

【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24年12月20日(2012.12.20)

【公表番号】特表2012-508011(P2012-508011A)

【公表日】平成24年4月5日(2012.4.5)

【年通号数】公開・登録公報2012-014

【出願番号】特願2011-535569(P2011-535569)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 A

C 12 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成24年10月31日(2012.10.31)

【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】

以下の段階を含む、自己免疫疾患、感染症または癌の相関クローン型のレベルを決定することにより、個体の自己免疫疾患、感染症または癌をモニターする方法：

(a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；

(b) 該試料の細胞から核酸分子を増幅する段階であって、該核酸分子が、T細胞受容体遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の相補性決定領域3(CDR3)の配列を含む、段階；

(c) 個々の増幅核酸分子を空間的に単離する段階；

(d) 該空間的に単離された個々の増幅核酸分子を配列決定して、CDR3配列の完全なレパートリーを提供する段階；ならびに

(e) 該試料中のCDR3配列の完全なレパートリーにおける1つまたは複数の相関クローン型のレベルから該疾患をモニターする段階。

【請求項2】

各CDR3配列の完全なレパートリーが、少なくとも30bpを含む少なくとも1000配列の読み取りを含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

各CDR3配列の完全なレパートリーのCDR3配列が、Vセグメントを含み、増幅段階が、各Vセグメントに特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応における増幅段階を含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】

1つまたは複数の相関クローン型が、使用されたV、DおよびJセグメントによってCDR3配列の完全なレパートリーから区別される、請求項2記載の方法。

【請求項5】

CDR3配列が、免疫グロブリン遺伝子由来であり、体細胞突然変異レベルを有し、1つまたは複数の相関クローン型が、該各クローン型における体細胞突然変異レベルによってCDR3配列の完全なレパートリーから区別される、請求項2記載の方法。

【請求項6】

各CDR3配列が、CDR3配列の完全なレパートリー中でレベルを有し、1つまたは複数の相関クローン型が、該各クローン型のレベルによってCDR3配列の完全なレパートリーから区別される、請求項2記載の方法。

【請求項7】

各試料が、少なくとも10,000個のB細胞または少なくとも10,000個のT細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

試料が血液である、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

各試料が、少なくとも10,000個のB細胞または少なくとも10,000個のT細胞を含み、各CDR3配列の完全なレパートリーが、少なくとも100,000個の配列読み取りを含む、請求項1記載の方法。

【請求項10】

疾患が、自己免疫疾患であり、1つまたは複数の相関クローン型が、該疾患のピーク状態で存在し、該疾患のピーク状態が、自己免疫疾患の再燃（flare）状態である、請求項1記載の方法。

【請求項11】

1つまたは複数の相関クローン型のレベルに基づき個体を薬物で処置する段階をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

自己免疫疾患が、関節リウマチであり、処置段階が、個体を抗炎症薬またはDMARDで処置する段階を含む、請求項10記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

別の様において、疾患は全身性エリテマトーデスまたは多発性硬化症である。

[本発明1001]

以下の段階を含む、T細胞および/またはB細胞における組換えDNA配列のプロファイルを決定するための方法：

- (a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；
- (b) 該細胞からゲノムDNAの個々の分子を空間的に単離する段階；
- (c) ゲノムDNAの空間的に単離された個々の該分子を配列決定する段階；
- (d) 該試料からの異なる配列についてそれらのレベルを測定して、組換えDNA配列のプロファイルを作成する段階。

[本発明1002]

以下の段階を含む、T細胞および/またはB細胞における組換えDNA配列のプロファイルを決定するための方法：

- (a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；
- (b) 該細胞からゲノムDNAの個々の分子を空間的に単離する段階；
- (c) ゲノムDNAの個々の該分子を増幅する段階；
- (d) 該増幅DNAを配列決定する段階；ならびに
- (e) 該試料からの異なる配列についてそれらのレベルを測定して、組換えDNA配列のプロファイルを作成する段階。

[本発明1003]

以下の段階を含む、T細胞および/またはB細胞における組換えDNA配列のプロファイルを決定するための方法：

- (a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；

- (b) 該細胞からゲノムDNAを増幅する段階；
- (c) 該増幅DNAの個々の分子を空間的に単離する段階；
- (d) 増幅DNAの空間的に単離された個々の該分子を配列決定する段階；ならびに
- (e) 該試料からの異なる配列についてそれらのレベルを測定して、組換えDNA配列のプロファイルを作成する段階。

#### [本発明1004]

以下の段階を含む、T細胞および/またはB細胞における組換えDNA配列のプロファイルを決定するための方法：

- (a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；
- (b) 該細胞からゲノムDNAを増幅する段階；
- (c) 該増幅DNAの個々の分子を空間的に単離する段階；
- (d) 該増幅DNA分子を再増幅する段階；
- (e) 該再増幅DNA分子を配列決定する段階；ならびに
- (f) 該試料からの異なる配列についてそれらのレベルを測定して、組換えDNA配列のプロファイルを作成する段階。

#### [本発明1005]

以下の段階を含む、T細胞および/またはB細胞における組換えDNAの配列のプロファイルを決定するための方法：

- (a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；
- (b) 該細胞由来のRNAを逆転写してcDNAを形成する段階；
- (c) 該cDNAの個々の分子を空間的に単離する段階；
- (d) 任意で、cDNAの空間的に単離された個々の該分子を再増幅する段階；
- (e) 該cDNAおよび/または再増幅cDNAを配列決定する段階；ならびに
- (f) 該試料からの異なる配列についてそれらのレベルを測定して、組換えDNA配列のプロファイルを作成する段階。

#### [本発明1006]

以下の段階を含む、T細胞および/またはB細胞における組換えDNA配列のプロファイルを決定するための方法：

- (a) T細胞および/またはB細胞を含む対象由来の試料を採取する段階；
- (b) 該試料中の個々の細胞を空間的に単離する段階；
- (c) 該細胞由来の核酸の個々の分子を配列決定する段階；ならびに
- (d) 該試料からの異なる配列についてそれらのレベルを測定して、組換えDNA配列のプロファイルを作成する段階。

#### [本発明1007]

増幅および/または再増幅段階が、PCR、多重PCR、TMA、NASBA、またはLAMPを含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

#### [本発明1008]

空間的に単離する段階が、細菌を形質転換するために用いられるベクターに前記DNAもしくはcDNAをサブクローニングすること、固体支持体上で前記DNAもしくはcDNAを二次元に分離すること、ミセルを有する溶液中で前記DNAもしくはcDNAを三次元に分離すること、または微小反応チャンバーを用いて分子を分離することを含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

#### [本発明1009]

増幅および/または再増幅段階が、サブクローニングしたDNAもしくはcDNAを保有する細菌の増殖、スライド上でのDNAもしくはcDNAの増幅、またはビーズ上でのDNAもしくはcDNAの増幅によるものである、本発明1001～1005のいずれかの方法。

#### [本発明1010]

配列決定段階がジデオキシ配列決定を含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

#### [本発明1011]

配列決定段階が、可逆的終結標識ヌクレオチドを用いた合成による配列決定を含む、本

発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1012]

配列決定段階が、ヌクレオチド取り込み時のピロリン酸放出の検出を含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1013]

配列決定段階が、標識オリゴヌクレオチドプローブのライブラリーへのアレル特異的ハイブリダイゼーションを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1014]

配列決定段階が、標識オリゴヌクレオチドプローブのライブラリーへのアレル特異的ハイブリダイゼーションとそれに続く該プローブの連結とを用いた合成による配列決定を含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1015]

配列決定段階が、重合工程中の標識ヌクレオチドの取り込みのリアルタイムモニタリングを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1016]

組換えDNA配列がT細胞受容体遺伝子および/または免疫グロブリン遺伝子を含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1017]

配列決定段階が、免疫グロブリン遺伝子および/またはT細胞受容体遺伝子の完全クローン配列のサブセットを配列決定することを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1018]

完全クローン配列のサブセットが、免疫グロブリン遺伝子もしくはT細胞受容体遺伝子のV-D結合部、D-J結合部、免疫グロブリン遺伝子もしくはT細胞受容体遺伝子の完全な可変領域、抗原認識領域、または相補性決定領域3(CDR3)を含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

T細胞受容体遺伝子がT細胞受容体遺伝子を含む、本発明1017の方法。

[本発明1020]

免疫グロブリン遺伝子が免疫グロブリン重鎖遺伝子を含む、本発明1017の方法。

[本発明1021]

増幅または再増幅段階が、Vセグメントと相補的な複数のプライマー、およびCセグメントと相補的な1つのプライマーを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1022]

増幅または再増幅段階が、Vセグメントと相補的な複数のプライマー、およびCセグメントと相補的な複数のプライマーを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1023]

Vセグメントと相補的な複数のプライマーが、各Vセグメントに対する少なくとも3種の異なるプライマーを含み、Cセグメントと相補的な複数のプライマーが、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、または少なくとも6種のプライマーを含む、本発明1022の方法。

[本発明1024]

T細胞および/またはB細胞が全T細胞および/またはB細胞のサブセットである、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1025]

T細胞のサブセットがCD4+細胞、CD8+細胞、またはCD27<sup>高</sup>細胞である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

試料が、少なくとも100,000個、少なくとも500,000個、少なくとも750,000個、または少なくとも1,000,000個のT細胞を含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1027]

配列決定段階が、1回の実行当たり少なくとも1000件の読み取り、1回の実行当たり少な

くとも10,000件の読み取り、1回の実行当たり少なくとも100,000件の読み取り、または1回の実行当たり少なくとも1,000,000件の読み取りを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1028]

配列決定段階が、1回の読み取り当たり約30 bp、約40 bp、約50 bp、約60 bp、約70 bp、約80 bp、約90 bp、約100 bp、約110 bp、または約120 bpを作成することを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1029]

対象が自己免疫疾患の再燃(flare)状態にある時点で試料を採取する、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1030]

全身性エリテマトーデスを有するかまたはそれを有する疑いのある対象から試料を採取する、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1031]

以下の段階を含む、対象における1つまたは複数の相関クローン型を決定するための方法：

(a) 疾患の第1状態に関連する少なくとも1つの対象由来の試料から空間的に単離された個々の分子を核酸配列決定することにより、1つまたは複数のクローン型プロファイルを作成する段階、および

(b) その1つまたは複数のクローン型プロファイルに基づいて、対象における1つまたは複数の相関クローン型を決定する段階。

[本発明1032]

少なくとも1つの試料が、疾患に罹患した組織に由来する、本発明1031の方法。

[本発明1033]

1つまたは複数の相関クローン型の決定が、少なくとも2つの試料からのクローン型プロファイルを比較することを含む、本発明1031の方法。

[本発明1034]

疾患の第1状態が、疾患のピーク状態である、本発明1031の方法。

[本発明1035]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において存在する、本発明1034の方法。

[本発明1036]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において存在しない、本発明1034の方法。

[本発明1037]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において高い、本発明1034の方法。

[本発明1038]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において低い、本発明1034の方法。

[本発明1039]

試料がT細胞および/またはB細胞を含む、本発明1031の方法。

[本発明1040]

T細胞および/またはB細胞がT細胞および/またはB細胞のサブセットを含む、本発明1039の方法。

[本発明1041]

T細胞および/またはB細胞のサブセットが、マーカーとの相互作用によって濃縮される、本発明1040の方法。

[本発明1042]

マーカーが、T細胞および/またはB細胞のサブセット上の細胞表面マーカーである、本

発明1041の方法。

[本発明1043]

T細胞および/またはB細胞のサブセットが、疾患において特異的に存在する抗原と相互作用する、本発明1039の方法。

[本発明1044]

疾患が全身性エリテマトーデスまたは多発性硬化症である、本発明1031の方法。

[本発明1045]

以下の段階を含む、疾患有する対象に由来する任意の試料における1つまたは複数の相関クローン型を予測し得るアルゴリズムを開発するための方法：

- (a) 疾患に関連する1組の試料から複数のクローン型プロファイルを作成する段階、
- (b) その1組の試料から1つまたは複数の相関クローン型を同定する段階、
- (c) (b)において同定された1つまたは複数の相関クローン型からの配列パラメータおよび/または機能的データを用いて、疾患有する対象に由来する任意の試料における相関クローン型を予測し得るアルゴリズムを開発する段階。

[本発明1046]

疾患に罹患した1つまたは複数の組織から1組の試料を採取する、本発明1045の方法。

[本発明1047]

1つまたは複数の相関クローン型の同定が、少なくとも2つの試料からのクローン型プロファイルを比較することを含む、本発明1045の方法。

[本発明1048]

機能的データが、T細胞および/もしくはB細胞表面上のマーカーの結合能、またはT細胞もしくはB細胞による抗原との相互作用を含む、本発明1045の方法。

[本発明1049]

配列パラメータが、核酸配列および予測されるアミノ酸配列を含む、本発明1045の方法

。

[本発明1050]

試料が、疾患のピーク状態にある1つまたは複数の個体に由来する、本発明1045の方法

。

[本発明1051]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において存在する、本発明1050の方法。

[本発明1052]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において高レベルである、本発明1050の方法。

[本発明1053]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において低レベルである、本発明1050の方法。

[本発明1054]

1つまたは複数の相関クローン型が、疾患のピーク状態において存在しない、本発明1050の方法。

[本発明1055]

疾患が全身性エリテマトーデスまたは多発性硬化症である、本発明1045の方法。

[本発明1056]

以下の段階を含む、個体の1つまたは複数の相関クローン型を発見するための方法：

- (a) 個体由来の試料からのクローン型プロファイルを、本発明1045のアルゴリズムに入力する段階、および

(b) アルゴリズムを用いて、個体の1つまたは複数の相関クローン型を決定する段階。

[本発明1057]

疾患のピーク状態において試料を採取する、本発明1056の方法。

[本発明1058]

疾患に罹患した組織から試料を採取する、本発明1056の方法。

[本発明1059]

以下の段階を含む、疾患活動性スコアを算出するアルゴリズムを作成するための方法：

(a) 1組の因子を用いて相関クローン型のレベルを疾患活動性スコアに統合するアルゴリズムを開発する段階、

(b) 疾患活動性スコアを、疾患状態に関する臨床データと比較する段階、および

(c) 臨床データと疾患活動性スコアとの相関を最大化するために因子を最適化する段階。

[本発明1060]

以下の段階を含む、個体の疾患状態をモニターするための方法：

(a) 個体由来の試料からのクローン型プロファイルを決定する段階、

(b) 本発明1059において作成された疾患活動性を算出するアルゴリズムに、(a)からのクローン型プロファイル情報を入力する段階、および

(c) 疾患活動性スコアを算出するアルゴリズムを用いて、個体の疾患状態を予測するスコアを作成する段階。

[本発明1061]

個体における1つまたは複数の相関クローン型を決定する段階、および1つまたは複数の相関クローン型の情報をアルゴリズムに入力する段階をさらに含む、本発明1060の方法。

[本発明1062]

個体における1つまたは複数の相関クローン型を決定する段階が、

(a) 疾患の第1状態に関連する少なくとも1つの対象由来の試料から空間的に単離された個々の分子を核酸配列決定することにより、1つまたは複数のクローン型プロファイルを作成すること、および

(b) その1つまたは複数のクローン型プロファイルに基づいて、対象における1つまたは複数の相関クローン型を決定することを含む、本発明1061の方法。

[本発明1063]

個体における1つまたは複数の相関クローン型を決定する段階が、

(a) (i) 疾患に関連する1組の試料から複数のクローン型プロファイルを作成する段階と、

(ii) その1組の試料から1つまたは複数の相関クローン型を同定する段階と、

(iii) (ii)において同定された1つまたは複数の相関クローン型からの配列パラメータおよび/または機能的データを用いて、疾患を有する対象に由来する任意の試料における相関クローン型を予測し得るアルゴリズムを開発する段階と

によって開発された、1つまたは複数のクローン型を予測し得るアルゴリズムに、個体由来の試料からのクローン型プロファイルを入力すること、ならびに

(b) 1つまたは複数のクローン型を予測し得るアルゴリズムを用いて、個体の1つまたは複数の相関クローン型を決定することを含む、本発明1061の方法。

[本発明1064]

疾患が全身性エリテマトーデスまたは多発性硬化症である、本発明1061の方法。