

【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】平成28年4月14日(2016.4.14)

【公表番号】特表2015-509724(P2015-509724A)

【公表日】平成27年4月2日(2015.4.2)

【年通号数】公開・登録公報2015-022

【出願番号】特願2014-559299(P2014-559299)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/68	Z
C 0 7 K	16/46	
G 0 1 N	33/50	P
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/00	Z N A

【手続補正書】

【提出日】平成28年2月25日(2016.2.25)

【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】

以下のステップを含む、VDJ組み換え産物を特定する方法：

(a) VDJ組み換え産物を含むDNAサンプルを得ること；

(b) 超音波処理、又は剪断、又はそれぞれのJ遺伝子の下流又は定常領域の下流の第1の部位と、V遺伝子の内部又はすぐ上流の第2の部位での制限エンドヌクレアーゼ反応を実施することによって、VDJ組み換え産物を断片化して、消化されたVDJ組み換え断片及び非組み換えJ断片を產生すること；

(c) 前記消化された断片とオリゴヌクレオチドとを、それぞれのJ遺伝子の内部又はすぐ下流のユニーク領域でアニーリングさせること；

(d) 非組み換えJ断片及び残りのゲノムから、消化されたVDJ組み換え断片を分離すること；

(e) VDJ組み換え断片又は産物を配列決定すること；及び

(f) 配列決定データのデータ処理を行って、各VDJ組み換え産物を特定する及びVDJ組み換え頻度を定量化すること。

【請求項2】

VDJ組み換え産物を含む前記DNAサンプルが、細胞集団を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記細胞集団が、ヒト又はマウス、例えばトランスジェニックマウスから得られる、請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記細胞集団が、免疫グロブリン含有細胞、例えば白血球、特にT細胞又はB細胞などの小リンパ球を含む、請求項2又は3記載の方法。

【請求項 5】

VDJ組み換え産物を含む前記DNAサンプルが、リボソームディスプレイなどのインビトロ抗体産生システムから得られるVDJ組み換えDNAサンプルのライプラリを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記VDJ組み換え産物が、重鎖免疫グロブリンから得られる、請求項1から5のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

前記VDJ組み換え産物が、軽鎖免疫グロブリンから得られる、請求項1から5のいずれか1項記載の方法。

【請求項 8】

前記VDJ組み換え産物が、T細胞受容体から得られる、請求項1から5のいずれか1項記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞集団が、マウス細胞を含み、かつ前記プライマーが、配列番号:1～4又は47～50に記載されたプライマーのいずれかから選択される、請求項2から8のいずれか1項記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞集団が、ヒト細胞を含み、かつ前記プライマーが、配列番号:51～56に記載されたプライマーのいずれかから選択される、請求項2から8のいずれか1項記載の方法。

【請求項 11】

前記DNAサンプルが、超音波処理によって断片化される、請求項1から10のいずれか1項記載の方法。

【請求項 12】

前記DNAサンプルが、制限エンドヌクレアーゼ反応を実施することによって断片化される、請求項1から10のいずれか1項記載の方法。

【請求項 13】

ステップ(b)で使用される前記制限エンドヌクレアーゼ酵素が、DpnII及び/又はNlaIIIから選択される、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

ステップ(b)が、V遺伝子の上流の領域に対して特異的である酵素などの第3の制限エンドヌクレアーゼ酵素の使用を含む、請求項12又は請求項13記載の方法。

【請求項 15】

ステップ(c)が、プライマー伸長、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、及び/又は逆転写を実施するステップをさらに含む、請求項1から14のいずれか1項記載の方法。

【請求項 16】

ステップ(c)が、消化された断片を、結合対(例えばビオチンとストレプトアビシン又は抗原と抗体など)の一方のメンバーでタグ付けすることを含む、請求項1から15のいずれか1項記載の方法。

【請求項 17】

ステップ(c)の後の、前記VDJ組み換え産物の一方の末端への第1のアダプター分子の付加をさらに含む、請求項1から15のいずれか1項記載の方法。

【請求項 18】

ステップ(b)で使用される前記制限エンドヌクレアーゼ酵素が、NlaIIIであり、かつ、前記アダプター分子が、配列番号:5から選択される、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

ステップ(b)で使用される前記制限エンドヌクレアーゼ酵素が、DpnIIであり、かつ、前記アダプター分子が、配列番号:6から選択される、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

前記VDJ組み換え産物の第2の末端への第2のアダプター分子の付加をさらに含む、請求

項17から19のいずれか1項記載の方法。

【請求項21】

前記細胞集団が、マウス細胞を含み、かつ、前記第2のアダプターの付加のためのプライマーが、配列番号:7~11又は57~65から選択される、請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記細胞集団が、ヒト細胞を含み、かつ、前記第2のアダプターの付加のためのプライマーが、配列番号:66~72から選択される、請求項20記載の方法。

【請求項23】

ステップ(d)が、両方の鎖上のそれぞれのJ遺伝子の上流領域に対して特異的なオリゴヌクレオチドの使用を含む、請求項1から22のいずれか1項記載の方法。

【請求項24】

前記細胞集団が、マウス細胞を含み、かつ、ステップ(d)で使用される前記オリゴヌクレオチドが、配列番号:12~19又は24~34から選択される、請求項23記載の方法。

【請求項25】

前記細胞集団が、ヒト細胞を含み、かつ、ステップ(d)で使用される前記オリゴヌクレオチドが、配列番号:39~46から選択される、請求項23記載の方法。

【請求項26】

VDJ組み換え産物を特定するためのキットであって、請求項1から25のいずれか1項記載の方法に従って前記キットを使用するための説明書を含む、前記キット。

【請求項27】

請求項1記載の方法のステップ(a)に必要とされるDNAサンプルを得るために構成された抽出試薬をさらに含む、請求項26記載のキット。

【請求項28】

それぞれのJ遺伝子の内部又はすぐ下流の、又は定常領域の内部のユニーク領域に対して特異的なオリゴヌクレオチド又はプライマーをさらに含む、請求項26又は請求項27記載のキット。

【請求項29】

1以上の制限エンドヌクレアーゼ酵素をさらに含む、請求項26から28のいずれか1項記載のキット。

【請求項30】

ステップ(e)で得られた配列決定データを処理し、かつ前記サンプルにおけるVDJ組み換え頻度の視覚的表示を作成するために構成されたコンピュータ可読の記憶媒体をさらに含む、請求項26から29のいずれか1項記載のキット。

【請求項31】

請求項1から25のいずれか1項記載の方法によって得ることが可能なVDJ組み換え産物。

【請求項32】

免疫不全障害をモニタリングする際に使用するための、請求項1から25のいずれか1項記載の方法、又は請求項31に記載のVDJ組み換え産物。

【請求項33】

前記免疫不全障害が、リンパ腫又は白血病から選択される、請求項32記載の方法又はVDJ組み換え産物。