

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte for dannelsen av monoklonale antistoffer, som omfatter følgende trinn:

5 a) dannelsen av et cDNA-sekvens bibliotek, hvori dannelsen omfatter følgende trinn:

i) isolering av mRNA fra lymfocytter isolert fra et vertindivid som er blitt immunisert med et antigen;

ii) revers transkripsjon av mRNA til cDNA;

10 iii) amplifisering av målantistoff cDNA sekvenser; og

iv) sekvensering av målantistoff cDNA sekvenser; og

b) analysen av hyppigheten av målantistoff cDNA sekvenser, som omfatter:

15 (i) sammenlikning av de relative hyppigheter av målantistoff cDNA sekvenser før og etter eksponering for antigenet, hvori målantistoff cDNA sekvenser som har en betydelig høyere hyppighet etter eksponering for antigenet identifiseres som kandidatantistoffsekvenser; eller

20 (ii) sammenlikning av de relative hyppigheter av målantistoff cDNA sekvenser på to eller flere tidspunkter etter eksponering for antigenet, hvori mål- antistoff cDNA sekvenser som har en betydelig lavere hyppighet på senere tidspunkter identifiseres som kandidatantistoffsekvenser.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori lymfocytene omfatter B-celler og T-celler, eventuelt hvori lymfocytene omfatter isolerte B-celler.

25 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvori det immuniserende trinnet omfatter flere eksponeringer for det samme eller beslektede antigener, og hvori analysen av hyppigheten av målantistoff omfatter sammenlikning av mål-antistoff cDNA sekvenser som har beslektede men ikke identiske tungkjede-regioner.

30 4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, som videre omfatter reimmunisering av vertindividet med antigenet, og dannelsen av et cDNA-sekvens bibliotek etter reimmuniseringen og sammenlikning av de relative hyppighetene av målantistoffsekvensene før og etter reimmunisering, hvori

antistoffsekvenser som er tilstede ved en betydelig høyere hyppighet etter re-immuniseringen identifiseres som modne kandidatantistoffsekvenser.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvori mål-antistoffsekvensene omfatter immunoglobulin (Ig) tungkjede variabelt domene sekvenser.
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvori mål-antistoffsekvensene omfatter sekvenser med en eller flere komplementaritetsbestemmende regioner (CDR) av et immunoglobulin (Ig) tungkjede variabelt domene.
7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, som videre omfatter subkloning av kandidatantistoffsekvensene med en lettkjede variabelt domene sekvens og et Ig-rammeverk for å frembringe et sett med monoklonale kandidatantistoffer, eventuelt hvori Ig-rammeverket er et humant Ig rammeverk.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 7, som videre omfatter analysering av de monoklonale kandidatantistoffene for affinitet til antigenet.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 7 eller 8, som videre omfatter å underkaste de monoklonale kandidatantistoffene for positiv seleksjon for å identifisere høy-affinitets-monoklonale antistoffer,

eventuelt hvori de monoklonale kandidatantistoffene underkastes positiv seleksjon som omfatter å bringe de monoklonale kandidatantistoffene i kontakt med antigenet bundet til et substrat og isolering av bundne antistoffer fra ikke-bundne antistoffer, og/eller

eventuelt hvori de monoklonale kandidatantistoffene bindes til et antigen med en affinitet på minst 1×10^{10} liter/mol, målt som en assosiasjons-konstant (K_{aff}).
10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, som videre omfatter sekvensering av de høy-affinitets-monoklonale antistoffene.
11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, hvori de relative hyppigheter av målantistoffsekvenser analyseres ved hjelp av en bioinformatikk

programvarealgoritme.

5 12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvori de
amplifiserte mål cDNA sekvensene sekvenseres ved hjelp av «massively parallel
signature sequencing» (MPSS).

10 13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, hvori vert-
individet er et forsøksdyr, eventuelt hvori vertindividet er et transgent dyr som
uttrykker humane antistoffer, eller eventuelt hvori vertindividet er en human pasient
som har blitt eksponert for et antigen eller et patogen eller som lider av en sykdom
som endrer den adaptive immunresponsen.

15 14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13, hvori vertindividet
er blitt immunisert med multiple antigener, eventuelt hvori det monoklonale antistoffet
er reaktivt overfor multiple antigener.

20 15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14, hvori et
bakgrunnsantigen har blitt administrert og med selektering med henblikk på
antistoffer som er reaktive med bakgrunnsantigenet, eventuelt hvori
bakgrunnsantigenet er blitt administrert etter et første antigen.