

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-521642  
(P2019-521642A)

(43) 公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 3
<b>C 0 7 K 16/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/00	4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 14/725 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/725	4 H 0 4 5
<b>C 4 0 B 40/08 (2006.01)</b>	C 4 0 B 40/08	
<b>C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/6876 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-553241 (P2018-553241)  
 (86) (22) 出願日 平成29年4月12日 (2017. 4. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月22日 (2018. 10. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/027199  
 (87) 国際公開番号 W02017/180738  
 (87) 国際公開日 平成29年10月19日 (2017. 10. 19)  
 (31) 優先権主張番号 62/321, 278  
 (32) 優先日 平成28年4月12日 (2016. 4. 12)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 504333972  
 メディミューン, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ  
 (74) 代理人 110002572  
 特許業務法人平木国際特許事務所  
 (72) 発明者 チョウドリー, パーサ, エス.  
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

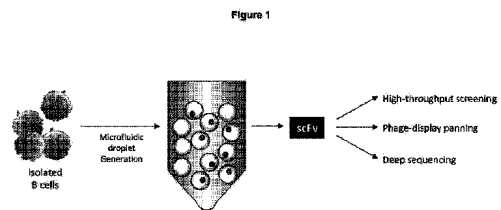
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫レパトリー発掘

(57) 【要約】

本発明は、単一細胞を小滴内に封入することによって、小滴は、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅し且つ沈めるための試薬を更に含有する、封入することと、封入された単一細胞を溶解することと、封入された自然対合 s c F v アンプリコンを生成することによって、各 s c F v アンプリコンは、重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を含む、生成することにより、封入された自然対合 s c F v アンプリコンを生成する方法を提供する。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

封入された自然対合 s c F v アンプリコンを生成する方法であって、

a . 単一細胞を小滴内に封入するステップであって、前記小滴は、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬を更に含有する、ステップと、

b . 前記封入された単一細胞を溶解するステップと、

c . 前記封入された自然対合 s c F v アンプリコンを生成するステップであって、各 s c F v アンプリコンは、重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を含む、ステップと

を含む方法。

10

## 【請求項 2】

前記細胞は、B細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記試薬は、ヒト I g 配列に対して設計されたプライマーを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記試薬は、表 1 又は表 5 に示されるプライマーを含むプライマープールを含む、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記封入されたアンプリコンを生成するステップは、最初に天然重鎖及び軽鎖可変領域配列から重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを形成することを含み、及び前記試薬は、

a . 第 1 及び第 2 の重鎖可変領域プライマーと、

b . 第 1 及び第 2 の軽鎖可変領域プライマーと

を含むプライマープールを含み、前記第 1 の重鎖可変領域プライマー及び前記第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、相互作用して、前記重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記プライマープールは、前記第 2 のプライマーよりも低い濃度の前記第 1 のプライマーを含む、請求項 5 に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記第 1 の重鎖可変領域プライマーは、第 1 のオーバーハング配列に融合され、前記第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、第 2 のオーバーハング配列に融合され、前記オーバーハング配列は、相互作用して、前記重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記第 1 及び第 2 のオーバーハング配列は、少なくとも部分的に相補的である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

a . 前記第 1 の重鎖可変領域プライマーは、前記天然配列 / アンプリコンの重鎖可変領域内に結合するリバースプライマーであり、且つ前記第 2 の重鎖可変領域プライマーは、前記天然配列 / アンプリコンの前記重鎖可変領域外に結合するフォワードプライマーであり、及び

40

b . 前記第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、前記天然配列 / アンプリコンの軽鎖可変領域内に結合するフォワードプライマーであり、且つ前記第 2 の軽鎖可変領域プライマーは、前記天然配列 / アンプリコンの前記軽鎖可変領域外に結合するリバースプライマーである、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

封入された自然対合 s c T C R アンプリコンを生成する方法であって、

a . 単一細胞を小滴内に封入するステップであって、前記小滴は、封入された単一細胞

50

からの T C R 鎖アンプリコンの自然対合を増幅するための試薬を更に含有する、ステップと、

b . 前記封入された単一細胞を溶解するステップと、

c . 前記封入された自然対合 s c T C R アンプリコンを生成するステップであって、各 s c T C R アンプリコンは、 T C R 鎖アンプリコンの自然対合を含む、ステップとを含む方法。

【請求項 1 1】

前記自然対合 T C R 鎖アンプリコンは、 及び 鎖アンプリコンである、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記自然対合 T C R 鎖アンプリコンは、 及び 鎖アンプリコンである、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記細胞は、 T 細胞である、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記試薬は、 T i t a n ( R o c h e c a t n o 1 1 8 5 5 4 7 6 0 0 1 ) を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記封入するステップは、マイクロ流体力学を使用することを含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記封入するステップは、水性懸濁液を油と組み合わせて、小滴内の前記封入された単一細胞を含むエマルジョンを形成することを含み、前記水性懸濁液は、前記細胞と、アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための前記試薬とを含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記油は、フッ素化油である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

細胞の前記懸濁液は、約 1 0 0 万 ~ 約 5 0 0 万細胞 / m l 、好ましくは約 3 5 0 万 ~ 約 4 5 0 万細胞 / m l 、より好ましくは約 4 0 0 万細胞 / m l の密度である、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

細胞の前記懸濁液は、安定剤を含む、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記封入されたアンプリコンを生成するステップは、 R T - P C R を使用することを含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

死んだ又は死にかけている細胞からの少なくともいくつかの遊離核酸が小滴内に封入されることを防止するステップを更に含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記防止するステップは、封入前に細胞を 4 8 時間未満にわたって刺激することを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記防止するステップは、封入前に生細胞を選択することを含む、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記防止するステップは、オリゴヌクレオチド被覆磁気ビーズを使用して前記核酸を隔離することを含む、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法によって生成される、封入された自然対合

10

20

30

40

50

アンプリコン。

【請求項 26】

自然対合アンプリコンのライブラリーを生成する方法であって、

a. 請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法により、封入された自然対合アンプリコンを生成するステップと、

b. 前記小滴を溶解して、自然対合アンプリコンのライブラリーを生成するステップとを含む方法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法によって生成される自然対合アンプリコンのライブラリー。

【請求項 28】

抗原結合及び / 又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c F v アンプリコンのライブラリーを生成する方法であって、

a. 請求項 27 に記載の方法による自然対合 s c F v アンプリコンのライブラリーを生成するステップと、

b. 自然対合 s c F v アンプリコンの更なるライブラリーを生成するステップであって、前記更なるライブラリーの前記自然対合 s c F v アンプリコンは、一般式 R 1 - V 1 - L - V 2 - R 2 を有し、ここで、

i. R 1 及び R 2 は、同じであるか又は異なり、且つそれぞれ制限酵素部位を含み、

ii. V 1 及び V 2 は、自然対合重鎖及び軽鎖可変領域であり、V 1 が前記軽鎖可変領域である場合、V 2 は、前記重鎖可変領域であり、又は V 1 が前記重鎖可変領域である場合、V 2 は、前記軽鎖可変領域であり、及び

iii. L は、直接結合又はリンカーである、ステップとを含む方法。

【請求項 29】

前記自然対合 s c F v アンプリコンの更なるライブラリーを生成するステップは、ネステッド PCR を使用することを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記ネステッド PCR は、V 1 の F R 1 及び V 2 の F R 4 に結合するプライマーを使用する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

抗原結合及び / 又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成する方法であって、

a. 請求項 27 に記載の方法による自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成するステップと、

b. 自然対合 s c T C R アンプリコンの更なるライブラリーを生成するステップであって、前記更なるライブラリーの前記自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C 1 - L - C 2 - R 2 を有し、ここで、

i. R 1 及び R 2 は、同じであるか又は異なり、且つそれぞれ制限酵素部位を含み、

ii. C 1 及び C 2 は、自然対合 及び T C R 鎖であり、C 1 が前記 T C R 鎖である場合、C 2 は、前記 T C R 鎖であり、又は C 1 が前記 T C R 鎖である場合、C 2 は、前記 T C R 鎖であり、及び

iii. L は、直接結合又はリンカーである、ステップとを含む方法。

【請求項 32】

抗原結合及び / 又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成する方法であって、

a. 請求項 27 に記載の方法による自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成するステップと、

b. 自然対合 s c T C R アンプリコンの更なるライブラリーを生成するステップであって、前記更なるライブラリーの前記自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C

10

20

30

40

50

1 - L - C 2 - R 2 を有し、ここで、

i . R 1 及び R 2 は、同じであるか又は異なり、且つそれぞれ制限酵素部位を含み、  
 i i . C 1 及び C 2 は、自然対合 及び T C R 鎖であり、C 1 が前記 T C R 鎖である場合、C 2 は、前記 T C R 鎖であり、又は C 1 が前記 T C R 鎖である場合、C 2 は、前記 T C R 鎖であり、及び

i i i . L は、直接結合又はリンカーである、ステップとを含む方法。

【請求項 3 3】

前記自然対合 s c T C R アンプリコンの更なるライブラリーを生成するステップは、ネステッド P C R を使用することを含む、請求項 3 1 又は 3 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

前記ネステッド P C R は、制限酵素部位を含むオーバーハング配列に融合されるプライマーを使用する、請求項 2 9、3 0 又は 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

R 1 は、S f i 1 制限酵素部位を含み、及び R 2 は、N o t 1 制限酵素部位を含み、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 2 8 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c F v 又は s c T C R アンプリコンのライブラリー。

20

【請求項 3 7】

抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c F v 又は s c T C R ライブラリーを生成する方法であって、

a . 請求項 2 8 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法により、自然対合アンプリコンのライブラリーを生成するステップと、

b . 前記自然対合 s c F v 又は s c T C R ライブラリーを発現させるステップとを含む方法。

【請求項 3 8】

自然対合 s c F v ライブラリーを生成するためのものであり、自然対合 s c F v を s c F v - F c として発現させることを含む、請求項 3 7 に記載の方法。

30

【請求項 3 9】

自然対合 s c F v ライブラリーを生成するためのものであり、自然対合 s c F v を s c F v ファージディスプレイライブラリーとして発現させることを含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c F v 又は s c T C R ライブラリー。

【請求項 4 1】

抗原特異的分子を特定する方法であって、

a . 請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法により、自然対合 s c F v 又は s c T C R ライブラリーを生成するステップと、

b . 抗原サンプルを用いて前記自然対合 s c F v 又は s c T C R ライブラリーを調べるステップと、

c . 抗原特異的分子を特定するステップとを含む方法。

40

【請求項 4 2】

前記自然対合ライブラリーは、s c F v ライブラリーであり、及び前記抗原特異的分子は、抗体である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記抗原サンプルは、腫瘍組織、細菌全体又はウィルス粒子である、請求項 4 1 又は 4

50

2に記載の方法。

【請求項44】

請求項41～43のいずれか一項に記載の方法によって生成される抗原特異的分子。

【請求項45】

単一細胞を小滴内に封入するためのマイクロ流体力学の使用であって、前記小滴は、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬を更に含有する、使用。

【請求項46】

前記細胞は、B細胞である、請求項45に記載の使用。

【請求項47】

前記試薬は、ヒトIg配列に対して設計されたプライマーを含む、請求項45又は46に記載の使用。

【請求項48】

前記試薬は、表1又は表5に示されるプライマーを含むプライマープールを含む、請求項47に記載の使用。

【請求項49】

前記試薬は、

a. 第1及び第2の重鎖可変領域プライマーと、

b. 第1及び第2の軽鎖可変領域プライマーと

を含むプライマープールを含み、前記第1の重鎖可変領域プライマー及び前記第1の軽鎖可変領域プライマーは、相互作用して、前記重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する、請求項45～48のいずれか一項に記載の使用。

【請求項50】

前記プライマープールは、前記第2のプライマーよりも低い濃度の前記第1のプライマーを含む、請求項49に記載の使用。

【請求項51】

前記第1の重鎖可変領域プライマーは、第1のオーバーハング配列に融合され、前記第1の軽鎖可変領域プライマーは、第2のオーバーハング配列に融合され、前記オーバーハング配列は、相互作用して、前記重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する、請求項49又は50に記載の使用。

【請求項52】

前記第1及び第2のオーバーハング配列は、少なくとも部分的に相補的である、請求項51に記載の使用。

【請求項53】

a. 前記第1の重鎖可変領域プライマーは、前記天然配列/アンプリコンの重鎖可変領域内に結合するリバースプライマーであり、且つ前記第2の重鎖可変領域プライマーは、前記天然配列/アンプリコンの前記重鎖可変領域外に結合するフォワードプライマーであり、及び

b. 前記第1の軽鎖可変領域プライマーは、前記天然配列/アンプリコンの軽鎖可変領域内に結合するフォワードプライマーであり、且つ前記第2の軽鎖可変領域プライマーは、前記天然配列/アンプリコンの前記軽鎖可変領域外に結合するリバースプライマーである、請求項49～52のいずれか一項に記載の使用。

【請求項54】

単一細胞を小滴内に封入するためのマイクロ流体力学の使用であって、前記小滴は、封入された単一細胞からのTCR鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬を更に含有する、使用。

【請求項55】

前記TCR鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである、請求項54に記載の使用。

【請求項56】

10

20

30

40

50

前記 T C R 鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである、請求項 5 4 に記載の使用。

【請求項 5 7】

前記細胞は、T 細胞である、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 8】

前記試薬は、Titan (Roche cat no 11855476001) を含む、請求項 4 5 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 9】

前記封入は、水性懸濁液を油と組み合わせて、小滴内の前記封入された単一細胞を含むエマルジョンを形成することを含み、前記水性懸濁液は、前記細胞と、アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための前記試薬とを含む、請求項 4 5 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 6 0】

前記油は、フッ素化油である、請求項 5 9 に記載の使用。

【請求項 6 1】

細胞の前記懸濁液は、約 1 0 0 万 ~ 約 5 0 0 万細胞 / m l、好ましくは約 3 5 0 万 ~ 約 4 5 0 万細胞 / m l、より好ましくは約 4 0 0 万細胞 / m l の密度である、請求項 5 9 又は 6 0 に記載の使用。

【請求項 6 2】

細胞の前記懸濁液は、安定剤を含む、請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 6 3】

前記試薬は、R T - P C R のための試薬である、請求項 4 5 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6 4】

抗原結合及び / 又は機能に関するスクリーニングのための自然対合組換え s c F v を含む s c F v ライブラリーであって、各 s c F v は、互いに連結された、単一細胞の自然対合の重鎖及び軽鎖可変領域を含む、s c F v ライブラリー。

【請求項 6 5】

前記 s c F v は、s c F v - F c である、請求項 6 4 に記載の s c F v ライブラリー。

【請求項 6 6】

s c F v ファージディスプレイライブラリーである、請求項 6 4 に記載の s c F v ライブラリー。

30

【請求項 6 7】

前記細胞は、B 細胞である、請求項 6 4 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の s c F v ライブラリー。

【請求項 6 8】

各 s c F v の前記重鎖及び軽鎖可変領域は、リンカーによって連結され、前記リンカーは、グリシン及び / 又はセリンに富んでいる、請求項 6 4 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の s c F v ライブラリー。

【請求項 6 9】

各 s c F v の前記重鎖及び軽鎖可変領域は、5 ~ 3 0 アミノ酸長、好ましくは 1 0 ~ 2 0 アミノ酸長、好ましくは 1 3 ~ 1 8 アミノ酸長、より好ましくは 1 5 アミノ酸長のリンカーによって連結されている、請求項 6 4 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の s c F v ライブラリー。

40

【請求項 7 0】

T 細胞受容体結合及び / 又は機能に関するスクリーニングのための自然対合組換え s c T C R を含む s c T C R ライブラリーであって、各 s c T C R は、互いに連結された、単一細胞の自然対合の T C R 鎖を含む、s c T C R ライブラリー。

【請求項 7 1】

前記自然対合 T C R 鎖は、及び鎖である、請求項 7 0 に記載の s c T C R ライブラ

50

リー。

【請求項 7 2】

前記自然対合 T C R 鎖は、及び鎖である、請求項 7 0 に記載の s c T C R ライブラリー。

【請求項 7 3】

前記細胞は、T 細胞である、請求項 7 0 ~ 7 2 のいずれか一項に記載の s c F v ライブラリー。

【請求項 7 4】

各 s c T C R の前記 T C R 鎖は、リンカーによって連結され、前記リンカーは、グリシン及び/又はセリンに富んでいる、請求項 7 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の s c T C R ライブラリー。

10

【請求項 7 5】

各 s c T C R の前記 T C R 鎖は、5 ~ 3 0 アミノ酸長、好ましくは 1 0 ~ 2 0 アミノ酸長、好ましくは 1 3 ~ 1 8 アミノ酸長、より好ましくは 1 5 アミノ酸長のリンカーによって連結されている、請求項 7 0 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の s c T C R ライブラリー。

【請求項 7 6】

前記リンカーは、( G l y <sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> である、請求項 6 7、6 9、7 4 又は 7 5 のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項 7 7】

抗原特異的分子を特定する方法であって、

20

a . 抗原サンプルを用いて、

i . 請求項 4 0 に記載の自然対合 s c F v 若しくは s c T C R ライブラリー、又は

i i . 請求項 6 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の s c F v 若しくは s c T C R ライブ

ラリー

を調べるステップと、

b . 抗原特異的分子を特定するステップと

を含む方法。

【請求項 7 8】

前記自然対合ライブラリーは、s c F v ライブラリーであり、前記抗原特異的分子は、抗体である、請求項 7 7 に記載の方法。

30

【請求項 7 9】

前記抗原サンプルは、腫瘍組織、細菌全体又はウイルス粒子である、請求項 7 7 又は 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

請求項 7 7 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の方法によって生成される抗原特異的分子。

【請求項 8 1】

抗原特異的分子を特定するための、

a . 請求項 4 0 に記載の自然対合 s c F v 若しくは s c T C R ライブラリー、又は

b . 請求項 6 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の s c F v 若しくは s c T C R ライブラリ

ー

40

の使用であって、抗原サンプルを用いて前記 s c F v 又は s c T C R ライブラリーを調べることと、抗原特異的分子を特定することを含む、使用。

【請求項 8 2】

前記ライブラリーは、s c F v ライブラリーであり、前記抗原特異的分子は、抗体である、請求項 8 1 に記載の使用。

【請求項 8 3】

前記抗原サンプルは、腫瘍組織、細菌全体又はウイルス粒子である、請求項 8 1 又は 8 2 に記載の使用。

【請求項 8 4】

a . 単一細胞を、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然

50

対合を増幅及び連結するための試薬と共に小滴内に封入するためのマイクロ流体チップと、

b. 封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結して、s c F v アンプリコンを生成するための試薬とを含むキット。

【請求項 8 5】

前記細胞は、B 細胞である、請求項 8 4 に記載のキット。

【請求項 8 6】

前記試薬は、R T - P C R のための試薬を含む、請求項 8 4 又は 8 5 に記載のキット。

【請求項 8 7】

前記試薬は、ヒト I g 配列に対して設計されたプライマーを含む、請求項 8 4 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 8】

前記試薬は、表 1 又は表 5 に示されるプライマーを含むプライマープールを含む、請求項 8 7 に記載のキット。

【請求項 8 9】

前記試薬は、

a. 第 1 及び第 2 の重鎖可変領域プライマーと、

b. 第 1 及び第 2 の軽鎖可変領域プライマーと

を含むプライマープールを含み、前記第 1 の重鎖可変領域プライマー及び前記第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、相互作用して、前記重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する、請求項 8 4 ~ 8 8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9 0】

前記プライマープールは、前記第 2 のプライマーよりも低い濃度の前記第 1 のプライマーを含む、請求項 8 9 に記載のキット。

【請求項 9 1】

前記第 1 の重鎖可変領域プライマーは、第 1 のオーバーハング配列に融合され、前記第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、第 2 のオーバーハング配列に融合され、前記オーバーハング配列は、相互作用して、前記重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する、請求項 8 9 又は 9 0 に記載のキット。

【請求項 9 2】

前記第 1 及び第 2 のオーバーハング配列は、少なくとも部分的に相補的である、請求項 9 1 に記載のキット。

【請求項 9 3】

a. 前記第 1 の重鎖可変領域プライマーは、重鎖可変領域内に結合するように設計されるリバースプライマーであり、且つ前記第 2 の重鎖可変領域プライマーは、重鎖可変領域外に結合するように設計されるフォワードプライマーであり、及び

b. 前記第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、軽鎖可変領域内に結合するように設計されるフォワードプライマーであり、且つ前記第 2 の軽鎖可変領域プライマーは、軽鎖可変領域外に結合するように設計されるリバースプライマーである、請求項 8 9 ~ 9 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9 4】

前記 s c F v アンプリコンを s c F v - F c として発現させるための発現ベクターを更に含む、請求項 8 4 ~ 9 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9 5】

前記 s c F v アンプリコンを s c F v フェージディスプレイライブラリーの一部として発現させるための発現ベクターを更に含む、請求項 8 4 ~ 9 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9 6】

ネステッド P C R を使用して前記 s c F v アンプリコンを増幅するためのプライマーを

10

20

30

40

50

更に含む、請求項 84 ~ 95 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 97】

前記ネステッド PCR プライマーは、重鎖可変領域の FR1 及び軽鎖可変領域の FR4 に結合するように設計されている、請求項 96 に記載のキット。

【請求項 98】

a. 単一細胞を、封入された単一細胞からの TCR 鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬と共に小滴内に封入するためのマイクロ流体チップと、

b. 封入された単一細胞からの TCR 鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結して、scTCR アンプリコンを生成するための試薬とを含むキット。

10

【請求項 99】

前記 TCR 鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである、請求項 98 に記載のキット。

【請求項 100】

前記 TCR 鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである、請求項 98 に記載のキット。

【請求項 101】

前記細胞は、T 細胞である、請求項 98 ~ 100 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 102】

ネステッド PCR を使用して前記 scTCR アンプリコンを増幅するためのプライマーを更に含む、請求項 98 ~ 101 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 103】

前記ネステッド PCR プライマーは、制限酵素部位を含むオーバーハング配列に融合される、請求項 96、97 又は 102 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 104】

前記ネステッド PCR プライマーは、プライマー対を含み、一方のプライマーは、SfiI 制限酵素部位をコードするオーバーハング配列に融合され、及び他方のプライマーは、NotI 制限酵素部位をコードするオーバーハング配列に融合される、請求項 103 に記載のキット。

【請求項 105】

前記マイクロ流体チップは、親フッ素性チップである、請求項 84 ~ 104 のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項 106】

フッ素化油を更に含む、請求項 84 ~ 105 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ドナー由来の細胞のプールからの抗体レパートリーの発掘に関する。特に、本発明は、抗体結合及び機能に関するスクリーニングを可能にする自然対合 scFv アンプリコンを生成することに関する。

40

【背景技術】

【0002】

ヒトドナー由来の抗体レパートリーを発掘するための以前の方法は、治療的に価値のある抗体を特定すること、新規な標的を定義すること、及び疾病に対する免疫応答に関する洞察を提供することに役立ってきた。これらの抗体を単離する方法は、一般に、2つのカテゴリー：B 細胞等の細胞から抗体を直接単離すること、又はファージディスプレイ、酵母ディスプレイ若しくは哺乳動物ディスプレイ等のコンビナトリアルライブラリーから抗体を選択することに分けられる。2つの手法は、異なる強度を有する。例えば、B 細胞から直接得られる抗体は、通常、効力及び製造特性がより良好であるが、ディスプレイプラットフォームは、後のスクリーニングに関する能力、深い発掘及びクローン安定性を提供

50

する (Burton, D et al., (2012), 12:397-407; これは参照により本明細書に組み込まれる)。現在、両方の手法の利益を組み合わせた高スループット技術は存在しない。

【0003】

現在、多数の細胞を封入した後、次世代シーケンシング技術によってそれらの  $V_H$  及び  $V_L$  領域を配列決定する技術が利用可能である。可変領域の元の対合は、B細胞と共に封入された粒子上のバーコード化プライマーの使用によって維持される。これらの技術により、レパートリーの抗原特異性又は他の生物学的機能に関する任意の情報を有することなく、配列の系統発生解析が可能となる。これらの技術は、抗体配列の高スループット翻訳及び続くスクリーニングを可能にしない。これは、免疫レパートリーの機能的分析において重大な制限をもたらす (DeKosky, B. J. et al., Nat. Biotechnol. (2013), 31:166-169; Stern J. Sci Transl. Med. (2014), 6:248; Tan Y-C, Arthritis Rheumatol. (2014), 66:2706-2715; Tan Y-C, Clin. Immunol. (2014), 151:55-65; Lu, D. R. Clin. Immunol. (2014), 152:77-89; Robins, W. H. Curr. Opin. Immunol. (2013), 25:646-652; DeKosky, B. J. et al., Nat. Med. (2015), 21:86-91; これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。更に、抗体リードの検証は、遺伝子合成、クローニング及び発現を必要とし、これは、機能的に評価され得る多数の候補に厳しい妨げをもたらし得る (Galson, J. D., et al., Crit. Rev. Immunol. (2015), 35:463-478; 参照により本明細書に組み込まれる)。

10

20

【0004】

マイクロタイプレート内で単一細胞から scFv 及び Fab 等の組換え抗体断片を生成することが記述されているが、この手法は、一度に最大で数千の細胞のみを取り扱うことが可能であり、最大成功率が 30~60% であるという点でスループットにおいて厳しく制限されている (Meijer, P. J. et al. J. Mol. Biol. (2006), 358:764-772; Tiller, T. J. Immunol. Methods. (2008), 329:112-124; これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。

30

【0005】

これらの技術の両方は、一般的な採血から得られる約  $10^7$  の B細胞を圧倒的にアンダーサンプルする低いスクリーニングスループットの欠点を有する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、活性に関する迅速スクリーニングを可能とするフォーマットにおいて、ヒトドナーからの自然対合抗体配列を、自然の多様性を十分に包含するように高い十分なスループットで迅速に単離することができる技術又は手法が当技術分野で必要とされている。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本発明は、抗体結合及び機能に関してスクリーニングされ得る自然対合 scFv アンプリコンのライブラリーを生成するための方法に関する。これに関連して、本発明は、方法、キット、scFv アンプリコンの組換えライブラリー、及び scFv の組換えライブラリーを提供する。また、これに関連して、本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法にも関する。

【0008】

本発明は、抗体結合及び機能に関してスクリーニングされ得る自然対合単一鎖 T細胞受容体 (scTCR) アンプリコンを生成するための方法にも関する。これに関連して、本発明は、方法、キット、scTCR アンプリコンの組換えライブラリー、及び scTCR

50

の組換えライブラリーを提供する。また、これに関連して、本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法にも関する。

【0009】

本発明は、単一細胞を小滴内に封入するためのマイクロ流体力学の使用にも関する。

【0010】

本発明の実施形態は、特許請求の範囲に定義されている。

【0011】

ここで、添付の図面を参照して本発明がより詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】免疫レプリカプラットフォームに関する戦略である。患者（例えば、回復期の患者）から単離された細胞（例えば、B細胞）は、同族 $V_H$ 及び $V_L$ 領域が増幅及び連結されるようにRT-PCR試薬と共に油中水小滴内に封入される。得られたアンプリコンは、そのまま発現に使用できるscFvを形成し、そのscFvは、スクリーニング、選択のためのファージ上の表示、又はレポーター特徴付けのためのディープシーケンシングのためにscFv-Fc又はIgGとして発現され得る。

【図2】単一細胞のマイクロ流体封入である。封入前に赤色又は緑色に染色された単一細胞のマイクロ流体封入を（A）明視野、（B）FITC及び（C）Texas Redチャンネルにおいて可視化した。小滴境界線の輪郭を参照のためにチャンネルB及びC上に重ね合わせた。

【図3】1次B細胞から自然対合scFvを回収する戦略である。（A）同族 $V_H$ 及び $V_L$ 領域を、IMGT生殖系列配列から設計されたプライマープールを使用して小滴内で増幅する。2つのアンプリコンを、プライマーを使用して相補的なオーバーハング（緑色）と連結し、これは $(Gly_4Ser)_3$ リンカーも生成する。限定量の $V_H-in-R$ 及び $V_L-in-F$ プライマープールを使用することにより、個々の $V_H$ 及び $V_L$ 領域よりも完全scFvの増幅が優先される。（B） $V_H-FR1$ 及び $V_L-FR4$ に特異的なプライマーを使用するネステッドPCRステップは、最終的なscFvを増幅し（C）、パニング又は直接スクリーニングのためにSfi1/Not1を介したベクター内へのクローニングを可能にするオーバーハングを有する。

【図4】免疫レプリカプラットフォームは、同族鎖対合を維持する。（A）1次ヒト細胞及びマウスB細胞を混合し、封入されるか又は未封入形態（「開放システム」/「コンビナトリアル」）で処理されるかのいずれかである。定常領域に特異的なプライマーを使用して、連結された $C_{H1}-C_K$ アンプリコンを生成し、ヒト（薄い灰色）又はマウス（濃い灰色）領域に特異的なプライマーを使用して鎖対合を決定した。（B）正確に対合された種（星印で示す）の増幅を示すアガロースゲルは、封入を使用して得ることができる一方、開放システムは、全ての可能性を比較的等しい量で生成する。

【図5】1次B細胞からのscFvアンプリコンの生成である。そのまま発現に使用できるscFvアンプリコンを、封入（「小滴」-レーン2及び4）又は未封入（「開放」-レーン3及び5）フォーマットのいずれかにおいて、48時間刺激したヒトB細胞から生成した。

【図6】ディープシーケンシングからのV/J生殖系列多様性の分布である。ScFvアンプリコンを、封入を有するか又は有さずに2人の健康な個人から生成し、 $V_H$ 、 $V$ 及び $V$ 領域の増幅のための鋳型として使用し、これらはバーコード化され、ペアエンドIlluminaシーケンシングによって配列決定された。独特の配列をIMGT生殖系列配列にアラインし、小滴（黒色棒グラフ）又は開放（白色棒グラフ）ライブラリーから得られた独特の全配列の百分率として示す。

【図7】工程の改善は、PCR中の小滴安定性を高めた。（A）PCRサイクリング（45サイクル）前及び後の収集されたエマルジョンの写真である。（B）に見られるように、最適化されたPCR条件及び賦形剤は、安定性の増大に寄与し、単分散小滴を生成した。

。

10

20

30

40

50

【図8】インフルエンザ赤血球凝集素 (H A - S D - 円形) 及びカンジダ・アルピカンス (C . a l b i c a n s ) マンナン (三角形) に対する2人の健康なドナー (642及び432) に関する血清力価である。ドナー642に関する力価は破線/白色記号で示し、ドナー432に関する力価は実線/黒色記号で示す。

【図9】小滴マイクロ流体力学を使用した単一細胞の封入である。細胞をC e l l T r a c k e r R e d及びG r e e n染料で染色し、混合し、単一細胞の封入に好ましい密度で小滴内に封入した。各小滴は、独立した反応容器を形成し、それにより細胞の同族V遺伝子が増幅及び対合され得る。スケールバー = 400  $\mu$ m。

【図10】1次B細胞は、逆転写の条件で効率的に溶解する。(A)培養培地、封入緩衝液(「低張緩衝液」)及びR T - P C R緩衝液のいずれかの中で30分間インキュベートした細胞に関して、V i C e l l生存率アナライザーを使用して細胞生存率測定を行った。比較のために、1回の凍結解凍サイクル後の生存率も測定した。(B)細胞溶解物の外観検査である。細胞をT r y p a n B l u eで染色し、R T - P C R緩衝液で50において30分間インキュベートする前及びインキュベートした後に画像化した。

【図11】単一細胞は、R T - P C R試薬によって小滴内で効率的に溶解する。I M 9多発性骨髄腫細胞をC e l l T r a c k e r R e d又はG r e e nで染色し、画像化の直前にP B S緩衝液(A)又はR T - P C R緩衝液(B)と共に封入した。(C)単一細胞をR T - P C R試薬及びS Y B R - G r e e n染料と共に封入して、細胞溶解による二本鎖核材料の放出を可視化した。

【図12】細胞インキュベーションは、死んだ又は死にかけている細胞から生成された遊離R N Aをもたらす。

【図13】スクリーニング及び次世代シーケンシング (N G S ) のための自然対合ライブラリーの生成である。(A)各封入B細胞からのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を特異的プライマーセットによって増幅し、相補的なオーバーハングを介してインフレイム (i n - f r a m e ) 対合する。V<sub>H</sub> F R 1及びV<sub>L</sub> F R 4プライマーによるネステッドP C Rは、オーバーハングを有する完全長s c F vを生成して、バーコード化対合M i S e qシーケンシングを可能にする。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub> F R 3、C D R 3及びF R 4は、それぞれR 2及びR 1プライマーによって配列決定される一方、R 3プライマーは、インデックス読み取りを提供してデマルチプレキシングを可能にする。アンプリコンは、S f i 1 / N o t 1制限部位を介してアダプター配列が切断されて、下流選択及びスクリーニングのために発現又はファージミドベクターにサブクローニングされ得る。(B~C)代表的なデータセットからのN G Sデータである。100万の刺激B細胞からのs c F vライブラリーがエマルション又はコンビナトリアル様式のいずれかで生成された。(B)エマルションライブラリーは、1 : 1 V<sub>L</sub> : V<sub>H</sub>比(サンプル中央値)に圧倒的に好都合であったが、コンビナトリアルライブラリーはスクランブルされた。(C)複数の対合が見られた場合、優勢パートナーは、エマルションライブラリーでは配列の99%を占めたが(サンプル中央値)、パートナーは、コンビナトリアルライブラリーではより均一に分布した。

【図14】対合V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>読み取りデータの次世代シーケンシング品質である。(A) V<sub>H</sub>及び(B) V<sub>L</sub>配列の代表的なシーケンシングP h r e d品質スコアである。フレームワーク (F W ) 及びC D R領域を示す。

【図15】この研究からの小滴内で生成された抗体ライブラリー(レーン1、2)及び参照研究(D e K o s k y , B . J . e t a l . , N a t . M e d . ( 2 0 1 5 ) , 2 1 : 8 6 - 9 1 ; これは参照により本明細書に組み込まれる)(レーン3~6)を比較するトップペア(t o p - p a i r )分析によるV<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>対合精度である。細胞数及びシーケンシング深度は、サンプル間で同等である。スチューデントのt検定を使用して、ドナー1又はドナー2と他のライブラリーのいずれかとの間で\*\*\* p < 0 . 0 0 1である。

【図16-1】特異的結合剤に関するファージ-ディスプレイ濃縮である。総B細胞(A)及びメモリー(B)B細胞から得られたエマルションライブラリーを赤血球凝集素H 1 (A / C a l i f o r n i a / 0 7 / 2 0 0 9 H 1 N 1)に対する2ラウンドのファージディスプレイパニングに供し、濃縮をポリクロールファージE L I S Aによって測定

10

20

30

40

50

した。

【図16-2】特異的結合剤に関するファージ-ディスプレイ濃縮である。(C)赤血球凝集素H1(A/California/07/2009 H1N1 - 無地)、H5(A/Vietnam/1203/2004 H5N1 - 平行線)又は無関係対照(白色)に対する18のモノクローナルscFv-Fc抗体に関する特異的ELISA結合データである。

【図16-3】特異的結合剤に関するファージ-ディスプレイ濃縮である。(D)インフルエンザAのグループ1(青色)及び2(赤色)サブタイプ、並びにインフルエンザBの両方の系列(緑色)からの赤血球凝集素抗原のパネルに対する1つのモノクローナルscFv-Fc抗体の交差反応性を示すELISA結合データである。負の対照のhisタグタンパク質に対する結合は灰色で示す。エラーバーは、3回行われた測定の標準偏差を表す。

【図17】赤血球凝集素H1に対する2ラウンドの選択後の濃縮を示すポリクローナルファージELISAである。非選択ライブラリーは、H1 CA/09、H1 SD/07、H2 MO/06、H5 VN/04、H6 HK/97及びH9 HK/99に関して示される一方、ラウンド2の選択ライブラリーは、H3 PE/09及びH7 NL/03に関して示される。H1(実線)又は無関係タンパク質対照(破線)に対する、希釈ファージの結合を、乳化された総B細胞(A)、乳化されたメモリーB細胞(B)、コンビナトリアル総B細胞(C)又はコンビナトリアルメモリーB細胞(D)から生成されたライブラリーに関して測定した。

【図18】赤血球凝集素H1(A/California/07/2009 H1N1)に対する2ラウンドのパニング前及び後のモノクローナルV<sub>H</sub>生殖系列分布である。同じドナーからのライブラリーを封入(A、C)又はコンビナトリアル(B、D)フォーマットのいずれかで生成した。非選択ライブラリー分布(A、B)を、読み取りクラスターを個々のV<sub>H</sub>生殖系列遺伝子にマッピングすることによって次世代シーケンシングから計算した。100を超えるクローンをSangerシーケンシングによって配列決定して、ファージディスプレイ選択後に生殖系列多様性を得た。IGHV1-69、重鎖相互作用のみを介してグループ1赤血球凝集素に接触することが既知の抗体をコードする遺伝子の相対的存在量を各プロット内に示す。表1: scFv生成に使用されたプライマー配列である。表2: Illuminaシーケンシングに使用されたプライマーである。表3

: ヒト及びマウスC<sub>H1</sub>/C<sub>H2</sub>連結に使用されたプライマーである。表4: 2つのよく見出される抗原に対する免疫レプリカキャンペーンである。2人の健康なドナー(642及び432)からのB細胞をscFv生成に使用した。約10,000の1次B細胞からのV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>領域を封入(「小滴」)又は非封入(「開放」)フォーマットのいずれかで増幅及び対合して、scFvカセットを生成し、そのカセットをscFv-Fc発現ベクターに直接クローニングした。5,632の細菌発現scFv-Fcクローンを、インフルエンザ赤血球凝集素(HA-SD)及びカンジダ・アルビカンス(C. albicans)マンナンに対する結合に関してELISAによってスクリーニングした。表5: V/J遺伝子増幅に使用されたプライマーである。標的遺伝子に特異的に結合するプライマーの領域は大文字で示される一方、オーバーハングは小文字で示される。接尾辞「\_1 d r」で示される各遺伝子に関するリーダー配列を有する標的V/J遺伝子を列挙する。表6: ファージディスプレイ生成又は次世代シーケンシングプロファイリングのためのライブラリー増幅に使用されるプライマーである。特定のインデックス配列は、下線が引かれている。表7: 次世代シーケンシングデータからの独特の配列の分析である。表8: スチューデントのt検定を使用したトップペア分析によるV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>対合精度の統計的比較である。小滴内で生成された抗体ライブラリーを、この研究(ドナー1及びドナー2)及び参照研究(DeKosky, B. J. et al., Nat. Med. (2015), 21: 86-91; これは参照により本明細書に組み込まれる)間で比較する(データセットSRR1585248、SRR1585249、SRR1585265及びSRR1585267)。細胞数及びシーケンシング深度は、サンプル間で同等である。表

10

20

30

40

50

9：ファージディスプレイライブラリー特徴付けである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、患者から単離された単一細胞、例えばB細胞を、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬と共に油中水小滴内に封入して、s c F vの組換えライブラリーを生成することを可能にする。記載全体において、ファージディスプレイを参照しているが、酵母ディスプレイ及び哺乳動物ディスプレイ技術を同じように適用することができ、本発明者らが、それらの代替的ディスプレイシステムを明らかに想定していることが当業者によって認識されるであろう。

【0014】

本発明は、封入された単一細胞からの可変領域( $V_H$ 及び $V_L$ )をクローニングし、それらを連結してs c F vを形成することを含む。各細胞を物理的に分離することにより、抗体結合及び機能を回復するのに不可欠な天然 $V_H - V_L$ 対合が保存される。得られたアンプリコンは、そのまま発現に使用できるs c F vを形成する。s c F vのライブラリーは、ファージ-ディスプレイパニングによって濃縮され、又は次世代シーケンシングを使用してディープシーケンシングされて、結合及び機能に関して直接スクリーニングできる翻訳可能なs c F vライブラリーである。

【0015】

本発明は、そのまま発現に使用できるs c F vライブラリーをスクリーニング方法(例えば、相-ディスプレイ)と結合して、抗原特異的クローンに関して濃縮することを更に可能にする。本発明は、特に、天然B細胞多様性を発掘して、ヒト患者からの抗原特異的抗体を迅速に単離することにより、抗原特異的抗体の高スループット特定を可能にする。本発明は、既存の技術によって見出されない抗体の特定を可能にする。

【0016】

本発明は、封入された自然対合s c F vアンプリコンを生成する方法を提供し、この方法は、単一細胞を小滴内に封入することであって、小滴は、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結のための試薬を更に含有する、封入することと、封入された単一細胞を溶解し、且つ封入された自然対合s c F vアンプリコンを生成することであって、各s c F vアンプリコンは、重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を含む、生成することを含む。

【0017】

一般に、s c F vアンプリコンは、式 $V_1 - L - V_2$ を含む。Lは、リンカーである。一実施形態において、 $V_1$ は、重鎖可変領域であり、 $V_2$ は、軽鎖可変領域であり、即ち、s c F vアンプリコンは、式 $V_H - L - V_L$ を有する。別の実施形態では、 $V_2$ は、重鎖可変領域であり、 $V_1$ は、軽鎖可変領域であり、即ち、s c F vアンプリコンは、式 $V_L - L - V_H$ を有する。

【0018】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬は、ヒトIg配列に対して設計されたプライマーを含む。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬は、表1に示されるプライマーを含むプライマープールを含む。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬は、表5に示されるプライマーを含むプライマープールを含む。表1又は表5のプライマーのグループは、必要に応じて更に細分することができ、例えば、プライマーの適切なセットは、細胞が若しくは発現細胞、又は異なるIg Hアイソタイプを発現する細胞に分離される場合に使用することができる。プライマーは、当技術分野で既知のカスタムソフトウェアを用いて設計することができる。重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンは、最初にs c F vアンプリコンの生成において天然重鎖及び軽鎖可変領域配列から形成される。

【0019】

10

20

30

40

50

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される封入された s c F v アンプリコンを生成するための生成ステップは、最初に天然重鎖及び軽鎖可変領域配列から重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを形成することを含み、及び試薬は、第 1 及び第 2 の重鎖可変領域プライマー、並びに第 1 及び第 2 の軽鎖可変領域プライマーを含むプライマープールを含み、第 1 の重鎖可変領域プライマー及び第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、相互作用して、重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する。一実施形態において、プライマープールは、第 2 のプライマーよりも低い濃度の第 1 のプライマーを含む。好ましくは、第 1 のプライマーの濃度は、第 2 のプライマーの濃度と比較して 2 ~ 8、例えば 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 の因数で低下される。好ましくは、濃度は、8 の因数で低下される。可変領域内に結合する核酸プライマーの量を制限することにより、個々の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域よりも完全 s c F v の増幅に好都合である。

10

**【0020】**

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される第 1 の重鎖可変領域プライマーは、第 1 のオーバーハング配列に融合され、及び本明細書のいずれかに定義される第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、第 2 のオーバーハング配列に融合され、オーバーハング配列は、相互作用して、重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンを連結する。好ましくは、第 1 及び第 2 のオーバーハング配列は、少なくとも部分的に相補的である。より好ましくは、第 1 及び第 2 のオーバーハング配列は、完全に相補的である。2 領域アンプリコンは、オーバーラップ発現 PCR を使用して連結されて s c F v アンプリコンを生成することができる。

20

**【0021】**

一実施形態において、RT-PCR は、オーバーラップ伸長 PCR と組み合わせて使用される。

**【0022】**

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される第 1 の重鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの重鎖可変領域内に（一般に、FR 4 の 3' 末端で）結合するリバースプライマーであり、且つ本明細書のいずれかに定義される第 2 の重鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの重鎖可変領域外に結合するフォワードプライマーであり、及び本明細書のいずれかに定義される第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの軽鎖可変領域内に（一般に、FR 1 の 5' 末端で）結合するフォワードプライマーであり、且つ本明細書のいずれかに定義される第 2 の軽鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの軽鎖可変領域外部に結合するリバースプライマーである。

30

**【0023】**

別の実施形態では、本明細書のいずれかに定義される第 1 の重鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの重鎖可変領域内に（一般に、FR 1 の 5' 末端で）結合するフォワードプライマーであり、且つ本明細書のいずれかに定義される第 2 の重鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの重鎖可変領域外に結合するリバースプライマーであり、及び本明細書のいずれかに定義される第 1 の軽鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの軽鎖可変領域内に（一般に、FR 4 の 3' 末端で）結合するリバースプライマーであり、且つ本明細書のいずれかに定義される第 2 の軽鎖可変領域プライマーは、天然配列 / アンプリコンの軽鎖可変領域外に結合するフォワードプライマーである。

40

**【0024】**

これらの試薬は、小滴内で同族 V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域が増幅されることを可能にする。

**【0025】**

本発明は、患者から単離された単一細胞、例えば T 細胞を、封入された単一細胞からの T 細胞受容体 (TCR) 鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結する試薬と共に油中水小滴内に封入して、単一鎖 T 細胞受容体 (scTCR) の組換えライブラリーを形成することも可能にする。

**【0026】**

50

本発明はまた、封入された単一細胞からのTCR鎖をクローニングし、且つそれらを連結してscTCRを形成することを含む。各細胞を物理的に分離することにより、抗体結合及び機能を回復するのに不可欠な天然TCR対合が保存される。得られたアンプリコンは、そのまま発現に使用できるscTCRを形成する。scTCRのライブラリーは、ファージ-ディスプレイパニングによって濃縮され、又は次世代シーケンシングを使用してディープシーケンシングされて、結合及び機能に関して直接スクリーニングできる翻訳可能なscTCRライブラリーである。

【0027】

本発明は、封入された自然対合scTCRアンプリコンを製造する方法を提供し、この方法は、単一細胞を小滴内に封入することであって、小滴は、封入された単一細胞からのTCR鎖アンプリコンの自然対合の増幅のための試薬を更に含有する、封入することと、封入された単一細胞を溶解することと、封入された自然対合scTCRアンプリコンを生成することであって、各scTCRアンプリコンは、TCR鎖アンプリコンの自然対合を含む、生成することを含む。

10

【0028】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される自然対合TCR鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである。別の実施形態では、本明細書のいずれかに定義される自然対合TCR鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである。

【0029】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される封入のステップは、マイクロ流体力学を使用することを含む。マイクロ流体力学は、ライブラリーへの並行増幅のために、数100万の細胞、潜在的には全レパートリーをピコリットルサイズの小滴内に保存することが可能であり、従って高スループット手法を提供する。一実施形態において、ライブラリーは、scFvライブラリーである(図1)。別の実施形態では、ライブラリーは、scTCRライブラリーである。

20

【0030】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義されるマイクロ流体力学は、圧力ポンプを有するガラスマイクロ流体チップを使用することを含む。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義されるマイクロ流体チップは、親フッ素性チップである。マイクロ流体チップは、水性流体の2つの流れを合流するように設計され、一方は、細胞の懸濁液を運び、且つ他方は、一段階逆転写(RT)及びオーバーラップ伸長PCRのための試薬を含有する。マイクロ流体力学は、均一サイズの小滴を高速で確実に生成するのに使用される。

30

【0031】

いくつかのグループにより、細胞ベースのRT-PCRは、5nL未満の体積で実行できないと報告されているが(DeKosky, B. J. et al., Nat. Biotechnol. (2013), 31: 166-169; DeKosky, B. J. et al., Nat. Med. (2015), 21: 86-91; White, A. K. et al., Proc. Natl. Acad. (2011), 108: 13999-14004; Eastburn, D. J. et al., PLoS ONE (2013), 8: e62961; これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)、本発明の方法は、ピコリットルサイズの小滴、例えば体積200pLの小滴内で細胞から直接Ig転写産物を問題なく増幅することができる。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される小滴は、体積が約50pL~約600pLである。一実施形態において、小滴は、体積が約100pL~約300pLである。一実施形態において、小滴は、体積が約200pLである。

40

【0032】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される封入ステップは、水性懸濁液を油と組み合わせて、水-油小滴内に封入された単一細胞を含むエマルジョンを形成することを含み、水性懸濁液は、細胞と、アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試

50

薬とを含む。

【0033】

一実施形態において、本方法は、封入ステップ前のステップを更に含み、このステップは、細胞と、アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬とを含む水性懸濁液を提供することを含む。一実施形態において、提供するステップは、細胞を含む第1の水性懸濁液中の細胞を刺激し、且つ続いて細胞を、アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬と組み合わせて、細胞及びアンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬を含む水性懸濁液を形成することを含む。一般に、細胞は、約48時間、好ましくは少なくとも48時間にわたって刺激され得ることが理解される。

【0034】

細胞懸濁液の滴定は、10個の小滴の各々に関しておよそ1個の細胞を達成し、これは、ポアソン統計に基づいて単一細胞の封入を>95%の確率でもたらす(図9)。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される細胞の懸濁液は、約100万~約500万細胞/mlの密度である。好ましい実施形態では、本明細書のいずれかに定義される細胞の懸濁液は、約350万~約450万細胞/mlの密度である。より好ましい実施形態では、本明細書のいずれかに定義される細胞の懸濁液は、約400万細胞/mlの密度である。これらの密度は、小滴内に封入された単一細胞を得るのに最適である(図2)。これらの密度により、およそ100µmの直径の小滴内に封入された単一細胞も得られる。空の小滴も生成され得るが、これらは鑄型細胞が存在しないため、ライブラリーに寄与しない。

【0035】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される細胞の懸濁液は、抗凝集剤を含む。別の実施形態では、封入前に、本明細書のいずれかに定義される細胞の懸濁液は、例えば、常磁性攪拌ディスクを用いて攪拌される。抗凝集剤の使用及び/又は攪拌は、封入前に、懸濁した細胞が沈殿することを防止する。刺激された細胞、例えばB細胞又はT細胞は、時間と共に集合する傾向があるため、抗凝集剤の使用及び/又は攪拌は、流速の変化及び複数の細胞が一緒に封入されることを防止する。

【0036】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される細胞の懸濁液は、安定剤を含む。好ましくは、安定剤は、両親媒性分子である。より好ましくは、安定剤は、アセチル化BSAである。アセチル化BSAは、水-油界面を安定化し、界面張力を低下させることができる両親媒性分子である(Dalglish, Trends in Food Science & Technology (1997), 8(1): 1-6; これは参照により本明細書に組み込まれる)。本発明者らは、アセチル化BSAの使用により、PCRサイクリングの過酷な条件において小滴の合体が低下することを見出した。更に、アセチル化BSAの存在は、逆転写酵素等の酵素が界面において変性することを防止し得る。

【0037】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される封入されたアンプリコンを生成するための生成ステップは、RT-PCRを含む。

【0038】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される油は、低粘度の油である。好ましい実施形態では、本明細書のいずれかに定義される油は、フッ素化油である。より好ましい実施形態では、本明細書のいずれかに定義される油は、HFE-7500フッ素化油+2%w/v 008-フルオロ界面活性剤(RAN Biotechnologies cat no 008-FLUOROSURFACTANT-HFE7500)である。本発明に使用される細胞(例えば、B細胞又はT細胞)の寿命に起因して、本発明の方法のスループットは、細胞の封入に必要な時間によって制限される。本発明者らは、スループットが、細胞の封入のための水-油小滴の形成に使用される油の粘度を低下させることによって改善され得ることを見出した。詳細には、本発明者らは、粘度が低い油が流速を増大させ得ることを見出した。一実施形態において、油に関するマイクロ流体の流速は、

10

20

30

40

50

90 ~ 125  $\mu\text{L}$  / 分、好ましくは100  $\mu\text{L}$  / 分であり、水性流体は、5.6 ~ 7  $\mu\text{L}$  / 分、好ましくは6.22  $\mu\text{L}$  / 分である。油の粘度の低下は、単一の小滴内に2つ以上の細胞が封入される危険性を低減するため、細胞密度の増大等の代替案よりも好ましい。

#### 【0039】

上記に定義した本発明の方法は、数百万の細胞の封入を可能にする。好ましくは、少なくとも100万、少なくとも200万、少なくとも300万、少なくとも400万、少なくとも500万、少なくとも600万、少なくとも700万、少なくとも800万、少なくとも900万又は少なくとも1000万の細胞が封入される。上記に定義した本発明の方法は、100万の細胞を約40分以内に封入することができる。

#### 【0040】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義されるアンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬は、標準的なRT-PCR試薬を含む。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される試薬は、Titan (Roche cat no 11855476001) を含む。

#### 【0041】

水性構成成分及びマイクロ流体の流速の上記の最適化は、サイズの均一性が改善され、またRT-PCR中の完全性が改善された小滴を生成する。これは、アンプリコン生成の确实性の改善を可能にする。

#### 【0042】

細胞が小滴内に封入される前に、いくつかの細胞は、死んで溶解し、それらの遺伝子材料（例えば、核酸）を周囲培地中に放出する。核酸、例えばVH又はVL領域をコードする核酸は、小滴を汚染し、非自然対合生成物をもたらす可能性がある。小滴内に存在する汚染核酸のレベルを最小限にすることが望ましいことが当業者によって認識されるであろう。特に、死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸は、RNAである。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される方法は、死んだ又は死にかけている細胞からの少なくともいくつかの遊離核酸が小滴内に封入されることを防止することを更に含む。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される方法は、死んだ又は死にかけている細胞からの実質的に全部の遊離核酸が小滴内に封入されることを防止することを更に含む。好ましくは、本明細書のいずれかに定義される方法は、死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸が小滴内に封入されることを防止することを更に含む。これを達成する任意の方法が本発明の範囲内にあることが当業者によって認識されるであろう。

#### 【0043】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される方法は、小滴内に封入された死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸のレベルを低下させることを更に含む。死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸のレベルは、この方法ステップが行われなかった場合に封入されたであろうレベルと比較して低下されることが理解されるであろう。これを達成する任意の方法が本発明の範囲内にあることが当業者によって認識されるであろう。一実施形態において、死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸のレベルは、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%低下される。

#### 【0044】

一実施形態において、防止することは、封入前に細胞を48時間未満にわたって刺激することを含む。一実施形態において、低下させることは、細胞を含む第1の水性溶液中で細胞を48時間未満にわたって刺激することを含む。

#### 【0045】

一実施形態において、防止することは、封入前に生細胞を選択することを含む。一実施形態において、低下させることは、水性懸濁液中でアンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬と組み合わせるために生細胞を選択することを含む。一実施形態において、選択することは、蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含む。一実施形態において、選択することは、ビーズベースの細胞選択を含む。封入に選択される所望の細胞は、生細胞

10

20

30

40

50

であり、死んだ又は死にかけている細胞でないことが当業者によって認識されるであろう。

【0046】

一実施形態において、防止することは、磁気ビーズを使用して、死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸を隔離することを含む。一実施形態において、低下させることは、磁気ビーズを使用して、死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸を第1の水性溶液から隔離することを含む。一実施形態において、低下させることは、死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸を、細胞及び試薬を含む水性懸濁液から隔離することを含む。死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸の隔離は、小滴内に封入された死んだ又は死にかけている細胞からの遊離核酸のレベルが低下するように遊離核酸が除去されることを可能にする。一実施形態において、磁気ビーズは、オリゴヌクレオチド被覆磁気ビーズである。一実施形態において、磁気ビーズは、ポリ-dTビーズである。核酸結合剤、特にRNA結合剤を有する磁化ビーズが封入前に細胞懸濁液に添加されて、周囲培地中に存在する遊離核酸、特にRNAを「拭い取る」。ビーズは、磁場を使用して封入前に除去され得、それにより汚染核酸が除去される。

10

【0047】

上記に定義した方法によって生成される、封入された自然対合アンプリコンは、本発明の範囲内である。上記に定義した方法に従って生成される、封入された自然対合アンプリコンの特徴を有する封入された自然対合アンプリコンも本発明の範囲内である。一実施形態において、封入された自然対合アンプリコンは、scFvアンプリコンである。別の実施形態では、封入された自然対合アンプリコンは、scTCRアンプリコンである。

20

【0048】

本発明は、自然対合アンプリコンのライブラリーを製造する方法を更に提供し、この方法は、上記に定義した方法に従って、封入された自然対合アンプリコンを生成することと、小滴を溶解して、自然対合アンプリコンのライブラリーを生成することとを含む。一実施形態において、自然対合アンプリコンは、scFvアンプリコンである。別の実施形態では、自然対合アンプリコンは、scTCRアンプリコンである。小滴を溶解するための市販のキットが利用可能である（例えば、EURxのMiccellaキット）。小滴由来のDNAは、QiagenのPCR精製キットを使用して、又はイソブタノール（Schutze, T. et al., *nal. Biochem.* (2011), 410: 155-157; これは参照により本明細書に組み込まれる）及びジエチルエーテル（Diehl, F. et al., *Nature Methods* (2006), 3; 551-559; これは参照により本明細書に組み込まれる）の使用等の他の方法によって精製することができ、記載されている。上記の方法に従って生成される自然対合アンプリコンのライブラリーは、本発明の範囲内である。この方法に従って生成される自然対合アンプリコンのライブラリーの特徴を有する自然対合アンプリコンのライブラリーも本発明の範囲内である。一実施形態において、自然対合アンプリコンは、scFvアンプリコンである。別の実施形態では、自然対合アンプリコンは、scTCRアンプリコンである。

30

【0049】

本発明は、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合scFvアンプリコンのライブラリーを生成する方法を更に提供し、この方法は、上記に定義した方法に従って自然対合scFvアンプリコンのライブラリーを生成することと、自然対合scFvアンプリコンの更なるライブラリーを生成することとを含み、更なるライブラリーの自然対合scFvアンプリコンは、一般式R1-V1-L-V2-R2を有し、ここで、R1及びR2は、同じであるか又は異なり、且つそれぞれ制限酵素部位を含み、V1及びV2は、自然対合重鎖及び軽鎖可変領域であり、V1が軽鎖可変領域である場合、V2は、重鎖可変領域であり、又はV1が重鎖可変領域である場合、V2は、軽鎖可変領域であり、及びLは、直接結合又はリンカーである。一実施形態において、更なるライブラリーの自然対合scFvアンプリコンは、一般式R1-VH-L-VL-R2を有し、即ち、V1は、VHであり、及びV2は、VLである。別の実施形態では、更なるライブラ

40

50

リーの自然対合 s c F v アンプリコンは、一般式 R 1 - V L - L - V H - R 2 を有し、即ち、V 1 は、V L であり、及び V 2 は、V H である。

【0050】

本発明は、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成する方法を更に提供し、この方法は、上記に定義した方法に従って自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成することと、自然対合 s c T C R アンプリコンの更なるライブラリーを生成することとを含み、更なるライブラリーの自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C 1 - L - C 2 - R 2 を有し、ここで、R 1 及び R 2 は、同じであるか又は異なり、且つそれぞれ制限酵素部位を含み、C 1 及び C 2 は、自然対合 及び T C R 鎖であり、C 1 が T C R 鎖である場合、C 2 は、T C R 鎖であり、又は C 1 が T C R 鎖である場合、C 2 は、T C R 鎖であり、及び L は、直接結合又はリンカーである。一実施形態において、C 1 は、T C R 鎖であり、及び C 2 は、T C R 鎖であり、即ち、更なるライブラリーの自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C - L - C - R 2 を有し、ここで、C は、T C R 鎖であり、及び C は、T C R 鎖である。別の実施形態では、C 1 は、T C R 鎖であり、及び C 2 は、T C R 鎖であり、即ち、更なるライブラリーの自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C - L - C - R 2 を有し、即ち、ここで、C は、T C R 鎖であり、及び C は、T C R 鎖である。

10

【0051】

本発明は、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成する方法を更に提供し、この方法は、上記に定義した方法に従って自然対合 s c T C R アンプリコンのライブラリーを生成することと、自然対合 s c T C R アンプリコンの更なるライブラリーを生成することとを含み、更なるライブラリーの自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C 1 - L - C 2 - R 2 を有し、ここで、R 1 及び R 2 は、同じであるか又は異なり、且つそれぞれ制限酵素部位を含み、C 1 及び C 2 は、自然対合 及び T C R 鎖であり、C 1 が T C R 鎖である場合、C 2 は、T C R 鎖であり、又は C 1 が T C R 鎖である場合、C 2 は、T C R 鎖であり、及び L は、直接結合又はリンカーである。一実施形態において、C 1 は、T C R 鎖であり、及び C 2 は、T C R 鎖であり、即ち、更なるライブラリーの自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C - L - C - R 2 を有し、ここで、C は、T C R 鎖であり、及び C は、T C R 鎖である。別の実施形態では、C 1 は、T C R 鎖であり、及び C 2 は、T C R 鎖であり、即ち、更なるライブラリーの自然対合 s c T C R アンプリコンは、一般式 R 1 - C - L - C - R 2 を有し、即ち、ここで、C は、T C R 鎖であり、及び C は、T C R 鎖である。

20

30

【0052】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される R 1 及び R 2 は、異なる。好ましくは、L は、リンカーである。好ましくは、R 1 及び R 2 は、異なり、及び L は、リンカーである。

【0053】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される自然対合アンプリコンの更なるライブラリーを生成することは、ネステッド P C R を使用することを含む。ネステッド P C R は、アンプリコンの生成に使用されるものと異なるプライマーの第 2 のセットを使用して完全アンプリコンを増幅する。従って、ネステッド P C R の続く実行は、そのまま発現に使用できる最終的なアンプリコンを増幅し、非特異的プライマー結合に起因して形成された代替的 P C R 産物の増幅を低減する。一実施形態において、アンプリコンは、s c F v アンプリコンである。更なる実施形態において、ネステッド P C R は、V 1 の F R 1 及び V 2 の F R 4 に結合するプライマーを使用する。従って、完全 s c F v アンプリコン産物が増幅され得る。別の実施形態では、アンプリコンは、s c T C R アンプリコンである。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義されるネステッド P C R は、制限酵素部位を含むオーバーハング配列に融合されるプライマーを使用する。好ましい制限酵素

40

50

部位は、S f i 1及びN o t 1である。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義されるR 1は、S f i 1制限酵素部位を含み、及び本明細書のいずれかに定義されるR 2は、N o t 1制限酵素部位を含む。得られたアンプリコンは、そのまま発現に使用できるアンプリコンを形成し、このアンプリコンは、ファージ-ディスプレイパニング又は直接スクリーニングのための任意の数の発現システムのための発現ベクターに容易にクローン化され得る。

【0054】

上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vアンプリコンのライブラリーは、本発明の範囲内である。上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vアンプリコンのライブラリーの特徴を有する抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vアンプリコンのライブラリーも本発明の範囲内である。

10

【0055】

上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rアンプリコンのライブラリーは、本発明の範囲内である。上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rアンプリコンのライブラリーの特徴を有する抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rアンプリコンのライブラリーも本発明の範囲内である。

20

【0056】

本発明は、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vライブラリーを生成する方法を更に提供し、この方法は、本明細書に記載した方法に従って自然対合s c F vアンプリコンのライブラリーを生成することと、自然対合s c F vを発現させることとを含む。一実施形態において、この方法は、自然対合s c F vをs c F v - F cとして発現させることとを含む。別の実施形態では、この方法は、自然対合s c F vをI g Gに再編成(reformat)することとを含む。好ましくは、この再編成されたI g Gは、ファージ-ディスプレイパニングによって濃縮され、又はレパトリー特徴付けのために次世代シーケンシングを使用してディープシーケンシングされて、結合及び機能に関して直接スクリーニングすることができる。更なる実施形態において、この方法は、自然対合s c F vをs c F vファージディスプレイライブラリーとして発現させることとを含む。

30

【0057】

本発明は、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rライブラリーを生成する方法を更に提供し、この方法は、本明細書に記載した方法に従って自然対合s c T C Rアンプリコンのライブラリーを生成することと、自然対合s c T C Rを発現させることとを含む。

【0058】

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義されるs c F vライブラリーの各s c F vは、リンカーによって互いに連結された単一細胞の自然対合の重鎖及び軽鎖可変領域を含む。リンカーは、重鎖及び軽鎖可変領域の対合を可能にする長さを有する必要がある。別の実施形態では、本明細書のいずれかに定義されるs c T C Rライブラリーの各s c T C Rは、リンカーによって互いに連結された単一細胞の自然対合のT C R鎖を含む。リンカーは、T C R鎖間の対合を可能にする長さを有する必要がある。好ましくは、本明細書のいずれかに定義されるリンカーは、グリシン及び/又はセリンに富んでいる。より好ましくは、本明細書のいずれかに定義されるリンカーは、(G l y<sub>4</sub> S e r)<sub>3</sub>であり、以下の配列によってコードされる：

40

g g a g g c g g c g g t a g c g g c g g a g g t g g c t c a g g c g g t g g c g g a a g t (配列番号168)。

【0059】

50

一実施形態において、リンカーは、5～30アミノ酸長を有する。好ましくは、本明細書のいずれかに定義されるリンカーは、10～20アミノ酸長を有する。より好ましくは、本明細書のいずれかに定義されるリンカーは、13～18アミノ酸長を有する。なおより好ましくは、本明細書のいずれかに定義されるリンカーは、15アミノ酸長を有する。好適なリンカーは、当業者に周知であろう。

#### 【0060】

上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vライブラリーは、本発明の範囲内である。上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vライブラリーの特徴を有する抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c F vライブラリーも本発明の範囲内である。有利には、s c F vライブラリーは、そのまま発現に使用できる。

10

#### 【0061】

上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rライブラリーは、本発明の範囲内である。上記に定義した方法によって生成される、抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rライブラリーの特徴を有する抗原結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合s c T C Rライブラリーも本発明の範囲内である。有利には、s c T C Rライブラリーは、そのまま発現に使用できる。

20

#### 【0062】

本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法を更に提供し、この方法は、本明細書に記載した方法に従って自然対合s c F vライブラリーを生成することと、抗原サンプルを用いて自然対合s c F vライブラリーを調べることと、抗原特異的分子を特定することを含む。

#### 【0063】

本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法を更に提供し、この方法は、本明細書に記載した方法に従って自然対合s c T C Rライブラリーを生成することと、抗原サンプルを用いて自然対合s c T C Rライブラリーを調べることと、抗原特異的分子を特定することを含む。

30

#### 【0064】

本明細書に記載したこの技術は、B細胞によって例示され、プラットフォームがB細胞レパートリー保存のために確立される。T細胞受容体もs c F vフォーマットに変換され、活性を維持するため(Gregoire et al., European Journal of Immunology (1996), 26(10): 2410-16; これは参照により本明細書に組み込まれる)、この技術は、同じようにT細胞受容体レパートリーの保存に適用することができる。

#### 【0065】

本発明はまた、単一細胞を小滴内に封入するためのマイクロ流体力学の使用を提供し、小滴は、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬を更に含有する。本発明はまた、単一細胞を小滴内に封入するためのマイクロ流体力学の使用を提供し、小滴は、封入された単一細胞からのT C R鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬を更に含有する。本発明の方法に関連して前述した全実施形態は、上記のマイクロ流体力学の使用に同じように適用される。使用の実施形態は、特許請求の範囲に更に定義されている。

40

#### 【0066】

本発明はまた、本明細書に定義した方法のいずれかを実施するためのキットを提供する。本発明は、特に、単一細胞を、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬と共に小滴内に封入するためのマイクロ流体チップと、封入された単一細胞からの重鎖及び軽鎖可変領域アンプリコンの自然対合を増幅及び連結して、s c F vアンプリコンを生成するための試薬とを含むキットを提供

50

する。本発明は、特に、単一細胞を、封入された単一細胞からのTCR鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結するための試薬と共に小滴内に封入するためのマイクロ流体チップと、封入された単一細胞からのTCR鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結して、scTCRアンプリコンを生成するための試薬とを含むキットを提供する。使用説明書もキットに含まれ得る。キットはまた、チューブ(tubing)、チューブインターフェース及びポンプを更に含み得る。キットはまた、小滴を可視化するための装置、例えば顕微鏡を更に含み得る。キットは、本明細書に定義した方法のいずれかに従って単一細胞を封入するためのマイクロ流体プラットフォームを含み得る。本発明の方法に関連して本明細書に前述した実施形態は、キットの構成要素に関する情報を更に提供し得る。キットの実施形態は、特許請求の範囲に更に定義されている。

10

**【0067】**

本発明は、抗体結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合組換えscFvを含むscFvライブラリーを更に提供し、各scFvは、互いに連結された単一細胞の自然対合の重鎖及び軽鎖可変領域を含む。本発明はまた、T細胞受容体結合及び/又は機能に関するスクリーニングのための自然対合組換えscTCRを含むscTCRライブラリーを提供し、各scTCRは、互いに連結された単一細胞の自然対合のTCR鎖を含む。本発明の方法に関連して本明細書に前述した実施形態は、ライブラリーの特徴に関する更なる情報を提供し得る。有利には、ライブラリーは、翻訳可能であり得る。本ライブラリーは、高スループット翻訳及び続く配列のスクリーニングを可能にする。

20

**【0068】**

ライブラリーの実施形態は、特許請求の範囲に更に定義されている。

**【0069】**

本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法を更に提供し、この方法は、本明細書のいずれかに定義される自然対合scFvを、抗原サンプルを用いて調べることと、抗原特異的分子を特定することとを含む。本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法を更に提供し、この方法は、本明細書のいずれかに定義されるscFvライブラリーを、抗原サンプルを用いて調べることと、抗原特異的分子を特定することとを含む。

**【0070】**

本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法を更に提供し、この方法は、本明細書のいずれかに定義される自然対合scTCRを、抗原サンプルを用いて調べることと、抗原特異的分子を特定することとを含む。本発明は、抗原特異的分子を特定するための方法を更に提供し、この方法は、本明細書のいずれかに定義されるscTCRライブラリーを、抗原サンプルを用いて調べることと、抗原特異的分子を特定することとを含む。

30

**【0071】**

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される自然対合ライブラリー又は本明細書のいずれかに定義されるライブラリーは、scFvライブラリーであり、及び抗原特異的分子は、抗体である。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される抗体は、モノクローナル抗体である。

**【0072】**

一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される抗原サンプルは、腫瘍組織である。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される抗原サンプルは、細菌全体である。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される抗原サンプルは、ウイルス粒子である。一実施形態において、本明細書のいずれかに定義される抗原サンプルは、赤血球凝集素(HA)タンパク質を含む。

40

**【0073】**

交差反応性抗原特異的分子の特定を可能にするために、好ましくは異なる抗原サンプルを用いてライブラリーを複数のラウンドにわたり調べ得ることが当業者によって認識されるであろう。一実施形態において、抗原特異的分子は、交差反応性である。

**【0074】**

本発明はまた、抗原特異的分子を特定するための、本明細書のいずれかに定義される自

50

然対合 s c F v ライブラリーの使用を提供する。本発明はまた、抗原特異的分子を特定するための、本明細書のいずれかに定義される s c F v ライブラリーの使用を提供する。本発明はまた、抗原特異的分子を特定するための、本明細書のいずれかに定義される自然対合 s c T C R ライブラリーの使用を提供する。本発明はまた、抗原特異的分子を特定するための、本明細書のいずれかに定義される s c T C R ライブラリーの使用を提供する。

【0075】

一実施形態において、上記に定義した使用は、抗原サンプルを用いて s c F v 又は s c T C R ライブラリーを調べることと、抗原特異的分子を特定することを含む。本発明の方法に関連して前述した全実施形態は、上記に定義した使用に同じように適用される。使用の実施形態は、特許請求の範囲に更に定義されている。

10

【0076】

本明細書に定義した方法は、ヒト B 細胞からの抗体の単離を可能にするが、この方法は、V 遺伝子配列情報が利用可能な任意の種からの抗体の単離に容易に拡大することができる。これは、特に低い融合効率 (0.02%未満 (Yu, X., et al., J. Immunol. Methods (2008), 336; 142-151; 参照により本明細書に組み込まれる)) がレパートリーの有意な損失をもたらすハイブリドーマ技術の幅及び深さを拡大するのに有用であり得る。本明細書に定義した方法は、骨髄腫融合パートナーが利用可能でない生物体からのモノクローナル抗体の生成にも適用することができる。T 細胞受容体 (T C R) レパートリー (対合 / 又は / 鎖からなる) も類似した組換えフォーマットで補足することができ、単一鎖 T C R は、ファージ及び酵母ディスプレイによる選択を受け入れることが示されている (Li, Y. et al. Nat. Biotechnol. (2005), 23: 349-354; Smith, S. N. et al. Methods Mol. Biol. Clifton NJ (2015), 1319: 95-141; 両方とも参照により本明細書に組み込まれる)。

20

【0077】

本発明の方法は、数百万の 1 次ヒト B 細胞から天然レパートリーを強力且つ高感度のスクリーニングプラットフォームに迅速に保存することが可能であり、治療的抗体開発、免疫レパートリー特徴付け及び合理的なワクチン設計のための潜在的な重要性を有する。例えば、可変領域を連結して翻訳可能な s c F v フォーマットとすることにより、複数の技術の強みを組み合わせることが可能となる。ディスプレイプラットフォームの膨大なスクリーニング能力を使用して、自然に進化した抗体応答の完全な豊かさを発掘する。

30

【0078】

本発明は、天然のレパートリーからのリード抗体生成の迅速方法を提供する - 一人の研究者が、数百万の 1 次 B 細胞から、4 週間以内に特異的なモノクローナル抗体に急速に前進させることができる。これは、特に新興感染症、例えば E b o l a 大流行に対抗する際に特に有益であり得る。

【0079】

本発明のライブラリーは、新たなドナーが加えられた際に拡張することができ、複数の標的 (細菌又は腫瘍組織の全部を含む) に対して繰り返しパニングすることができ、又は未来の使用のために無限に保管することができる更新可能な資源を構成する。

40

【0080】

例えば、最近発足した Human Immunome Program (Crowe, J. E. & Koff, W. C. Expert Rev. Vaccines (2015), 14: 1421-1425) 等、抗体機能を予測するための次世代シーケンシングを使用する大規模な活動は、特に利益を得る可能性がある。このプロジェクトは、1000人の個人からの発現された抗体レパートリーをシーケンシングし、シーケンシング情報のみに基づいてワクチン反応性を推測することを目的としている。このプロジェクトに対して追加される刺激的なことは、本明細書に概略した方法を使用してこれらの個人からのプールされたディスプレイライブラリーを構築し、それにより、任意の数のワクチン候補に対するヒトレパートリーの反応性を直接測定できることであり得る。

50

## 【実施例】

## 【0081】

## 実施例1：プライマー設計

全ヒトIg配列の最大適用範囲のためにPerlで記述されたカスタムソフトウェアを使用してプライマーを設計した(表1及び表5)。リーダー、可変及び定常領域に関するヌクレオチド配列を、ヒト重鎖、及び遺伝子(偽遺伝子及び切断型転写産物を除く)に関してIMGT(Lefranc et al., Nucleic Acids Research(2009), 37)からダウンロードし、プライマーの4セットを各遺伝子ファミリーに関して設計した。外部プライマー(プライマー名における「out」添字)を、Primer3を呼び出すことによって設計し、プライマーをリーダー配列のスプライスジャンクションにまたがるように設計し(「out\_5」プライマー)、又は定常領域の第1の50塩基内に結合するように設計した(「out\_3」プライマー)。VK\_out\_3の場合、手作業で設計したプライマーを可変領域-定常領域スプライスジャンクションにまたがるように形成した。全プライマーは、最小融解温度60でアニールするように設計された。内部プライマー(プライマー名における「in」添字)を、プライマーの5'末端をVコーディング配列のstart(「in\_5」)又はend(「in\_3」)に固定することによって設計し、Primer3からのOligo Tmモジュールを使用してTmが60に達するまで伸長した。FR4特異的プライマーも特異性の増大のために手作業で設計した。可能な場合、各セット内のプライマーを、最大で4つの縮重塩基を有するように統一した。可能な場合、各セット内のプライマーをオーバーハングに融合して、リンカー形成(VH\_in\_3及びVK/L\_in\_5)を可能にした。可能な場合、各セット内のプライマーをオーバーハングに融合して、NotI又はSfiIによる制限消化を可能にした。可能な場合、各セット内のプライマーをMiSeqディープシーケンシングのためにバーコード化した(表1)。

## 【0082】

## 実施例2：免疫レプリカ技術を用いた細胞からの自然対合scFvの回収

## 実施例2.1：1次ヒトB細胞の封入

以下に記載する方法は、1次B細胞のプールから抗体レパートリーを、同族重鎖及び軽鎖対合を維持しながら、スクリーニング可能なフォーマットに保存するプラットフォームを提供する(図1)。これを達成するために、各B細胞を、試薬を含有する油中水小滴内に封入し、この試薬は、重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子転写産物のRT-PCR増幅、並びにscFvアンプリコンを生成するためのオーバーラップ伸長PCRによるそれらの対合用である。

## 【0083】

RoboSepヒトB細胞濃縮キット(Stem Cell Technologies、19054RF)を使用して、健康なヒト血液サンプルからB細胞を単離した。この細胞を500xgで10分間遠心分離し、インスリン-トランスフェリン-セレン(Invitrogen、41400-045)、10%ウシ胎児血清(Invitrogen、10082-147)、0.5µg/ml megaCD40L(Enzo、LX-522-110-C010)、33ng/ml IL-21(内部で製造)及びペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン(Invitrogen、10378-016)で補充したRPMI1640(Invitrogen、10491-01)中に再懸濁し、37及び5%CO<sub>2</sub>で48時間増殖させた。封入前に細胞をPBS(700xgで3分間)中で洗浄し、その後、抗凝集剤(Invitrogen、0010057DG)の1:1,000希釈及び0.4mg/mlアセチル化BSA(EURx、E4020-01)を含有する低浸透圧電気融合緩衝液(Eppendorf、940002150)中に再懸濁した。

## 【0084】

刺激されたB細胞は、時間と共に凝集する傾向を有し、これは、流速の変化及び複数の細胞と一緒に封入される原因となり得る。抗凝集賦形剤及び常磁性攪拌ディスクの使用に

より、封入前に細胞の沈殿が回避されることが見出された。

【0085】

アセチル化BSAは、水-油界面を安定化し、界面張力を低下させることができる両親媒性分子である(Dalgleish, Trends in Food Science & Technology (1997), 8(1): 1-6; これは参照により本明細書に組み込まれる)。PCRサイクリングの過酷な条件における小滴の合体が最適化された。低い変性温度とアセチル化BSAの使用との組み合わせは、小滴の合体を減少させ、小滴安定性を改善した(図7)。好ましくは、変性温度は、約85 ~ 約95 の範囲内である。より好ましくは、変性温度は、約86 ~ 約90 の範囲内である。例えば、変性温度は、約88 であり得る。更に、アセチル化BSAの存在は、逆転写酵素等の酵素を界面での変性から保護し得る。

10

【0086】

小滴内の試薬は、小滴が形成されると加える又は減じることができないため、反応混合物は、単一の反応ミックスにおいて全ステップを行うように最適化された。細胞を2 x RT-PCRマスターミックスと1:1比で封入した。ストックプライマーを100 μMで等量で混合してプールを形成し、これをRT-PCRミックスに加えた。

【0087】

300 μlの典型的なマスターミックスは、4.86 μl VH-out-F-T7、4.86 μl VL-out-R-T3、2 μl VH-in-R及び2 μl VL-in-F(表2)、120 μl 5x OneStep RT-PCR緩衝液、24 μl OneStep RT-PCR酵素ミックス、54.1 μl Q溶液(Qiagen、210212)、12 μl 10mM dNTP(Invitrogen、18109-017)及び30 μl RNaseOUT(Invitrogen、10777-019)から構成されていた。試薬を氷上でインキュベートしたままにし、その後、0.22 μm スピンドフィルター(Corning、8169)を通して遠心分離した。

20

【0088】

MicellulaエマルションPCRキット(EURx、3600-02)を使用し、60%構成成分1、20%構成成分2及び20%構成成分3を使用してエマルションの有機相を作製した。試薬を最大速度で60秒間混合及びボルテックスし、室温で少なくとも30分間インキュベートした。封入前に有機相を0.22 μmフィルターでろ過した。

30

【0089】

OB1流量制御器(Elvesys)を使用して揚送された流体を用いて、2-試薬小滴生成チップ(Dolomite、3200242)上で封入を行った。細胞及びRT-PCRミックスの水性流体をそれぞれ57 mbarで揚送すると共に油液体を101 mbarで揚送した。得られたエマルションを6分画分(約40 μlエマルション/画分)でPCRストリップチューブ内に収集した。対照として、等量の細胞及びRT-PCRミックスを組み合わせ、40 μlアリコートでPCRストリップチューブ内に分割して開放PCR反応を行った。

【0090】

「外部」プライマーに対する「内部」の相対的な量を、8の因数で低下させることにより(図3)、早期PCRサイクル中の内部プライマーの選択的枯渇が可能となり、個々の可変領域アンプリコンよりも完全連結産物の生成に有利に作用することが見出された(データは示さず)。

40

【0091】

実施例2.2: 自然対合可変領域遺伝子を含むscFvの生成

55 で30分間の逆転写ステップ、次いでRTの熱失活/88 で2分間のTaqポリメラーゼの賦活化により、封入及び開放逆転写PCR反応を行った。続いて、45サイクルのPCR(88 で30秒間、62 で30秒間、72 で1分間)、最終的な72 で10分間の伸長ステップを行った。小滴上の過剰の油は、手作業で取り除き、Qiagen Quick PCR精製キット(Qiagen、28106)の5x過剰の緩衝液PBを

50

加えることによって小滴を溶解し、PCR産物を製造業者の指示書に従って精製した。産物を、QiaQuickゲル抽出キット(Qiagen、28706)を使用して1%アガロース上で600~1200bpにサイズ選択し、40 $\mu$ l EB緩衝液中に溶出した。

#### 【0092】

実施例2.3：自然対合可変領域遺伝子を含むs c F vの増幅

VH-in-FとVK-in-R又はVL-in-Rのいずれかとの混合物(1:50希釈、表2)を使用して、1 $\mu$ lの鋳型としての精製RT-PCR産物、3 $\mu$ lの希釈プライマーミックス、1.5 $\mu$ lの10xHiFi Platinum PCR緩衝液、0.3 $\mu$ lの10mM dNTP、0.6 $\mu$ lの50mM MgSO<sub>4</sub>及び0.06 $\mu$ lのHiFi Platinum Taq(Invitrogen、11304-011)からなる15 $\mu$ l反応物におけるネステッドPCR増幅を行った。サイクリング条件は、94で2分間の初期変性ステップ、次いで45サイクルのPCR(94で15秒間、61で30秒間、68で60秒間)、及び68で10分間の最終的な伸長ステップからなっていた。産物を、QiaQuick PCR精製キットを使用して精製し、40 $\mu$ l EB緩衝液中に溶出した。

10

#### 【0093】

実施例3：単一のハイブリドーマ細胞の封入

単一細胞の封入を証明するために、100万の Mausハイブリドーマ細胞の2つのアリコート、Cell Tracker染料(Invitrogen、C34552及びC7025)を使用して製造業者の指示書に従って赤色又は緑色蛍光で染色した。染色細胞をPBS中に再懸濁し、上述した条件を用いて、RT-PCRミックスをPBSに置き換えて封入した。小滴を6ウェル皿内に収集し、Evos FL自動細胞画像化システム(Invitrogen)を使用して倍率200xで画像化した。

20

#### 【0094】

400万細胞/mlの密度は、およそ100 $\mu$ mの直径の小滴内への殆どの単一細胞の封入に最適であることが見出された(図2)。この工程中、多数の空の小滴が生成したが、鋳型細胞が存在しないため、これらはs c F vライブラリーに寄与しなかった。

#### 【0095】

実施例4：注射器及び圧力ポンプを使用した小滴安定性の比較

小滴安定性の改善を測定するために、2つの方法を使用して、Mausハイブリドーマ細胞及びRT-PCR緩衝液を用いて小滴を生成した。第1の方法は、2つの注射器ポンプ(Razel R-99)を使用して、それぞれ水性及び油流体をマイクロ流体チップに供給した。水性流体は、1mL注射器内に装填され、単一のポンプから0.5 $\mu$ l/分で同時に分配された一方、油：界面活性剤溶液は、3mL注射器内に装填され、別個のポンプから1.5 $\mu$ l/分で分配された。第2の方法は、パルスレス圧力ポンプを使用する上述されたものであった。0.5 $\mu$ lエマルジョンを96ウェルマイクロタイタープレートに移し、倍率25xで画像化して合体及び小滴均一性に関して調べた。次いで、エマルジョンを45サイクルのRT-PCR(上述したような)に供し、再度画像化した。

30

#### 【0096】

最適化PCR条件及び賦形剤は、単分散小滴を生成すると共に安定性の増大に寄与した(図7)。

40

#### 【0097】

実施例5：免疫レプリカ技術によるs c F vの自然鎖対合の検証

RT-PCR中の単一細胞の封入及び小滴安定性の達成における最適化を試験するために、1次ヒト細胞とMausB細胞との混合物を使用し、プライマーセットをC<sub>H1</sub>及びC領域を増幅及び連結するように設計した。

#### 【0098】

より詳細には、健康なドナー由来の1次ヒトB細胞を、上述したように処理及び刺激した。MausB細胞単離キット(StemCell Technologies、1985

50

4) を使用して、製造業者の指示書に従って1次マウスB細胞を脾細胞から単離した。これらの細胞を、ヒトB細胞と同一の条件で、me g a C D 4 0 LをマウスC D 4 0 L ( E n z o、L X - 5 2 2 - 1 2 0 - C 0 1 0 ) 及びマウスI L 2 1 ( 内部で製造 ) に置き換えて刺激した。48時間刺激細胞を1:1比で組み合わせ、10,000の細胞を上述したように封入した。10,000の細胞を封入なしで直接RT-PCRミックス中に組み合わせることにより、並行「開放」反応を行った。上述したように、RT-PCR及びネステッドPCRを使用してScFv-様アンプリコンを生成し、プライマーセットは、C<sub>H1</sub>及びC領域を増幅及び対合するように設計された。

#### 【0099】

可変領域の代わりに定常領域を使用することにより、予想されるアウトプットの複雑性を高く低減し、4つの可能性：対合断片(hC<sub>H1</sub>-hC及びmC<sub>H1</sub>-mC)を有する2つのアンプリコン、及びスクランブル断片(hC<sub>H1</sub>-mC及びmC<sub>H1</sub>-hC)を有する2つのアンプリコンのみとし、これらは、特異的プライマーを用いネステッドPCRによって容易に検出することができ、Sangerシーケンシングによって確認された。予想通り、開放反応を用いて全ての可能な産物が特定されたが、印象的なことに、免疫レプリカ技術は、正確に対合したアンプリコンのみを生成した(図4)。これは、鎖対合が小滴内で維持される証拠を提供する。

10

#### 【0100】

実施例6:1次ヒトB細胞からの抗原特異的scFvの単離

実施例6.1:共通抗原に対する血清力価の決定

20

2人の健康なドナー(642及び432)由来の血清を500xgで10分間の全血の遠心分離によって単離した後、ELISAブロッキング緩衝液(PBS中、3%無脂肪ミルク-Bio-Rad、106404XTU+0.1%Tween-20-BDH、BDH4210)中で希釈した。カンジダ・アルビカンス(C.albicans)マンナン及びインフルエンザ赤血球凝集素(South Dakota)抗原を社内で生成し、96ウェル高結合プレート(Corning、3690)上に4µg/mlで被覆し、4で一晩インキュベートした。プレートをELISAブロッキング緩衝液で2時間ブロックした後、ELISA洗浄緩衝液(PBS+0.05%Tween-20)で3回洗浄し、段階希釈の血清と共に1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、結合IgGを1:10,000希釈の抗ヒトFc-HRP(Jackson Labs、109-035-098)で5分間にわたるTMB展開(KPL、52-00-04)によって検出した。等量の1M塩酸を加えて反応を停止させた後、450nmでの吸光度を測定することによって比色分析を行った。

30

#### 【0101】

両方のドナーは、2つの共通治療的標的：インフルエンザ赤血球凝集素(H1、South-Dakota変異体)及びカンジダ・アルビカンス(C.albicans)マンナンに対する中程度の血清力価を有した(図8)。

#### 【0102】

実施例6.2:抗原特異的scFvの単離

免疫レプリカ技術を検証するために、単一細胞の封入を有する及び有さない1次ヒトB細胞から生成されたライブラリーの直接比較を行った。

40

#### 【0103】

2人の健康なドナー(642及び432)の各々に関して、およそ10,000の1次B細胞を、上述したようなヒト可変遺伝子増幅及び鎖対合のための完全セットのプライマーと共に封入した(「em」)。並行して、可変遺伝子対合がスクランブルされることが予測される、封入されていない(開放(「op」)反応)10,000の1次B細胞を使用して各ドナーに関する参照ライブラリーも生成した。

#### 【0104】

RT-PCR及びネステッドPCR増幅後、ELISAによる高スループットスクリーニングのために、scFvアンプリコンバンドを、NotI/SfiI(New Eng

50

land Biolabs cat no R0189S及びR0123S)を用いて scFv-Fc 発現ベクター内にサブクローニングした(図5)。

#### 【0105】

4つのライブラリー(642-em、642-op、432-em及び432-op)からの形質転換体を、2xYT寒天+100µg/mlカルベニシリン+2%ブドウ糖(Teknova、Y6260)を含有するQtrays上に蒔き、各々について1,408のコロニーを、60ul LB+100µg/mlカルベニシリン(Invitrogen、10177-012)+2%ブドウ糖(Teknova、G0535)を含む384ウェルプレート内に採集し、37で一晚増殖させた。5µlの一晚培養物を使用して、250µl再構成Magic Media(Invitrogen、K6803)+100µg/mlカルベニシリンを含む384深ウェルプレートに接種し、25で3日間にわたり増殖させた。3日後、培養物を1:10希釈のPopCulture試薬(Novagen、71092)+1:10,000希釈のDNAse I(Invitrogen、18047-019)で処理し、デブリを4000xgで15分間の遠心分離によって排除した。ブロックステップがPBS中の3%BSA(Sigma、7030)+0.05%Tween-20(BDH、BDH4210)を使用した以外、上述したようにELISAによって抗原結合を行った。抗体は抗原特異的と思われ、シグナルは平均背景シグナル+背景標準偏差の20倍よりも大きかった。ヒットは、抗体をグリセロールストックから再発現させ、ELISAを繰り返すことによって検証された。

10

#### 【0106】

固定化抗原に対する結合に関してスクリーニングした5,632のコロニーのうち、赤血球凝集素に対する5つの結合剤、及びマンナンに対する1つの結合剤が特定された(表3)。大部分のヒット(5/6)が小滴ライブラリーに由来し、自然鎖対合を保存することにより、コンビナトリアルライブラリーの構成中に損失され得るクローンの特定が容易になることが示唆された。

20

#### 【0107】

実施例6.3:V/J生殖系列多様性のディープシーケンシング分析

並行して、封入及び開放ライブラリーのレポーターをペアエンドIllumina MiSeqディープシーケンシングによって特徴付けた。

#### 【0108】

scFvアンプリコンはMiSeqディープシーケンシングには大き過ぎるため、別個のV<sub>H</sub>及びV<sub>K/L</sub>断片を、特異的プライマーセットを使用して増幅した(表1)。iV<sub>H</sub>-in-F/iV<sub>H</sub>-in-R、iV<sub>K</sub>-in-F/iV<sub>K</sub>-in-R及びiV<sub>L</sub>-in-F/iV<sub>L</sub>-in-R(1:50希釈、表2)の混合物を使用して、1µl鋳型、3µl 1:50希釈のプライマーミックス(V<sub>H</sub>-in-F+V<sub>L</sub>-in-R)、1.5µl 10x HiFi Platinum PCR緩衝液、0.3µl 10mM dNTP、0.6µl 50mM MgSO<sub>4</sub>及び0.06µl HiFi Platinum Taq(Invitrogen、11304-011)からなる15µl反応物におけるネステッドPCR増幅を行った。サイクリング条件は、94で2分間の初期変性ステップ、その後の45サイクルのPCR(94で15秒間、61で30秒間、68で60秒間)、及び68で10分間の最終的な伸長ステップからなっていた。産物をMiSeq 2x250bpペアエンドシーケンシング(SeqMatic)のために提出した。生の読み取りデータを、FASTQファイルの報告された品質スコアに基づいて品質フィルタリングした。独特の読み取りデータをIMGT V及びJ遺伝子生殖系列配列にマッピングして、小滴内での増幅の結果として導入された可能性がある任意のバイアスを決定した。

30

40

#### 【0109】

開放ライブラリーにおいて検出された全遺伝子ファミリーは、封入ライブラリーの範囲内でも非常に類似した割合で特定され、小滴増幅はレポーターを偏らせないことが示唆された(図6)。

50

## 【0110】

実施例7：免疫レプリカライブラリーのスループットを増大させるための工程最適化

免疫レプリカ技術のスループットを $10^6$ 細胞を増大させるために、粘度がより低い油担体（フッ素化油）を使用してより高い流速の使用を可能にした。ViCellで計数された $10^6$ 細胞は、30～40分間で問題なく封入された。

## 【0111】

RT-PCR構成成分、細胞封入緩衝液及びマイクロ流体の流速を更に最適化して、 $10^6$  B細胞から小滴を生成し、この小滴は、RT-PCR中の安定性が改善され、サイズが均一であった。

## 【0112】

実施例8：組換えヒトB細胞レパートリーは、稀な特異的且つ自然対合抗体に関するスクリーニングを可能にする

以下に記載する方法は、200万の1次B細胞を、次世代シーケンシングによる対合レパートリーのプロファイリングの能力をなお維持しながら、直接濃縮され及び機能に関してスクリーニングされ得る自然対合の発現可能なライブラリーに保存することを示す（図1）。これは、B細胞をピコリットルサイズの小滴（およそ200pLの体積）内に封入することによって達成され、それらの同族V遺伝子は、インフレームで融合されてscFvカセットを形成する。100万のB細胞が40分以内に封入され得るように、ガラスマイクロ流体チップを圧力ポンプと共に使用して均一サイズの小滴を高速で確実に生成した。

## 【0113】

この手法の能力は、2人の健康なドナーの末梢血細胞から自然対合ファージ-ディスプレイライブラリーを構成することによって証明され、これは、選択が複数のインフルエンザ赤血球凝集素（HA）サブタイプに対する抗体交差反応性へ推進されることを可能にした。

## 【0114】

全血単離から18の独特の抗HAモノクローナル抗体への前進は、4週間以内に達成された。これらの抗体の6つは、インフルエンザA（グループ1及び2）及びB系列からの10個の異なるサブタイプに対して交差反応性を示した1つを含み、複数のHAサブタイプに対して交差反応性であった。これらの抗体配列の圧倒的多数は、対合レパートリーの次世代シーケンシングによって検出されず、この方法が、既存の技術によって見出される可能性が低い非常に稀なリードをどのように単離できるかを示している。

## 【0115】

実施例8.1：スループットを増大させるための最適化工程を使用した、1次ヒトB細胞の対合免疫グロブリンレパートリーの、発現可能なフォーマットへの保存

対合免疫グロブリンレパートリーを発現可能なフォーマットに保存するために、全ての既知のヒトV及びJ遺伝子のマルチプレックス増幅のためのプライマーセットを、実施例1に記載したようにIMGTコンセンサス配列から計算的に設計した。合計で92プライマーを設計して、scFv生成のために適切なオーバーハングを有する542の機能的ヒトV及びJアレルを増幅した（表5）。

## 【0116】

健康なドナーからの総B細胞を単離し、上記の実施例に記載したように刺激した。メモリーB細胞単離のために、ヒトスイッチ（Switched）メモリーB細胞単離キット（Miltenyi Biotec）を更に使用する。

## 【0117】

200万のB細胞を2人の健康なドナーの血液から別々に単離した：ドナー1からの総B細胞、及びドナー2からのIgG<sup>+</sup>/IgA<sup>+</sup>スイッチメモリーB細胞。

## 【0118】

各ドナーに関して細胞をPBS中で洗浄し（700gで3分間）、半分に分割した。

## 【0119】

10

20

30

40

50

100万の細胞を最適化RT-PCRミックスと共に封入して、自然対合アンプリコンライブラリー（「エマルションライブラリー」）を生成した。詳細には、100万の細胞を封入緩衝液：1：1，000希釈の抗凝集剤（Invitrogen、01-0057AE）及び16% OptiPrep密度勾配培地（Sigma、D1556）を含有する低浸透圧電気融合緩衝液（Eppendorf、940002001）中に再懸濁した。

#### 【0120】

細胞を2xRT-PCRマスターミックスと共に1：1比で封入した。各セット内のプライマーを等量で混合し、最適化された濃度の各セットをRT-PCRミックスに加えた。典型的な2xマスターミックスは、139nM VH-out-F、416nM VL-out-R、39nM VH-in-R及び13nM VL-in-F（表3）、2x One Tube RT-PCR反応緩衝液（Roche cat no 11855476001）、4% Titan One Tube RT-PCR酵素ミックス（Roche、11855476001）、18.2% Q溶液（Qiagen、210212）、0.4mM dNTP（Invitrogen、18427013）、10mM DTT（Roche、11855476001）及び120単位RNaseOUT（Invitrogen、10777019）から構成されていた。

10

#### 【0121】

OB1流量制御器（Elveflow、MKII）を使用して流体を揚送して、2-試験小滴生成親フッ素性チップ（Dolomite、3200510）上で封入を行った。細胞及びRT-PCRミックスの水性液体をそれぞれ30mbarで揚送した一方、HFE-7500フッ素化油+2%w/v 008-フルオロ-界面活性剤（RAN Biotechnologies、008-FLUOROSURFACTANT-HFE7500）を67mbarで揚送し、圧力を水性流体の1：1ミックスが得られるように微調整した。得られたエマルションをPCRストリップチューブ内に画分で収集し（約40μlエマルション/画分）、鉱物油で覆った。過剰のフッ素化油を取り除いて、全体の体積を100μlに維持した。

20

#### 【0122】

この方法を用いて、100万のB細胞を40分以内で封入できることが見出された。この方法により、均一サイズの小滴を高速で確実に生成することが可能となる。

30

#### 【0123】

残りの100万の細胞を使用して、コンビナトリアルscFvライブラリー（「コンビナトリアルライブラリー」）を構築した。詳細には、100万の細胞を、RNeasy RNA単離キット（Qiagen）を使用して製造業者の指示書に従って全RNAに関して処理した。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>配列が別々に増幅された後、オーバーラップ伸長PCR（同じプライマーセットを使用して）によって対合したことを除いて、エマルションの場合と同じマスターミックスを使用して、250ngの総RNAをRT-PCRに使用した。

#### 【0124】

実施例8.2：自然対合V遺伝子含有するscFvの増幅

50で30分間の逆転写、次いでRTの熱失活/88で2分間のTaqポリメラーゼの賦活化により、封入及びコンビナトリアルライブラリーを形成した。続いて、45（エマルション）又は35（コンビナトリアル）サイクルのPCR（88で10秒間、62で30秒間、68で45秒間）及び最終的な68で7分間の伸長ステップを行った。小滴の下方の過剰の油は、手作業で取り除き、等量のPico-Break 1（Dolomite）を使用して小滴を化学的に合体させた。増幅したDNAを、QIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を使用して2%アガロース上でサイズ選択した。

40

#### 【0125】

いくつかのグループにより、細胞ベースのRT-PCRは、5nL未満の体積で実行できないと報告されているが（DeKosky, B. J. et al., Nat. Biotechnol. (2013), 31:166-169; DeKosky, B. J. et

50

al., Nat. Med. (2015), 21: 86-91; White, . K. et al., Proc. Natl. Acad. (2011), 108: 13999-14004; Eastburn, D. J. et al., PLoS ONE (2013), 8: e62961; これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)、この方法は、およそ200 pLの体積の小滴内で細胞からIg転写産物を直接増幅できることが見出された。

#### 【0126】

両方のケースは、(5'から3'へ) V<sub>H</sub> リーダー配列、V<sub>H</sub>、(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> リンカー、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>のN末端の部分からなる連結産物をもたらした。次いで、この産物を、V<sub>H</sub> FR1及びV<sub>L</sub> FR4特異的プライマーセットを用いたネステッドPCRの鑄型として使用して、完全長scFvアンプリコンライブラリーを生成した(図13A)。

10

#### 【0127】

保存されたレパートリーの深度評価を得るために、ネステッドPCRプライマーは、Illumina MiSeq上での次世代シーケンシングを可能にするバーコード化オーバーハングを含有した(図13A)。

#### 【0128】

ネステッドPCR増幅は、25%精製RT-PCR産物、100 nM V<sub>H</sub>-in-F及びV<sub>L</sub>-in-Rプライマープール(表5)、1x HiFi Platinum PCR緩衝液、0.15 mM dNTP、1.5 mM MgSO<sub>4</sub>及び0.6単位HiFi Platinum Taq (Invitrogen)からなっていた。サイクリング条件は、94 で2分間の初期変性ステップ、その後の50サイクルのPCR(94 で30秒間、55 で30秒間、68 で60秒間)、及び68 で10分間の最終的な伸長ステップからなっていた。産物を再度上記のようにサイズ選択した。

20

#### 【0129】

共通のフォワード(Illu\_\_scaleup\_\_F)及びバーコード化リバープライマー(Illu\_\_R\_\_N50X)を使用して最終的な規模拡大PCRを行って、ライブラリー構成及びIlluminaシーケンシングを可能にした(表6)。本発明者らは、Q5ポリメラーゼ(NEB)を製造業者の指示書に従って使用し、以下のサーモサイクリングプログラムを使用した: 98 で2分間、98 で10秒間及び72 で30秒間の12~20サイクル、72 で2分間。

30

#### 【0130】

実施例8.3: 次世代シーケンシング及びバイオインフォマティクス分析

各バーコード化ライブラリーを850 bpにサイズ選択し、等量で組み合わせ、カスタムプライミング手法(SeqMatic)を使用した2x300 bp MiSeqシーケンシングに供した。カスタムプライミング戦略は、FR4、CDR3及びFR3からなるV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>の3'末端の対合300 bp読み取りデータを得るように設計された(図14)。R1及びR2プライマー(表6)を、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>配列を生成するために使用した一方、標準的なIllumina P5プライマーをインデックス読み取りのために使用した。V<sub>L</sub>読み取りは、コンストラクトの3'末端に導入したプライミング部位を使用して得られたが、V<sub>H</sub>読み取りは、(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>リンカー配列にアニーリングされた内部プライマーを必要とした(表6)。

40

#### 【0131】

デマルチプレキシング後、生のFastq読み取りデータを、FastQCを使用して品質フィルタリングし、Illumina Fastq IDによって対合し、IMGT V及びJ遺伝子にアラインし、Kabata定義に従って注釈をつけて(Lloyd, C. et al. Protein Eng. Des. Sel. PEDS (2009) 22: 159-168; これは参照により本明細書に組み込まれる)、CDR3配列を抽出した。続いて、CDRH3及びCDRL3配列を連結し、アミノ酸アイデンティティが92%を超える場合、クラスタリングした。

#### 【0132】

50

独特のCDRH3及びCDRL3配列を計数し、各々の独特のV<sub>H</sub>と対合した独特のV<sub>L</sub>配列の数を対合効率の目安として計算した。複数のCDRL3と対合したCDRH3配列の場合、トップペア重量は、最も豊富なCDRL3と全CDRL3配列との数の比として決定した(DeKosky, B. J. et al., Nat. Med. (2015), 21: 86-91; これは参照により本明細書に組み込まれる)。全部で266, 344及び2, 666, 926の独特のCDRH3:CDRL3クラスターがそれぞれ2つのエマルジョン及びコンビナトリアルライブラリーに関して回収された(表7)。

#### 【0133】

エラー訂正漸近Chao豊かさ推定器(Chiu, C.-H. & Chao, Peer J (2016), 4: e1634; これは参照により本明細書に組み込まれる)を使用してクラスタリングパラメーターを検証し、シーケンシングアーチファクトに関して調整したアンプリコンライブラリーの算出された多様性は、観察されたクラスター数に非常に近いことが見出された。これは、クラスタリングパラメーターが真に独特の配列の損失を最小限にする一方、シーケンシングエラーに関して確実に訂正した証拠を提供する。

10

#### 【0134】

実施例8.4: 抗体の自然鎖対合の検証

実施例8.4.1: マウス及びヒトB細胞混合物を使用した検証

単一細胞の封入及び同族鎖対合の達成に対するこの手法を検証するために、1次ヒト及びマウスB細胞を単離し、実施例5に記載したように刺激した。等量の1次刺激マウス及びヒトB細胞を混合し、この混合物からの10, 000の細胞を実施例8.1に記載したように封入した。

20

#### 【0135】

10, 000の細胞を封入なしで直接RT-PCRミックス中に組み合わせることによって並行「コンビナトリアル」反応を行った。RT-PCR及びネステッドPCR条件は、実施例8.2に記載した通りであり、プライマーセットをC<sub>H1</sub>及びC領域を増幅及び対合するように設計した(表3)。

#### 【0136】

予想通り、コンビナトリアルフォーマットは、全ての可能な産物を生成したが、際立ったことに、封入によって自然対合アンプリコンのみが生成された(図4b)。

30

#### 【0137】

実施例8.4.2: スパイクイン実験によるscFvの自然鎖対合の検証

健康なドナーの血液から単離された100万の総B細胞を10, 000のIM-9細胞(1%)と混合した後、最適化されたRT-PCRミックスと共に封入して、(5'から3'へ)V<sub>H</sub>リーダー配列、V<sub>H</sub>、(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>リンカー、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>のN末端の部分からなる自然対合アンプリコンライブラリーを生成した。次いで、この産物を、V<sub>H</sub>FR1及びV<sub>L</sub>FR4特異的なプライマーセットを用いたネステッドPCRの鋳型として使用して、完全長scFvアンプリコンライブラリーを生成した(図13A)。

#### 【0138】

正確な鎖対合の更なる検証として、IM-9 CDRH3配列(RRGVTDI DPF DI; IM9-CDRH3-Fwd)に特異的なプライマーを一般的なリバースプライマー(R1、表6)と共に使用して、IM-9重鎖と対合する全V<sub>L</sub>配列を増幅した。得られたアンプリコンをクローン化し、Sangerシーケンシングによって分析し、この分析は正確な対合を示し、97/101コロニーにおいて既知のIM-9 V<sub>L</sub>(QHYNRPWT)を有した(96%対合精度)。これにより、競合B細胞の圧倒的存在量を用いても、本方法は、正確な鎖対合を維持することが確認された。

40

#### 【0139】

実施例8.4.3: 各CDRH3配列と対合する独特のCDRL3配列の数の決定

免疫レプリカシステムが鎖対合を保存することのなお更なる検証として、各CDRH3配列と対合した独特のCDRL3配列の数を決定した。

#### 【0140】

50

予想通り、コンビナトリアルライブラリーは、各CDRH3配列が中央値5~9の独特のCDRL3配列と対合された雑多な対合を示した(図13B、表7)。シーケンシング深度( $10^6$ )は、コンビナトリアルライブラリー( $10^{12}$ )の理論的な配列多様性を大きくアンダーサンプルすることを仮定すれば、コンビナトリアル対合の真の率は、相当より高い可能性があるであろう。これは、中央値1:1 CDRH3/CDRL3対合であり、狭い分布が観察されたエマルジョンライブラリーに対する著しい対照であった。複数の対合が検出された場合、トップペア分析は、 $V_H - V_L$ 対合における95%~98%精度を決定した(図13C)。トップペア方法は、シーケンシングのみに好適であり、スクリーニングに好適でないアンプリコンを生成する以前公表された方法において、同族鎖対合を検証するのに使用されている(DeKosky, B. J. et al., Nat. Med. (2015), 21: 86-91; これは参照により本明細書に組み込まれる)。しかしながら、同様のシーケンシング深度及び出発細胞数を使用して、対合効率は、本方法を用いると有意により良好であることが見出された( $p < 0.007$ 、図15及び表8)。

#### 【0141】

##### 実施例8.5: 封入された単一B細胞の画像化

B細胞をCellTracker Red CMTPX又はCellTracker Green CMFDA染料(Life Technologies)を使用して、製造業者の指示書に従って染色した。染色細胞をPBSに再懸濁し、上述した条件を用いて、RT-PCRミックスをPBSに置き換えて封入した。細胞溶解物を2つの方法で画像化した:(1)染色細胞を封入緩衝液に再懸濁し、RT-PCRミックスと共に封入し、50で5分間加熱した;(2)未染色細胞を2x SYBR-Green (Invitrogen)を含有するRT-PCRミックスと共に封入し、5分間で50に加熱した。小滴を $\mu$ -Slide<sup>0.1</sup>チャンネルスライド(Ibidi)内に収集し、Evos FL自動細胞画像化システム(Invitrogen)を使用して倍率200xで画像化した。

#### 【0142】

RT-PCR緩衝液の添加と50でのインキュベーションによって生じた堅牢な細胞溶解物を、Trypan Blue染色(図10)並びにSYBR-Greenによる細胞質染色及び核材料の放出の検出(図11)によって観察した。

#### 【0143】

実施例8.6: ファージディスプレイライブラリー構成及び抗赤血球凝集素抗体の濃縮原理の証明として、scFvライブラリーを使用して、インフルエンザ赤血球凝集素、ヒトが通常暴露される抗原に対する抗体を単離した。

#### 【0144】

##### 実施例8.6.1: scFvライブラリーを使用した抗体の単離

エマルジョン及びコンビナトリアルライブラリーをファージミドベクターにバルクサブクロニングして(Vaughan, T. J. et al., Nat. Biotechnol. (1996), 14: 309-314; これは参照により本明細書に組み込まれる)、 $1 \times 10^8$ の形質転換体にわたるファージ-ディスプレイライブラリーを構成した。

#### 【0145】

詳細には、エマルジョン及びコンビナトリアルアンプリコンライブラリーを、Not1/Sfi1制限酵素(NEB)を使用してファージミドベクター(pCANTAB6)にサブクロニングし、ファージディスプレイライブラリーをVaughan, T. J. et al., Nat. Biotechnol. (1996), 14: 309-314(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように生成した。4つのライブラリーの各々からの96のコロニーを対数中期(mid-log)まで培養し、M13-K07(Invitrogen)で感染させて一晚モノクローナルファージ生成を開始した。抗体ディスプレイをELISAによって決定した。 $1 \mu\text{g/ml}$ 抗myc抗体(Invitrogen)を96ウェルMAXISORPプレート(Nunc)上に一晚固定化し

10

20

30

40

50

、3% BSA (Sigma) 及び0.05% Tween-20 (BDH) で2時間ブロックした。PBST (PBS pH7.2 (Invitrogen) + 0.05% Tween-20) で洗浄した後、希釈ファージ上清を結合させ、抗M13-HRP抗体(1:5000、GE Healthcare) を使用して検出し、TMB (KPL) によって可視化した。scFvに融合されたmyc tagに対するモノクローナルファージELISAは、ライブラリーがほぼscFvを良好に表示し、ポジティブディスプレイがクローンの90~99%に関して見られたことを示した(表9)。

【0146】

組換え赤血球凝集素タンパク質をBenjamin, E. et al., J. Virol. (2014), 88:6743-6750 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように発現させ且つ精製した。使用したHAタンパク質は、以下の通りである: H1 CA/09、/California/07/2009 H1N1; H1 SD/07、A/South Dakota/06/2007 H1N1; H2 MO/06、A/Swine/Missouri/2006 H2N3; H5 VN/04、/Vietnam/1194/2004 H5N1; H6 HK/97、A/teal/Hong Kong/W312/97 H6N1; H9 HK/97、A/chicken/Hong Kong/G9/97 H9N2; H3 PE/09、A/Perth/16/2009 H3N2; H7 NL/03、A/Netherlands/219/2003 H7N7; B FL/06、B/Florida/04/2006 Yamagata lineage; B BR/08、B/Brisbane/60/2008 Victoria lineage)。

10

20

【0147】

4つのライブラリーを、使用済みの75 nMビオチン化赤血球凝集素H1 (A/California/07/2009 H1N1) を使用して、Vaughan, T. J. et al., Nat. Biotechnol. (1996), 14:309-314 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように2ラウンドの濃縮に供した。

【0148】

ファージとのインキュベーション前に、固定化ニュートラアビジン (Thermo Fisher Scientific) を使用して特定のビオチン化抗原を捕捉して、増幅されたファージアウトプットをポリクローナルELISAによってプロファイリングした。ポリクローナルファージELISAは、B細胞源に関わらず、特異的赤血球凝集素H1結合剤に関する堅牢な濃縮を確認した(図16A及び16B、図17)。注目すべきことに、コンビナトリアルライブラリーが全体的により強力な特異的濃縮を示した一方、濃縮されたクローンのモノクローナルシーケンシングは、対応するエマルジョンライブラリー(2.9%、図18)と比較してIGHV1-69生殖系列配列に関する強いバイアス(90%)を示した。

30

【0149】

抗体を含有するIGHV1-69は、重鎖相互作用のみを介してグループ1赤血球凝集素サブタイプに接触できることが以前に示されているため(Pappas, L. et al., Nature (2014), 516:418-422; これは参照により本明細書に組み込まれる)、コンビナトリアルライブラリーの濃縮は、細菌内で良好に発現されるか又は折り畳まれるIGHV1-69に対するV<sub>L</sub> パートナーの選択によって推進されたことが示唆される。これは、コンビナトリアルライブラリーを用いた際の重要なバイアスを強調するものである。

40

【0150】

実施例8.6.2: 交差反応性抗体に関する特異的濃縮

交差反応性抗体を特異的に濃縮するために、第1ラウンドのアウトプットを非循環性グループ1サブタイプ、インフルエンザA赤血球凝集素H5 (75 nM、/Vietnam/1203/2004) に関してエマルジョンライブラリーからパニングした。

【0151】

50

濃縮されたライブラリーを、Not1/Sfi1制限酵素(NEB)を使用してscFv-Fc発現ベクター(Xiao, X. et al. PLoS ONE (2015), 10:e0140691;これは参照により本明細書に組み込まれる)にバルクサブクローニングし、化学的にコンピテントなトップ10細胞(Invitrogen)に形質転換した。単一のクローンを、100µg/mlカルベニシリン(Invitrogen)及び2%ブドウ糖(TekNova)を含有するLB中で一晚増殖させた後、100µg/mlカルベニシリン(Invitrogen)を含有する再構成Magic Media(Invitrogen)中で1:500に希釈した。細胞を25で72時間誘導し、遠心分離によってペレット化した。希釈した上清を使用し、抗Fc-HRP2次抗体(Jackson ImmunoResearch)を使用して、上述したようにELISAによって抗原反応性を決定した。シーケンシング後、独特のクローンをHEK-293 Freestyle細胞内で6日間発現させ、上清を使用してELISAによる結合を確認した。

10

#### 【0152】

スクリーニングした5,632のクローンのうちの320のクローンが、18の独特の配列からなるH1に対する特異的結合を示した。これは、6つの独特の抗体を含み、この抗体は、パニングに使用した両方の抗原に対する交差反応性を示した(図16C)。驚くべきことに、これらの抗体(IGHV1-18/IGLV1-44)の1つは、A(グループ1及び2)及びインフルエンザBの両方の系列(Yamagata及びVictoria)からのサブタイプを含む、試験した10のHAサブタイプの全部に対する特異的結合を示し、16nM~51nMの範囲の比較的類似したEC50値を有した(図16D)。このような普遍的な抗インフルエンザ抗体は、極めて稀であると考えられ、長い間探し求められてきたが、コンビナトリアルファージディスプレイによって1度特定されたのみである(Dreyfus, C. et al. Science (2012), 337:1343-1348;これは参照により本明細書に組み込まれる)。使用した健康なドナーサンプル中のそのような抗体の存在は予想外であったが、レパトリーの深い発掘によってこの抗体を単離する能力は、本方法の能力を示すものである。

20

#### 【0153】

実施例8.6.3:CDRH3:CDRL3対合によって確認されたヒットの相対的頻度  
保存されたB細胞レパトリーにおけるヒットの相対的頻度を確認するために、そのCDRH3:CDRL3対の各々を次世代シーケンシングデータセット内で探し、最大で4つのアミノ酸ミスマッチが、可能なシーケンシング誘導による突然変異を構成することを許容した。18の抗原特異的配列の1つのみが266,344の独特の対合配列クラスタの中で認められ、これは、残りのヒットが次世代シーケンシングではあまりにも稀であるために検出できないことを示唆する。この配列(0089EA-C02)は、4,956,249のマッピングされた読み取りデータの2つを占めた(表7)。選択後、このクローンは、スクリーニングされた5,632クローンのうちの32で繰り返され、濃縮は14,000倍であることが見出された。

30

#### 【0154】

自然ヒト抗体を表示する他のプラットフォームが同様に適用でき、本発明者らがそのような代替的ディスプレイシステムを明確に想定していることが当業者によって認識されるであろう。例えば、酵母ディスプレイシステムは、レパトリー内に存在する可能性があるが、細菌内のヒト抗体の発現及び折り畳みの相違によって選択されなかった更なる抗原特異的配列の特定を可能にし得る。

40

#### 【0155】

このプラットフォームは、遺伝子特異的プライマーからのPCRの成功に依存するため、プライマー結合部位内の抗体遺伝子変異型を、得られたライブラリーから排除することが可能である。等しい活性を有するが、より少ない突然変異を有する祖先抗体(Macagno, . et al. J. Virol. (2010), 84:1005-1013;これは参照により本明細書に組み込まれる)が依然として捕捉される可能性がある。

50

## 【 0 1 5 6 】

それにも関わらず、このリードの特定のセットは、シーケンシング情報のみでは予測されなかった可能性がある。次世代シーケンシングによって決定されたこれらのリードの希少性が元の B 細胞プール内で表す範囲では、これは、これらのリードが個々の B 細胞の培養及びスクリーニングの標準的な方法を介して見出され得なかったことを示唆する。

## 【 0 1 5 7 】

実施例 9：封入前の細胞溶解物は、小滴を RNA で汚染し得る

小滴内に取り込む前の死んだ又は死にかけている細胞からの遊離 RNA の封入は、自然対合ライブラリーの単離を妨害し得ると考えられた。特に、VH 又は VL 領域をコードする RNA は、小滴を汚染し、非自然対合産物をもたらす可能性がある。封入前の細胞溶解物が小滴を RNA で汚染するか否かを決定するために、48 時間刺激細胞を一般的な封入と同じ時間 (30 分間) インキュベートし、次いで上清又は細胞ペレット (正の対照) のいずれかから VH 領域のバルク RT-PCR を行った。水対照は、負の対照として含まれていた。

10

## 【 0 1 5 8 】

結果は、有意な量の RNA が細胞から放出されることを示す (図 12)。

## 【 0 1 5 9 】

この問題を緩和する方法には、刺激時間の短縮、生細胞のより厳格な選択 (例えば、FACS、ビーズベースの)、及びオリゴ被覆磁気ビーズを使用した RNA の隔離が含まれる。

20

## 【 0 1 6 0 】

実施例 10：理論的な単一細胞の封入百分率

理論的には、単一の小滴内に封入される細胞の数は、細胞と小滴の比が 1 : 10 と仮定すると、 $\lambda = 0.1$  のポアソン分布に従う。

## 【 数 1 】

$$p(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

式中、 $\lambda = 0.1$  である。

## 【 0 1 6 1 】

30

単一細胞の封入百分率は、単一細胞を有する小滴を、1 の細胞を有する小滴で除算する百分率として定義され、従って、確率は、以下のように計算することができる。

## 【 数 2 】

$$\frac{p(k=1)}{1-p(k=0)} = 95.08\%$$

## 【 0 1 6 2 】

細胞懸濁液の滴定は、10 個の小滴の各々に関しておよそ 1 個の細胞を達成し、これは、ポアソン統計に基づいて単一細胞の封入を > 95% の確率でもたらす (図 9)。

## 【 0 1 6 3 】

40

【表 1】

表 1

ミックス	名称	配列番号	配列
VH-in-R	VH_in_3_01	1	gagccacctccgcccgtaccgcccctccagaGGAGACGGTGACCCTGG
	VH_in_3_02	2	gagccacctccgcccgtaccgcccctccagaGGAGACAGTGACCAGGGTG
	VH_in_3_03	3	gagccacctccgcccgtaccgcccctccagaGGAGACGGTGACCAGGGT
	VH_in_3_04	4	gagccacctccgcccgtaccgcccctccagaAGAGACGGTGACCATTGTCC
VK-in-5	VK_in_5_01	5	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAATWGTGWTGACGCAGTCTCC
	VK_in_5_02	6	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtRACATCCAGATGACCCAGTCTC
	VK_in_5_03	7	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGCCATCCGATGACCCAG
	VK_in_5_04	8	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAG
	VK_in_5_05	9	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAACGACACTCACGCAGTC
	VK_in_5_06	10	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGACATCGTGATGACCCAGTCT
	VK_in_5_07	11	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAGATTGTGATGACCCAGACTCC
	VK_in_5_08	12	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGACATCCAGTTGACCCAGTCT
	VK_in_5_09	13	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGTCATCTGGATGACCCAGTCTC
	VK_in_5_10	14	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAATTTGTGTTGACACAGTCTCCA
	VK_in_5_11	15	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGATATTGTGATGACTCAGTCTCCAC
	VK_in_5_12	16	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCA
	VK_in_5_13	17	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAATTTGTAATGACACAGTCTCCAGC
	VK_in_5_14	18	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGCCATCCAGWTGACCCAGT
	VK_in_5_15	19	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGATATTGTGATGACCCAGACTCCA
	VL_in_5_01	20	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGRCTGTGCTGACYCAGG
	VL_in_5_02	21	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtTCCTATGAGCTGACTCAGCCA
	VL_in_5_03	22	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGTCTGTGCTGACGCAG
	VL_in_5_04	23	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGGCAGGGCTGACTCAG
	VL_in_5_05	24	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtAATTTTATGCTGACTCAGCCCC
VL_in_5_06	25	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtTCCTATGAGCTGAYRCAGCC	
VL_in_5_07	26	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCWGSCGTGTGCTGACTCAGC	
VL_in_5_08	27	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGCYTGTGCTGACTCAATCR	
VL_in_5_09	28	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGTCTGCCCTGACTCAGC	
VL_in_5_10	29	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGTCTGTSKTGACGCAGC	
VL_in_5_11	30	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGACTGTGCTGACTCAGGAG	
VL_in_5_12	31	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtCAGTCTGTGCTGACTCAGCC	
VL_in_5_13	32	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtTCTTCTGAGCTGACTCAGGACC	
VL_in_5_14	33	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtTCCTATGAGCTGACACAGCTAC	
VL_in_5_15	34	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtTCCTATGTGCTGACTCAGCC	
VH-out-F	VH_out_5_01	35	AAAAGGTGTCCAATGTGAGGTGC
	VH_out_5_02	36	AAGGAGTCTGTGCCGAGG
	VH_out_5_03	37	AAGGTGTCCAGTGTGAGGT

10

20

30

40

	VH_out_5_04	38	ACAGATGCCTACTCCCAGATG
	VH_out_5_05	39	AAAGCTGTCCAGTGTCCAGGT
	VH_out_5_06	40	CAGCAGCTACAGGTGTCCGA
	VH_out_5_07	41	AAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGT
	VH_out_5_08	42	GGTGGCAGCTCCAGATG
	VH_out_5_09	43	CTGACCACGCCTTCCTGG
	VH_out_5_10	44	GTGGCAGCTCCAGATGG
	VH_out_5_11	45	ATGGGGTGTCTGTCCACAG
	VH_out_5_12	46	AAGTGCCCACTCCCAGGT
	VH_out_5_13	47	GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTG
	VH_out_5_14	48	AGCAGCTACAGGCACCCA
	VH_out_5_15	49	CCATGGGTGTCTGTCCACA
	VH_out_5_16	50	ACAGGTGTCCACTCCCAGG
	VH_out_5_17	51	ACTGACTGTCCCGTCTGG
	VH_out_5_18	52	ACAGGTGCCCACTCCCAG
	VH_out_5_19	53	TGGTTDTTCCTCCTGCTGG
	VH_out_5_20	54	CCCCTCCACAGTGAGAGTC
	VH_out_5_21	55	ACAGGTGCCCACTCCCAAA
	VH_out_5_22	56	AGCTCCAGGTGCTCACTCC
	VH_out_5_23	57	CAGCCACAGGAGCCCACT
	VH_out_5_24	58	AGGTGTCCAGTGTCCAGGTG
	VH_out_5_25	59	CTGCTGACCATCCCTTCATG
	VH_out_5_26	60	CCTTGTGCTATTTTAAAAGGTGTCC
	VH_out_5_27	61	AAGGAGTCTGTCCAGGTG
	VH_out_5_28	62	CTGGCTGTAGCACCAGGT
VL-out-R	VK_out_3_01	63	CCACAGTTCGTTTRATHTCAS
	VL_out_3_01	64	AGAGGAGGGTGGGAACAGA
	VL_out_3_02	65	ACTTCCACTGCTCAGGGG
	VL_out_3_03	66	AACAGAGTGACCGAGGGG
	VL_out_3_04	67	AGAGGAGGGCGGGAACAG
VL-in-R	VK_in_3_01c	68	ctgtgctctgggccgcTTTGATCTCCASCTTGGTCCCTCCGCCGAAAGT
	VK_in_3_02c	69	ctgtgctctgggccgcTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAAGT
	VK_in_3_03c	70	ctgtgctctgggccgcTTTAATCTCCAGTCTGTCCCTTGGCCGAAAGT
	VK_in_3_04c	71	ctgtgctctgggccgcTTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGCCGAAAGT
	VL_in_3_01c	72	ctgtgctctgggccgcTAGGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAAAYAC
	VL_in_3_02c	73	ctgtgctctgggccgcGAGGRCBGTGAGCTGGGTGCCTCCTCCGAAACAC
	VL_in_3_03c	74	ctgtgctctgggccgcTAGGACGGTGACCTTGGTCCCAGTTCGGAAGAC
	VL_in_3_05c	75	ctgtgctctgggccgcGAGGACGGTCACCTTGGTGCCACTGCCGAAACAC
VH-in-F	VH_in_5_01	76	caagcagaagaaggcatalagagatggcccagccagccatggccCAGGTGCAGCTACAACAGTG
	VH_in_5_02	77	caagcagaagaaggcatalagagatggcccagccagccatggccCAGGTRCAGCTRCAGSAGT
	VH_in_5_03	78	caagcagaagaaggcatalagagatggcccagccagccatggccCAGGTACCTTGAAGGAGTCT

10

20

30

VH_in_5_04	79	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG
VH_in_5_05	80	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGGTGCAGTCTGGTGGAG
VH_in_5_06	81	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccGARGTGCADCTGGTGGAGT
VH_in_5_07	82	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGGTYCAGCTKGTGCAGT
VH_in_5_08	83	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGGTACAGCTGGTGGAGTC
VH_in_5_09	84	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCGGCTGCAGCTGCAGG
VH_in_5_10	85	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGA
VH_in_5_11	86	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccGAGGTGCAGCTGGTGCA
VH_in_5_12	87	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccSAGGTGCAGCTGTTGGAGT
VH_in_5_13	88	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccSAGGTCCAGCTGGTACAGTC
VH_in_5_14	89	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGGTACCTTBAGGGAGTC
VH_in_5_15	90	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCARATGCAGCTGGTGCAGT
VH_in_5_16	91	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGGTSCAGCTGGTGSAG
VH_in_5_17	92	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccGARGTGCAGCTGGTGSAG
VH_in_5_18	93	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCGGGTCACCTTGAGGGAG
VH_in_5_19	94	caagcagaagaaggcatacagagatggcccagcccgcccatggccCAGGTGCGGCTGCAGG

10

【 0 1 6 4 】

【表 2】

表 2

ミックス	名称	配列番号	配列
IVH_in_F	IVH_in_5_01	95	CAGGTGCAGCTACAACAGTG
	IVH_in_5_02	96	CAGGTRCAGCTRCAGSAGT
	IVH_in_5_03	97	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCT
	IVH_in_5_04	98	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG
	IVH_in_5_05	99	CAGGTGCAGTCTGGTGGAG
	IVH_in_5_06	100	GARGTGCADCTGGTGGAGT
	IVH_in_5_07	101	CAGGTYCAGCTKGTGCAGT
	IVH_in_5_08	102	CAGGTACAGCTGGTGGAGTC
	IVH_in_5_09	103	CGGCTGCAGCTGCAGG
	IVH_in_5_10	104	CAGSTGCAGCTGCAGGA
	IVH_in_5_11	105	GAGGTGCAGCTGGTGCA
	IVH_in_5_12	106	SAGGTGCAGCTGTTGGAGT
	IVH_in_5_13	107	SAGGTCCAGCTGGTACAGTC
	IVH_in_5_14	108	CAGGTACCTTGAGGGAGTC
	IVH_in_5_15	109	CARATGCAGCTGGTGCAGT
	IVH_in_5_16	110	CAGGTSCAGCTGGTGS A
	IVH_in_5_17	111	GARGTGCAGCTGGTGSAG
	IVH_in_5_18	112	CGGGTCACCTTGAGGGAG
	IVH_in_5_19	113	CAGGTGCCGCTGCAGG
IVH_in_R	IVH_in_3_01	114	GGAGACGGTGACCGTGG
	IVH_in_3_02	115	GGAGACAGTGACCAGGGTG
	IVH_in_3_03	116	GGAGACGGTGACCAGGGT
	IVH_in_3_04	117	AGAGACGGTGACCATTGTCC
IVK_in_F	IVK_in_5_01	118	GAAATWGTGWTGACGCAGTCTCC
	IVK_in_5_02	119	RACATCCAGATGACCCAGTCTC
	IVK_in_5_03	120	GCCATCCGGATGACCCAG
	IVK_in_5_04	121	GAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAG
	IVK_in_5_05	122	GAAACGACACTCACGCAGTC
	IVK_in_5_06	123	GACATCGTGATGACCCAGTCT
	IVK_in_5_07	124	GAGATTGTGATGACCCAGACTCC
	IVK_in_5_08	125	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
	IVK_in_5_09	126	GTCATCTGGATGACCCAGTCTC
	IVK_in_5_10	127	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCA
	IVK_in_5_11	128	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCAC
	IVK_in_5_12	129	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCA
	IVK_in_5_13	130	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGC
	IVK_in_5_14	131	GCCATCCAGWTGACCCAGT

10

20

30

40

IVK_in_R	IVK_in_5_15	132	GATATTGTGATGACCCAGACTCCA
	IVK_in_3_01b	133	TTTGATETCCASCTTGGTCCCTCCG
	IVK_in_3_02b	134	TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGCCCGA
	IVK_in_3_03b	135	TTTAATCTCCAGTCTGTGCCCTTGCCCGA
	IVK_in_3_04b	136	TTTGATATCCACTTGGTCCCGAGGCCGA
IVL_in_F	IVL_in_5_01	137	CAGRCTGTGGTGACYCAGG
	IVL_in_5_02	138	TCCTATGAGCTGACTCAGCCA
	IVL_in_5_03	139	CAGTCTGTGCTGACGCGAG
	IVL_in_5_04	140	CAGGCAGGGCTGACTCAG
	IVL_in_5_05	141	AATTTTATGCTGACTCAGCCCC
	IVL_in_5_06	142	TCCTATGAGCTGAYRCAGCC
	IVL_in_5_07	143	CWGSCTGTGCTGACTCAGC
	IVL_in_5_08	144	CAGCYTGTGCTGACTCAATCR
	IVL_in_5_09	145	CAGTCTGCCCTGACTCAGC
	IVL_in_5_10	146	CAGTCTGTSKTGACGCGAGC
	IVL_in_5_11	147	CAGACTGTGGTGACTCAGGAG
	IVL_in_5_12	148	CAGTCTGTGCTGACTCAGCC
	IVL_in_5_13	149	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACC
	IVL_in_5_14	150	TCCTATGAGCTGACACAGCTAC
	IVL_in_5_15	151	TCCTATGTGCTGACTCAGCC
IVL_in_R	IVL_in_3_01b	152	TAGGACGGTCAGCTTGGTCCCTCC
	IVL_in_3_02b	153	GAGGRDGGTCAGCTGGGTGCCTCCT
	IVL_in_3_03b	154	TAGGACGGTGACCTTGGTCCCAGTTC
	IVL_in_3_05b	155	GAGGACGGTCACCTTGGTGCCACTGCCGA

10

20

【 0 1 6 5 】

【 表 3 】

表 3

名称	配列番号	配列
Hs-CH1-out-F	156	AAGGGCCCATCGGTCTTC
Hs-CH1-in-F	157	CACCCCTCCTCCAAGAGCAC
Hs-CH1-in-R	158	gagccacctccgccgctaccgccgctccagaTCTTGTCCACCTTGGTGTTG
Hs-CK-in-F	159	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtGTGGCTGCACCATCTGTCT
Hs-CK-out-R	160	TCCCCTGTTGAAGCTCTTTG
Hs-CK-in-R	161	CTGTTGAAGCTCTTTGTGACG
Mm-CH1-out-F	162	CGACACCCCCATCTGTCTAT
Mm-CH1-in-F	163	CCCCCATCTGTCTATCCACT
Mm-CH1-in-R	164	gagccacctccgccgctaccgccgctccagaCAATTTTCTTGTCCACCTTGG
Mm-CK-in-F	165	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCTGTATCCATCTTCCCACCA
Mm-CK-out-R	166	ACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG
Mm-CK-in-R	167	GGGTGAAGTTGATGTCTTGTGA

30

40

【 0 1 6 6 】

【表4】

表4

ライブラリー	ドナー	採集した コロニー	結合剤	
			インフルエンザ HA-SD	カンジダ・アルビカンス ( <i>C. albicans</i> ) マンナン
小滴	432	1408	2	0
	642	1408	2	1
開放	432	1408	0	0
	642	1408	1	0
合計:		<b>5632</b>	<b>5</b>	<b>1</b>

10

【0167】

【表5】

表5

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
VH_in_3_01	1	gagccaacctccgcccgtaccgcccgtccagaGGAGA CGGTGACCGTGG	IGHJ6*01,IGHJ6*04
VH_in_3_02	2	gagccaacctccgcccgtaccgcccgtccagaGGAGA CAGTGACCAGGGTG	IGHJ2*01
VH_in_3_03	3	gagccaacctccgcccgtaccgcccgtccagaGGAGA CGGTGACCAGGGT	IGHJ1*01,IGHJ4*01,IGHJ4*02,IGHJ4*03 ,IGHJ5*01,IGHJ5*02
VH_in_3_04h	169	gagccaacctccgcccgtaccgcccgtccagaAGAGA CGRTGACCATTGTCC	IGHJ3*01,IGHJ3*02
VH_in_5_01f	76	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTGCAGCTACAACAGTG	IGHV4-34*02
VH_in_5_02f	77	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTRCAGCTRCAGSAGT	IGHV4-28*01,IGHV4-28*02,IGHV4- 28*03,IGHV4-28*04,IGHV4- 28*05,IGHV4-28*06,IGHV4- 28*07,IGHV4-30-4*01,IGHV4-30- 4*02,IGHV4-30-4*03,IGHV4-30- 4*07,IGHV4-31*01,IGHV4-31*02,IGHV4- 31*03,IGHV4-31*05,IGHV4- 31*06,IGHV4-31*07,IGHV4- 31*08,IGHV4-31*09,IGHV4- 31*10,IGHV4-34*01,IGHV4- 34*03,IGHV4-34*04,IGHV4- 34*05,IGHV4-34*06,IGHV4- 34*07,IGHV4-34*08,IGHV4- 34*09,IGHV4-34*10,IGHV4- 34*11,IGHV4-34*12,IGHV4-38- 2*01,IGHV4-38-2*02,IGHV4- 4*01,IGHV4-4*02,IGHV4-4*03,IGHV4- 4*04,IGHV4-4*05,IGHV4-4*07,IGHV4- 4*08,IGHV4-59*01,IGHV4-59*02,IGHV4- 59*03,IGHV4-59*04,IGHV4- 59*05,IGHV4-59*06,IGHV4- 59*07,IGHV4-59*08,IGHV4- 59*10,IGHV4-61*01,IGHV4- 61*02,IGHV4-61*03,IGHV4- 61*04,IGHV4-61*08,IGHV6-1*01,IGHV6- 1*02
VH_in_5_03f	78	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTCACCTTGAAGGAGTCT	IGHV2-26*01,IGHV2-5*08,IGHV2- 5*09,IGHV2-70*03,IGHV2-70*04,IGHV2- 70*06,IGHV2-70*10,IGHV2- 70D*04,IGHV2-70D*14

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
VH_in_5_04f	79	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG	IGHV2-5*01,IGHV2-5*02,IGHV2-5*04,IGHV2-5*05,IGHV2-5*06,IGHV2-70*09,IGHV2-70*12
VH_in_5_05f	170	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTGCAGTCTGGTGGAGT	IGHV3-11*02
VH_in_5_06f	171	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccGARGTGCADCTGGTGGAGWC	IGHV3-13*01,IGHV3-13*02,IGHV3-13*03,IGHV3-13*04,IGHV3-13*05,IGHV3-15*01,IGHV3-15*02,IGHV3-15*03,IGHV3-15*04,IGHV3-15*05,IGHV3-15*06,IGHV3-15*07,IGHV3-15*08,IGHV3-20*01,IGHV3-20*02,IGHV3-21*01,IGHV3-21*02,IGHV3-21*03,IGHV3-21*04,IGHV3-23*04,IGHV3-43*01,IGHV3-43*02,IGHV3-43D*01,IGHV3-48*01,IGHV3-48*02,IGHV3-48*03,IGHV3-48*04,IGHV3-49*01,IGHV3-49*02,IGHV3-49*03,IGHV3-49*04,IGHV3-49*05,IGHV3-53*01,IGHV3-53*02,IGHV3-53*03,IGHV3-53*04,IGHV3-64*01,IGHV3-64*02,IGHV3-64*03,IGHV3-64*05,IGHV3-64D*06,IGHV3-66*01,IGHV3-66*02,IGHV3-66*03,IGHV3-66*04,IGHV3-7*01,IGHV3-7*02,IGHV3-7*03,IGHV3-72*01,IGHV3-73*01,IGHV3-73*02,IGHV3-74*01,IGHV3-74*02,IGHV3-74*03,IGHV3-9*01,IGHV3-9*02,IGHV3-9*03
VH_in_5_07f	82	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTYCAGCTKGTGCAGT	IGHV1-18*01,IGHV1-18*02,IGHV1-18*03,IGHV1-18*04,IGHV1-3*01,IGHV1-3*02,IGHV1-69*04,IGHV1-69*05,IGHV1-69*10,IGHV1-69*11,IGHV1-69*12,IGHV1-69*13,IGHV1-69*14
VH_in_5_08f	83	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTACAGCTGGTGGAGTC	IGHV3-33*02
VH_in_5_09f	84	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCGGCTGCAGCTGCAGG	IGHV4-39*06

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
VH_in_5_10f	85	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGSTGCAGCTGCAGGA	IGHV4-28*01,IGHV4-28*02,IGHV4-28*03,IGHV4-28*04,IGHV4-28*05,IGHV4-30-2*01,IGHV4-30-2*02,IGHV4-30-2*03,IGHV4-30-2*05,IGHV4-30-2*06,IGHV4-30-4*01,IGHV4-30-4*02,IGHV4-30-4*03,IGHV4-30-4*04,IGHV4-30-4*07,IGHV4-31*01,IGHV4-31*02,IGHV4-31*03,IGHV4-31*05,IGHV4-31*06,IGHV4-31*07,IGHV4-31*08,IGHV4-31*08,IGHV4-31*10,IGHV4-34*08,IGHV4-34*10,IGHV4-38-2*01,IGHV4-38-2*02,IGHV4-39*01,IGHV4-39*02,IGHV4-39*03,IGHV4-39*05,IGHV4-39*07,IGHV4-4*01,IGHV4-4*02,IGHV4-4*03,IGHV4-4*04,IGHV4-4*05,IGHV4-4*07,IGHV4-4*08,IGHV4-59*01,IGHV4-59*02,IGHV4-59*03,IGHV4-59*04,IGHV4-59*05,IGHV4-59*06,IGHV4-59*07,IGHV4-59*08,IGHV4-61*01,IGHV4-61*02,IGHV4-61*03,IGHV4-61*04,IGHV4-61*05,IGHV4-61*08
VH_in_5_11f	86	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccGAGGTGCAGCTGGTGCA	IGHV5-51*01,IGHV5-51*02,IGHV5-51*03,IGHV5-51*04
VH_in_5_12f	87	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccSAGGTGCAGCTGTTGGAGT	IGHV3-11*03,IGHV3-23*01,IGHV3-23*02,IGHV3-23*03,IGHV3-23*05,IGHV3-23D*01
VH_in_5_13f	88	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccSAGGTCCAGCTGGTACAGTC	IGHV1-24*01,IGHV1-69-2*01
VH_in_5_14f	89	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCAGGTACCTTGAGGGAGTC	IGHV2-70*01,IGHV2-70*02,IGHV2-70*07,IGHV2-70*08,IGHV2-70*13
VH_in_5_15f	90	caagcagaagacggcatacagagatggcccagccggcca tggccCARATGCAGCTGGTGCAGT	IGHV1-45*01,IGHV1-45*02,IGHV1-58*01,IGHV1-58*02

10

20

30

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
VH_in_5_16f	91	caagcagaagacggcatacgagatggcccagccggcca tggccCAGGTSCAGCTGGTGSA	IGHV1-2*01,IGHV1-2*02,IGHV1-2*03,IGHV1-2*04,IGHV1-2*05,IGHV1-46*01,IGHV1-46*02,IGHV1-46*03,IGHV1-69*01,IGHV1-69*02,IGHV1-69*03,IGHV1-69*04,IGHV1-69*05,IGHV1-69*06,IGHV1-69*08,IGHV1-69*09,IGHV1-69*10,IGHV1-69*11,IGHV1-69*12,IGHV1-69*13,IGHV1-69*14,IGHV1-69D*01,IGHV1-8*01,IGHV1-8*02,IGHV3-11*01,IGHV3-11*04,IGHV3-11*05,IGHV3-11*06,IGHV3-30*01,IGHV3-30*02,IGHV3-30*03,IGHV3-30*04,IGHV3-30*05,IGHV3-30*06,IGHV3-30*07,IGHV3-30*08,IGHV3-30*09,IGHV3-30*10,IGHV3-30*11,IGHV3-30*12,IGHV3-30*13,IGHV3-30*14,IGHV3-30*15,IGHV3-30*16,IGHV3-30*17,IGHV3-30*18,IGHV3-30*19,IGHV3-30-3*01,IGHV3-30-3*02,IGHV3-30-3*03,IGHV3-33*01,IGHV3-33*03,IGHV3-33*04,IGHV3-33*05,IGHV3-33*06,IGHV3-64*04,IGHV3-NL1*01,IGHV7-4-1*01,IGHV7-4-1*02,IGHV7-4-1*04,IGHV7-4-1*05
VH_in_5_17f	172	caagcagaagacggcatacgagatggcccagccggcca tggccGAAGTGCAGCTGGTGCACT	IGHV5-10-1*01,IGHV5-10-1*02,IGHV5-10-1*03,IGHV5-10-1*04
VH_in_5_18f	93	caagcagaagacggcatacgagatggcccagccggcca tggccCGGGTCACCTTGAGGGAG	IGHV2-70*11
VH_in_5_19f	94	caagcagaagacggcatacgagatggcccagccggcca tggccCAGGTGCGGCTGCAGG	IGHV4-31*04
VH_out_5_01	35	AAAAGGTGTCCAATGTGAGGTGC	IGHV3-49*01_idr,IGHV3-49*02_idr,IGHV3-49*03_idr
VH_out_5_03	37	AAGGTGTCCAGTGTGAGGT	IGHV3-13*01_idr,IGHV3-13*02_idr,IGHV3-15*01_idr,IGHV3-15*02_idr,IGHV3-15*03_idr,IGHV3-15*04_idr,IGHV3-15*05_idr,IGHV3-15*06_idr,IGHV3-15*07_idr,IGHV3-15*08_idr,IGHV3-20*01_idr,IGHV3-21*01_idr,IGHV3-21*02_idr,IGHV3-23*01_idr,IGHV3-23*02_idr,IGHV3-23*04_idr,IGHV3-48*01_idr,IGHV3-48*02_idr,IGHV3-48*03_idr,IGHV3-

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
			53*01_idr,IGHV3-53*03_idr,IGHV3-64*01_idr,IGHV3-64*02_idr,IGHV3-66*01_idr,IGHV3-66*03_idr,IGHV3-66*04_idr,IGHV3-7*01_idr,IGHV3-72*01_idr,IGHV3-73*01_idr,IGHV3-73*02_idr,IGHV3-74*01_idr,IGHV3-74*03_idr
VH_out_5_04	173	ACAGGTGYCCACTCCCARR	IGHV1-18*01_idr,IGHV1-18*02_idr,IGHV1-3*01_idr,IGHV1-3*02_idr,IGHV1-58*01_idr,IGHV1-58*02_idr,IGHV1-69*03_idr,IGHV7-4-1*02_idr
VH_out_5_05	174	ACAGATGCCTACTCCCAGATGC	IGHV1-45*02_idr
VH_out_5_06	39	AAAGCTGTCCAGTGTCCAGGT	IGHV3-11*02_idr
VH_out_5_07	40	CAGCAGCTACAGGTGTCCA	IGHV1-69*01_idr,IGHV1-69*03_idr,IGHV1-69*04_idr,IGHV1-69*06_idr
VH_out_5_08	41	AAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGT	IGHV3-30*01_idr,IGHV3-30*03_idr,IGHV3-30*18_idr,IGHV3-33*01_idr,IGHV3-33*02_idr
VH_out_5_10	175	GGTGGCAGCTCCCAGATGG	IGHV4-28*01_idr,IGHV4-28*02_idr,IGHV4-28*03_idr,IGHV4-30-2*03_idr,IGHV4-30-4*01_idr,IGHV4-30-4*02_idr,IGHV4-30-4*03_idr,IGHV4-30-4*04_idr,IGHV4-31*02_idr,IGHV4-31*03_idr,IGHV4-31*06_idr,IGHV4-31*07_idr,IGHV4-31*08_idr,IGHV4-31*09_idr,IGHV4-31*10_idr,IGHV4-34*01_idr,IGHV4-34*02_idr,IGHV4-34*03_idr,IGHV4-34*04_idr,IGHV4-34*05_idr,IGHV4-34*06_idr,IGHV4-34*07_idr,IGHV4-34*09_idr,IGHV4-34*10_idr,IGHV4-34*11_idr,IGHV4-4*01_idr,IGHV4-4*02_idr,IGHV4-4*03_idr,IGHV4-4*04_idr,IGHV4-4*05_idr,IGHV4-4*07_idr,IGHV4-59*01_idr,IGHV4-59*02_idr,IGHV4-59*10_idr,IGHV4-61*01_idr,IGHV4-61*03_idr,IGHV4-61*04_idr,IGHV4-61*08_idr
VH_out_5_11	43	CTGACCACCCCTTCCTGG	IGHV2-26*01_idr

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
VH_out_5_12	44	GTGGCAGCTCCCAGATGG	IGHV4-28*01_ldr,IGHV4-28*02_ldr,IGHV4-28*03_ldr,IGHV4-30-2*03_ldr,IGHV4-30-4*01_ldr,IGHV4-30-4*02_ldr,IGHV4-30-4*03_ldr,IGHV4-30-4*04_ldr,IGHV4-31*02_ldr,IGHV4-31*03_ldr,IGHV4-31*06_ldr,IGHV4-31*07_ldr,IGHV4-31*08_ldr,IGHV4-31*09_ldr,IGHV4-31*10_ldr,IGHV4-34*01_ldr,IGHV4-34*02_ldr,IGHV4-34*03_ldr,IGHV4-34*04_ldr,IGHV4-34*05_ldr,IGHV4-34*06_ldr,IGHV4-34*07_ldr,IGHV4-34*09_ldr,IGHV4-34*10_ldr,IGHV4-34*11_ldr,IGHV4-4*01_ldr,IGHV4-4*02_ldr,IGHV4-4*03_ldr,IGHV4-4*04_ldr,IGHV4-4*05_ldr,IGHV4-4*07_ldr,IGHV4-59*01_ldr,IGHV4-59*02_ldr,IGHV4-59*10_ldr,IGHV4-61*01_ldr,IGHV4-61*03_ldr,IGHV4-61*04_ldr,IGHV4-61*08_ldr
VH_out_5_13	45	ATGGGGTGTCTCTGTCACAG	IGHV6-1*01_ldr
VH_out_5_14	46	AAGTGCCCACTCCCAGGT	IGHV1-8*01_ldr
VH_out_5_15 h	176	GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGWGTG	IGHV3-15*01_ldr,IGHV3-15*02_ldr,IGHV3-15*03_ldr,IGHV3-15*04_ldr,IGHV3-15*05_ldr,IGHV3-15*06_ldr,IGHV3-15*07_ldr,IGHV3-15*08_ldr,IGHV3-20*01_ldr,IGHV3-23*02_ldr,IGHV3-23*04_ldr,IGHV3-43*01_ldr,IGHV3-53*01_ldr,IGHV3-53*03_ldr,IGHV3-66*01_ldr,IGHV3-66*03_ldr,IGHV3-66*04_ldr,IGHV3-73*01_ldr,IGHV3-73*02_ldr,IGHV3-74*01_ldr,IGHV3-74*03_ldr,IGHV3-9*01_ldr
VH_out_5_16	48	AGCAGCTACAGGCACCCA	IGHV1-24*01_ldr
VH_out_5_17	49	CCATGGGTGTCTCTGTCACA	IGHV6-1*02_ldr
VH_out_5_18	51	ACTGACTGTCCCGTCCTGG	IGHV2-5*08_ldr,IGHV2-5*09_ldr,IGHV2-70*01_ldr,IGHV2-70*02_ldr,IGHV2-70*03_ldr,IGHV2-70*06_ldr,IGHV2-70*07_ldr,IGHV2-70*08_ldr,IGHV2-70*11_ldr,IGHV2-70*12_ldr,IGHV2-70*13_ldr
VH_out_5_19	52	ACAGGTGCCCACTCCCAG	IGHV1-18*01_ldr,IGHV1-18*02_ldr,IGHV1-3*01_ldr,IGHV7-4-

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
			I*02_ldr
VH_out_5_20	53	TGGTTCTTCCTCCTGCTGG	IGHV4-28*01_ldr,IGHV4-28*02_ldr,IGHV4-28*03_ldr,IGHV4-30-2*03_ldr,IGHV4-30-4*01_ldr,IGHV4-30-4*02_ldr,IGHV4-30-4*03_ldr,IGHV4-30-4*04_ldr,IGHV4-31*02_ldr,IGHV4-31*03_ldr,IGHV4-31*06_ldr,IGHV4-31*07_ldr,IGHV4-31*08_ldr,IGHV4-31*09_ldr,IGHV4-31*10_ldr,IGHV4-34*09_ldr,IGHV4-39*01_ldr,IGHV4-39*02_ldr,IGHV4-39*03_ldr,IGHV4-39*06_ldr,IGHV4-4*07_ldr
VH_out_5_21	54	CCCCTCCACAGTGAGAGTC	IGHV5-a*02_ldr
VH_out_5_22	56	AGCTCCAGGTGCTCACTCC	IGHV1-46*01_ldr,IGHV1-46*03_ldr
VH_out_5_23	57	CAGCCACAGGAGCCCACT	IGHV1-2*01_ldr,IGHV1-2*02_ldr,IGHV1-2*03_ldr
VH_out_5_24	58	AGGTGTCCAGTGTCAGGTG	IGHV3-11*01_ldr,IGHV3-30*01_ldr,IGHV3-30*03_ldr,IGHV3-30*18_ldr,IGHV3-33*01_ldr
VH_out_5_25	59	CTGCTGACCATCCCTTCATG	IGHV2-5*01_ldr,IGHV2-5*04_ldr,IGHV2-5*05_ldr,IGHV2-5*06_ldr,IGHV2-5*07_ldr,IGHV2-70*09_ldr,IGHV2-70*10_ldr
VH_out_5_26	60	CCTTGTTGCTATTTAAAAGGTGTC	IGHV3-20*01_ldr,IGHV3-43*01_ldr,IGHV3-49*01_ldr,IGHV3-49*03_ldr,IGHV3-53*01_ldr,IGHV3-53*03_ldr,IGHV3-66*01_ldr,IGHV3-66*03_ldr,IGHV3-66*04_ldr,IGHV3-73*01_ldr,IGHV3-73*02_ldr,IGHV3-74*01_ldr,IGHV3-74*03_ldr
VH_out_5_27	177	AAGGAGTCTGKCCGAGGTG	IGHV5-51*01_ldr,IGHV5-51*02_ldr
VH_out_5_28	62	CTGGCTGTAGCACCAGGT	IGHV1-46*02_ldr
VK_in_3_01g	178	gattacgccaagcttggagccgcccgcTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAAMGT	IGKJ4*01,IGKJ4*02
VK_in_3_02g	179	gattacgccaagcttggagccgcccgcTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAACGT	IGKJ1*01
VK_in_3_03g	180	gattacgccaagcttggagccgcccgcTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGCCGAAGGT	IGKJ5*01
VK_in_3_04g	181	gattacgccaagcttggagccgcccgcTTTGATAT	IGKJ3*01

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
		CCACTTTGGTCCCAGGGCCGAAAGT	
VK_in_3_05g	182	gattacgccaagcttggagccgaggccgcTTTGATCT CCAGCTTGGTCCCCTGGCCAAAST	IGKJ2*01,IGKJ2*02,IGKJ2*03,IGKJ2*04
VK_in_5_01e	183	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAA TWGTGWTGACRCAGTCTCCA	IGKV3-11*01,IGKV3-11*02,IGKV3-15*01,IGKV3-20*01,IGKV3-20*02,IGKV3-NL1*01,IGKV3-NL2*01,IGKV3-NL3*01,IGKV3-NL4*01,IGKV3-NL5*01,IGKV3D-11*01,IGKV3D-15*01,IGKV3D-20*01
VK_in_5_02h	184	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtRACA TCCAGATGACCCAGTYTC	IGKV1-12*01,IGKV1-12*02,IGKV1-16*01,IGKV1-16*02,IGKV1-17*01,IGKV1-17*02,IGKV1-27*01,IGKV1-33*01,IGKV1-39*01,IGKV1-39*02,IGKV1-5*01,IGKV1-5*02,IGKV1-5*03,IGKV1-NL1*01,IGKV1D-12*01,IGKV1D-12*02,IGKV1D-16*01,IGKV1D-16*02,IGKV1D-17*01,IGKV1D-17*02,IGKV1D-33*01,IGKV1D-39*01
VK_in_5_03	7	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGCCA TCCGGATGACCCAG	IGKV1-8*01,IGKV1D-43*01
VK_in_5_04	8	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAA TAGTGATGATGCAGTCTCCAG	IGKV3D-15*02
VK_in_5_05	9	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAA CGACACTCACGCAGTC	IGKV5-2*01
VK_in_5_06	10	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGACA TCGTGATGACCCAGTCT	IGKV4-1*01
VK_in_5_07e	185	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAGA TTGTGATGACCCAGACTCCA	IGKV2D-26*01,IGKV2D-26*02
VK_in_5_08	12	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGACA TCCAGTTGACCCAGTCT	IGKV1-9*01
VK_in_5_09	13	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGTCA TCTGGATGACCCAGTCTC	IGKV1D-8*01
VK_in_5_11	15	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGATA TTGTGATGACTCAGTCTCCAC	IGKV2-28*01,IGKV2D-28*01
VK_in_5_12	16	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGATG TTGTGATGACTCAGTCTCCA	IGKV2-30*01,IGKV2-30*02,IGKV2D-30*01
VK_in_5_13	17	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcggaagtGAAA TTGTAATGACACAGTCTCCAGC	IGKV3D-7*01

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
VK_in_5_14	18	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtGCCA TCCAGWTGACCCAGT	IGKV1-13*01,IGKV1-13*02,IGKV1- 6*01,IGKV1D-13*01
VK_in_5_15	19	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtGATA TTGTGATGACCCAGACTCCA	IGKV2-24*01,IGKV2-29*01,IGKV2- 29*02,IGKV2-29*03,IGKV2- 40*01,IGKV2D-29*01,IGKV2D- 29*02,IGKV2D-40*01
VL_in_3_01g	186	gattacgccaagcttggagccggcggcgcTAGGACG GTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAAYAC	IGLJ2*01,IGLJ3*01,IGLJ3*02
VL_in_3_02g	187	gattacgccaagcttggagccggcggcgcGAGGRCG GTCAGCTGGGTGCCTCCTCCGAACAC	IGLJ7*01,IGLJ7*02
VL_in_3_03g	188	gattacgccaagcttggagccggcggcgcTAGGACG GTGACCTTGGTCCAGTCCGAAGAC	IGLJ1*01
VL_in_3_05g	189	gattacgccaagcttggagccggcggcgcGAGGACG GTCACCTTGGTGCCACTGCCGAACAC	IGLJ6*01
VL_in_5_01	20	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCAGR CTGTGGTGACYCAGG	IGLV7-43*01,IGLV7-46*01,IGLV7- 46*02,IGLV7-46*03,IGLV8-61*01,IGLV8- 61*02
VL_in_5_02	21	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtTCCT ATGAGCTGACTCAGCCA	IGLV3-1*01,IGLV3-12*01,IGLV3- 12*02,IGLV3-9*01,IGLV3-9*02,IGLV3- 9*03
VL_in_5_03	22	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCAGT CTGTGCTGACGCAG	IGLV1-40*01
VL_in_5_04e	190	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCAGG CAGGGCTGACTCAGCCA	IGLV10-54*01,IGLV10-54*02,IGLV10- 54*03
VL_in_5_05	24	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtAATT TTATGCTGACTCAGCCCC	IGLV6-57*01
VL_in_5_06e	191	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtTCCT ATGAGCTGAYRCAGCCAYC	IGLV3-10*01,IGLV3-10*02,IGLV3- 16*01,IGLV3-25*01,IGLV3-25*02,IGLV3- 25*03,IGLV3-27*01
VL_in_5_07	26	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCWGS CTGTGCTGACTCAGC	IGLV4-3*01,IGLV5-37*01,IGLV5- 39*01,IGLV5-39*02,IGLV5-45*01,IGLV5- 45*02,IGLV5-45*03,IGLV5-52*01,IGLV9- 49*01,IGLV9-49*02,IGLV9-49*03
VL_in_5_08	27	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCAGC YTGTGCTGACTCAATCR	IGLV4-60*01,IGLV4-60*02,IGLV4- 60*03,IGLV4-69*01,IGLV4-69*02
VL_in_5_09	28	agcggcggagggtggctcaggcgggtggcgggaagtCAGT CTGCCCTGACTCAGC	IGLV2-11*01,IGLV2-11*02,IGLV2- 14*01,IGLV2-14*02,IGLV2-18*01,IGLV2- 18*02,IGLV2-18*03,IGLV2-18*04,IGLV2- 23*01,IGLV2-23*02,IGLV2-23*03,IGLV2-

10

20

30

40

プライマー名	配列番号	プライマー配列	標的V/J遺伝子
			8*01,IGLV2-8*02
VL_in_5_10	29	agcggcggaggtggctcagggcgggtggcggaagtCAGT CTGTSTGACGCAGC	IGLV1-40*02,IGLV1-40*03,IGLV1- 51*01,IGLV1-51*02
VL_in_5_11	30	agcggcggaggtggctcagggcgggtggcggaagtCAGA CTGTGGTGACTCAGGAG	IGLV7-43*01
VL_in_5_12	31	agcggcggaggtggctcagggcgggtggcggaagtCAGT CTGTGCTGACTCAGCC	IGLV1-36*01,IGLV1-44*01,IGLV1- 47*01,IGLV1-47*02
VL_in_5_13	32	agcggcggaggtggctcagggcgggtggcggaagtTCTT CTGAGCTGACTCAGGACC	IGLV3-19*01
VL_in_5_14	33	agcggcggaggtggctcagggcgggtggcggaagtTCCT ATGAGCTGACACAGCTAC	IGLV3-22*01,IGLV3-22*02
VL_in_5_15	34	agcggcggaggtggctcagggcgggtggcggaagtTCCT ATGTGCTGACTCAGCC	IGLV3-21*01,IGLV3-21*02,IGLV3-21*03
VK_out_3_01	63	CCACAGTTCGTTTTRATHTCAS	IGKC*01,IGKC*02,IGKC*03,IGKC*04,IG KC*05
VL_out_3_01	192	AGAGGAGGGTGGGAACAGAG	IGLC3*01,IGLC3*02,IGLC3*03,IGLC7*0 1,IGLC7*02
VL_out_3_02	65	ACTTCCA CTGCTCAGGCG	IGLC2*01,IGLC2*02,IGLC2*03,IGLC3*0 1,IGLC3*02,IGLC3*03,IGLC3*04,IGLC6* 01,IGLC6*02,IGLC6*03,IGLC6*04,IGLC6 *05
VL_out_3_03	66	AACAGAGTGACCGAGGGG	IGLC2*01,IGLC2*02,IGLC3*01,IGLC3*0 2,IGLC3*03,IGLC3*04,IGLC6*02,IGLC6* 05,IGLC7*01
VL_out_3_04	193	AGAGGAGGGCGGGAACAGAG	IGLC1*01,IGLC1*02,IGLC2*01,IGLC2*0 2,IGLC3*04,IGLC6*01,IGLC6*02,IGLC6* 03,IGLC6*04,IGLC6*05

10

20

30

【 0 1 6 8 】

【表 6】

表 6

プライマー名	配列番号	プライマー配列
Illu_R_N505	194	aatgatacggcgaccaccgagatctacac <u>GTAAGGAG</u> gattacgccaagctttggagcc
Illu_R_N506	195	aatgatacggcgaccaccgagatctacac <u>ACTGCAT</u> Agattacgccaagctttggagcc
Illu_R_N507	196	aatgatacggcgaccaccgagatctacac <u>AAGGAGT</u> Agattacgccaagctttggagcc
Illu_R_N508	197	aatgatacggcgaccaccgagatctacac <u>CTAAGCCT</u> gattacgccaagctttggagcc
R1	198	GATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
R2	199	CGCTACCGCCGCCTCCAGA
Illu_F_scaleup	200	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT

10

20

【 0 1 6 9 】

【表 7】

表 7

ライブラリー	ドナー1 小滴	ドナー1 コンビナトリアル	ドナー2 小滴	ドナー2 コンビナトリアル
マッピングされた読み取りデータ( $V_H$ )	3,311,883	1,867,114	2,841,606	3,534,010
マッピングされた読み取りデータ( $V_L$ )	2,397,908	898,120	1,981,098	2,553,130
マッピングされた読み取りデータ( $V_H-V_L$ )	2,649,093	981,684	2,171,741	2,645,525
独特のCDR-H3:CDR-L3	274,979	931,779	206,225	2,171,198
CDR-H3クラスター	152,032	445,249	101,488	376,885
CDR-L3クラスター	45,444	160,243	38,326	176,520
CDR-H3:CDR-L3クラスター	121,845	766,146	90,173	1,783,269
CDR-H3:CDR-L3調整Chao	170,886	N/A	122,309	N/A
$V_L:V_H$ 比(中央値)	2	9	2	5

30

40

【 0 1 7 0 】

【表 8】

表 8

p値	SRR1585267	SRR1585265	SRR1585248	SRR1585249
ドナー1	1.46E-157	1.08E-42	6.13E-45	1.30E-06
ドナー2	3.41E-65	3.24E-20	4.14E-19	0.00065

10

【 0 1 7 1 】

【表 9】

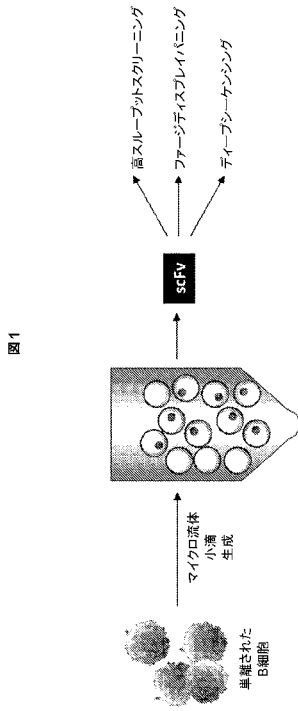
表 9

ファージライブラリー	B細胞源	ライブラリーサイズ	scFvを表示する クローン(%)
ドナー1エマルション	総 B細胞	$3.0 \times 10^8$	98.9
ドナー1コンビナトリアル	総 B細胞	$3.0 \times 10^8$	94.7
ドナー2エマルション	メモリー B細胞	$3.5 \times 10^8$	90.5
ドナー2コンビナトリアル	メモリー B細胞	$1.0 \times 10^8$	95.7

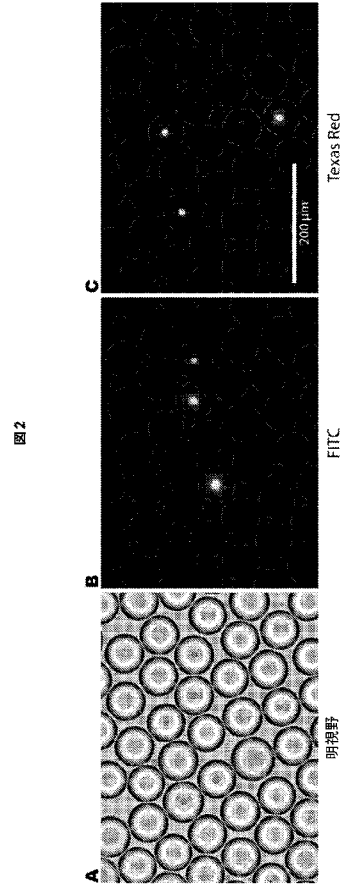
20

30

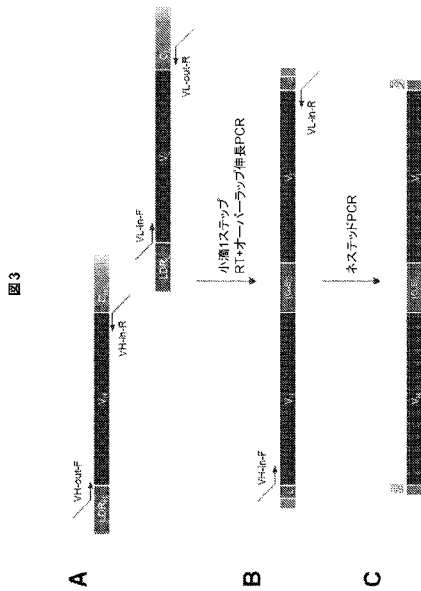
【 図 1 】



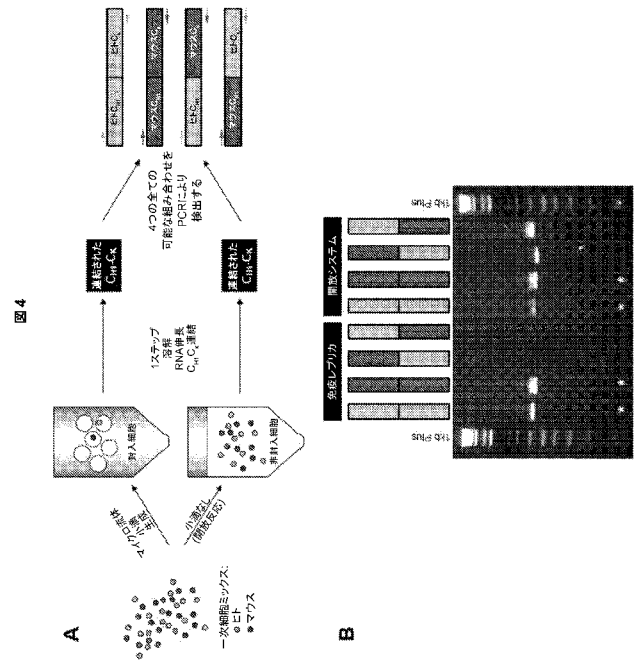
【 図 2 】



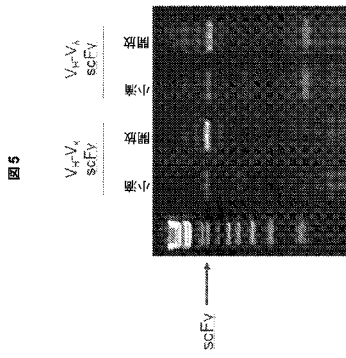
【 図 3 】



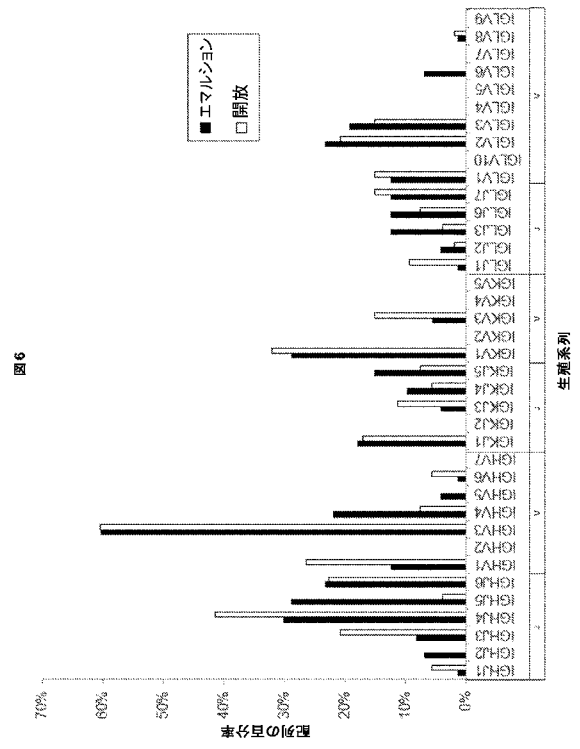
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 9 】

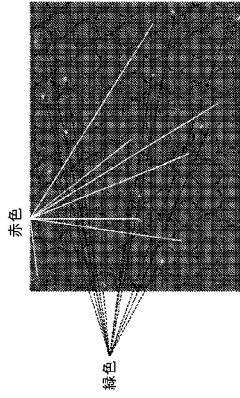


図 9

【 図 1 0 】

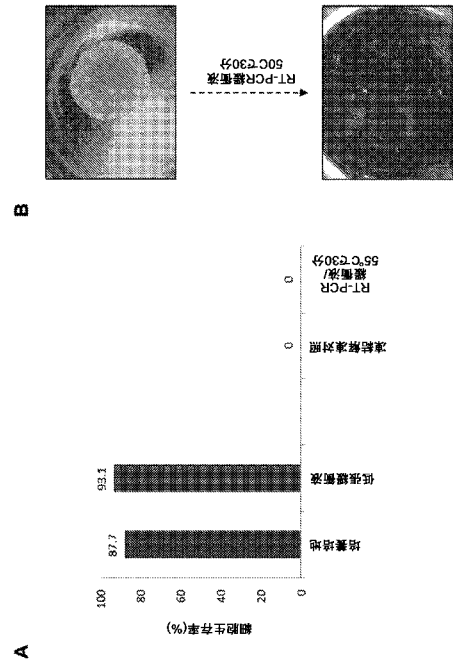


図 10

【 図 1 1 】

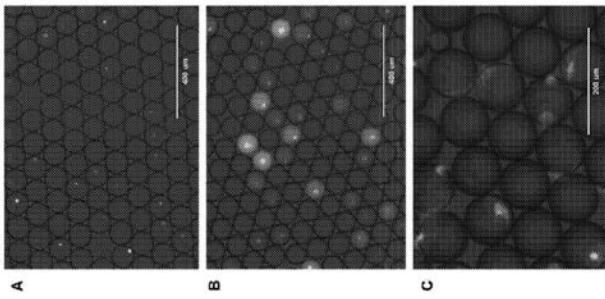
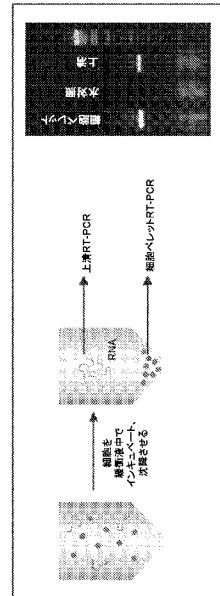


Figure 11

【 図 1 2 】

図 12



【 図 1 3 】

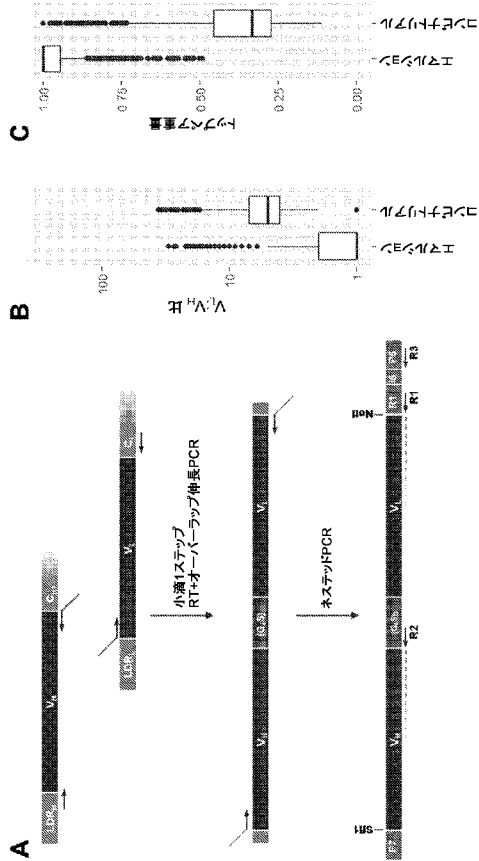
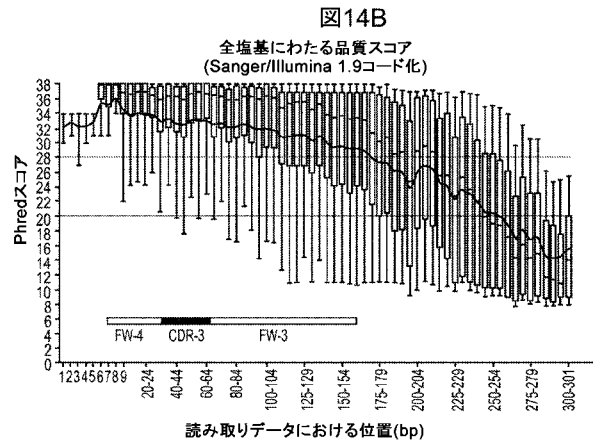
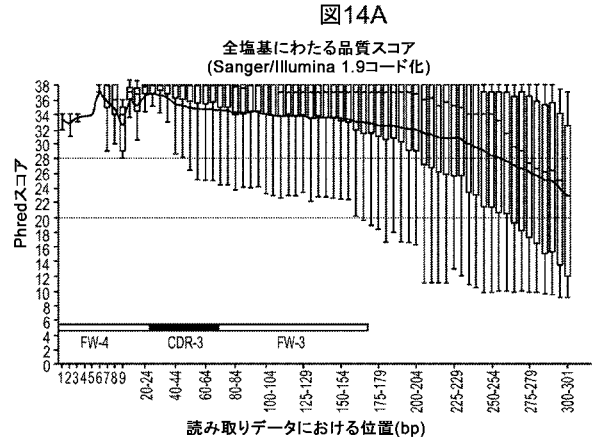


図13

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

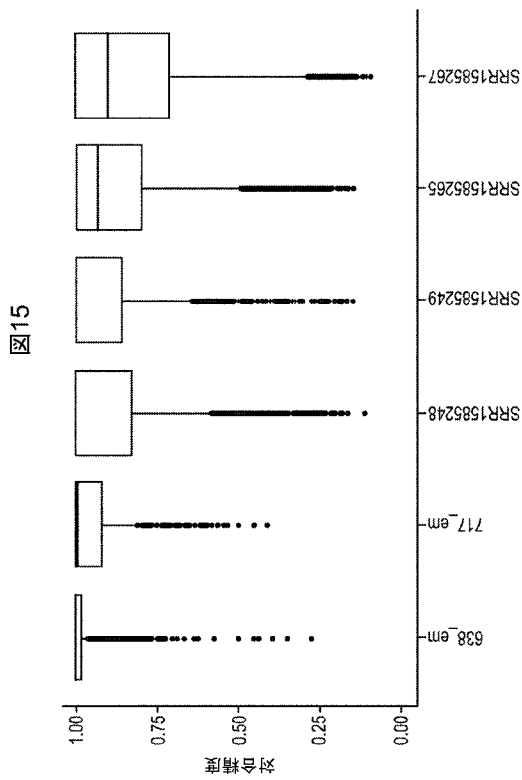
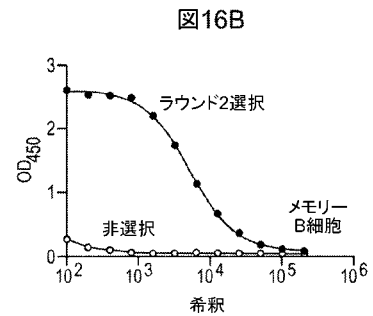
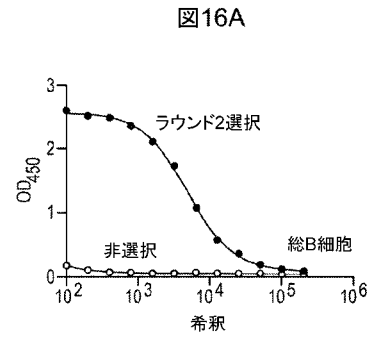
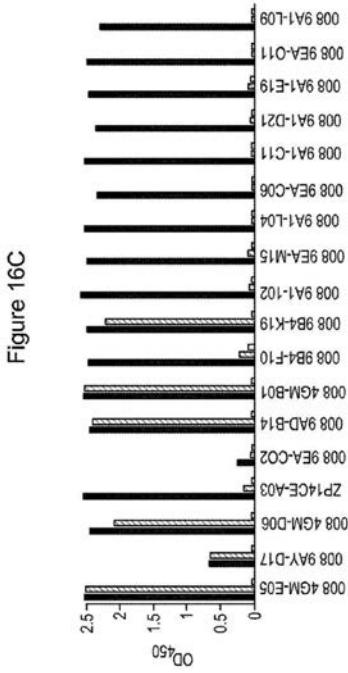


図15

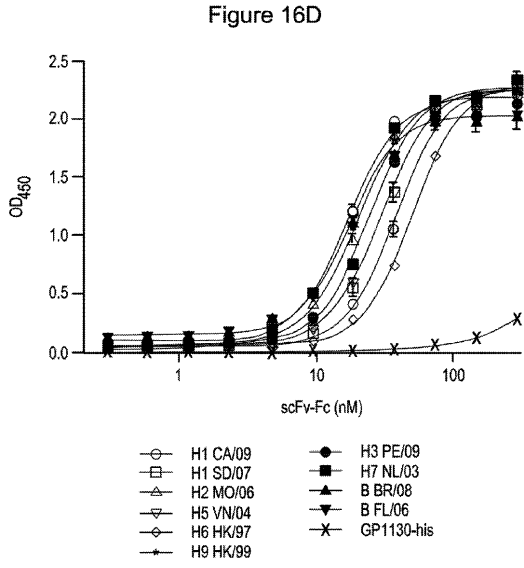
【 図 1 6 - 1 】



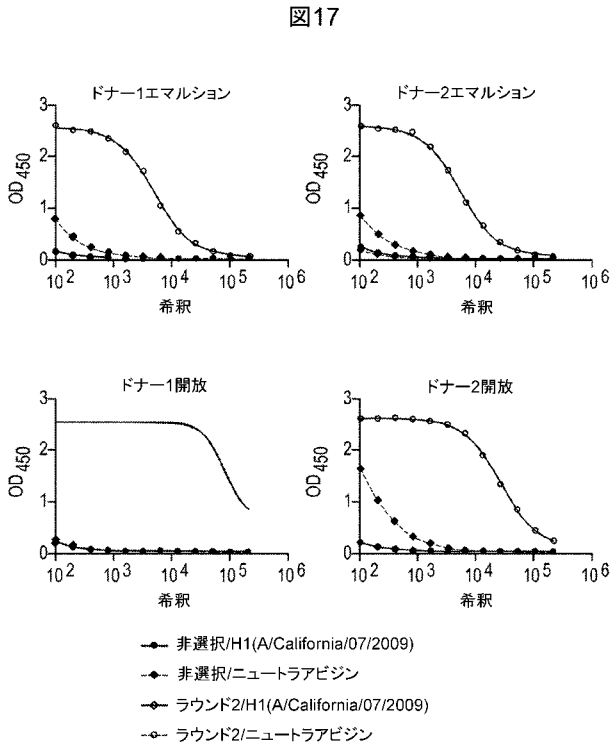
【 図 1 6 - 2 】



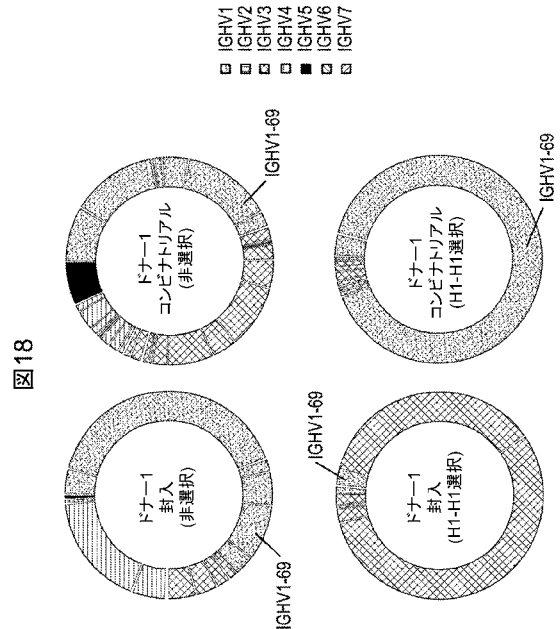
【 図 1 6 - 3 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【配列表】

2019521642000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/027199

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 15/10; C12N 15/09; C07K 14/725; C07K 16/00; C12Q 1/68 (2017.01) CPC - C12N 15/1031; C12N 15/1093; C07K 2317/622; C07K 2319/00; C12N 15/10; C12N 15/09; C07K 14/7051; C07K 16/00; C07K 2317/10; C12Q 1/68 (2017.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 506/40; 506/16; 506/2 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	US 2007/0141048 A1 (OLEKSIEWICZ et al) 21 June 2007 (21.06.2007) entire document	64, 66, 67, 70-73 ---
Y		1-3, 10-13, 45-47, 54-57, 65, 84-86, 98-101
Y	WO 2014/182197 A1 (EVROGEN JOINT STOCK COMPANY) 13 November 2014 (13.11.2014) entire document	1-3, 10-13
Y	US 2010/0285975 A1 (MATHIES et al) 11 November 2010 (11.11.2010) entire document	45-47, 54-57, 84-86, 98-101
Y	XIAO et al. "A Novel Dual Expression Platform for High Throughput Functional Screening of Phage Libraries in Product like Format." PLoS One. 2015 October 15 (15.10.2015), Vol. 10, Iss. 10, Pgs. 1-16. entire document	65
A	TURCHANINOVA et al. "Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR," European journal of immunology, 01 September 2013 (01.09.2013), Vol. 43, Iss. 9, Pgs. 2507-2515 .entire document	1-3, 10-13, 45-47, 54-57, 64-67, 70-73, 84-86, 98-101
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 25 July 2017	Date of mailing of the international search report <b>16 AUG 2017</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT DSP: 571-272-7774	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/027199

**Box No. 1** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a.  forming part of the international application as filed:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
 on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

An ISA/225 was mailed on 12 May 2017. No approved electronic sequence listing was submitted in response to the ISA/225. The electronic sequence listing filed on 08 June 2017 contained errors and could not be entered into ISA/US's search system/tool.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/027199

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 4, 48  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 4 and 48 are held unsearchable as a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it.
  
3.  Claims Nos.: 5-9, 14-44, 49-53, 58-63, 68, 69, 74-83, 87-97, 102-106  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/686 (2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 4 0 B	40/10 (2006.01)	C 4 0 B	40/10	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/70 (2006.01)	C 1 2 N	15/70	Z
C 4 0 B	30/04 (2006.01)	C 4 0 B	30/04	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	5/0781 (2010.01)	C 1 2 N	5/0781	
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 ラジャン, サラバナン

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

(72)発明者 キーニー, マイケル, ロバート

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ46 QQ53 QQ79 QR32 QR33 QR36  
 QR48 QR59 QR62 QR77 QR80 QR81 QS05 QS25 QS36 QS38  
 QS40 QX01  
 4B065 AA90X AA90Y AA98Y AB01 AC14 BA02 BC50 CA24 CA25 CA44  
 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20  
 EA50 FA74

专利名称(译)	挖掘免疫库		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019521642A</a>	公开(公告)日	2019-08-08
申请号	JP2018553241	申请日	2017-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
发明人	チヨウドリー, パーサ, エス. ラジャン, サラバナン キーニー, マイケル, ロバート		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/00 C07K14/725 C40B40/08 C12Q1/6876 C12Q1/686 C40B40/10 C07K16/46 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/70 C40B30/04 G01N33/53 C12N15/12 C12N5/0781 C12N5/0783		
CPC分类号	C07K16/00 C07K16/005 C07K2317/10 C07K2317/622 C07K2319/00 C12Q1/6806 C12Q1/686 C12Q2563/159 C12Q2531/113		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/00 C07K14/725 C40B40/08 C12Q1/6876.Z C12Q1/686.Z C40B40/10 C07K16/46 C12N15/62.Z C07K19/00 C12N15/70.Z C40B30/04 G01N33/53.N C12N15/12 C12N5/0781 C12N5/0783		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ46 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR81 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA98Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BC50 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	62/321278 2016-04-12 US		
其他公开文献	JP2019521642A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明是将单个细胞包裹在液滴中，其中液滴从囊封的单个细胞中扩增和沉没重链和轻链可变区扩增子的天然配对。包裹，裂解被包裹的单细胞并产生被包裹的天然配对的scFv扩增子，每个scFv扩增子均包含重链和提供了一种用于生产封装的天然配对的scFv扩增子的方法，其包括自发地配对轻链可变区扩增子。[选型图]图1

