

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年5月28日(2020.5.28)

【公表番号】特表2019-521642(P2019-521642A)

【公表日】令和1年8月8日(2019.8.8)

【年通号数】公開・登録公報2019-032

【出願番号】特願2018-553241(P2018-553241)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/725 (2006.01)

C 4 0 B 40/08 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 4 0 B 40/10 (2006.01)

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/70 (2006.01)

C 4 0 B 30/04 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 5/0781 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 15/13 Z N A

C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 14/725

C 4 0 B 40/08

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 4 0 B 40/10

C 0 7 K 16/46

C 1 2 N 15/62 Z

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/70 Z

C 4 0 B 30/04

G 0 1 N 33/53 N

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 5/0781

C 1 2 N 5/0783

【手続補正書】

【提出日】令和2年4月9日(2020.4.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

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 . 前記小滴内の封入された単一細胞を溶解するステップと、

c . 前記小滴内の自然対合 s c F v アンプリコンを生成するステップであって、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。

【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 s c F v 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。

【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。

【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

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】

前記試薬は、Titan (Roche cat no 11855476001) を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

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 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

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、アンブ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 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 s c F v アンブ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 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

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 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記防止するステップは、封入前に細胞を 48 時間未満にわたって刺激すること、封入前に生細胞を選択すること、又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 14 に記載の方法。

【請求項 16】

封入された対合 s c F v アンブリコンであって、前記 s c F v アンブリコンは油中水小滴内に封入され、前記 s c F v アンブリコンはそのまま発現に使用でき、抗原結合及び / 又は機能に関するスクリーニングに適している、前記 s c F v アンブリコン。

【請求項 17】

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 アンブ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 ~ 15 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 s c F v アンブ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 s c F v アンブリコンのライブラリーを生成するステップとを含み、

c . 前記 s c F v アンブリコンはそのまま発現に使用でき、抗原結合及び / 又は機能に関するスクリーニングに適している、方法。

【請求項 18】

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 アンブ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 17 に記載の方法により自然対合 s c F v アンブ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 アンブ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 アンブリコンは、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、

i i . 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

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 19】

請求項 16 に記載の封入された対合 s c F v アンブリコンを複数含むエマルジョンであって、前記エマルジョンが水中油エマルジョンであり、各 s c F v アンブリコンが前記エマルジョン中の油中水小滴内に封入される、前記エマルジョン。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。

本発明は、例えば以下の実施形態を包含する。

[実施形態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。

[実施形態2] 前記細胞は、B細胞である、実施形態1に記載の方法。

[実施形態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、実施形態1又は2に記載の方法。

[実施形態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、実施形態3に記載の方法。

[実施形態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、実施形態1～4のいずれかに記載の方法。

[実施形態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、実施形態5に記載の方法。

[実施形態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、実施形態5又は6に記載の方法。

[実施形態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、実施形態7に記載の方法。

[実施形態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

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プライマーである、実施形態 5 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 1 0] 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。

[実施形態 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、実施形態 1 0 に記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 1 0 に記載の方法。

[実施形態 1 3] 前記細胞は、T 細胞である、実施形態 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 1 4] 前記試薬は、Titan (Roche cat no 1 1 8 5 5 4 7 6 0 0 1) を含む、実施形態 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 1 7] 前記油は、フッ素化油である、実施形態 1 6 に記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 1 6 又は 1 7 に記載の方法。

[実施形態 1 9] 細胞の前記懸濁液は、安定剤を含む、実施形態 1 6 ~ 1 8 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 2 1 に記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 2 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 2 5] 実施形態 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の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。

[実施形態 2 6] 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 . 実施形態 1 ~ 2 4 のいずれか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。

[実施形態 2 7] 実施形態 2 6 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。

[実施形態 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 . 実施形態 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、

i i . 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

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。

[実施形態 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 P C R を使用することを含む、実施形態 28 に記載の方法。

[実施形態 30] 前記ネステッド 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、実施形態 29 に記載の方法。

[実施形態 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 . 実施形態 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、

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。

[実施形態 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 . 実施形態 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、

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。

[実施形態 33] 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、実施形態 31 又は 32 に記載の方法。

[実施形態 34] 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、実施形態 29、30 又は 33 のいずれかに記載の方法。

[実施形態 35] 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 制限酵素部位を含む、実施形態 34 に記載の方法。

[実施形態36] 実施形態28～35のいずれか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。

[実施形態37] 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. 実施形態28～35のいずれか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。

[実施形態38] 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、実施形態37に記載の方法。

[実施形態39] 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、実施形態37に記載の方法。

[実施形態40] 実施形態37～39のいずれか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。

[実施形態41] 抗原特異的分子を特定する方法であって、

a. 実施形態37～39のいずれか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。

[実施形態42] 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、実施形態41に記載の方法。

[実施形態43] 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、実施形態41又は42に記載の方法。

[実施形態44] 実施形態41～43のいずれかに記載の方法によって生成される抗原特異的分子。

[実施形態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。

[実施形態46] 前記細胞は、B細胞である、実施形態45に記載の使用。

[実施形態47] 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、実施形態45又は46に記載の使用。

[実施形態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、実施形態47に記載の使用。

[実施形態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、実施形態45～48のいずれかに記載の使用。

[実施形態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、実施形態49に記載の使用。

[実施形態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、実施形態49又は50に記載の使用。

[実施形態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、実施形態51に記載の使用。

[実施形態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、実施形態49~52のいずれかに記載の使用。

[実施形態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。

[実施形態55] 前記TCR鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである、実施形態54に記載の使用。

[実施形態56] 前記TCR鎖アンプリコンは、及び鎖アンプリコンである、実施形態54に記載の使用。

[実施形態57] 前記細胞は、T細胞である、実施形態54~56のいずれかに記載の使用。

[実施形態58] 前記試薬は、Titan (Roche cat no 11855476001)を含む、実施形態45~57のいずれかに記載の使用。

[実施形態59] 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、実施形態45~58のいずれかに記載の使用。

[実施形態60] 前記油は、フッ素化油である、実施形態59に記載の使用。

[実施形態61] 細胞の前記懸濁液は、約100万~約500万細胞/ml、好ましくは約350万~約450万細胞/ml、より好ましくは約400万細胞/mlの密度である、実施形態59又は60に記載の使用。

[実施形態62] 細胞の前記懸濁液は、安定剤を含む、実施形態59~61のいずれかに記載の使用。

[実施形態63] 前記試薬は、RT-PCRのための試薬である、実施形態45~62のいずれかに記載の使用。

[実施形態64] 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scFvを含むscFvライブラリーであって、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、scFvライブラリー。

[実施形態65] 前記scFvは、scFv-Fcである、実施形態64に記載のscFvライブラリー。

[実施形態66] scFvファージディスプレイライブラリーである、実施形態64に記載のscFvライブラリー。

[実施形態67] 前記細胞は、B細胞である、実施形態64~66のいずれかに記載のscFvライブラリー。

[実施形態68] 各scFv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、実施形態64~67のいずれかに記載のscFvライブラリー。

[実施形態69] 各scFvの前記重鎖及び軽鎖可変領域は、5~30アミノ酸長、好ましくは10~20アミノ酸長、好ましくは13~18アミノ酸長、より好ましくは15アミノ酸長のリンカーによって連結されている、実施形態64~68のいずれかに記載のscFvライブラリー。

[実施形態70] 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。

[実施形態 7 1] 前記自然対合 T C R 鎖は、及び鎖である、実施形態 7 0 に記載の s c T C R ライブラリー。

[実施形態 7 2] 前記自然対合 T C R 鎖は、及び鎖である、実施形態 7 0 に記載の s c T C R ライブラリー。

[実施形態 7 3] 前記細胞は、T 細胞である、実施形態 7 0 ~ 7 2 のいずれかに記載の s c F v ライブラリー。

[実施形態 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、実施形態 7 0 ~ 7 3 のいずれかに記載の s c T C R ライブラリー。

[実施形態 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、実施形態 7 0 ~ 7 4 のいずれかに記載の s c T C R ライブラリー。

[実施形態 7 6] 前記リンカーは、(G l y ₄ S e r) ₃ である、実施形態 6 7、6 9、7 4 又は 7 5 のいずれかに記載のライブラリー。

[実施形態 7 7] 抗原特異的分子を特定する方法であって、

a . 抗原サンプルを用いて、

i . 実施形態 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 . 実施形態 6 4 ~ 7 6 のいずれかに記載の s c F v 若しくは s c T C R ライブラリー

り

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。

[実施形態 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、実施形態 7 7 に記載の方法。

[実施形態 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、実施形態 7 7 又は 7 8 に記載の方法。

[実施形態 8 0] 実施形態 7 7 ~ 7 9 のいずれかに記載の方法によって生成される抗原特異的分子。

[実施形態 8 1] 抗原特異的分子を特定するための、

a . 実施形態 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 . 実施形態 6 4 ~ 7 6 のいずれかに記載の s c F v 若しくは s c T C R ライブラリー

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。

[実施形態 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、実施形態 8 1 に記載の使用。

[実施形態 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、実施形態 8 1 又は 8 2 に記載の使用。

[実施形態 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。

[実施形態 8 5] 前記細胞は、B 細胞である、実施形態 8 4 に記載のキット。

[実施形態 8 6] 前記試薬は、R T - P C R のための試薬を含む、実施形態 8 4 又は 8 5 に記載のキット。

[実施形態 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、実施

形態 8 4 ~ 8 6 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 7 に記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 4 ~ 8 8 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 9 に記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 9 又は 9 0 に記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 9 1 に記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 9 ~ 9 2 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 4 ~ 9 3 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 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、実施形態 8 4 ~ 9 3 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 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更に含む、実施形態 8 4 ~ 9 5 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 9 7] 前記ネステッド P C R プライマーは、重鎖可変領域の F R 1 及び軽鎖可変領域の F R 4 に結合するように設計されている、実施形態 9 6 に記載のキット。

[実施形態 9 8] a . 単一細胞を、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 T C R 鎖アンプリコンの自然対合を増幅及び連結して、s c T C R アンプリコンを生成するための試薬とを含むキット。

[実施形態 9 9] 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、実施形態 9 8 に記載のキット。

[実施形態 1 0 0] 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、実施形態 9 8 に記載のキット。

[実施形態 1 0 1] 前記細胞は、T 細胞である、実施形態 9 8 ~ 1 0 0 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 1 0 2] ネステッド P C R を使用して前記 s c T C R アンプリコンを増幅するためのプライマーを更に含む、実施形態 9 8 ~ 1 0 1 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 1 0 3] 前記ネステッド P C R 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、実施形態 9 6、9 7 又は 1 0 2 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 1 0 4] 前記ネステッド P C R プライマーは、プライマー対を含み、一方のプ

ライマーは、S f i 1 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、N o t 1 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、実施形態 1 0 3 に記載のキット。

[実施形態 1 0 5] 前記マイクロ流体チップは、親フッ素性チップである、実施形態 8 4 ~ 1 0 4 のいずれかに記載のキット。

[実施形態 1 0 6] フッ素化油を更に含む、実施形態 8 4 ~ 1 0 5 のいずれかに記載のキット。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2019521642A5	公开(公告)日	2020-05-28
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 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	JP2019521642A		

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，裂解被包裹的单个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