

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月6日(06.10.2022)



(10) 国際公開番号
WO 2022/210066 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/012965
- (22) 国際出願日: 2022年3月22日(22.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-061507 2021年3月31日(31.03.2021) JP
- (71) 出願人: 積水メディカル株式会社 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 関野 哲男 (SEKINO Tetsuo); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積

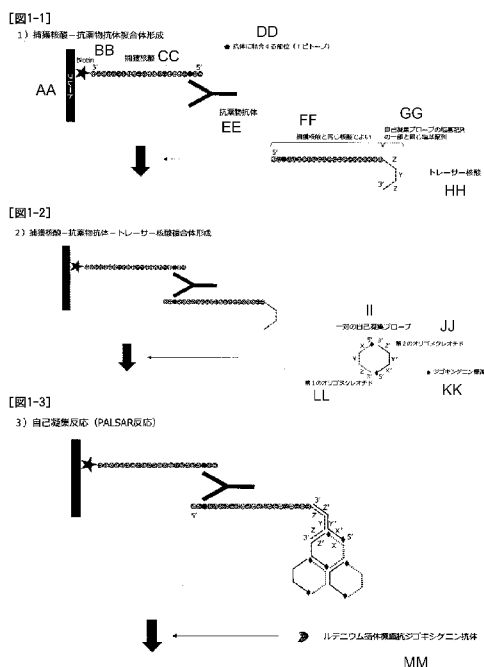
水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 大森 茜 (OOMORI Akane); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所 (MOEGI PATENT OFFICE); 〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目1番3号 Kan a l P l a t z 7階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: ANTIDRUG ANTIBODY MEASUREMENT METHOD

(54) 発明の名称: 抗薬物抗体測定方法



- 1 Capture nucleic acid-antidrug antibody composite formation
 - 2 Capture nucleic acid-antidrug antibody-tracer nucleic acid composite formation
 - 3 Self-aggregation reaction (PALSAR reaction)
 - 4 Detection antibody reaction
- AA Plate
 - BB Biotin
 - CC Capture nucleic acid
 - DD Position that bonds to antibody (epitope)
 - EE Antidrug antibody
 - FF May be same nucleic acid as capture nucleic acid
 - GG Same base sequence as portion of base sequence of self-aggregation probe
 - HH Tracer nucleic acid
 - II Pair of self-aggregation probes
 - JJ Second oligonucleotide
 - KK Digoxigenin label
 - LL First oligonucleotide
 - MM Ruthenium complex-labeled anti-digoxigenin antibody

(57) Abstract: Provided is a measurement method for antidrug antibodies that is easier and lower-cost compared with conventional methods. Provided is a double antigen bridging immunoassay method using a capture nucleic acid and a tracer nucleic acid. By using the capture nucleic acid and the tracer nucleic acid in the double antigen bridging immunoassay method, it is possible to measure antidrug antibodies easily and at a lower cost. Moreover, by using the tracer nucleic acid, it becomes possible to employ a nucleic acid-utilizing high-sensitivity detection method.



WO 2022/210066 A1

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))
-

(57) 要約：従来法と比較して、簡便かつ安価な抗薬物抗体の測定法を提供する。捕獲核酸及びトレーサー核酸を使用する二重抗原架橋イムノアッセイ法を提供する。二重抗原架橋イムノアッセイ法において捕獲核酸及びトレーサー核酸を使用することにより、抗薬物抗体の測定を簡便かつ安価に行うことができる。また、トレーサー核酸を使用することにより、核酸を利用した高感度検出方法を採用することが可能になる。

明 細 書

発明の名称：抗薬物抗体測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗薬物抗体の測定方法と、そのような測定方法に用いるためのキットに関する。

背景技術

[0002] 抗薬物抗体の測定方法として、捕獲薬物抗体とトレーサー薬物抗体を使用する二重抗原架橋イムノアッセイ法が知られている(特許文献1)。特許文献1の方法は、捕獲薬物抗体が、固相に結合される抗体部位が異なる、同じアミノ酸配列を有する少なくとも2つの該薬物抗体を含む該薬物抗体の混合物であること、及び、トレーサー薬物抗体が、検出可能な標識に結合される抗体部位が異なる、同じアミノ酸配列を有する少なくとも2つの該薬物抗体を含む該薬物抗体の混合物であることを特徴としている。

しかし、特許文献1の方法は、上記したように固相又は検出可能な標識に結合される抗体の部位が異なる、同じアミノ酸配列を有する薬物抗体を、捕獲薬物抗体用及びトレーサー薬物抗体用に、それぞれ2種以上ずつ、合計4種以上を調製することが必須であるため、両抗体の調製に高額な費用及び長い時間が必要になる。また、当該薬物抗体を使用したイムノアッセイ法の性能管理及び試薬の品質管理も複雑になる。

したがって、より簡便かつ安価な抗薬物抗体の測定方法に対するニーズが存在する。

本発明者らは、捕獲核酸及びトレーサー核酸を使用することにより、簡便かつ安価に抗薬物抗体を測定できることを見出し、本発明を完成した。捕獲核酸及びトレーサー核酸は、極めて簡便かつ安価に化学合成することが可能であり、かつ、多種多様な修飾も容易に行うことができる。更にアッセイ法の性能管理及び試薬の品質管理も簡便に行うことができる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第4902674号

特許文献2：特許第3267576号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明が解決しようとする課題は、従来法と比較して、簡便かつ安価な抗薬物抗体の測定方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明の課題を解決するために、捕獲核酸及びトレーサー核酸を使用する二重抗原架橋イムノアッセイ法を提供する。即ち、本発明は以下の〔実施態様1〕～〔実施態様20〕の構成からなる。

〔実施態様1〕

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i)試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させて前記捕獲核酸、前記抗薬物抗体、及び前記トレーサー核酸の複合体(「捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体」と呼ぶことがある)を形成させる工程、

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する；及び

(ii)前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を検出する工程。

〔実施態様2〕

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i)試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させて捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成させる工程、

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する；及び

(ii)増感法を用いて前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を検出する工程。

〔実施態様3〕

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i) 試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させて捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成させる工程、

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する；

(ii) 前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体に、第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプローブを接触させて、前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体と、第1及び第2のオリゴヌクレオチドが自己凝集してなるオリゴヌクレオチドポリマーとのポリマー複合体を形成する工程；及び

(iii) 前記ポリマー複合体を検出する工程。

〔実施態様4〕

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i) 試料と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する捕獲核酸と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有するトレーサー核酸とを接触させる工程、

ここで、前記試料中に前記抗薬物抗体が含まれる場合には、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成される；

(ii) 前記捕獲核酸を捕捉し、前記複合体の形成に関与せず遊離の状態で存在する前記トレーサー核酸を当該複合体と分離し、除去する工程；及び

(iii) 前記分離・除去工程の後、分離・除去されずに残存するトレーサー核酸を検出することにより、試料中の抗薬物抗体を検出する工程。

〔実施態様5〕

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i) 試料と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する捕獲核酸と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有するトレーサー核酸とを接触させる工程、

ここで、前記試料中に前記抗薬物抗体が含まれる場合には、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成される；

(ii)前記捕獲核酸を捕捉する工程、

ここで、前記捕捉工程は前記複合体の形成前、形成後、形成途中、又は形成と同時にされる；

(iii)前記捕獲核酸を捕捉し、前記複合体の形成に関与せず遊離の状態に存在する前記トレーサー核酸を前記複合体と分離し、除去する工程；及び

(iv)前記分離・除去工程の後、分離・除去されずに残存するトレーサー核酸を検出することにより、試料中の抗薬物抗体を検出する工程。

〔実施態様6〕

捕獲核酸を捕捉する工程が、捕獲核酸の固相への結合であり、分離・除去する工程が、捕獲核酸が結合した固相の洗浄である、実施態様4又は5に記載の方法。

〔実施態様7〕

検出される抗薬物抗体は、試料中にIgG、IgM、IgD、IgE、又はIgAのIgクラスの抗体が存在する場合、2以上のIgクラスを一の測定で検出する、実施態様1～6のいずれかに記載の方法。

〔実施態様8〕

捕獲核酸及びトレーサー核酸における前記抗薬物抗体が結合するエピトープが同じである、実施態様1～7のいずれかに記載の方法。

〔実施態様9〕

捕獲核酸及びトレーサー核酸は、核酸鎖の鎖長が同一であるか又はトレーサー核酸の核酸鎖の鎖長が捕獲核酸より1mer～60mer長いものである、実施態様1～8のいずれかに記載の方法。

〔実施態様10〕

トレーサー核酸は、核酸鎖の鎖長が捕獲核酸より10mer～50mer長いものである、実施態様1～9のいずれかに記載の方法。

〔実施態様11〕

試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させる工程は、試料と捕獲核酸を接触させる第1の工程と、第1の工程の産物とトレーサー核酸を接触させる第2の工程を含む、実施態様1~10のいずれかに記載の方法：

ここで、前記試料中に前記抗薬物抗体が含まれる場合には、第1の工程で捕獲核酸-抗薬物抗体複合体が形成され、第2の工程で捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成される。

〔実施態様12〕

前記第1の複合体を形成する工程と第2の複合体を形成する工程が同時に行われる、実施態様11に記載の方法。

〔実施態様13〕

前記捕獲核酸とトレーサー核酸の一方又は両方が化学修飾された核酸である、実施態様1~12のいずれかに記載の方法。

〔実施態様14〕

前記化学修飾された核酸が、ロックド核酸(LNA)、架橋核酸(BNA)、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、モルフォリノオリゴヌクレオチド、ボラノフォスフェートオリゴヌクレオチド、2'-O-メチル化RNA(2'-OMe)、2'-O-メトキシエチル化RNA(2'-MOE)、又は2'-F-RNAである実施態様13に記載の方法。

〔実施態様15〕

前記抗薬物抗体が抗核酸医薬抗体である実施態様1~14のいずれかに記載の方法

〔実施態様16〕

試料が血液由来成分である実施態様1~15のいずれかに記載の方法。

〔実施態様17〕

以下を含む、試料中の抗薬物抗体を検出するキット：

- (1)捕獲核酸；
- (2)トレーサー核酸；及び
- (3)第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプロ-

ブ;

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する。

〔実施態様18〕

捕獲核酸及びトレーサー核酸の前記抗薬物抗体に対するエピトープが同じである、実施態様17に記載のキット。

〔実施態様19〕

以下を特徴とする、捕獲核酸とトレーサー核酸とを含む二重抗原架橋イムノアッセイを用いて試料中の抗薬物抗体を免疫学的に測定するための方法:

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する。

〔実施態様20〕

実施態様1～19のいずれかに記載の方法又はキット:ここで、

前記捕獲核酸は、

鎖長が15～30merの一本鎖DNA、

の構成を有し、

前記トレーサー核酸は、

5'末端側から順に、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域X、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Y、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域X、及び捕獲核酸と同じ配列、からなるオリゴヌクレオチド、又は

5'末端側から順に、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Z、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Y、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Z、及び捕獲核酸と同じ配列、からなるオリゴヌクレオチド

の構成を有し、

前記第1のオリゴヌクレオチドは、

5'末端から順に核酸領域X、核酸領域Y、及び核酸領域Zからなるオリゴヌクレオチド

の構成を有し、

前記第2のオリゴヌクレオチドは、

5'末端から順に前記核酸領域Xに相補的な核酸領域X'、前記核酸領域Yに相補的な核酸領域Y'、前記核酸領域Zに相補的な核酸領域Z'からなるオリゴヌクレオチド

の構成を有し、

トレーサー核酸に含まれる標識又は第1又は第2のオリゴヌクレオチドに含まれる標識が検出される。

発明の効果

- [0006] 二重抗原架橋イムノアッセイ法において捕獲核酸及びトレーサー核酸を使用することにより、抗薬物抗体の測定を簡便かつ安価に行うことができる。また、トレーサー核酸を使用することにより、PCR法やパルサー法(特許文献2)などの核酸を利用する高感度検出方法を採用することが可能になる。

図面の簡単な説明

- [0007] [図1]本発明の基本工程の一態様を示す工程模式図である。
[図2]実施例1のシグナル値を示すグラフである。
[図3]実施例2のシグナル値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0008] 本明細書において「測定方法」、「検出方法」の用語は、特に断らない限り同一の概念を含む最も広義な用語として使用している。
従って、本発明の方法は、検出されるシグナルの強度を測定することにより、抗薬物抗体の測定方法、検出方法、定量測定方法、又は定性測定方法として使用することが出来る。
- [0009] 本明細書において、「抗薬物抗体」という用語は、薬物に対して向けられる抗体を意味する。そのような抗体は、例えば、薬物が投与された患者の免疫原性反応として薬物治療の際に産生される可能性がある。測定対象の「抗薬物抗体」は、生体試料中に含まれるものであれば特に限定はないが、好ましくは、IgG、IgM、IgD、IgE、又はIgAであり、更に好ましくはIgG又はIgMである。

[0010] 上記抗薬物抗体としては、「抗核酸医薬抗体」が挙げられる。当該「抗核酸医薬抗体」における「核酸医薬」としては、公知の「siRNA」、「miRNA」、「アンチセンス」、「アプタマー」、「デコイ」、「リボザイム」、「CpGオリゴ」、「その他（自然免疫の活性化を目的としたPolyI:PolyC(二本鎖RNA)、アンチジーンなど)」などを挙げることができる。また、当該「核酸医薬」には、「遺伝子治療薬における遺伝子が組み込まれたベクター」や「遺伝子ワクチンに含まれる遺伝子」、更にデフィブロチドナトリウム(CAS登録番号:83712-60-1)のようなポリデオキシリボヌクレオチド化合物など、有効成分として核酸鎖を含む医薬も含むものとする。また、当該「核酸医薬」は、2以上のヌクレオチドで構成されるオリゴ核酸を意味し、オリゴ核酸を構成する核酸は、天然の構造である以外に非天然の構造(いわゆる核酸アナログなど)であってもよい。ただし、5-FU(5-フルオロウラシル)などの核酸アナログそれぞれ自体は本発明における「核酸医薬」には含まない。本発明の「核酸医薬」は一本鎖核酸であっても二本鎖核酸であってもよい。また、二本鎖核酸の場合には、ヘテロ二本鎖核酸であってもよい。なお本明細書において「核酸」の用語は、ヌクレオチドの重合体を意味するが、文脈によりヌクレオチドそれぞれ自体を指す場合もある。

[0011] 上記「核酸医薬」に対して抗薬物抗体が産生された場合、核酸医薬における抗薬物抗体が結合するエピトープは、オリゴ核酸中の特定のヌクレオチドの、塩基部分、糖部分、リン酸部分であることができる。また、抗薬物抗体が結合するエピトープを構成する核酸の数は、特定のヌクレオチド単独である場合、2以上のヌクレオチドで構成される核酸(オリゴ核酸)である場合の両方であることができる。また、オリゴ核酸を核酸医薬とするための、相補結合の強弱の調節、生分解耐性の調節、DDSの調節などを目的とする修飾、例えば、後記するヌクレオチド中の糖やリン酸が修飾されていたり、オリゴ核酸が環状構造やヘアピン構造などの構造を有していたり、オリゴ核酸の配列中に核酸以外の分子が含まれていたり、当該核酸以外の分子がオリゴ核酸との間で形成する立体構造が含まれていたり、ポリエチレングリコールの付加な

どが施されていたりする場合には、抗薬物抗体が結合するエピトープは当該修飾部分であってもよい。

- [0012] 本発明の検出方法に使用する「試料」は、生体由来のものであり、抗薬物抗体が存在しうるものであれば特に限定は無く、好ましくは、ヒト、サル、イヌ、ブタ、ラット、モルモット、又はマウスの全血、血清、血漿、リンパ液、又は唾液であり、特に好ましくはヒトの血液由来成分、例えば、全血、血清、又は血漿である。これらは水又は緩衝液で希釈されて用いられることもある。また、本発明の試料には、既知の濃度の抗薬物抗体を水、緩衝液又は抗薬物抗体を含まない生体由来成分(例えば、血液由来成分)で希釈、濃度調整したものも含む。
- [0013] 上記した試料は、必要に応じて前処理を行うことができる。例えば、酸や界面活性剤と混合し、試料中の抗薬物抗体の性状を変化させたり、特定の分子量画分を篩い分けられるフィルターでろ過して、試料中の、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体の形成に影響を与える物質を分離、除去することなどが挙げられる。
- [0014] 上記緩衝液としては、一般的に使用されるものであればよく、例えばトリス塩酸、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸、フタル酸、グルタル酸、マレイン酸、グリシン及びそれらの塩などや、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPESなどのグッド緩衝液などが挙げられ、水としては、RNase, DNase free waterなどが挙げられる。なお、緩衝液の調製などの際に使用される水としてもRNase, DNase free waterが好適である。
- [0015] 本発明の検出方法に使用する「捕獲核酸」及び「トレーサー核酸」は、それぞれ、化学的に合成可能なものであれば特に限定はなく、好ましくは、DNA (deoxyribonucleic acid)、RNA(ribonucleic acid)、PNA(peptide nucleic acid)、又は化学修飾された核酸であり、非天然のヌクレオチドや任意の修飾基を含みうる。
- [0016] 化学修飾は核酸の塩基部分、糖部分、リン酸部分のいずれの部位も対象と

なりうる。上記化学修飾された核酸としては、例えば、ホスホロチオエート修飾(S化)、2' -F修飾、2' -O-Methyl(2' -OMe)修飾、2' -O-Methoxyethyl(2' -MOE)修飾、モルフォリノ修飾、LNA修飾、BNA^{COG}修飾、BNA^{NC}修飾、ENA修飾、cEtBNA修飾などが挙げられる。

[0017] このうちでも、好ましくは、ロックド核酸(LNA)、架橋核酸(BNA)、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、モルフォリノオリゴヌクレオチド、ボラノフォスフェートオリゴヌクレオチド、2' -O-メチル化RNA(2' -OMe)、2' -O-メトキシエチル化RNA(2' -MOE)、又は2' -F-RNAである。

[0018] 上記核酸は一本鎖又は二本鎖の何れでも良い。

[0019] 本発明の検出方法に使用する「捕獲核酸」及び「トレーサー核酸」は、上記した「核酸医薬」それ自体を使用することができる。また、抗薬物抗体が結合するエピトープを構造中に含むことを限度として、それぞれ、任意の配列を含みうる。「捕獲核酸」の配列と「トレーサー核酸」の配列は、互いに同一でも良いし、異なってもよい。

[0020] 本発明の検出方法に使用する「捕獲核酸」及び「トレーサー核酸」が有する抗薬物抗体が結合するエピトープは、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)を検出原理とするアフィニティーセンサーを使用する方法や、抗原競合法などによって特定することができる。本発明の「捕獲核酸」及び「トレーサー核酸」は、好ましくは、同一の抗薬物抗体が結合するエピトープを有する。

[0021] 捕獲核酸は、1種又は2種以上であり、固相に結合される部位が異なる2種以上の組合せであっても良い。また、トレーサー核酸は、1種又は2種以上であり、2種以上の組合せであっても良い。

[0022] 本発明の検出方法に使用する「捕獲核酸」は、後述する固相に結合させるための化学修飾を含んでいてもよく、「トレーサー核酸」は、後述する抗薬物抗体を検出するための標識を結合させるための化学修飾を含んでいてもよい。

[0023] 本発明における「捕獲核酸」及び「トレーサー核酸」の核酸鎖長は、特に限定されない。核酸医薬として十数mer~数十merの鎖長のものが報告されて

おり、本発明の「捕獲核酸」及び「トレーサー核酸」の核酸鎖長は、これと対応させることができる。また、本発明の検出方法に好適な核酸鎖の鎖長は、抗薬物抗体検出における所望の特異性、感度などを考慮し適宜に設計することができる。好ましい一例として、捕獲核酸及びトレーサー核酸の鎖長が同一であるか又はトレーサー核酸の核酸鎖の鎖長が捕獲核酸より1mer~60mer長い場合が挙げられ、更に好ましい例としてトレーサー核酸の核酸鎖の鎖長が捕獲核酸より5mer~55mer、10mer~50mer、15mer~45mer、20mer~40mer、25mer~35mer、25mer~40mer、25mer~45mer、25mer~50mer、30mer~40mer、30mer~45mer、30~50mer、35mer~45mer、35mer~50mer長い場合が挙げられる。

[0024] 上記核酸鎖の鎖長のうちには、抗薬物抗体産生の原因となった抗薬物抗体が結合するエピトープを含む核酸医薬に由来する配列を含み、更に抗薬物抗体が結合するエピトープと同一の配列、類似の配列、又は類似の構造を有さない配列が含まれ得る。トレーサー核酸の核酸鎖長が、捕獲核酸の核酸鎖長より長い場合には、当該長い核酸鎖長の部分は、抗薬物抗体が結合するエピトープと同一の配列、類似の配列、又は類似の構造を有さない配列であることが好ましい。

[0025] 本発明における「捕獲核酸」の具体的な構成としては、限定ではなく、以下の例が挙げられる。

5' -(n)a-(epitope)-(n)b-(官能基)-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「a」及び「b」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「官能基」は捕獲核酸を修飾するアミノ基等の官能基を表す。)

5' -(n)a-(epitope)-(n)b-(アダプター)-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「a」及び「b」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「アダプター」は捕獲核酸に結合するビオチン等のアダプターを表す。)

5' -(官能基)-(n)a-(epitope)-(n)b-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオ

チド、「a」及び「b」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「官能基」は捕獲核酸を修飾するアミノ基等の官能基を表す。)

5'-(アダプター)-(n)a-(epitope)-(n)b-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「a」及び「b」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「アダプター」は捕獲核酸に結合するビオチン等のアダプターを表す。)

[0026] 本発明における「トレーサー核酸」の具体的な構成としては、限定ではなく、以下の例が挙げられる。

5'-(n)c-(epitope)-(n)d-(官能基)-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「c」及び「d」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「官能基」はトレーサー核酸を標識するためのアミノ基等の官能基を表す。)

5'-(n)c-(epitope)-(n)d-(標識)-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「c」及び「d」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「標識」はトレーサー核酸を修飾するジゴキシゲニン等の標識を表す。)

5'-(n)c-(epitope)-(n)d-(タグ配列)-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「c」及び「d」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「タグ配列」は一对の自己凝集プローブの一方の配列と部分的に同じ(一对の自己凝集プローブの他方の配列と部分的に相補的な)タグ配列を表す。)

5'-(官能基)-(n)c-(epitope)-(n)d-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「c」及び「d」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「官能基」はトレーサー核酸を標識するためのアミノ基等の官能基を表す。)

5'-(標識)-(n)c-(epitope)-(n)d-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「c」及び「d」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の

要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「標識」はトレーサー核酸を修飾するジゴキシゲニン等の標識を表す。)

5'-(タグ配列)-(n)c-(epitope)-(n)d-3' (ここで、「n」は任意のヌクレオチド、「c」及び「d」はそれぞれ独立に0又は自然数(但し、前記の核酸鎖長の要件を満たす)、「epitope」は抗薬物抗体が結合するエピトープ、「タグ配列」は一对の自己凝集プローブの一方の配列と部分的に同じ(一对の自己凝集プローブの他方の配列と部分的に相補的な)タグ配列を表す。)

[0027] 一態様において、前記のタグ配列は、

5'末端側から順に、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域X、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Y、及び第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Xからなるオリゴヌクレオチド、又は

5'末端側から順に、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Z、第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Y、及び第1のオリゴヌクレオチドの核酸領域Zからなるオリゴヌクレオチド

の構成を有し、

前記第1のオリゴヌクレオチドは、

5'末端から順に核酸領域X、核酸領域Y、及び核酸領域Zからなるオリゴヌクレオチド

の構成を有し、

前記第2のオリゴヌクレオチドは、

5'末端から順に前記核酸領域Xに相補的な核酸領域X'、前記核酸領域Yに相補的な核酸領域Y'、前記核酸領域Zに相補的な核酸領域Z'からなるオリゴヌクレオチド

の構成を有する。

[0028] 本明細書において、「接触させる」、あるいは「接触工程」という用語は、ある物質と他の物質との間で、共有結合、イオン結合、金属結合、非共有結合などの化学結合を形成できるように、これらの物質を互いに近傍に置くことを意味する。本発明の一態様においては、本発明の検出方法における、

試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸との「接触」工程は、液体状の試料と、捕獲核酸を含む溶液と、トレーサー核酸を含む溶液を、何れかの組合せで混合することにより行われる。

[0029] 本発明の検出方法に使用する捕獲核酸及びトレーサー核酸が有する「抗薬物抗体が結合するエピトープ」は、上記したとおりであり、抗薬物抗体が結合できれば特に限定はないが、好ましくは、核酸、ポリペプチド、糖鎖、タンパク質、高分子化合物、中分子化合物、若しくは低分子化合物、又はそれらの一部である。

[0030] 「抗薬物抗体が結合するエピトープ」としては、限定ではないが、以下の例が挙げられる。

5-メチル化シトシン、ホスホロチオエート核酸、ボラノホスフェート核酸、モルフォリノ核酸、LNA、BNA、2'-O-メチル化RNA(2'-OMe)、2'-O-メトキシエチル化RNA(2'-MOE)、2'-F-RNA、ENA(商標登録)(2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)核酸、ポリエチレングリコール

[0031] 本発明の検出方法に使用する「増感法」は、例えば、PCR法、チラミドシグナル増幅法、酵素増感法、分岐DNA法、デンドリマー法、パルサー法などが挙げられ、好ましくは、パルサー法である。

[0032] 本明細書において、「自己凝集」という用語は、複数の第1のオリゴヌクレオチドが、第2のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより複合体を形成した状態、及び、複数の第2のオリゴヌクレオチドが、第1のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより複合体を形成した状態を意味する。

[0033] 本発明の検出方法に使用する「第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプロープ」は、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドが互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し、自己凝集反応によるオリゴヌクレオチドポリマーの形成が可能なオリゴヌクレオチドをいう。好ましくは、前記第1又は第2のオリゴヌクレオチドのうち

少なくとも一方は、標識物質により標識されている。ここで、「ハイブリダイズ可能」とは、一態様においては、当該相補的塩基配列領域において完全に相補的であることを意味する。また別の態様においては、1つ又は2つのミスマッチを除いて、当該相補的塩基配列領域において相補的であることを意味する。

[0034] 自己凝集可能な一対のプロープにはあらかじめ検出のための標識物質で標識しておくことも可能である。そのような標識物質として、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光物質、発光物質、色素、又は金属錯体などが好適な例として挙げられる。

[0035] 好ましくは、当該標識物質はルテニウム錯体、ビオチン、又はジゴキシゲニンであり、当該オリゴヌクレオチドの標識は、好ましくは5'末端又は3'末端を標識することにより行われる。

[0036] 「自己凝集可能」な一対のプロープをより具体的に説明すると、第1のオリゴヌクレオチドが、5'末端側から順に少なくとも核酸領域X、核酸領域Y、及び核酸領域Zを含むオリゴヌクレオチドであり、第2のオリゴヌクレオチドが、5'末端側から順に少なくとも前記核酸領域Xに相補的な核酸領域X'、前記核酸領域Yに相補的な核酸領域Y'、及び前記核酸領域Zに相補的な核酸領域Z'を含むオリゴヌクレオチドということになる。

[0037] 捕獲核酸を固相に結合させる場合の「固相」としては、不溶性の微粒子、マイクロビーズ、蛍光微粒子、磁気粒子、マイクロプレート、マイクロアレイ、スライドガラス、電気伝導性基板などの基板などが挙げられ、好ましくは、磁気粒子又は電気伝導性基板である。

[0038] 捕獲核酸の固相への結合は、化学結合による方法、生物学的相互作用による方法、物理吸着による方法などが挙げられる。化学結合による方法では、例えば、カルボキシル基等の官能基でコートされた固相を用いる場合、捕獲核酸を予めアミノ基等の官能基で修飾しておいて、当該官能基との間でカップリング反応をさせることができる。生物学的相互作用による方法では、例えば、固相にコートしたストレプトアビジンと、捕獲核酸に予め結合させた

ビオチンとの間の結合力を利用することができる。また、物理吸着による方法では、例えば、負の電荷を有する固相を用いた場合、捕獲核酸にアミノ基など正の電荷を有する物質を標識することで、静電的に固相に吸着させることができる。

[0039] 捕獲核酸を修飾するための官能基としては、限定ではなく、以下の例が挙げられる。

アミノ基、カルボキシル基、チオール基、マレイミド基

[0040] 捕獲核酸が結合した固相を「洗浄」する方法は特に限定されず、例えば、固相に任意の量の洗浄液を加え、静置又は緩やかに振盪後、固相内の溶液を分離し、除去することにより行う。溶液の分離・除去方法は、好ましくは、デカント法、遠心分離法、吸引法などが挙げられる。

[0041] 溶液を「デカント法」により分離し、除去する工程は、通常、固相を傾けて溶液を取り除くことにより行う。

[0042] 溶液を「遠心分離」法により分離し、除去する工程は、通常、20~30℃で0.2~5分間、500~3000×gの遠心、23~28℃で0.5~2分間、800~1500×gの遠心、好ましくは、25℃で1分間、1000×gの遠心にて上清を生成させ、それを除去することにより行う。

[0043] 溶液を「吸引」法により分離し、除去する工程は、通常、マイクロピペット又はアスピレーターを用いて行う。より具体的には、マイクロピペット又はアスピレーターの製造会社の取扱説明書に従えばよい。

[0044] 捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成された後に、当該複合体の形成に関与せず、遊離の状態で存在するトレーサー核酸を捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体から「分離・除去」するためには、好ましくは、デカント法、遠心分離法、吸引法を用いることが挙げられる。具体的な分離、除去方法は、溶液の分離、除去方法と同じである。トレーサー核酸を検出する方法としては、濁度法、吸光度法、蛍光測定法、電気化学発光法、フローサイトメトリー法が挙げられ、好ましくは、電気化学発光法が挙げられる。

[0045] 電気化学発光法としては、例えば、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が結合した電気伝導性基板に電気エネルギーを加え、トレーサー核酸に予め標識されたルテニウム錯体が還元することにより発する発光を検出することにより行う。

[0046] 本発明において、試料中の抗薬物抗体を検出するキットには、少なくとも以下の構成が含まれる。

(1)捕獲核酸

(2)トレーサー核酸

(3)第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプロープ
ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する。

各構成については、上述のとおりである。

[0047] 本発明の基本工程の一態様を、図1を参照して説明する。

まず、抗薬物抗体が含まれる試料、捕獲核酸を準備する。最初に、ビオチン((図1-1)中、星印)で修飾された捕獲核酸をストレプトアビジンコーティングプレート(固相)に結合させる。次に、抗薬物抗体と捕獲核酸を接触させる(図1-1)。捕獲核酸における抗薬物抗体が結合するエピトープに抗薬物抗体が結合し、捕獲核酸-抗薬物抗体複合体を形成する。

[0048] 前記捕獲核酸-抗薬物抗体複合体を含む試料に、トレーサー核酸を接触させる(図1-2)。一実施態様においては、トレーサー核酸の5'末端又は3'末端に一対の自己凝集プロープの一方の配列と部分的に同じ(一対の自己凝集プロープの他方の配列と部分的に相補的な)タグ配列を含む。トレーサー核酸における抗薬物抗体が結合するエピトープに抗薬物抗体が結合し、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成する。

[0049] これらの複合体形成は、図1で例示した(1)捕獲核酸と抗薬物抗体の複合体を先ず形成させ、さらにトレーサー核酸と複合体を形成させる以外の順序で形成させることもできる。すなわち、(2)抗薬物抗体とトレーサー核酸とを先ず接触させて、抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成した後、当該複合体

を含む試料と捕獲核酸を接触させ、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成させたり、(3)捕獲核酸、抗薬物抗体、トレーサー核酸をほぼ同時に接触させて3者の複合体を形成させることもできる。上記の(1)~(3)において、捕獲核酸を固相に結合させる工程は、適宜なタイミングで2者の複合体、又は3者の複合体の形成前、形成後、形成途中、又は形成と同時に行うことができる。前記3者をほぼ同時に接触させて3者の複合体を形成させる工程は、捕獲核酸をプレートなどの固相に結合させる前に行うことが好ましい。

[0050] 一実施態様においては、前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を含む試料に、第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプローブを接触させて、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体と、第1及び第2のオリゴヌクレオチドが自己凝集してなるオリゴヌクレオチドポリマーとの複合体を形成する(いわゆるパルサー反応、図1-3)。

[0051] ここで、第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプローブは、第1のオリゴヌクレオチドが、5'末端側から順に核酸領域X、核酸領域Y、及び核酸領域Zを含むオリゴヌクレオチドであり、第2のオリゴヌクレオチドが、5'末端側から順に核酸領域X'、核酸領域Y'、及び核酸領域Z'を含み、XとX'、YとY'、ZとZ'は相互に相補的である(以下、当該核酸領域を単に、X、Y、Z、X'、Y'、Z'ということがある)。また、第1と第2のオリゴヌクレオチドの5'末端はジゴキシゲニン((図1-3)中、ひし形)で標識されている。捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体のトレーサー核酸のY、Zに第2のオリゴヌクレオチドのY'、Z'がハイブリダイズし、第1のオリゴヌクレオチドのX、Y、Zに第2のオリゴヌクレオチドのX'、Y'、Z'がそれぞれハイブリダイズする。そして次々とXとX'、YとY'、ZとZ'がハイブリダイズを繰り返すことで、自己凝集プローブのオリゴヌクレオチドポリマーが形成される。

[0052] 一実施態様においては、前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体及び自己凝集した第1及び第2のオリゴヌクレオチドとの複合体を含む試料とルテニウム錯体標識抗ジゴキシゲニン抗体を接触させる(図1-4)。ルテニウム

錯体からの発光を検出することにより、抗薬物抗体の濃度などを測定することができる。

[0053] なお、パルサー反応を行う前の捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を検出することにより抗薬物抗体を検出することも可能である。当該複合体を検出するための方法は、限定ではなく、以下の例が挙げられる。

(1) 予めトレーサー核酸にルテニウム錯体を結合させ、当該複合体を直接検出する方法。

(2) 予めトレーサー核酸にジゴキシゲニンを結合させ、さらに、Ru錯体標識抗ジゴキシゲニン抗体で当該複合体を検出する方法。

(3) 予めトレーサー核酸に(A)を結合させ、当該複合体を直接検出する方法。

(A) 125Iや32P等の放射性同位元素、Cyanin 5やフルオレセイン等の蛍光色素

[0054] パルサー法の具体例は、国際公開2013/172305号の図4～図14などに示されており、ダイマー形成用プローブなどを用いて当業者常識にもとづき適宜変形して本発明の自己凝集反応に応用することが可能である。

[0055] 本発明の方法は、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が、捕獲核酸及びトレーサー核酸における抗薬物抗体が結合するエピトープを介して複合体を形成するので極めて特異性が高い。また、複合体の形成に係る抗薬物抗体のIgクラスを選ばない。これより、試料中にIgG、IgM、IgD、IgE、又はIgAのIgクラスの抗薬物抗体が存在する場合、2以上のIgクラスを一の測定で検出することができる。ここで一の測定とは、試料と捕獲核酸及びトレーサー核酸との接触が1回であることを意味する。本発明の検出方法は、この特徴により、薬物(核酸医薬)の投与間隔、期間や、試料の採取時期にかかわらず、Igクラスのスイッチの影響を受けずに抗薬物抗体の存在を鋭敏に検出することができる。

[0056] これより本発明は、核酸医薬を投与されている個体における核酸医薬の投与方針を決定するためのデータ取得や、核酸医薬を開発する際の、抗核酸医

薬抗体産生の可能性確認、当該抗薬物抗体が結合するエピトープの特定による核酸医薬自体の設計にも使用することが可能である。

[0057] 以下、本発明をより理解しやすいように具体的な態様を実施例をもって説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0058] [実施例1]

1. 材料及び方法

(1) 標的抗体

測定対象の抗体としては、抗5-メチルシトシン抗体(抗5-mC抗体)(アブカム、製品番号ab10805)を用いた。上記の標的抗体は、抗体希釈液を用いて0.1、0.5、1 μ g/mLに調製して用いた。標的抗体を含まないブランクサンプルも用意した。

(1-1)抗体希釈液の組成

1xPBS-TP[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300]、1% BSA(ウシ血清アルブミン)

(2) 捕獲核酸

捕獲核酸としては、Hasegawaら(Anal Sci. 2016;32(6):603-6)が使用したM-DNA1の配列の3'末端がビオチン修飾された以下のM-DNA1-3Bを用いた。M-DNA1-3Bの配列は、5'-TACGTTATCAGACTGATGTTGA-3'(配列番号1)である。核酸は日本遺伝子研究所に合成を依頼した(HPLC精製グレード)。上記の核酸は、Hasegawaらと同様に、5'末端から3番目の塩基(シトシン)は5-メチルシトシンである。M-DNA1-3BについてはTE(10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA(pH8.0))を用いて1pmol/ μ Lに調製して用いた。

(3) トレーサー核酸

トレーサー核酸としては、捕獲核酸と同じ塩基配列(22塩基)及びシグナル増幅用プローブ(HCP-2)の一部と相補的な塩基配列(シグナル増幅用プローブ(HCP-1)の一部と同じ塩基配列)からなる、3'末端がアミノ修飾されたトレー

サー核酸(AP-ADA-M-DNA1-ZYZ-3N)を用いた。核酸は日本遺伝子研究所に合成を依頼した(HPLC精製グレード)。上記の核酸は、Hasegawaらと同様に、5'末端から3番目の塩基(シトシン)は5-メチルシトシンである。

〈AP-ADA-M-DNA1-ZYZ-3Nの配列〉

5' - TACGTTATCAGACTGATGTTGAGATATAAGGAGTGGATACCGATGAAGGATATAAGGAGTG
-(NH₂)-3' (塩基部分は配列番号2)

(4) 捕獲核酸-標的抗体-トレーサー核酸複合体の形成(ブリッジング反応)
標的抗体50 μLに、ブリッジング反応液を50 μL加え、計100 μLとし、600 rpmで振盪しながら37°Cで3時間反応させた。

(4-1)ブリッジング反応液の組成

1xPBS-TP[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300]49.8 μL、10pmol/μL AP-ADA-M-DNA1-ZYZ-3N 0.1 μL、1pmol/μL M-DNA1-3B 0.1 μL

(5)測定プレートのブロッキング

ストレプトアビジンが固定された測定プレート(Meso Scale Diagnostics、製品番号L45SA-1)に、ブロッキング液を150 μL加え、600rpmで振盪しながら25°Cで1時間反応させた後、1xPBS-TP 200 μLで2回洗浄した。

(5-1)ブロッキング液の組成

1xPBS-TP[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300]、3% BSA

(5-2)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(6)測定プレートへの捕獲核酸-標的抗体-トレーサー核酸複合体の固定

ブリッジング反応後の反応液75 μLをブロッキング後の測定プレートへ加え

、600rpmで振盪しながら25℃で1時間反応させた後、1xPBS-TP 200 μ Lで2回洗浄した。

(6-1)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(7)検出補助反応

捕獲核酸-標的抗体-トレーサー核酸複合体固定後の測定プレートに、検出補助反応液を50 μ L加え、600rpmで振盪しながら40℃で1時間反応させた後、1xPBS-TP 200 μ Lで2回洗浄した。

(7-1)検出補助液の組成

ハイブリダイゼーション液[189.3mM Tris-HCl (pH7.5)、2.4xPBS[328.8mM Sodium Chloride、19.44mM Disodium Phosphate、6.432mM Potassium Chloride、3.528mM Potassium Dihydrogenphosphate]、3.6mM EDTA(pH8.0)、0.12% Tween20]21 μ L、10x supplement-T[500mM Tris-HCl(pH8.0)、40mM EDTA(pH8.0)、8% Tween20、1.5ppm ProClin300]8 μ L、20pmol/ μ L HCP-2 0.42 μ L、Nuclease-Free Water 20.46 μ L

(7-2)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(7-3)HCP-2の塩基配列

本実施例1に使用する核酸プローブ(HCP-2)は、自己凝集可能な一対のプローブのうちAP-ADA-M-DNA1-ZYZ-3Nの塩基配列の一部に相補的な配列を含み、5'末端がジゴキシゲニンで標識されている。

<HCP-2の塩基配列>

5' -(DIG)- GTCCTGATTGTTGCTTCATCGGTATCCACTCCTTATATC -3' (塩基部分は配列番号3)

(8)検出抗体反応

検出補助反応後の測定プレートに、検出抗体反応液を50 μ L加え、600rpmで振盪しながら30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、1xPBS-TP 200 μ Lで2回洗浄した。

(8-1)検出抗体反応液の組成

1xPBS-TP (1% BSA)[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300、1% BSA]49.7 μ L、100 μ g/mL Ru-Anti-DIG, Fab fragment 0.3 μ L

(8-2)Ru-Anti-DIG, Fab fragmentの調製

Anti-Digoxigenin, Fab fragments(メルク、製品番号11214667001)に、MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester(Meso Scale Diagnostics、製品番号R91A0-1)を、第一級アミンを介して結合させることにより調製した。結合方法はMeso Scale Diagnostics社の製品添付プロトコールに従った。

(8-3)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(9)検出

検出抗体反応後の測定プレートに0.5xRead Buffer[[MSD GOLD Read Buffer A(Meso Scale Diagnostics、製品番号R92TG-1)]を滅菌精製水で2倍希釈]150 μ Lを加え、Meso QuickPlex SQ 120MMシステム(Meso Scale Diagnostics社製)を用いてRu-Anti-DIG, Fab fragmentからの発光量を測定し、標的抗体のシグナルを検出した。

(10)結果

測定結果を図2に示す。抗5-メチルシトシン抗体の濃度の上昇に応じてシグナルが増大した。

[0059] [実施例2]

1.材料及び方法

(1) 標的抗体

測定対象の抗体としては、実施例1で使用した抗5-メチルシトシン抗体(抗5-mC抗体)(アブカム、製品番号ab10805)を用いた。上記の標的抗体は、抗体希釈液を用いて0.1、0.5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製して用いた。標的抗体を含まないブランクサンプルも用意した。

(1-1)抗体希釈液の組成

1xPBS-TP[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300]、1% BSA

(2) 捕獲核酸

捕獲核酸としては、実施例1で使用したM-DNA1-3Bを使用した。M-DNA1-3BについてはTE(10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA(pH8.0))を用いて1pmol/ μL に調製して用いた。

(3) トレーサー核酸

トレーサー核酸としては、実施例1で使用したAP-ADA-M-DNA1-ZYZ-3Nを用いた。

(4)捕獲核酸-標的抗体-トレーサー核酸複合体の形成(ブリッジング反応)

標的抗体50 μL に、ブリッジング反応液を50 μL 加え、計100 μL とし、600rpmで振盪しながら37°Cで3時間反応させた。

(4-1)ブリッジング反応液の組成

1xPBS-TP[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300]49.8 μL 、10pmol/ μL AP-ADA-M-DNA1-ZYZ-3N 0.1 μL 、1pmol/ μL M-DNA1-3B 0.1 μL

(5)測定プレートのブロッキング

ストレプトアビジンが固定された測定プレート(Meso Scale Diagnostics、製品番号L45SA-1)に、ブロッキング液を150 μL 加え、600rpmで振盪しながら25°Cで1時間反応させた後、1xPBS-TP 200 μL で2回洗浄した。

(5-1)ブロッキング液の組成

1xPBS-TP[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300]、3% BSA

(5-2)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(6)測定プレートへの捕獲核酸-標的抗体-トレーサー核酸複合体の固定

ブリッジング反応後の反応液75 μ Lをブロッキング後の測定プレートへ加え、600rpmで振盪しながら25 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、1xPBS-TP 200 μ Lで2回洗浄した。

(6-1)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(7)自己凝集反応(PALSAR反応)

捕獲核酸-標的抗体-トレーサー核酸複合体固定後の測定プレートに、PALSAR反応液を50 μ L加え、600rpmで振盪しながら40 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、1xPBS-TP 200 μ Lで2回洗浄した。

本実施例に使用する自己凝集可能な一対のプローブ(シグナル増幅用プローブともいう)の配列は、5'末端がジゴキシゲニンで標識された以下のHCP-1及びHCP-2である。

<HCP-1の配列>

5' -(DIG)- CAACAATCAGGACGATACCGATGAAGGATATAAGGAGTG -3' (塩基部分は配列番号4)

<HCP-2の塩基配列>

5' -(DIG)- GTCCTGATTGTTGCTTCATCGGTATCCACTCCTTATATC -3' (塩基部分は

配列番号3)

(7-1)PALSAR反応液の組成

ハイブリダイゼーション液[189.3mM Tris-HCl (pH7.5)、2.4xPBS[328.8mM Sodium Chloride、19.44mM Disodium Phosphate、6.432mM Potassium Chloride、3.528mM Potassium Dihydrogenphosphate]、3.6mM EDTA(pH8.0)、0.12% Tween20]21 μ L、10x supplement-T[500mM Tris-HCl(pH8.0)、40mM EDTA(pH8.0)、8% Tween20、1.5ppm ProClin300]8 μ L、20pmol/ μ L HCP-1 0.35 μ L、20pmol/ μ L HCP-2 0.42 μ L、Nuclease-Free Water 20.11 μ L

(7-2)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300

(8)検出抗体反応

自己凝集反応後の測定プレートに、検出抗体反応液を50 μ L加え、600rpmで振盪しながら30°Cで30分間反応させた後、1xPBS-TP 200 μ Lで2回洗浄した。

(8-1)検出抗体反応液の組成

1xPBS-TP (1% BSA)[1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、1.5ppm ProClin300、1% BSA]49.7 μ L、100 μ g/mL Ru-Anti-DIG, Fab fragment 0.3 μ L

(8-2)Ru-Anti-DIG, Fab fragmentの調製

Anti-Digoxigenin, Fab fragments(メルク、製品番号11214667001)に、MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester(Meso Scale Diagnostics、製品番号R91A0-1)を、第一級アミンを介して結合させることにより調製した。結合方法はMeso Scale Diagnostics社の製品添付プロトコールに従った。

(8-3)1xPBS-TPの組成

1xPBS[137mM Sodium Chloride、8.1mM Disodium Phosphate、2.68mM Potassium Chloride、1.47mM Potassium Dihydrogenphosphate]、0.02% Tween20、

1.5ppm ProClin300

(9)検出

検出抗体反応後の測定プレートに0.5xRead Buffer[[MSD GOLD Read Buffer A(Meso Scale Diagnostics、製品番号R92TG-1)]を滅菌精製水で2倍希釈]150 μ Lを加え、Meso QuickPlex SQ 120MMシステム(Meso Scale Diagnostics社製)を用いてRu-Anti-DIG, Fab fragmentからの発光量を測定し、標的抗体のシグナルを検出した。

(10)結果

測定結果を図3に示す。抗5-メチルシトシン抗体の濃度の上昇に応じてシグナルが増大した。

上記実施例1~2より、本発明の方法は抗薬物抗体を検出できることが確認できた。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明の検出方法は、生体由来の試料に含まれる抗薬物抗体を検出するため、及び当該検出方法を実施するための試薬やキットを設計及び製造するために、簡便かつ安価に使用することができる。

請求の範囲

[請求項1]

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法:

(i)試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させて前記捕獲核酸、前記抗薬物抗体、及び前記トレーサー核酸の複合体(「捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体」と呼ぶことがある)を形成させる工程、

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する; 及び

(ii)前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を検出する工程。

[請求項2]

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法:

(i)試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させて捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成させる工程、

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する; 及び

(ii)増感法を用いて前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を検出する工程。

[請求項3]

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法:

(i)試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させて捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体を形成させる工程、

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する;

(ii)前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体に、第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプローブを接触させて、前記捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体と、第1及び第2のオリゴヌクレオチドが自己凝集してなるオリゴヌクレオチドポリマーとのポリマー複合体を形成する工程; 及び

(iii)前記ポリマー複合体を検出する工程。

[請求項4]

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i)試料と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する捕獲核酸と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有するトレーサー核酸とを接触させる工程、

ここで、前記試料中に前記抗薬物抗体が含まれる場合には、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成される；

(ii)前記捕獲核酸を捕捉し、前記複合体の形成に関与せず遊離の状態が存在する前記トレーサー核酸を当該複合体と分離し、除去する工程；及び

(iii)前記分離・除去工程の後、分離・除去されずに残存するトレーサー核酸を検出することにより、試料中の抗薬物抗体を検出する工程。

[請求項5]

以下の工程を含む試料中の抗薬物抗体を検出する方法：

(i)試料と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する捕獲核酸と、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有するトレーサー核酸とを接触させる工程、

ここで、前記試料中に前記抗薬物抗体が含まれる場合には、捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成される；

(ii)前記捕獲核酸を捕捉する工程、

ここで、前記捕捉工程は前記複合体の形成前、形成後、形成途中、又は形成と同時に行われる；

(iii)前記捕獲核酸を捕捉し、前記複合体の形成に関与せず遊離の状態が存在する前記トレーサー核酸を前記複合体と分離し、除去する工程；及び

(iv)前記分離・除去工程の後、分離・除去されずに残存するトレーサー核酸を検出することにより、試料中の抗薬物抗体を検出する工程。

[請求項6]

捕獲核酸を捕捉する工程が、捕獲核酸の固相への結合であり、分離

・ 除去する工程が、捕獲核酸が結合した固相の洗浄である、請求項4又は5に記載の方法。

[請求項7] 検出される抗薬物抗体は、試料中にIgG、IgM、IgD、IgE、又はIgAのIgクラスの抗体が存在する場合、2以上のIgクラスを一の測定で検出する、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 捕獲核酸及びトレーサー核酸における前記抗薬物抗体が結合するエピトープが同じである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 捕獲核酸及びトレーサー核酸は、核酸鎖の鎖長が同一であるか又はトレーサー核酸の核酸鎖の鎖長が捕獲核酸より1mer～60mer長いものである、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

[請求項10] トレーサー核酸は、核酸鎖の鎖長が捕獲核酸より10mer～50mer長いものである、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

[請求項11] 試料と、捕獲核酸と、トレーサー核酸とを接触させる工程は、試料と捕獲核酸を接触させる第1の工程と、第1の工程の産物とトレーサー核酸を接触させる第2の工程を含む、請求項1～10のいずれかに記載の方法：

ここで、前記試料中に前記抗薬物抗体が含まれる場合には、第1の工程で捕獲核酸-抗薬物抗体複合体が形成され、第2の工程で捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体が形成される。

[請求項12] 前記第1の複合体を形成する工程と第2の複合体を形成する工程が同時に行われる、請求項11に記載の方法。

[請求項13] 前記捕獲核酸とトレーサー核酸の一方又は両方が化学修飾された核酸である、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

[請求項14] 前記化学修飾された核酸が、ロックド核酸(LNA)、架橋核酸(BNA)、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、モルフォリノオリゴヌクレオチド、ボラノフォスフェートオリゴヌクレオチド、2'-O-メチル化RNA(2'-OMe)、2'-O-メトキシエチル化RNA(2'-MOE)、又は2'-F-RNAである請求項13に記載の方法。

[請求項15] 前記抗薬物抗体が抗核酸医薬抗体である請求項1～14のいずれかに記載の方法

[請求項16] 試料が血液由来成分である請求項1～15のいずれかに記載の方法。

[請求項17] 以下を含む、試料中の抗薬物抗体を検出するキット：

(1)捕獲核酸；

(2)トレーサー核酸；及び

(3)第1及び第2のオリゴヌクレオチドからなる自己凝集可能な一対のプローブ；

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する。

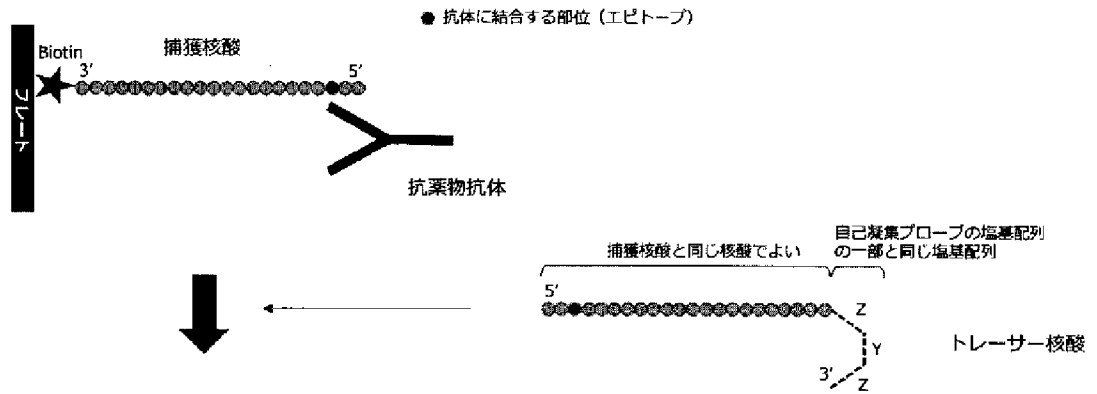
[請求項18] 捕獲核酸及びトレーサー核酸の前記抗薬物抗体に対するエピトープが同じである、請求項17に記載のキット。

[請求項19] 以下を特徴とする、捕獲核酸とトレーサー核酸とを含む二重抗原架橋免疫アッセイを用いて試料中の抗薬物抗体を免疫学的に測定するための方法：

ここで、捕獲核酸及びトレーサー核酸は、前記抗薬物抗体が結合するエピトープを有する。

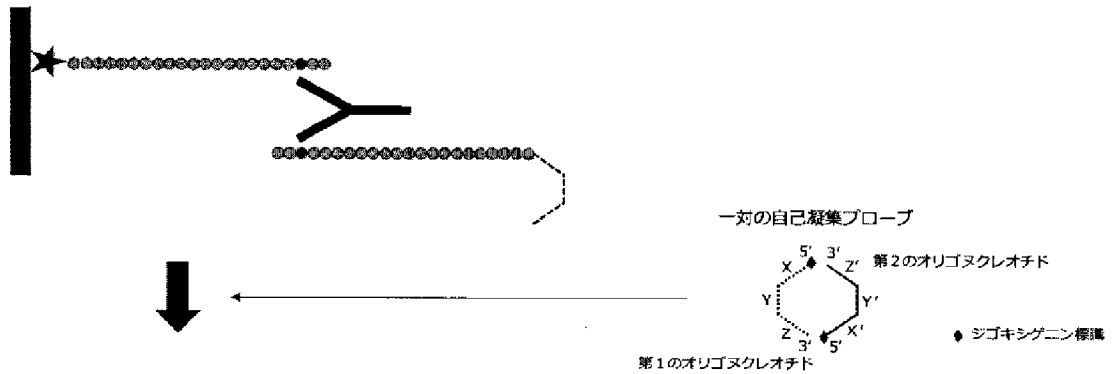
[図1-1]

1) 捕獲核酸-抗薬物抗体複合体形成



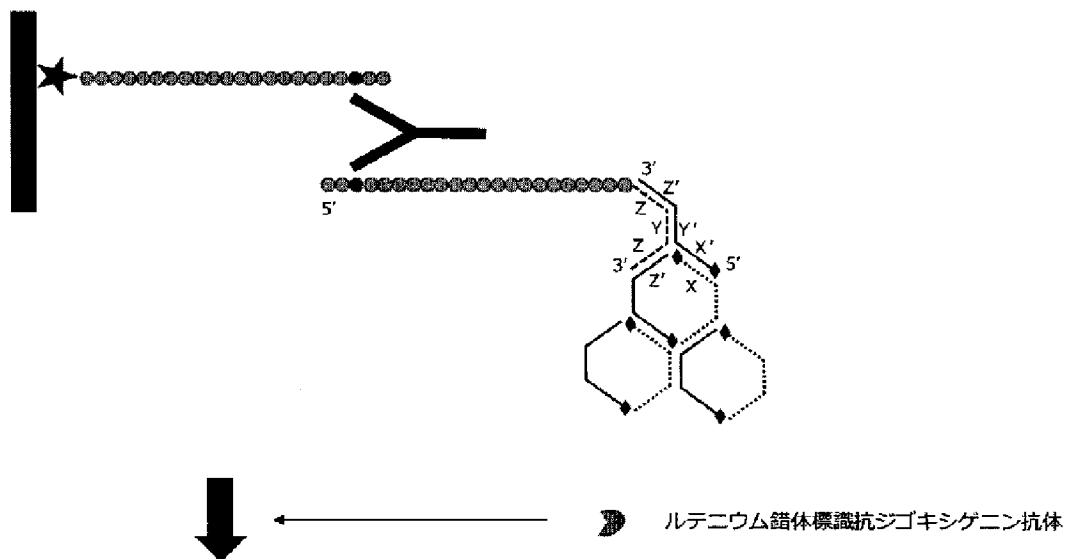
[図1-2]

2) 捕獲核酸-抗薬物抗体-トレーサー核酸複合体形成



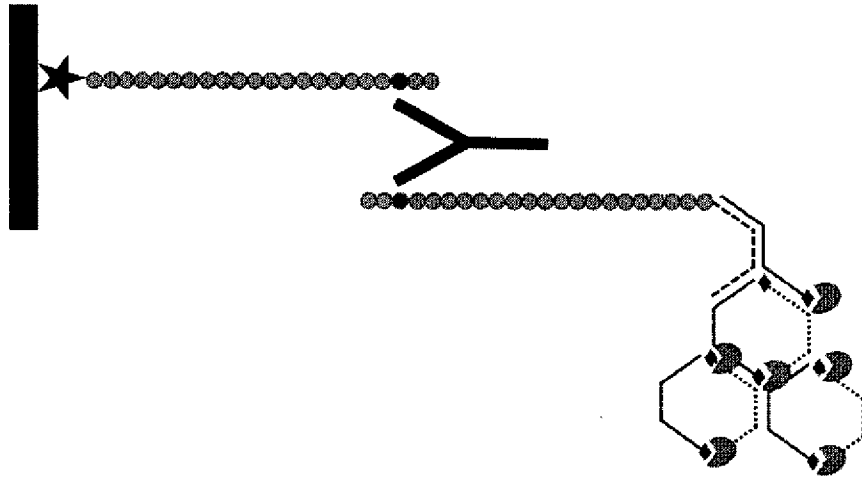
[図1-3]

3) 自己凝集反応 (PALSAR反応)

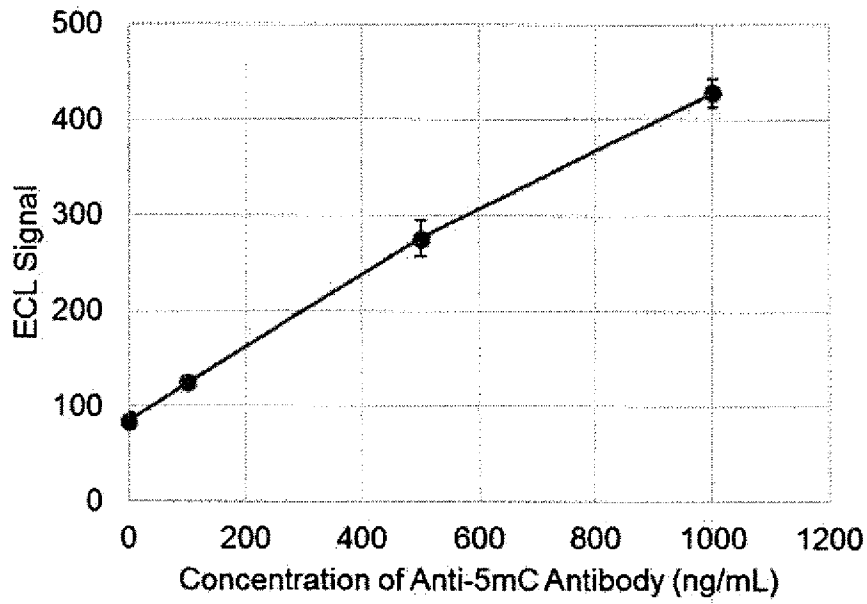


[図1-4]

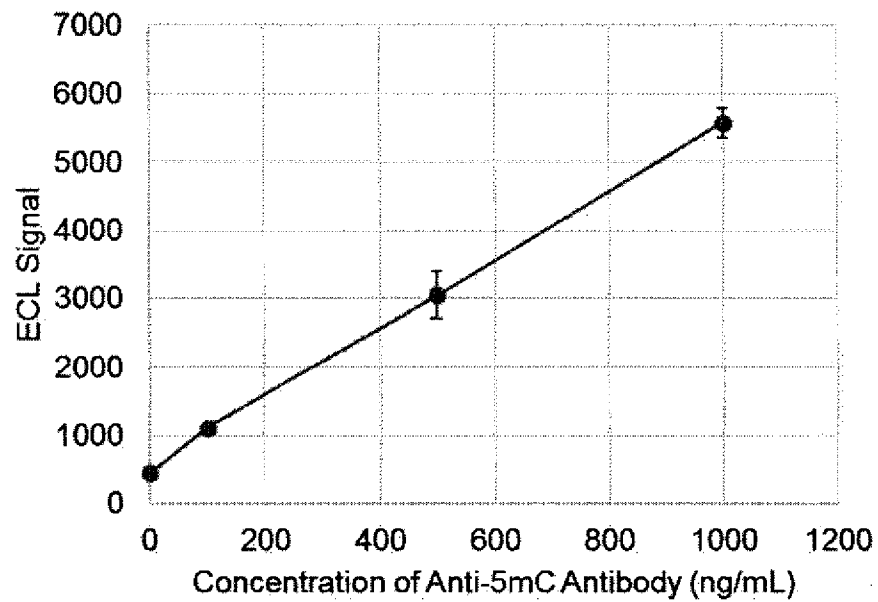
4) 検出抗体反応



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/012965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68</i> (2018.01)i; <i>G01N 33/53</i> (2006.01)j FI: G01N33/53 N ZNA; C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/68; G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017/0044591 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 16 February 2017 (2017-02-16) claims, fig. 1	1-19
A	JP 6718032 B1 (SEKISUI MEDICAL CO LTD) 08 July 2020 (2020-07-08) claims, paragraphs [0001]-[0011], fig. 2-4	1-19
A	BUHL, A. et al. Novel Biosensor-Based Analytic Device for the Detection of Anti-Double-Stranded DNA Antibodies. <i>Clinical Chemistry</i> . 2007, vol. 53, no. 2, pp. 334-341 in particular, "abstract", "conjugate preparation", fig. 1	1-19
A	JP 4902674 B2 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 21 March 2012 (2012-03-21) claims, fig. 1	1-19
A	US 2015/0226758 A1 (GENZYME CORPORATION) 13 August 2015 (2015-08-13) claims, fig. 1	1-19
A	WO 2013/172305 A1 (EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.) 21 November 2013 (2013-11-21) claims, fig. 1	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June 2022		Date of mailing of the international search report 14 June 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/012965

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2017/0044591	A1	16 February 2017	WO 2015/164635 A2 claims, fig. 1	
JP	6718032	B1	08 July 2020	EP 3851527 A1 claims, paragraphs [0001]-[0011], fig. 2-4	
				CN 112639093 A	
				KR 10-2021-0057074 A	
JP	4902674	B2	21 March 2012	US 2015/0253338 A1 claims, fig. 1	
				WO 2007/101661 A1	
				KR 10-2008-0102164 A	
US	2015/0226758	A1	13 August 2015	WO 2015/123315 A1 claims, fig. 1	
				CN 106164670 A	
WO	2013/172305	A1	21 November 2013	US 2015/0299788 A1 claims, fig. 1	
				EP 2851425 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/68(2018.01)i; G01N 33/53(2006.01)i FI: G01N33/53 N ZNA; C12Q1/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/68; G01N33/53 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 2017/0044591 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 16.02.2017 (2017-02-16) 特許請求の範囲、図1	1-19
A	JP 6718032 B1 (積水メディカル株式会社) 08.07.2020 (2020-07-08) 特許請求の範囲、段落 [0001] - [0011]、図2-4	1-19
A	BUHL, A. et al., Novel Biosensor-Based Analytic Device for the Detection of Anti-Double-Stranded DNA Antibodies, Clinical Chemistry, 2007, Vol.53, No.2, pp.334-341 特に、"abstract", "CONJUGATE PREPARATION", Fig. 1	1-19
A	JP 4902674 B2 (エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー) 21.03.2012 (2012-03-21) 特許請求の範囲、図1	1-19
A	US 2015/0226758 A1 (GENZYME CORPORATION) 13.08.2015 (2015-08-13) 特許請求の範囲、図1	1-19
A	WO 2013/172305 A1 (エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社) 21.11.2013 (2013-11-21) 特許請求の範囲、図1	1-19
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー "A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの "E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの "L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） "O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 "P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 "T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの "X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの "Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの "&" 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	02.06.2022	国際調査報告の発送日 14.06.2022
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 白形 優依 2J 4781 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2022/012965

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2017/0044591 A1	16.02.2017	WO 2015/164635 A2 特許請求の範囲、図1	
JP 6718032 B1	08.07.2020	EP 3851527 A1 特許請求の範囲、段落 [001] - [0011]、 図2-4 CN 112639093 A KR 10-2021-0057074 A	
JP 4902674 B2	21.03.2012	US 2015/0253338 A1 特許請求の範囲、図1 WO 2007/101661 A1 KR 10-2008-0102164 A	
US 2015/0226758 A1	13.08.2015	WO 2015/123315 A1 特許請求の範囲、図1 CN 106164670 A	
WO 2013/172305 A1	21.11.2013	US 2015/0299788 A1 特許請求の範囲、図1 EP 2851425 A1	