

【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27年7月16日(2015.7.16)

【公表番号】特表2014-521316(P2014-521316A)

【公表日】平成26年8月28日(2014.8.28)

【年通号数】公開・登録公報2014-046

【出願番号】特願2014-520314(P2014-520314)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 4 0 B 40/02 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 4 0 B 40/02 Z N A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成27年5月29日(2015.5.29)

【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】

ヒト組織試料中のヒト免疫グロブリンのV領域をコードする核酸の少なくとも90%を増幅するための、リーダー特異的プライマーのセット。

【請求項2】

請求項1に記載のセットにおいて、ヒト組織試料中のヒト免疫グロブリンのV領域をコードする核酸の100%を増幅することを特徴とするセット。

【請求項3】

請求項1に記載のセットにおいて、少なくとも50の異なるプライマーを含み、前記異なるプライマーのそれぞれが、配列番号1から76からなる群から選択される異なる核酸配列を含むことを特徴とするセット。

【請求項4】

請求項1に記載のセットにおいて、少なくとも32の異なるプライマーを含み、前記異なるプライマーのそれぞれが、配列番号1から32からなる群から選択される異なる核酸配列を含むことを特徴とするセット。

【請求項5】

請求項1に記載のセットにおいて、少なくとも15の異なるプライマーを含み、前記異なるプライマーのそれぞれが、配列番号33から48からなる群から選択される異なる核酸配列を含むことを特徴とするセット。

【請求項6】

請求項1に記載のセットにおいて、少なくとも27の異なるプライマーを含み、前記異なるプライマーのそれぞれが、配列番号49から76からなる群から選択される異なる核酸配列を含むことを特徴とするセット。

【請求項7】

可変領域の最初の8アミノ酸において体細胞高頻度突然変異を有する免疫グロブリン重鎖をコードする少なくとも 10^5 の核酸分子を含む、ファージライプラリ。

【請求項8】

リーダー特異的プライマーを使用した、ヒト対象から単離されるBリンパ球のPCR増幅により単離される可変領域コード核酸配列を含むファージディスプレイライプラリをスクリーニングすることによって決定される可変領域配列を含む、精製抗体。

【請求項9】

(a) Bリンパ球を含むヒト組織試料からヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖ヌクレオチド配列を増幅するために第一のPCRを使用し、前記PCR増幅においてリーダー特異的プライマーが使用され；

(b) 前記第一のPCR段階から増幅産物を単離し；

(c) 前記第一のPCR段階からの単離された前記増幅産物を発現ベクターに挿入することによって、コンストラクトの第一のセットを作製し；

(d) ヒト免疫グロブリンヌクレオチド配列の第一のライプラリを作製するために、前記コンストラクトの第一のセットを宿主細胞の第一のセットに導入する、

段階を含む、方法。

【請求項10】

請求項9に記載の方法において、前記リーダー特異的プライマーが、それぞれがストリンジエントなハイブリッド形成条件下で配列番号1から76からなる群から選択される異なる核酸配列の相補体に結合する異なるポリヌクレオチドのセットを含むことを特徴とする方法。

【請求項11】

請求項9に記載の方法において、

(e) 第一のライプラリまたはヒト組織試料からヒト免疫グロブリンヌクレオチド配列を増幅するために第二のPCRを使用し、前記PCR増幅において可変領域特異的なプライマーが使用され；

(f) 前記第二のPCR段階から増幅産物の第二のセットを単離し；

(g) 単離された前記増幅産物の第二のセットを発現ベクターに挿入することによって、コンストラクトの第二のセットを作製し；

(h) ヒト免疫グロブリンヌクレオチド配列の第二のライプラリを作製するために、宿主細胞の第二のセットに前記コンストラクトの第二のセットを導入し；

(i) 標的抗原に特異的に結合する可変領域をコードするヌクレオチド配列について前記第二のライプラリをスクリーニングし；

(j) 標的抗原に特異的に結合する可変領域をコードする前記ヌクレオチド配列の配列を得て；

(k) 標的抗原に特異的に結合する可変領域をコードする前記ヌクレオチド配列に特異的なリバースプライマーを作製するために、得られた配列情報を使用し；

(l) 前記標的抗原への免疫グロブリンの結合を促進するヒト組織試料中のBリンパ球における免疫グロブリンの配列に対応するヌクレオチド配列を前記第一のライプラリから増幅するために、第三のPCRにおいて前記リバースプライマーおよび前記リーダー特異的プライマーを使用する、

段階をさらに含むことを特徴とする、方法。

【請求項12】

体細胞高頻度突然変異が生じたV領域配列の完全セットを含む、ヒト免疫グロブリンcDNAライプラリ。