ）る場合の、両方の配列がＺ個以上の容器で見出される確率を算出する。

【０２９４】

幾つかの実施形態では、ＡとＢの配列が重複する容器が偶然に観察される確率が低けれ

ば、それらの同時出現は偶然ではなく、むしろ真の同族対形成による可能性が高くなる。
【０２９５】
次に、統計学的確率に基づく対形成の高い尤度を有する複数の推定の同族対を同定することは、ユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列ごとに、最も低いマッチングのｐ値スコアを有するユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を同定する工程、又は、ユニークな第２のアダプター免疫受容体アンプリコン配列ごとに、最も低いマッチングのｐ値スコアを有するユニークな第１のアダプター免疫受容体アンプリコン配列を発見する工程と、を含む。
【０２９６】
他の実施形態では、偽発見率の推定値を決定することは、サンプル中で同定される複数の推定の同族対のそれぞれについてｐ値を算出する工程と、複数の推定の同族対の全てに関するｐ値と、予想されるｐ値分布とを比較する工程であって、予想されるｐ値分布が、真の同族対が存在しない実験を表すものとして算出される工程と、推定の同族対ごとに、推定の同族対のｐ値と同じ若しくはそれ以下の全てのｐ値が、真の同族対形成を表すものとして決定されるように、予想される偽陽性結果の割合を決定する工程と、を含む。
【０２９７】
特定の実施形態では、予想されるｐ値分布を算出する工程は、それぞれの第１及び第２の適応免疫受容体の配列が、真の同族対はないがれ以外は同一である実験で観察されている容器の順序を変える工程と、それぞれの推定の同族対に関連するｐ値分布を算出する工程と、を含む。
【０２９８】
方法は、偽発見率の推定値に基づいて算出される閾値以下のｐ値を有する複数の推定の同族対を選択することにより、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体配列の複数の同族対を、真の同族対として同定することを含む。
【０２９９】
一実施形態では、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列の同定された同族対は、１％未満の偽発見率の推定値を有する。他の実施形態では、ユニークな第１及び第２の適応免疫受容体アンプリコン配列の同定された同族対は、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％又は１０％未満の偽発見率の推定値を有する。
【０３００】
方法はまた、前記複数の容器のそれぞれを、前記複数のリンパ系細胞から得られるｍＲＮＡ分子の逆転写を促進するのに十分な条件及び時間にて、第１の逆転写プライマーセットと接触させることを含みうる。特定の実施形態において、第１のオリゴヌクレオチド逆転写プライマーセット（Ａ）は、複数の第１及び第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを生じさせるための、複数の第１及び第２の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする複数のｍＲＮＡ配列を逆転写できるプライマーを含み、第１の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする複数の第１の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンは、１）ユニークなＶ領域コード遺伝子配列と、２）ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列の両方と、を含み、第２の適応免疫受容体ポリペプチドをコードする複数の第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンは、１）ユニークなＶ領域コード遺伝子配列と、２）ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列の両方と、を含む。
【０３０１】
第１及び第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを、次に２回目の反応で増幅する。反応は、前記複数の容器のそれぞれを、第１及び第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンの多重ＰＣＲ増幅を促進するのに十分な条件及び時間にて、第２の（Ｂ）及び第３の（Ｃ）オリゴヌクレオチドプライマーセットと接触させることから開始される。幾つかの態様では、第２のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｂ）は、複数の第１の逆転写されたアダプター免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅でき

るフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーは、それぞれ、第１の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンとハイブリダイズできる。

【０３０２】

第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーの各対は、第１の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅できる。第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、第１のユニバーサルアダプター配列とＶ領域コード遺伝子配列と相補的な領域とを含む。第２のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、第２のユニバーサルアダプター配列とＪ領域コード遺伝子配列又はＣ領域コード遺伝子配列と相補的な領域とを含む。

【０３０３】

第３のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｃ）は、複数の逆転写された第２の適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含む。第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、第２の逆転写された適応免疫受容体ｃＤＮＡアンプリコンを増幅できる。一態様では、第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、第１のユニバーサルアダプター配列とＶ領域コード遺伝子配列と相補的な領域とを含む。第３のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、第２のユニバーサルアダプター配列と、Ｊ領域コード遺伝子配列と相補的か、又はＣ領域コード遺伝子配列と相補的である領域と、を含む。

【０３０４】

方法はまた、ｉ）複数の第３の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれが、ユニークなＶ領域コード遺伝子配列又はその相補配列と、ユニークなＪ領域コード遺伝子配列若しくはユニークなＪ領域コード遺伝子配列とユニークなＣ領域コード遺伝子配列との両方又はその相補配列と、前記第１及び第２のユニバーサルアダプター配列と、を含む、前記アンプリコンと、ｉｉ）複数の第４の適応免疫受容体アンプリコンであって、それぞれあ、ユニークなＶ領域コード遺伝子配列又はその相補配列と、ユニークなＪ領域コード遺伝子配列、又はユニークなＪ領域コード遺伝子配列及びユニークなＣ領域コード遺伝子配列の両方、又はそれらの相補配列と、前記第１及び第２のユニバーサルアダプター配列と、を含む前記アンプリコン、を生じさせることを含む。

【０３０５】

複数の第３の適応免疫受容体アンプリコンと複数の第４の適応的免疫受容体アンプリコンは、次に更なるプライマーで増幅される。方法は複数の容器のそれぞれを、複数の第３及び第４の適応免疫受容体アンプリコンの第２の多重ＰＣＲ増幅を促進する条件下及び十分な時間、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｄ）及び第５のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｅ）と接触させることを含む。

【０３０６】

一実施形態では、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｄ）は、複数の第３のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含み、前記フォワード及びリバースプライマーは、それぞれ、第３の適応的免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズできる。前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記第３のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できる。

【０３０７】

第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、複数の第３の適応免疫受容体アンプリコンにおける第１のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域とを含み、リバースプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、複数の第３の適応的免疫受容体アンプリコンにおける第２のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含む。他の実施形態

では、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーの一方又は両方は、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットが添加される容器に関連するユニークなバーコード配列を含む。

【０３０８】

第５のオリゴヌクレオチドプライマーセット（Ｅ）は、複数の第４のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できるフォワード及びリバースプライマーを含み、フォワード及びリバースプライマーは、それぞれ、第４の適応的免疫受容体アンプリコンとハイブリダイズできる。前記第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワード及びリバースプライマーのそれぞれの対は、前記複数の第４のアダプター免疫受容体アンプリコンを増幅できる。前記第５のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるフォワードプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、複数の第４の適応免疫受容体アンプリコンにおける第１のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含み、第５のオリゴヌクレオチドプライマーセットにおけるリバースプライマーは、シークエンシングプラットホームタグ配列と、複数の第４の適応免疫受容体アンプリコンにおける第２のユニバーサルアダプター配列と相補的な領域と、を含む。

【０３０９】

第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットのフォワード及びリバースプライマーの一方又は両方は、第４のオリゴヌクレオチドプライマーセットが添加される容器に関連するユニークなバーコード配列を含み、それにより、複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンと複数の第２の適応的免疫受容体アンプリコンとを含むアンプリコンのライブラリを生じさせる。

【０３１０】

次に、方法は、シークエンシング用に複数の容器からのアンプリコンのライブラリを組み合わせて混合することを含む。ハイスループットシークエンシング法は、上記、並びに、米国特許出願第１３／２１７，１２６号、米国特許出願第１２／７９４，５０７号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０２６３７３又はＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４９０１２に記載されており、その全内容を参照により本発明に援用する。

【０３１１】

一態様では、複数の第１の適応免疫受容体アンプリコンは、Ｃ領域コード配列を含む。幾つかの態様では、複数の第２の適応免疫受容体アンプリコンは、Ｃ領域コード配列を含む。

【０３１２】

幾つかの場合、サンプルは、血液サンプルを含む。他の実施形態では、サンプルは、組織サンプルを含む。特定の実施形態では、サンプルは、精製又は培養されたヒトのリンパ系細胞のサンプルを含む。他の実施形態では、容器は少なくとも１０４個のリンパ系細胞を含む。他の実施形態では、サンプルは少なくとも１０４個の細胞を含む。

【０３１３】

方法は、ＴＣＲ　α（ＴＣＲＡ）鎖とＴＣＲ　β（ＴＣＲＢ）鎖との対形成、ＴＣＲ　γ（ＴＣＲＧ）鎖とＴＣＲ　δ（ＴＣＲＤ）鎖との対形成、又は免疫グロブリン重鎖（ＩＧＨ）と免疫グロブリン軽鎖（ＩＧＬ）又はＩＧＫ鎖との対形成などの、上記の様々な適応免疫受容体座に適用できる。

【０３１４】

適応免疫受容体ヘテロ二量体の第１のポリペプチドがＩＧＨ鎖であり、適応免疫受容体ヘテロ二量体の第２のポリペプチドがＩＧＬ及びＩＧＫである場合、以下を含む３つの異なる増幅プライマーセットが用いられる：ＩＧＨに対する第１のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット、ＩＧＫに対する第２のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット、及びＩＧＬに対する第３のオリゴヌクレオチド増幅プライマーセット。

【０３１５】

このように、本発明の方法及び組成物は、免疫学、医療及び治療面での開発における多くの用途に有用であることがわかる。本発明の方法は、選択された免疫受容体のコレクシ

ョンの主要な配列と、それらの選択を引き起こす標的（またエピトープ）との間の関連を研究する機会を提供する。実験設計及び変数の調整（例えば、ＨＬＡタイプ）に留意することにより、本発明の方法は、腫瘍に浸潤するリンパ球由来の重要なＴＣＲを同定する目的、ルーチン又は実験的な予防接種への応答性に関する新しい基準を確立する目的、及び公衆被ばく及び共有レスポンス（shared responses）の疫学的解析の目的、に有用なアプローチである。本発明の方法はまた、所定の応答に対するそれぞれの独立した鎖の相対的な関与に関する情報を提供する。更に、本発明のアプローチは、特定の免疫応答を支配するＴＣＲ鎖の物理的属性の有無に関するデータを提供する。例えば、所定のタイプの抗原チャレンジに対する所定のタイプの応答に関して一方又は両方の鎖の長さ又は生物物理学的パラメータに対する拘束。本発明の方法は、専門知識の必要なく、標準的な研究資材及び設備で実施することができ、また開始サンプルのタイプは幅広い種類が使用可能である（腫瘍サンプル、ソートされた細胞、細胞懸濁液など）。この技術はスケーラブルで、様々な研究施設において利用可能である。

【０３１６】

重要なことは、本発明の方法が、ＴＣＲγ／δ、並びに免疫グロブリン重鎖及び軽鎖（ＩＧＨと、ＩＧＫ又はＩＧＬと）を連結するために応用することができ、等しく良好に機能することを認識することである。モノクローナル抗体の開発に対する実際的な関心、並びに液性免疫応答の一般的な重要性を考慮すると、本発明の方法は、生物医学的な発見のための重要な技術となる可能性がある。

【０３１７】

前記の様々な実施形態を組み合わせて、更なる実施形態を提供することができる。本明細書で参照する全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国での特許出願及び非特許文献は、その全内容を参照により本発明に援用する。必要に応じて、これらの実施形態の態様を改良し、様々な特許、特許出願及び刊行物の概念を盛り込んで、更に他の実施形態を提供することができる。

【０３１８】

前記の詳細な説明を考慮して、これらの、及び他の実施形態の変更を行うことができる。一般に、以下の請求の範囲において用いられる用語は、特許請求の範囲を、明細書及び特許請求の範囲において開示される特定の実施形態に限定するものと解釈すべきでなく、かかる特許請求の範囲に含まれる全ての範囲の均等物と合わせて、全ての考えられる実施形態を含むもの解釈すべきである。したがって、特許請求の範囲は当該開示により限定されない。

【０３１９】

【０３２０】

【表１１－１】

表Ｓ１：ＴＣＲＡＤ及びＴＣＲＢのＶ遺伝子フォワードプライマーの配列

| TCRA Ｖ遺伝子プライマー | | TCRB Ｖ遺伝子プライマー | |
|---|---|---|---|
| 配列名 | 配列 | 配列名 | 配列 |
| TRAV01－1 | TCATTCCTTAGTCGCTCTGATAGTTATGGTTA | TCRBV01 | GAATGCCCTGACAGCTCTCG CTTATA |
| TRAV01－2 | CATTCCTTAGTCGGTCTAAAGGGTACAGTTA | TCRBV02 | CTCAG AG AAGTCTG AA AT ATTCG ATG ATCAATT CTC AGTTG |
| TRAV02 | ACAACATGACCTATGAACGGTTCTCTTCATC | TCRBV03－1 | CCAAATCG MTTCTC ACCTAAATCTCC AG AC AAAG |
| TRAV03 | CTGAATTTAACAAGAGCCAAACCTCCTTCCA | TCRBV03－2 | CACCTGACTCTCCAGACAAAGCTCAT |
| TRAV048 | CCGA CAGAAA GTCCAGCACTCTGAG | TCRBV04－1／2／3 | CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC |
| TRAV05 | CACTGTTCTATTGAATAAAAAGGATAAACATCTGTC | TCRBV05－1 | GATTCTCAGGGCGCCAGTTCTCTA |
| TRAV06 | GTCACCTTTGATACCACCCTTAAACAGAGTTT | TCRBV05－2 | CCTAATTGATTCTCAGCTCACCACGTCCATA |
| TRAV07 | AGACTAAATGCTACATTACTGAAGAATGGAAGCAG | TCRBV05－3 | TCAGGGCGCCAGTTCCATG |
| TRAV08－1 | TGAGGCTGAATTTATAAAGAGTAAATTCTCCTTTAA | TCRBV05－4 | TCCTAGATTCTCAGGTCTCCAGTTCCCTA |
| TRAV08－2 | GCTGAATTTAAGAAGAGTGAAACCTCCTTCCA | TCRBV05－5 | GAGGAAA CTTCCCTGATCGATTCTCAGC |
| TRAV08－3 | GGCTGAATTTAAGAGGAGTCAATCTTCCTTCAA | TCRBV05－6 | CAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCA |
| TRAV08－5P | GACACTTATCACTTCCCCAATCAATACCCC | TCRBV05－7 | AGGAAA CTTCCCTGATCAATTCTCAGGTCA |
| TRAV08－6 | GGCTGAATTTAACAAGAGTCAAACTTCCTTCCA | TCRBV05－8 | GGAAACTTCCCTCCTAGATTTTCAGGTCG |
| TRAV08－7ORF | GCTGAATTTAAGAAGAGCGAAACCTCCTTCTA | TCRBV06－1 | CCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATT |
| TRAV09－1 | CCATGTACCGTAAAGAAACCACTTCTTTCCA | TCRBV06－2／3 | GGAGAGGTCCCTGATGGCTACAA |
| TRAV09－2 | CCACATACCGTAAAGAAACCACTTCTTTCCA | TCRBV06－4 | TCCCTGATGGTTATAGTGTCTCCAGAGC |
| TRAVIO | TGGATGCAGACACAAAGCAAAGCTC | TCRBV06－5 | GGAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTC |
| TRAV11P | TAAAGAACTGCTTGGAAAAGAAAAATTTTATAGTGT | TCRBV06－6 | AAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTACAA |
| TRAV12－1 | ACAGCTCAATAGAGCCAGCCAGTATATTTC | TCRBV06－7 | GTTCCCAATGGCTACAATGTCTC CAGATC |
| TRAV12－2 | CAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTC | TCRBV06－8 | GAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCTAGATT |
| TRAV12－3 | GCACAGGTCGATAAATCCAGCAAGTATATCTC | TCRBV06－9 | GAGAA GTCCCCGATGGCTACAATGTA |
| TRAV13－1 | CTGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATTTCTC | TCRBV07－1 | GTGATCGGTTCTCTGCACAGAGGT |
| TRAV13－2 | CACCGTTTTATTGAATAAGACAGTGAAACATCTCTC | TCRBV07－2 | CGCTTCTCTGCAGAGAGGACTGG |
| TRAV14／DV4 | CCAGAAGGCAAGAAAATCCGCCAA | TCRBV07－3 | GGTTCTTTGCAGTCAGGCCTGA |
| TRAV15P | AGAAGCGCTTGGAAAAGAGAAGTTTTATAGTGT | TCRBV07－4 | CAGTGGTCGGTTCTCTGCAGAG |
| TRAV16 | TGACCTTAACAAAGGCGAGACATCTTTCCA | TCRBV07－5 | GCTCAGTGATCAATTCTCCACAGAGAGGT |
| TRAV17 | CGCTTGACACTTCCAAGAAAAGCAGTTC | TCRBV07－6／7 | TTCTCTGCAGAGAGGCCTGAGG |
| TRAV18 | CAGTCCTATCAAGAGTGACAGTTCCTTCCA | TCRBV07－8 | CCCAGTGATCGCTTCTTTGCAGAAA |
| TRAV19 | GAACTTCCAGAAATCCACCAGTTCCTTCAA | TCRBV07－9 | CTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCT |
| TRAV20 | GCTAAAAGCCACATTAACAAAGAAGGAAAGCTT | TCRBV08－1 | GAAGGGTACAATGTCTCTGGAAACAAACTCAAG |
| TRAV21 | CTCGCTGGATAAATCATCAGGACGTAGTAC | TCRBV08－2 | GGGGTACTGTGI11CI IGAAACAAGCTTGAG |
| TRAV22 | TCGCTACGGAACGCTACAGCTT | TCRBV09 | CAGTTCCCTG ACTTG CACTCTG AACTAAAC |
| TRAV23／DV6 | CTCCTTCAATAAAAGTGCCAAGCAGTTCTC | TCRBV10－1 | ACTAACAAAGGAGAAGTCTCAGATGGCTACAG |

【０３２１】

【表１１－２】

（表Ｓ１の続き）

| TCRA Ｖ遺伝子プライマー | | TCRB Ｖ遺伝子プライマー | |
|---|---|---|---|
| 配列名 | 配列 | 配列名 | 配列 |
| TRAV24 | CACTCTTAATACCAAGGAGGGTTACAGCTA | TCRBV10－2 | AGATAAAGGAGAAGTCCCCGATGGCTA |
| TRAV25 | TCAGTTTGGAGAAGCAAAAAAGAA CAGCTC | TCRBV10－3 | GATACTGACAAAGGAGAAGTCTCAGATGGCTATAG |
| TRAV26－1 | GATCATCACAGAAGACAGAAAGTCCAGCAC | TCRBV11－1／2／3 | CTAAGGATCGATTTTCTGCAGAGAGGCTC |
| TRAV26－2 | GCAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTAC | TCRBV12－1 | TTGATTCTCAGCACAGATGCCTGATGT |
| TRAV27 | CAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTC | TCRBV12－2 | ATTCTCAGCTGAGAGGCCTGATGG |
| TRAV28P | CAGTCAAAGCTGAGGAACTTTATGGCCA | TCRBV12－3／4 | GGATCGATTCTCAGCTAAGATGCCTAATGC |
| TRAV29DV05 | CTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTC | TCRBV12－5 | CTCAG CAGAG ATG CCTG ATGCAACTTTA |
| TRAV30 | CTGCTTCATTTAATGAAAAAAAGCAGCAAAGCTC | TCRBV13 | CTGATCGATTCTCAG CTCAACAGTTCAGT |
| TRAV31P | TTCTGTGAGCTTCCAG AA AACAACTAAAACTA TT CA | TCRBV14 | TAGCTGAAAGGACTGGAGGGACGTAT |
| TRAV32P | CACTGTACTGTTGAATAAAAATGCTAAACATGTCTC | TCRBV15 | CCAGGAGGCCGAACACI ICI I ICT |
| TRAV33P | GCCTGTG A ACTTTG A A AAAAAG AAAAAG TTCATCAA | TCRBV16 | GCTAAGTGCCTCCCAAATTCAC CCT |
| TRAV34 | CCAAGTTGGATGAGAAAAAGCAGCAAAGTTC | TCRBV17 | CACAGCTGAAAGACCTAACGGAACGT |
| TRAV3S | TCAGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTT | TCRBV18 | CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC |
| TRAV36／TRDV7 | AAGTAGCATATTAGATAAG A AAGAACTTTCC AGCAT | TCRBV19 | AGGGTACAGCGTCTCTCGGG |
| TRAV37P | CAGGOTAAAAAAGGAGACCAGCACATTTC | TCRBV20 | GCCTGACCTTGTCCACTCTGACA |
| TRAV38－1 | CrTCCAGAAAGCAGCCAAATCCTTCAG | TCRBV21 | ATGAGCGATTTTTAGCCCAATGCTCCA |
| TRAV39 | TGATACCAAAGCCCGTCTCAGCAC | TCRBV22 | TGAAGGCTACGTGTCTGCCAAGAG |
| TRAV40 | GAGGCGGAAATATTAAAGACAAAAACTCCCC | TCRBV23 | CTCATCTCAATG CCCCAAG AACGC |
| TRAV41 | CC AC A ATAAACATAC AGG A AAAGCACAGC TC | TCRBV24 | AGATCTCTGATGGATACAGTGTCTCTCGACA |
| TRDVOI | AGAAAGCAGCGAAATCCGTCGC | TCRBV25 | AGATCTTTCCTCTG AGTCAACAGTCTCCAGAATA |
| TRDV02 | TGACATTGATATTGCAAAGAACCTGGCTGT | TCRBV26 | CACTGAAAAAGGAGATATCTCTGAGGGGTATCATG |
| TRDV03S | GAAACACATTCTGACCCAGAAAGCCTTTCA | TCRBV27 | GTTCCTGAAGGGTACAAAGTCTCTCGAAAAG |
| | | TCRBV28 | CTGAGGGGTACAGTGTCTCTAGAGAGA |
| | | TCRBV29 | AGCCGCCCAAACCTAACATTCTCAA |
| | | TCRBV30 | CCCAGGACCGGCAGTTCA |
| | | TCRBVA | TTGATTAGAGACATATCCCTATTGAAAATATTTCCTGGCA |
| | | TCRBVB | AGATGCCCTGAGTCAGCATAGTCATTCTAAC |

【０３２２】

【表１２】

表Ｓ２．ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢのＣ遺伝子リバースＰＣＲプライマーの配列

| TCRA及びTCRBのＣ－セグメントプライマー | |
|---|---|
| 配列名 | 配列 |
| TCRA__C50 | ACAG ACTT GTCACTG G ATTT AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCAGGGTC |
| TCRB__C50 | G AG ATCTCTG CTT CTG ATG G CT CAAACACAG CGACCTCGGGTGGG AACAC |

【０３２３】
【表１３】
表Ｓ３．ＤＮＡバーコードの配列

| バーコード | 配列 | バーコード | 配列 | バーコード | 配列 | バーコード | 配列 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| JS01 | CAAGGTCA | JS49 | TCACTGCA | JS97 | TGACCTTG | JS145 | TGCAGTGA |
| JS02 | GCATAACT | JS50 | ATGGTCAA | JS98 | AGTTATGC | JS146 | TTGACCAT |
| JS03 | CTCTGATT | JS51 | CAAGTCAC | JS99 | AATCAGAG | JS147 | GTGACTTG |
| JS04 | TACGTACG | JS52 | TAGACGGA | JS100 | CGTACGTA | JS148 | TCCGTCTA |
| JS05 | TACGCGTT | JS53 | CAGCTCTT | JS101 | AACGCGTA | JS149 | AAGAGCTG |
| JS06 | CTCAGTGA | JS54 | GAGCGATA | JS102 | TCACTGAG | JS150 | TATCGCTC |
| JS07 | TCTGATAT | JS55 | CTCGAGAA | JS103 | ATATCAGA | JS151 | TTCTCGAG |
| JS08 | CATATGCT | JS56 | ATGACACC | JS104 | AGCATATG | JS152 | GGTGTCAT |
| JS09 | CGTAATTA | JS57 | CTTCACGA | JS105 | TAATTACG | JS153 | TCGTGAAG |
| JS10 | ACGTACTC | JS58 | CTATAAGG | JS106 | GAGTACGT | JS154 | CCTTATAG |
| JS11 | CTTCTAAG | JS59 | CGTAGAGT | JS107 | CTTAGAAG | JS155 | ACTCTACG |
| JS12 | ACTATGAC | JS60 | ATAGATAC | JS108 | GTCATAGT | JS156 | GTATCTAT |
| JS13 | GACGTTAA | JS61 | TCGTCGAT | JS109 | TTAACGTC | JS157 | ATCGACGA |
| JS14 | ACAAGATA | JS62 | TAAGAATC | JS110 | TATCTTGT | JS158 | GATTCTTA |
| JS15 | GACTAAGA | JS63 | AATGACAG | JS111 | TCTTAGTC | JS159 | CTGTCATT |
| JS16 | GTGTCTAC | JS64 | AGCTAGTG | JS112 | GTAGACAC | JS160 | CACTAGCT |
| JS17 | TTCACTAG | JS65 | TGAGACCT | JS113 | CTAGTGAA | JS161 | AGGTCTCA |
| JS18 | AATCGGAT | JS66 | AGCGTAAT | JS114 | ATCCGATT | JS162 | ATTACGCT |
| JS19 | AGTACCGA | JS67 | TAACCAAG | JS115 | TCGGTACT | JS163 | CTTGGTTA |
| JS20 | TTGCCTCA | JS68 | GATGGCTT | JS116 | TGAGGCAA | JS164 | AAGCCATC |
| JS21 | TCGTTAGC | JS69 | GCATCTGA | JS117 | GCTAACGA | JS165 | TCAGATGC |
| JS22 | TATAGTTC | JS70 | TTCCGGTA | JS118 | GAACTATA | JS166 | TACCGGAA |
| JS23 | TGGCGTAT | JS71 | GACACTCT | JS119 | ATACGCCA | JS167 | AGAGTGTC |
| JS24 | TGGACATG | JS72 | TTAAGCAT | JS120 | CATGTCCA | JS168 | ATGCTTAA |
| JS25 | AGGTTGCT | JS73 | TGCTACAC | JS121 | AGCAACCT | JS169 | GTGTAGCA |
| JS26 | ATATGCTG | JS74 | TCAGCTTG | JS122 | CAGCATAT | JS170 | CAAGCTGA |
| JS27 | GTACAGTG | JS75 | CATGTAGA | JS123 | CACTGTAC | JS171 | TCTACATG |
| JS28 | ATCCATGG | JS76 | TTCGGAAC | JS124 | CCATGGAT | JS172 | GTTCCGAA |
| JS29 | TGATGCGA | JS77 | GCAATTCG | JS125 | TCGCATCA | JS173 | CGAATTGC |
| JS30 | GTAGCAGT | JS78 | CAAGAGGT | JS126 | ACTGCTAC | JS174 | ACCTCTTG |
| JS31 | GGATCATC | JS79 | TCGATTAA | JS127 | GATGATCC | JS175 | TTAATCGA |
| JS32 | GTGAACGT | JS80 | GAATGGAC | JS128 | ACGTTCAC | JS176 | GTCCATTC |
| JS33 | ATTAAGCG | JS81 | AGAATCAG | JS129 | CGCTTAAT | JS177 | CTGATTCT |
| JS34 | TATTGGCG | JS82 | AACTGCCA | JS130 | CGCCAATA | JS178 | TGGCAGTT |
| JS35 | CGATTACA | JS83 | AAGTAACG | JS131 | TGTAATCG | JS179 | CGTTACTT |
| JS36 | TGTCATCG | JS84 | ACTCAATG | JS132 | CGATGACA | JS180 | CATTGAGT |
| JS37 | TATCAAGT | JS85 | CCTAGTAG | JS133 | ACTTGATA | JS181 | CTACTAGG |
| JS38 | AGGCTTGA | JS86 | CTGACGTT | JS134 | TCAAGCCT | JS182 | AACGTCAG |
| JS39 | GATAACCA | JS87 | TGCAGACA | JS135 | TGGTTATC | JS183 | TGTCTGCA |
| JS40 | AATCCTGC | JS88 | AGTTGACC | JS136 | GCAGGATT | JS184 | GGTCAACT |
| JS41 | GTTATATC | JS89 | GTCTCCTA | JS137 | GATATAAC | JS185 | TAGGAGAC |
| JS42 | ACACACGT | JS90 | CTGCAATC | JS138 | ACGTGTGT | JS186 | GATTGCAG |
| JS43 | ATACGACT | JS91 | TGAGCGAA | JS139 | AGTCGTAT | JS187 | TTCGCTCA |
| JS44 | ATCTTCGT | JS92 | TTGGACTG | JS140 | ACGAAGAT | JS188 | CAGTCCAA |
| JS45 | ACATGTAT | JS93 | AGCAATCC | JS141 | ATACATGT | JS189 | GGATTGCT |
| JS46 | TCCACAGT | JS94 | CGAACTAC | JS142 | ACTGTGGA | JS190 | GTAGTTCG |
| JS47 | CAGTCTGT | JS95 | TTAATGGC | JS143 | ACAGACTG | JS191 | GCCATTAA |
| JS48 | TCCATGTG | JS96 | GCTTAGTA | JS144 | CACATGGA | JS192 | TACTAAGC |

【０３２４】
参考文献
１．Ｎ．Ｒ．Ｇａｓｃｏｉｇｎｅ，Ｙ．－ｈ．Ｃｈｉｅｎ，Ｄ．Ｍ．Ｂｅｃｋｅｒ，Ｊ．Ｋａｖａｌｅｒ，Ｍ．Ｍ．Ｄａｖｉｓ，Ｇｅｎｏｍｉｃ ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｔ－ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ β－ｃｈａｉｎ ｃｏｎｓｔａｎｔ－ａｎｄ ｊｏｉｎｉｎｇ－ｒｅｇｉｏｎ ｇｅｎｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ ３１０，３８７～３９１（１９８４）。

2. G. Siu, S. P. Clark, Y. Yoshikai, M. Malissen, Y. Yanagi, E. Strauss, T. W. Mak, L. Hood, The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. Cell 37, 393～401（1984）。
3. Y. Yoshikai, S. P. Clark, S. Taylor, U. Sohn, B. I. Wilson, M. D. Minden, T. W. Mak, Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor α-chain.（1985）。
4. B. Toyonaga, Y. Yoshikai, V. Vadasz, B. Chin, T. W. Mak, Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. Proceedings of the National Academy of Sciences 82, 8624～8628（1985）; published online EpubDecember 1, 1985（
5. M. M. Davis, P. J. Bjorkman, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 334,（1988）。
6. J. Nikolich-Zugich, M. K. Slifka, I. Messaoudi, The many important facets of T-cell repertoire diversity. Nature Reviews Immunology 4, 123～132（2004）。
7. H. S. Robins, P. V. Campregher, S. K. Srivastava, A. Wacher, C. J. Turtle, O. Kahsai, S. R. Riddell, E. H. Warren, C. S. Carlson, Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. Blood 114, 4099～4107（2009）; published online EpubNov 5（10. 1182／blood-2009-04-217604）。
8. R. L. Warren, B. H. Nelson, R. A. Holt, Profiling model T-cell metagenomes with short reads. Bioinformatics 25, 458～464（2009）。
9. J. Glanville, W. Zhai, J. Berka, D. Telman, G. Huerta, G. R. Mehta, L Ni, L. Mei, P. D. Sundar, G. M. Day, D. Cox, A. Rajpal, J. Pons, Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 20216～20221（2009）; published online EpubDec 1（10. 1073／pnas. 0909775106）。
10. S. D. Boyd, E. L. Marshall, J. D. Merker, J. M. Maniar, L. N. Zhang, B. Sahaf, C. D. Jones, B. B. Simen, B. Hanczaruk, K. D. Nguyen, Measurement and clinical monitoring of human lymphocyte clonality by massively parallel VDJ

pyrosequencing. Science translational medicine 1, 12ra23～12ra23(2009)。
11. H. S. Robins, S. K. Srivastava, P. V. Campregher, C. J. Turtle, J. Andriesen, S. R. Riddell, C. S. Carlson, E. H. Warren, Overlap and effective size of the human CD8+T cell receptor repertoire. Science translational medicine 2, 47ra64(2010)。
12. R. L. Warren, J. D. Freeman, T. Zeng, G. Choe, S. Munro, R. Moore, J. R. Webb, R. A. Holt, Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes. Genome research 21, 790～797(2011)。
13. H. Robins, C. Desmarais, J. Matthis, R. Livingston, J. Andriesen, H. Reijonen, C. Carlson, G. Nepom, C. Yee, K. Cerosaletti, Ultra-sensitive detection of rare T cell clones. Journal of Immunological Methods, (2011)10.1016/j.jim.2011.09.001)。
14. A. M. Sherwood, C. Desmarais, R. J. Livingston, J. Andriesen, M. Haussier, C. S. Carlson, H. Robins, Deep sequencing of the human TCR gamma and TCRbeta repertoires suggests that TCRbeta rearranges after alphabeta and gammadelta T cell commitment. Science translational medicine 3, 90ra61(2011);published online EpubJul 6(10.1126/scitranslmed.3002536)。
15. K. Larimore, M. W. McCormick, H. S. Robins, P. D. Greenberg, Shaping of human germline IgH repertoires revealed by deep sequencing. Journal of immunology 189, 3221～3230(2012);published online EpubSep 15(10.4049/jimmunol.1201303)。
16. M. Faham, J. Zheng, M. Moorhead, V. E. Carlton, P. Stow, E. Coustan-Smith, C. H. Pui, D. Campana, Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood 120, 5173～5180(2012);published online EpubDec 20(10.1182/blood-2012-07-444042)。
17. D. Wu, A. Sherwood, J. R. Fromm, S. S. Winter, K. P. Dunsmore, M. L. Loh, H. A. Greisman, D. E. Sabath, B. L. Wood, H. Robins, High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. Science translational medicine 4, 134ral63～

134ra163(2012)。
18. S. A. Grupp, M. Kalos, D. Barrett, R. Aplenc, D. L. Porter, S. R. Rheingold, D. T. Teachey, A. Chew, B. Hauck, J. F. Wright, Chimeric antigen receptor-Modified T cells for acute lymphoid leukemia. New England Journal of Medicine 368, 1509～1518(2013)。
19. W.-K. Weng, R. Armstrong, S. Arai, C. Desmarais, R. Hoppe, Y. H. Kim, Minimal Residual Disease Monitoring with High-Throughput Sequencing of T Cell Receptors in Cutaneous T Cell Lymphoma. Science translational medicine 5, 214ra171-214ra171(2013)。
20. M. L. Davila, I. Riviere, X. Wang, S. Bartido, J. Park, K. Curran, S. S. Chung, J. Stefanski, O. Borquez-Ojeda, M. Olszewska, Efficacy and Toxicity Management of 19～28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Science translational medicine 6, 224ra225～224ra225(2014)。
21. M. Embleton, G. Gorochov, P. T. Jones, G. Winter, In-cell PCR from mRNA:amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells. Nucleic acids research 20, 3831～3837(1992)。
22. P.-J. Meijer, P. S. Andersen, M. Haahr Hansen, L. Steinaa, A. Jensen, J. Lantto, M. B. Oleksiewicz, K. Tengbjerg, T. R. Poulsen, V. W. Coljee, Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. Journal of molecular biology 358, 764～772(2006)。
23. N. Chapal, M. Bouanani, M. Embleton, I. Navarro-Teulon, M. Biard-Piechaczyk, B. Pau, S. Peraldi-Roux, In-cell assembly of scFv from human thyroid-infiltrating B cells. Biotechniques 23, 518～524(1997)。
24. S. M. Kim, L. Bhonsle, P. Besgen, J. Nickel, A. Backes, K. Held, S. Vollmer, K. Dommair, J. C. Prinz, Analysis of the paired TCR alpha-and beta-chains of single human T cells. PloSone 7, e37338(2012)10. 1371/joumal. pone. 0037338)。
25. B. J. DeKosky, G. C. Ippolito, R. P. Deschner, J. J. Lavinder, Y. Wine, B. M. Rawlings, N. Varadarajan, C. Giesecke, T. Domer, S. F. Andrews, P. C. Wilson, S. P. Hunicke-Smith, C. G. Willson, A. D. Ellington, G. Georgiou, High-throughput sequencing of the paired human immunog

lobulin heavy and light chain repertoire. Nature biotechnology 31, 166～169 (2013) ; published online EpubFeb (10.1038/nbt.2492)。

26. M. A. Turchaninova, O. V. Britanova, D. A. Bolotin, M. Shugay, E. V. Putintseva, D. B. Staroverov, G. Sharonov, D. Shcherbo, I. V. Zvyagin, I. Z. Mamedov, C. Linnemann, T. N. Schumacher, D. M. Chudakov, Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. European journal of immunology 43, 2507～2515 (2013) 10.1002/eji.201343453)。

27. X. Sun, M. Saito, Y. Sato, T. Chikata, T. Naruto, T. Ozawa, E. Kobayashi, H. Kishi, A. Muraguchi, M. Takiguchi, Unbiased Analysis of TCR α/β Chains at the Single-Cell Level in Human CD8+T-Cell Subsets. PloS one 7, e40386 (2012)。

28. S.-M. Kim, L. Bhonsle, P. Besgen, J. Nickel, A. Backes, K. Held, S. Vollmer, K. Dommair, J. C. Prinz, Analysis of the paired TCR α-and β-chains of single human T cells. PloSone 7, e37338 (2012)。

29. P. Dash, J. L. McClaren, T. H. Oguin III, W. Rothwell, B. Todd, M. Y. Morris, J. Becksfort, C. Reynolds, S. A. Brown, P. C. Doherty, Paired analysis of TCRα and TCRβ chains at the single-cell level in mice. The Journal of clinical investigation 121, 288 (2011)。

30. C. E. Busse, I. Czogiel, P. Braun, P. F. Amdt, H. Wardemann, Single-cell based high-throughput sequencing of full-length immunoglobulin heavy and light chain genes. European journal of immunology 44, 597～603 (2014) ; published online EpubFeb (10.1002/eji.201343917)。

31. Y.-C. Tan, L. K. Scalfone, S. Kongpachith, C.-H. Ju, X. Cai, T. M. Lindstrom, J. Sokolove, W. H. Robinson, Sequencing Antibody Repertoires Provides Evidence for Original Antigenic Sin Shaping the Antibody Response to Influenza Vaccination. Clinical Immunology, (2014)。

32. J. D. Ashwell, A. Weissman, in Clinical Immunology, Principles and Practice, R. R. Rich, Ed. (Mosby International Limited, London, 2001), chap. 5, pp. 5. 1～5. 19。

33. C. S. Carlson, R. O. Emerson, A. M. Sherwood, C. Desmarais, M. W. Chung, J. M. Parsons, M. S. Steen, M. A. LaMadrid-Hemnannsfeldt, D. W. Will

iamson, R. J. Livingston, D. Wu, B. L. Wood, M. J. Rieder, H. Robins, Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. Nature communications 4, 2680 (2013) 10.1038/ncomms3680)。

34. http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Probes/Rearrangements%20and%20junctions/human/Hu_TRrea.html.

35. Y. Sandberg, B. Verhaaf, E. J. van Gastel-Mol, I. L. Wolvers-Tettero, J. de Vos, R. A. Macleod, J. G. Noordzij, W. A. Dik, J. J. van Dongen, A. W. Langerak, Human T-cell lines with well-defined T-cell receptor gene rearrangements as controls for the BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction tubes. Leukemia 21, 230～237 (2007) ; published online EpubFeb (10.1038/sj.leu.2404486)。

36. H. P. Bonarius, F. Baas, E. B. Remmerswaal, R. A. van Lier, L J. ten Berge, P. P. Tak, N. de Vries, Monitoring the T-cell receptor repertoire at single-clone resolution. PloS one 1, e55 (2006) 10.1371/joumal.pone.0000055)。

37. M. Klinger, K. Kong, M. Moorhead, L. Weng, J. Zheng, M. Faham, Combining next-generation sequencing and immune assays:a novel method for identification of antigen-specific T cells. PloSone 8, e74231 (2013) 10.1371/joumal.pone.0074231)。

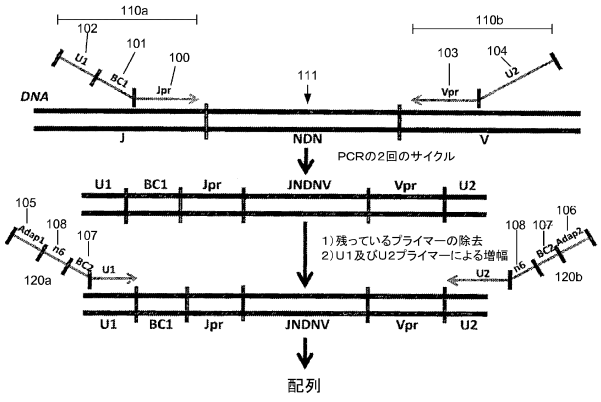
38. H. D. Royer, D. Ramarli, O. Acuto, T. J. Campen, E. L. Reinherz, Genes encoding the T-cell receptor alpha and beta subunits are transcribed in an ordered manner during intrathymic ontogeny. Proceedings of the National Academy of Sciences 82, 5510～5514 (1985)。

39. R. N. Sangster, J. Minowada, N. Suciu-Foca, M. Minden, T. W. Mak, Rearrangement and expression of the alpha, beta, and gamma chain T cell receptor genes in human thymic leukemia cells and functional T cells. The Journal of experimental medicine 163, 1491～1508 (1986) ; published online EpubJune 1, 1986 (10.1084/jem.163.6.1491)。

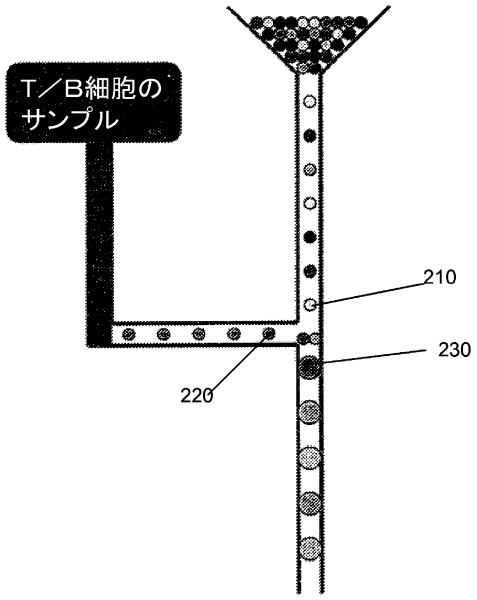
40. D. Chowdary, J. Lathrop, J. Skelton, K. Curtin, T. Briggs, Y. Zhang, J. Yu, Y. Wang, A. Mazumder, Prognostic gene expression signatures can be measured in tissues collected in RNAlater preservative. The journal of m

olecular diagnostics 8, 31～39（2006）。
41. T. Bancroft, C. Du, D. Nettleton, Estimation of False Discovery Rate Using Sequential Permutation p−Values. Biometrics 69, 1～7（2013）。

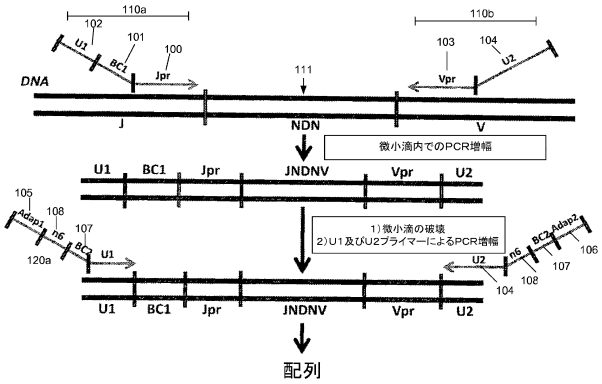
【図１】



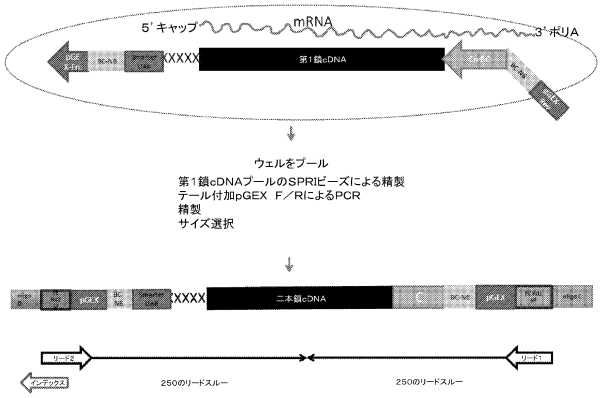

【図２】



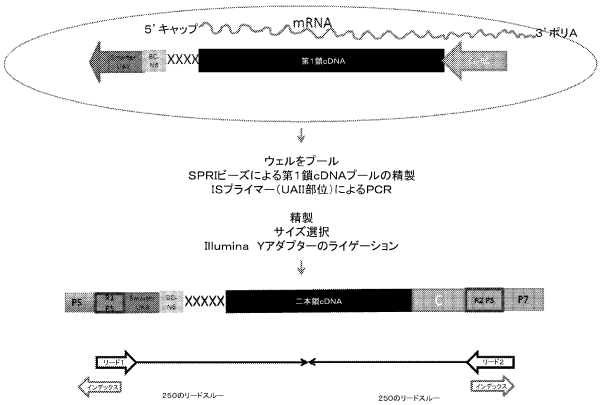
【図３】



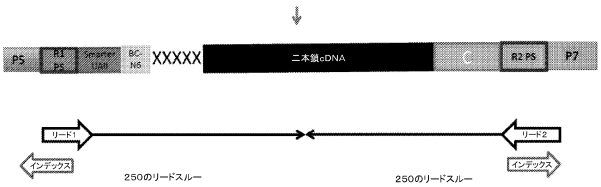

【図４】



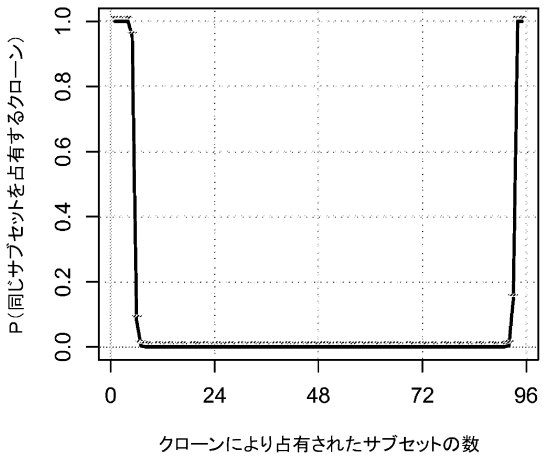

【図５】



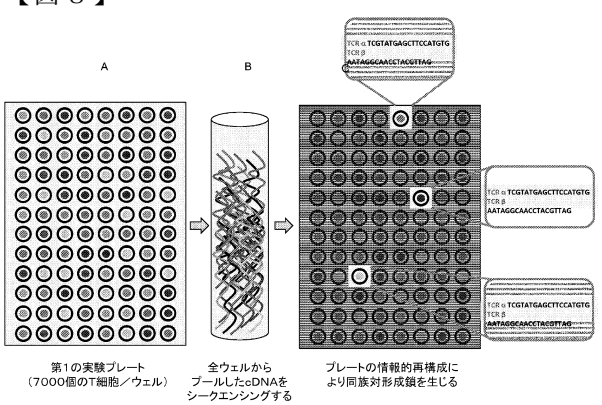

【図６】



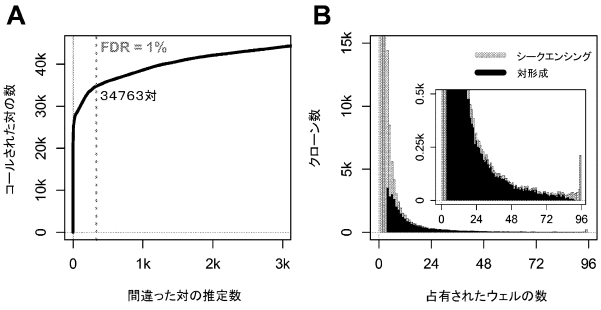

【図７】




【図８】




【図９】



【図１０】

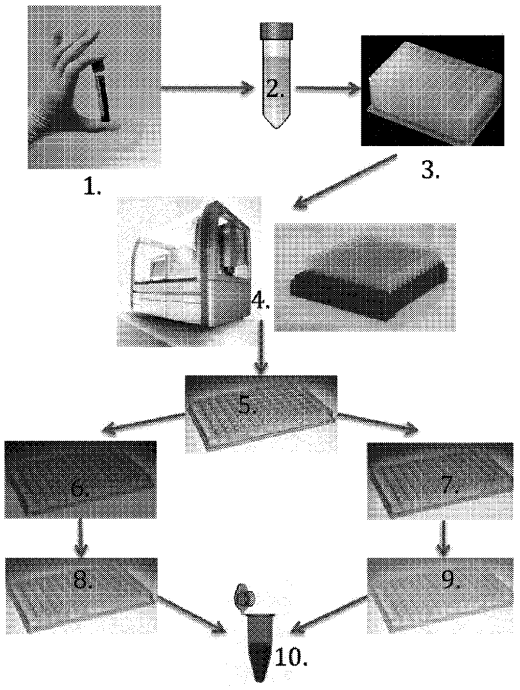
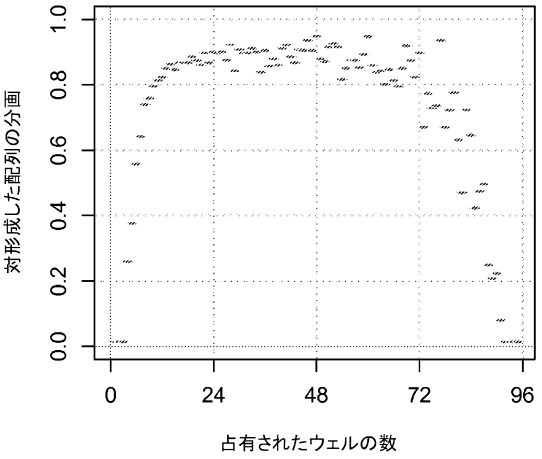
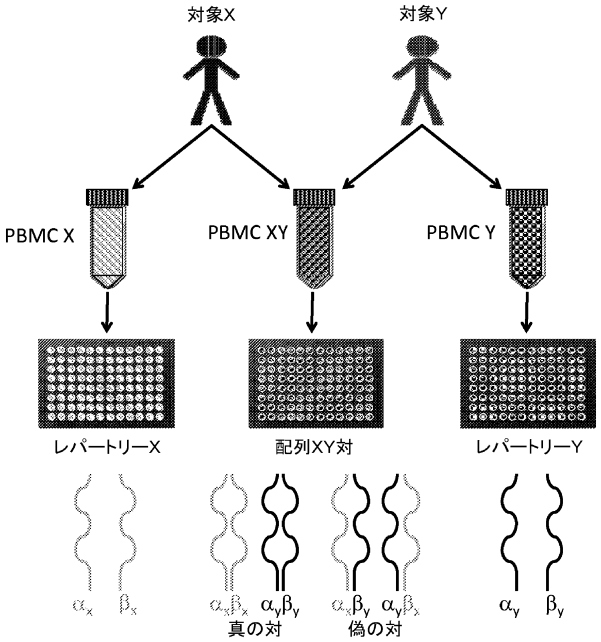



FIG. 10

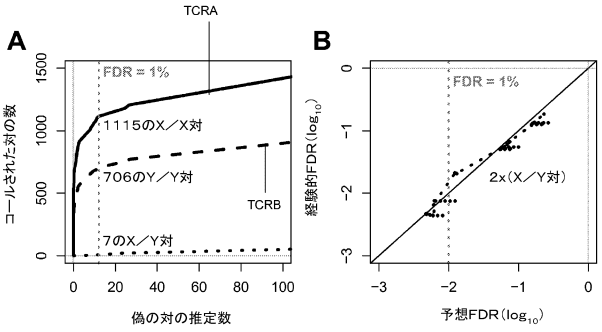
【図１１】



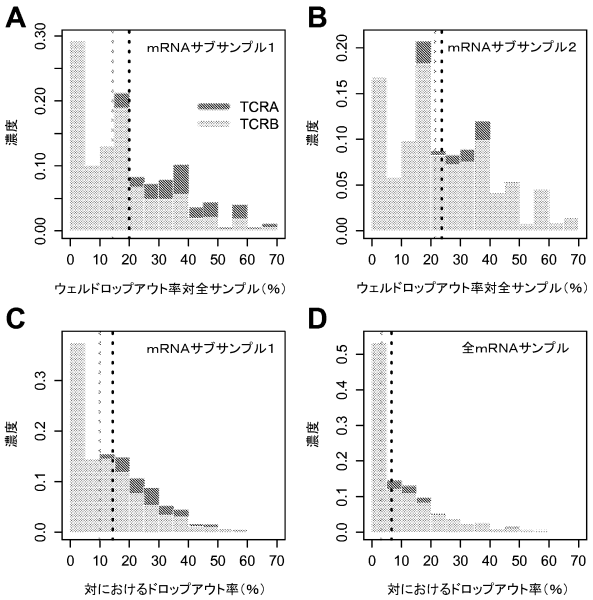

【図１２】



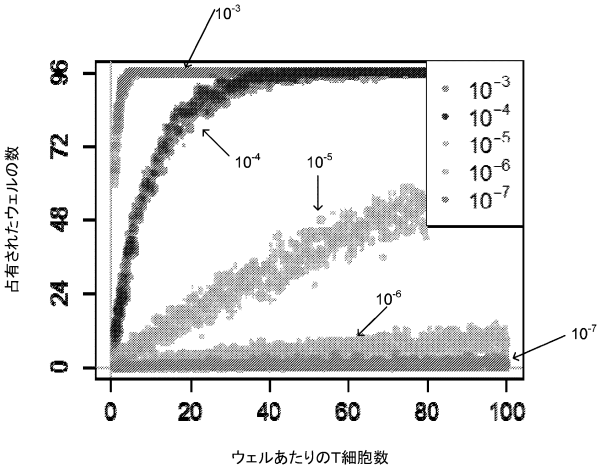

【図１３】



【図１４】




【図１５】




【配列表】

0006431895000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　ロビンズ，ハーラン，エス.
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０２，シアトル，スイート　２００，１５５１　イースト　レイク　アベニュー　イースト，アダプティブ　バイオテクノロジーズ　コーポレイション内

審査官　北村　悠美子

(56)参考文献　国際公開第２０１３／１３４１６２（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／０１２７０３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／１５９７５４（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／１２２４８４（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ　　１／００－１／７０
Ｃ１２Ｎ　　１５／００－１５／９０