

【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29年4月13日(2017.4.13)

【公表番号】特表2016-512685(P2016-512685A)

【公表日】平成28年5月9日(2016.5.9)

【年通号数】公開・登録公報2016-027

【出願番号】特願2016-502574(P2016-502574)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
C 1 2 N	5/078	(2010.01)
C 0 7 K	14/705	(2006.01)
C 0 7 K	16/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/00	F
C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	5/078	
C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	16/00	

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月10日(2017.3.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中の単一のリンパ系細胞に由来する適応免疫受容体(AIR)へテロ二量体を形成する第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを含む複数の同族の適応免疫受容体(AIR)の対を同定する方法であって、前記サンプルが、哺乳動物対象に由来する複数のリンパ系細胞を含み、前記方法が、

(A) 各容器が複数のリンパ系細胞を含むように複数のリンパ系細胞を複数の容器に分配する工程と、

(B) 前記容器のそれぞれにおいて前記複数のリンパ系細胞に由来するmRNA分子をcDNA分子に逆転写する工程と、

(C) cDNA分子の多重PCRを実施することにより、前記複数の容器において複数のアンプリコンを生成させる工程であって、前記多重PCRが1回の反応で実質的に全ての再構成されたAIR分子を增幅し、前記アンプリコンのライブラリが、

(i) (a) 可変(V)領域コード配列およびJ領域コード配列、又は、V領域コード配列およびC領域コード配列、ならびに(b)ユニバーサルアダプター、を含む第1のAIR配列をコードする複数の第1のAIRアンプリコンと、

(ii) (a) V領域コード配列およびJ領域コード配列、又は、V領域コード配列およびC領域コード配列、ならびに(b)ユニバーサルアダプター、を含む第2のAIR配列をコードする複数の第2のAIRアンプリコンと、

を含む、工程と、

(D) 工程(C)で得られた前記複数のアンプリコンを第2のPCR反応において増幅して第2の複数のアンプリコンを生成させる工程であって、前記第2のPCR反応が、工程(C)で加えられた前記ユニバーサルアダプターに特異的なプライマーを使用し、前記第2のPCR反応の前記プライマーが(a)前記容器を識別できる少なくとも1種のバーコード、(b)生じたアンプリコンの実質的にそれぞれが、固有のランダムなスクレオチド配列を有するような、少なくとも1種のランダムなスクレオチド配列、および(c)シークエンシングプラットホーム特異的アダプター、を含む、工程と、

(E) 工程(D)で生成された前記第2の複数のアンプリコンのライプラリのハイスループットシークエンシングを行って、複数の第1のAIR配列及び第2のAIR配列のデータセットを得る工程と、

(F) 工程(D)で加えられた前記バーコード配列に基づいて、特定の容器に、それぞれの第1のAIRアンプリコン配列およびそれぞれの第2のAIRアンプリコン配列を割り当てるにより、それぞれの第1のAIR配列およびそれぞれの第2のAIR配列についての容器占有パターンを決定する工程と、

(G) 推定のAIR同族対を形成する可能性がある第1及び第2のAIR配列の可能な対形成のそれぞれに関して、前記第1のAIR配列及び第2のAIR配列がリンパ系細胞の同じクローン集団に由来しないことを考慮して、前記第1及び第2のAIR配列間での容器共有割合を観察する統計学的確率、又は、偶然予想されるより大きい容器共有割合を観察する統計学的確率、を算出する工程と、

(H) (1)所定の尤度カットオフ値より低いスコアを有する前記統計学的確率に基づき、複数の推定の第1のAIR配列と第2のAIR配列との対を特定する工程、または(2)同定された推定の第1のAIR配列と第2のAIR配列との対ごとに、前記第1のAIR配列と前記第2のAIR配列との可能な間違った対形成に関して、偽発見率の推定値を決定する工程、を実施する工程と、

(I) 前記統計学的確率または前記偽発見率の推定値に基づき、第1のAIR配列と第2のAIR配列との複数の同族対を、前記AIRヘテロ二量体をコードする真の同族対として同定する工程と、

を含む、方法。

**【請求項2】**

工程(B)におけるRNAのcDNAへの逆転写が、各RNA配列のVセグメント、Jセグメント、またはCセグメントに特異的にハイブリダイズするプライマーを使用することを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項3】**

前記複数の容器が、マルチウェルプレートのウェルを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項4】**

工程(B)の各容器が、同一の固有のバーコードを有するプライマーを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項5】**

工程(B)におけるRNAのcDNAへの逆転写が、ユニバーサルアダプターの組み込みを導くプライマーを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項6】**

工程(C)の前記多重PCRが、前記ユニバーサルアダプターに特異的にハイブリダイズするプライマーを利用する、請求項5に記載の方法。

**【請求項7】**

工程(D)の前記第2のPCR反応の前記プライマーが、さらなるバーコード、少なくとも5スクレオチド長のオリゴスクレオチドスペーサー、および/またはシークエンシングオリゴスクレオチドをさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項8】**

前記第1のポリペプチドがTCRポリペプチドを含み且つ前記第2のポリペプチドが

T C R ポリペプチドを含むか、前記第1のポリペプチドがT C R ポリペプチドを含み且つ前記第2のポリペプチドがT C R ポリペプチドを含むか、前記第1のポリペプチドがIgHポリペプチドを含み且つ前記第2のポリペプチドがIgHポリペプチドを含むか、前記第1のポリペプチドがIgHポリペプチドを含み且つ前記第2のポリペプチドがIgHポリペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記サンプルが血液サンプルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記サンプルが組織サンプルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記サンプルが、精製または培養されたヒトリンパ系細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

それぞれの容器が少なくとも $10^4$ 個のリンパ系細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記統計学的確率を算出する工程が、それぞれ推定の第1のAIR配列と第2のAIR配列との対形成についてのp値を決定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

偽発見率の推定値の決定が、

(a) 前記サンプルにおいて同定される前記複数の第1のAIR配列および第2のAIR配列のそれぞれの可能な対形成についてp値を算出する工程と、

(b) 第1のAIR配列および第2のAIR配列の前記可能な対形成の全てについての前記p値を、予想されるp値分布と比較する工程であって、前記予想されるp値分布が、第1のAIR配列および第2のAIR配列の真の対が存在しない実験を表すものとして算出される工程と、

(c) 第1のAIR配列および第2のAIR配列の推定の対ごとに、第1のAIR配列および第2のAIR配列の前記推定の対のp値と同じ若しくはそれ以下の全てのp値が、真の同族対形成を表すものとして決定されるように、予想される偽陽性結果の割合を決定する工程と、

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記予想されるp値分布の算出が、

第1のAIR配列および第2のAIR配列の真の対がないがそれ以外は同一である実験において第1のAIR配列および第2のAIR配列がそれぞれ観察されている前記容器の順序を変える工程と、

それぞれの推定のAIRの対に関連するp値の前記分布を算出する工程と、  
を含む、請求項14に記載の方法。