

【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7月20日(2017.7.20)

【公表番号】特表2016-523547(P2016-523547A)

【公表日】平成28年8月12日(2016.8.12)

【年通号数】公開・登録公報2016-048

【出願番号】特願2016-524301(P2016-524301)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 Q 1/02 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A Z

C 12 Q 1/68 A

C 12 Q 1/02

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月8日(2017.6.8)

【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】

複数の免疫細胞受容体鎖からクロノタイププロファイルを生成する方法であって、

(a) 反応混合物中、プライマー伸長条件下で、第1セットのプライマーとB細胞及び/又はT細胞由来の再構成された核酸サンプル及び/又は無細胞系DNAサンプルとを組み合わせる工程であって、前記第1セットのそれぞれのプライマーは受容体特異的な部分、第1のプライマー結合部位を含有する5'-非相補的末端、及び前記受容体特異的な部分と前記第1のプライマー結合部位との間に配置された配列タグを含み、前記受容体特異的な部分は、第1の所定の位置にて異なる再構成された核酸にアニーリングし、伸長して第1伸長産物を生成する、工程と；

(b) プライマー伸長条件下で、前記反応混合物に第2セットのプライマーを添加する工程であって、前記第2セットのそれぞれのプライマーは、受容体特異的な部分を有し、前記受容体特異的な部分は、第2の所定の位置にて前記第1の伸長産物にアニーリングし、前記第2セットのそれぞれのプライマーは、伸長して第2の伸長産物を生成し、それぞれの第2の伸長産物は、第1のプライマー結合部位、配列タグ、及びT細胞受容体鎖又はB細胞受容体鎖の部分をコードしている再構成された核酸を含む、工程と；

(c) 前記反応混合物においてポリメラーゼ連鎖反応を実施して、アンプリコンを生成する工程であって、前記ポリメラーゼ連鎖反応は、前記第1のプライマー結合部位に特異的な順方向プライマーと、前記第2セットのプライマーに特異的な逆方向プライマーとを使用する、工程と；

(d) 前記アンプリコンを配列決定して、複数のT細胞受容体鎖及び/又はB細胞受容体鎖のクロノタイププロファイルを生成する工程と、を含む、複数の免疫細胞受容体鎖からクロノタイププロファイルを生成する方法。

【請求項2】

前記複数のT細胞受容体鎖がTCR、TCR及びTCRを含み、前記第1セットのプライマー及び前記第2セットのプライマーが、TCR及びTCRのVDJ領域をコードしている再構成された核酸領域に隣接するプライマー及びTCRのVJ領域に隣

接するプライマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記配列決定する工程が：

それぞれのエラー率を有し、それぞれのタグ配列と、再構成された核酸配列とを含む配列リードを生成することと；

同様のタグ配列を有する配列リードをアライメントして、同様の配列タグを有する配列リードのグループを形成することと；

グループの配列リードを結合させてクロノタイプを決定することであって、配列リードのグループの尤度が明らかに少なくとも 95 % であるときは常に、配列リードのグループを、異なる再構成された核酸配列に結合させる、決定することと；

前記クロノタイプから前記クロノタイププロファイルを生成することと、を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の伸長産物及び / 又は前記第 2 の伸長産物の生成後に、伸長していない前記第 1 セット及び / 又は前記第 2 セットのプライマーを除去する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 セットの前記プライマーのアニーリング及び伸長が、前記第 1 の伸長産物の融解後に繰り返される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 2 セットの前記プライマーのアニーリング及び伸長が、前記第 2 の伸長産物の融解後に繰り返される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記除去する工程が、前記反応混合物にエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を添加することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数の B 細胞受容体鎖が Ig H 及び Ig K を含み、前記第 1 セットの前記プライマー及び前記第 2 セットの前記プライマーが、Ig H の VDJ 領域、Ig H の DJ 領域、及び Ig K の VJ 領域をコードしている再構成された核酸領域に隣接するプライマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

サンプル中の、複数の免疫受容体鎖をコードしている再構成された核酸のクロノタイププロファイルを生成する方法であって、

(a) T 細胞及び / 又は B 細胞及び / 又は無細胞系 DNA を含む個体由来のサンプルの T 細胞受容体遺伝子又はイムノグロブリン遺伝子の再構成された核酸分子に配列タグを付加させてタグ - 核酸複合体を生成する工程であって、少なくとも 1 つのタグ - 核酸複合体又はそれらのコピーには異なる配列タグが付加されている、工程と；

(b) 前記タグ - 核酸複合体を増幅させる工程と；

(c) 前記タグ - 核酸複合体を配列決定して、それぞれのエラー率を有し、それぞれの配列タグと、再構成された核酸配列とを含む配列リードを提供する工程と；

(d) 同様の配列タグを有する配列リードをアライメントして、同様の配列タグを有する配列リードのグループを形成する工程と；

(e) グループの配列リードを結合させてクロノタイプを決定する工程であって、配列リードのグループの尤度が明らかに少なくとも 95 % であるときは常に、配列リードのグループを、異なる再構成された核酸配列に結合させる、工程と；

(f) クロノタイプレベルを検出することにより前記サンプルのクロノタイププロファイルを生成する工程と、を含む、サンプル中の、複数の免疫受容体鎖をコードしている再構成された核酸のクロノタイププロファイルを生成する方法。

【請求項 10】

前記付加させる工程が、

反応混合物中、プライマー伸長条件下で、第1セットのプライマーとサンプルとを組み合わせることとあって、前記第1セットのそれぞれのプライマーは受容体特異的な部分、第1のプライマー結合部位を含有する5' - 非相補的末端、及び前記受容体特異的な部分と前記第1のプライマー結合部位との間に配置された配列タグを含み、前記受容体特異的な部分は、第1の所定の位置にて異なる再構成された核酸にアニーリングし、伸長して第1伸長産物を生成する、組み合せることと；

プライマー伸長条件下で、前記反応混合物に第2のプライマーセットを添加することとあって、前記第2セットのそれぞれのプライマーは、受容体特異的な部分を有し、前記受容体特異的な部分は、第2の所定の位置にて前記第1の伸長産物にアニーリングし、前記第2セットのそれぞれのプライマーは、伸長して第2の伸長産物を生成し、それぞれの第2の伸長産物は、第1のプライマー結合部位、配列タグ、及びT細胞受容体鎖又はB細胞受容体鎖の部分をコードしている再構成された核酸を含む、添加することと、を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記反応混合物から、伸長していない前記第1セット及び前記第2セットのプライマーを除去する工程を更に含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記第1セットの前記プライマーのアニーリング及び伸長が、前記第1の伸長産物の融解後に繰り返される、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記第2セットの前記プライマーのアニーリング及び伸長が、前記第2の伸長産物の融解後に繰り返される、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

前記除去する工程が、前記反応混合物にエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を添加することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

前記付加する工程及び前記增幅させる工程がタグ-核酸複合体を生成し、少なくとも1つの再構成された核酸及びそのそれぞれのコピーには複数の異なる配列タグが付加されている、請求項9に記載の方法。

【請求項16】

前記再構成された核酸が、TCR、TCR及びTCR鎖をコードしている再構成された核酸を含み、前記第1セットのプライマー及び前記第2セットのプライマーが、TCR及びTCRのVDJ領域をコードしている再構成された核酸領域に隣接するプライマー及びTCRのVJ領域に隣接するプライマーを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記再構成された核酸が、IGH及びIGKをコードしている再構成された核酸を含み、前記第1セットのプライマー及び前記第2セットのプライマーが、IGHのVDJ領域、IGHのDJ領域、及びIGKのVJ領域をコードしている再構成された核酸領域に隣接するプライマーを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記配列リードのグループの尤度が明らかに少なくとも99.9%であるときは常に、前記結合させる工程が、前記配列リードのグループを、異なる再構成された核酸配列に結合させることを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項19】

前記配列タグがモザイクタグであり、前記モザイクタグが、交互する定常領域及び可変領域を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記順方向プライマー及び/又は逆方向プライマーが、サンプルタグを含有する5' - 非相補的末端を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記第1の所定の位置が、V領域である、請求項1に記載の方法。

**【請求項22】**

前記第1セットのそれぞれのプライマーの受容体特異的な部分が、V領域の重複しない異なる部分にアニーリングする、請求項21に記載の方法。

**【請求項23】**

前記第2の所定の位置が、J領域又はC領域である、請求項1に記載の方法。

**【請求項24】**

前記第2セットのそれぞれのプライマーの受容体特異的な部分が、J領域の重複しない異なる部分にアニーリングする、請求項23に記載の方法。

**【請求項25】**

前記第2セットのそれぞれのプライマーの受容体特異的な部分が、J領域の単一のプライマー結合部位にアニーリングする、請求項23に記載の方法。

**【請求項26】**

前記添加する工程が、前記反応混合物においてポリメラーゼ連鎖反応を実施して、アンブリコンを生成することを含み、前記ポリメラーゼ連鎖反応が、前記第1のプライマー結合部位に特異的な順方向プライマーと、前記第2セットのプライマーに特異的な逆方向プライマーとを使用する、請求項10に記載の方法。

**【請求項27】**

前記順方向プライマー及び/又は逆方向プライマーが、サンプルタグを含有する5' - 非相補的末端を含む、請求項26に記載の方法。

**【請求項28】**

前記配列タグがモザイクタグであり、前記モザイクタグが、交互する定常領域及び可変領域を含む、請求項9に記載の方法。

**【請求項29】**

前記第1の所定の位置が、V領域である、請求項10に記載の方法。

**【請求項30】**

前記第1セットのそれぞれのプライマーの受容体特異的な部分が、V領域の重複しない異なる部分にアニーリングする、請求項29に記載の方法。

**【請求項31】**

前記第2の所定の位置が、J領域又はC領域である、請求項10に記載の方法。

**【請求項32】**

前記第2セットのそれぞれのプライマーの受容体特異的な部分が、J領域の重複しない異なる部分にアニーリングする、請求項31に記載の方法。

**【請求項33】**

前記第2セットのそれぞれのプライマーの受容体特異的な部分が、J領域の単一のプライマー結合部位にアニーリングする、請求項31に記載の方法。