

【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】令和2年10月15日(2020.10.15)

【公表番号】特表2019-528063(P2019-528063A)

【公表日】令和1年10月10日(2019.10.10)

【年通号数】公開・登録公報2019-041

【出願番号】特願2019-508929(P2019-508929)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z

C 1 2 Q 1/6806 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6813 Z

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/48 A

C 1 2 Q 1/6876 Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年9月4日(2020.9.4)

【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】

以下の工程を含む、腎損傷を検出するための体液試料を調製する方法：

体液試料を得る工程；

(i) 体液試料由来のcfDNAを、核酸プローブと接触させて、体液試料由来のcfDNAを測定する工程であって、該核酸プローブがAluリピートにハイブリダイズするように構成されているヌクレオチド配列を含む、工程；

(ii) 体液試料由来の炎症マーカーを、それに対する抗体と接触させて、体液試料由来の炎症マーカーを測定する工程；

(iii) 体液試料由来のアポトーシスマーカーを、それに対する抗体と接触させて、体液試料由来のアポトーシスマーカーを測定する工程；

(iv) 体液試料由来のクレアチニンを、検出試薬と接触させて、体液試料由来のクレアチニンを測定する工程；

(v) 体液試料由来の全タンパク質マーカーを、検出試薬と接触させて、体液試料由来の全タンパク質を測定する工程；および

(vi) 体液試料由来のメチル化DNAを、5-メチルシトシンを認識する抗体と接触させて、体液試料由来のメチル化DNAを測定する工程。

【請求項2】

工程(i)～(vi)から得られた測定値を分析して、腎損傷を示すスコアを生成する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

前記炎症マーカーがC-X-Cモチーフケモカインリガンドであり、前記アポトーシスマーカーがクラスタリンである、請求項1または2記載の方法。

**【請求項 4】**

前記C-X-Cモチーフケモカインリガンドが、CXCL10である、請求項3記載の方法。

**【請求項 5】**

前記スコアが、工程(i)～(vi)からの測定値を非線形モデルに入力することにより生成される、請求項2～4のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6】**

前記核酸プローブが、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2の少なくとも20～300個の連続ヌクレオチドに対して相補的であるヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7】**

全タンパク質に対する検出試薬が、比色試薬である、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 8】**

クラスタリンに対する抗体が、ELISAに基づくアッセイの一部である、請求項3～7のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 9】**

CXCL10に対する抗体が、ELISAに基づくアッセイの一部である、請求項4～8のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 10】**

核酸プローブと接触させる前に、cfDNAが増幅されていない、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 11】**

工程(i)～(vi)の前に、体液試料が溶液で安定化されている、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 12】**

安定化溶液が、細胞溶解を阻害しかつ体液試料中のヌクレアーゼを阻害するために十分な濃度で、ホルムアルデヒドドナー、キレート剤、アウリントリカルボン酸、およびポリエチレングリコール(PEG)を含む、請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

体液試料が尿である、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 14】**

前記スコアが、腎損傷の推定確率を表す複合値である、請求項2～13のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 15】**

前記スコアが、0～100にスケールされている、請求項14記載の方法。

**【請求項 16】**

前記スコアが、少なくとも91%の感度と少なくとも91%の特異度で、腎損傷を検出するために使用される、請求項2～15のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 17】**

前記スコアが、90%より大きい、受信者動作特性曲線の下面積(AUC)で、腎損傷を検出するために使用される、請求項2～15のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 18】**

前記非線形モデルが、腎結石、免疫複合体、癌、糖尿病、および移植拒絶を含む、腎損傷の複数の原因を有する対象と対照を評価することによって生成される、請求項5記載の方法。

**【請求項 19】**

前記非線形モデルが、少なくとも400の試料を評価することによって生成される、請求

項18記載の方法。

【請求項 2 0】

移植術後期間の異なる時点において、対象から複数の体液試料を得る工程をさらに含む、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 1】

体液試料由来のcfDNAを核酸プローブと接触させることにより、固定化cfDNA/核酸プローブ複合体が生じる、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 2】

検出基質を含む溶液と前記複合体を接触させる工程をさらに含む、請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

前記検出基質が、化学発光基質である、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

クラスタリンに対する抗体が、マイクロウェルに基づくアッセイにおいて使用される、請求項3～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5】

CXCL10に対する抗体が、マイクロウェルに基づくアッセイにおいて使用される、請求項4～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 6】

腎損傷に罹患している対象が、医学的介入を必要としているかどうかを決定するための方法であって、請求項2記載の方法によって生成されたスコアを得る工程を含み、該スコアに基づいて、該対象に対する医学的介入の必要性が示される、方法。

【請求項 2 7】

前記医学的介入が、対象へ免疫抑制薬を投与することまたは対象への免疫抑制薬の投与量を変更することを含む、請求項26記載の方法。

【請求項 2 8】

前記免疫抑制薬が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、mTOR阻害剤、ステロイド、または導入剤である、請求項27記載の方法。

【請求項 2 9】

前記免疫抑制薬が、タクロリムス、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル、ミコフェノール酸ナトリウム、アザチオプリン、シロリムス、プレドニゾン、サイモグロブリン、IL2受容体遮断薬、およびベラタセプトからなる群より選択される、請求項27または28記載の方法。

【請求項 3 0】

移植術後期間の異なる時点において、対象から複数の体液試料を得る工程をさらに含む、請求項26～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 1】

細胞溶解を阻害しかつ体液中のヌクレアーゼを阻害するために十分な濃度で、ホルムアルデヒドドナー、キレート剤、アウリントリカルボン酸、およびポリエチレングリコール（PEG）を含む、溶液。

【請求項 3 2】

ホルムアルデヒドドナーがジアゾリジニル尿素である、請求項31記載の溶液。

【請求項 3 3】

キレート剤がEDTAである、請求項31または32記載の溶液。

【請求項 3 4】

アジ化ナトリウムをさらに含む、請求項31～33のいずれか一項記載の溶液。

【請求項 3 5】

緩衝剤を含む、請求項31または34記載の溶液。

【請求項 3 6】

体液試料をさらに含む、請求項31～35のいずれか一項記載の溶液。

**【請求項 37】**

体液試料が、臓器移植を受けたことがあるかまたは腎疾患を有する患者に由来する、請求項31～36のいずれか一項記載の溶液。

**【請求項 38】**

臓器移植が腎移植である、請求項37記載の溶液。

**【請求項 39】**

以下の工程を含む、体液試料中のセルフリーDNA (cfDNA) を検出する方法：

ヒトから体液試料を得る工程；

体液試料からcfDNAを抽出する工程；

核酸プローブに相補的であるcfDNAに核酸プローブがハイブリダイズすることを可能にする条件下で、cfDNAを核酸プローブと接触させることによって、反応混合物を形成させる工程であって、核酸プローブが、3'末端および5'末端を有する核酸配列を有し、核酸プローブが、SEQ ID NO:1の少なくとも20個かつ292個以下の連続ヌクレオチドにハイブリダイズするように構成されており、3'末端または5'末端が、検出可能な標識に共有結合で連結されている、工程；および

該プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量を定量化する工程。

**【請求項 40】**

前記プローブがSEQ ID NO:2の少なくとも50個の連続ヌクレオチドに相補的である、請求項39記載の方法。

**【請求項 41】**

反応混合物を形成させる前に請求項31記載の溶液を体液試料と混合する工程をさらに含む、請求項39または40記載の方法。

**【請求項 42】**

体液試料が尿試料であり、

前記方法が、反応混合物中のクレアチニンの量を定量化する工程をさらに含む、請求項39～41のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 43】**

前記プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量を、尿試料中のクレアチニンの量に対して正規化して、ハイブリダイズしたDNAの正規化された量を得る工程を含む、請求項42記載の方法。

**【請求項 44】**

ハイブリダイズしたcfDNAの正規化された量を、腎臓状態を示すカットオフ値と比較する工程をさらに含む、請求項42または43記載の方法。

**【請求項 45】**

前記プローブにハイブリダイズしたcfDNAの検出された量またはcfDNAの正規化された量がカットオフ値より大きい場合、患者が腎損傷を有すると決定する工程をさらに含む、請求項42～44のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 46】**

ヒトが腎移植を受けたことがある患者であり、腎損傷が、患者が急性拒絶エピソードを有することを示す、請求項42～45のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 47】**

ヒトが腎移植を受けたことがある患者であり、

前記方法が、cfDNAの正規化された量と、尿試料が患者から採取された時点での腎臓移植からの期間とに基づき、腎臓の健康を決定するための予測スコアを生成する工程をさらに含む、

請求項42～45のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 48】**

予測スコアが予測スコアのカットオフ値より大きい時、患者が急性拒絶エピソードを有すると決定される、請求項47記載の方法。

**【請求項 49】**

尿試料が、BKウイルス性腎炎、巣状分節性糸球体硬化症、急性尿細管壊死、IgA疾患、および糖尿病性腎疾患からなる群より選択される疾患によって引き起こされた腎損傷を有すると推測される個体に由来する、請求項42～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 0】

CXCL10の量を定量化する工程をさらに含む、請求項39～49のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 1】

前記プローブが、SEQ ID NO:1に相補的な50～150ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、請求項39～50のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 2】

前記プローブが、SEQ ID NO:1に相補的な70～100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、請求項39～50のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 3】

前記プローブが、SEQ ID NO:1に相補的な80～90ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、請求項39～50のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 4】

前記ヌクレオチド配列が正確に81個のヌクレオチドを有する、請求項53記載の方法。

【請求項 5 5】

検出可能な標識がビオチンであり、  
前記方法が、ストレプトアビジンと連結されたシグナル生成剤と、検出可能な標識とを接触させる工程を含む、  
請求項39～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 6】

シグナル生成剤が、化学発光、色、または蛍光を生成する、請求項39～55のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 7】

患者の腎移植受容から0～400日後または10～100日後または20～50日後または移植腎の寿命中に、尿試料が採取される、請求項39～56のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 8】

(i) 尿試料から抽出された未増幅のセルフリーDNA (cfDNA) と、  
(ii) 核酸配列を有し3'末端および5'末端を有する核酸プローブと  
を含む反応混合物であって、  
核酸プローブがSEQ ID NO:1の20～292個の連続ヌクレオチドに相補的であり、3'末端または5'末端が検出可能な標識に共有結合で連結されている、反応混合物。

【請求項 5 9】

臓器移植が肺移植である、請求項37記載の溶液。

【請求項 6 0】

体液試料が気管支肺泡洗浄 (BAL) 液試料であり、  
前記方法が、BAL液の全体積を定量化する工程をさらに含む、  
請求項39記載の方法。

【請求項 6 1】

前記プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量を、全BAL液試料体積に対して正規化して、ハイブリダイズしたDNAの正規化された量を得る工程を含む、請求項60記載の方法。

【請求項 6 2】

ハイブリダイズしたcfDNAの正規化された量を、肺状態を示すカットオフ値と比較する工程をさらに含む、請求項61記載の方法。

【請求項 6 3】

プローブにハイブリダイズしたcfDNAの検出された量またはcfDNAの正規化された量が、カットオフ値より大きい場合、患者が肺損傷を有すると決定する工程をさらに含む、請求項60～62のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 4】

ヒトが肺移植を受けたことがある患者であり、肺損傷が、患者が拒絶エピソードを有することを示す、請求項60～63のいずれか一項記載の方法。

【請求項65】

以下の工程を含む、臓器損傷を検出する方法：

損傷を有すると推測されるかまたは損傷を発症する可能性が高い臓器から採取された体液試料において、cfDNAの量および1種または複数種のマーカーの量を測定する工程であって、1種または複数種のマーカーが、

- (i) 1種または複数種の炎症マーカー、
- (ii) 1種または複数種のアポトーシスマーカー、
- (iii) 全タンパク質、および
- (iv) DNAメチル化マーカーのうちの1つまたは複数

からなる群より選択される、工程；

cfDNAの量および1種または複数種のマーカーの量を使用して、ITスコアを得る工程；

ITスコアが所定のカットオフより高い場合、患者が臓器に損傷を有すると決定するか、患者が臓器に損傷を発症し得ると予測する工程。

【請求項66】

ホルムアルデヒドドナーが、5g/L～20g/Lの濃度で存在し、

PEGが、1g/L～30g/Lの濃度で存在し、

アウリントリカルボン酸が、0.2mM～10mMの濃度で存在し、かつ

キレート剤が、2mM～50mMの濃度で存在する、

請求項31～38のいずれか一項記載の溶液。

【請求項67】

前記体液試料が尿である、請求項36～38のいずれか一項記載の溶液。

【請求項68】

前記体液試料が、気管支肺胞洗浄（BAL）液試料である、請求項36～38のいずれか一項記載の溶液。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

いくつかの態様において、本開示は、以下の工程を含む臓器損傷を検出する方法を提供する：損傷を有すると推測されるかまたは損傷を発症する可能性が高い臓器から採取された体液試料において、cfDNAの量および1種または複数種のマーカーの量を測定する工程であって、1種または複数種のマーカーは、(i) 1種または複数種の炎症マーカー、(ii) 1種または複数種のアポトーシスマーカー、(iii) 全タンパク質、および(iv) DNAメチル化マーカーのうちの1つまたは複数からなる群より選択される、工程；cfDNAの量および1種または複数種のマーカーの量を使用してITスコアを得る工程；ならびにITスコアが所定のカットオフより高い場合、患者が臓器に損傷を有するかまたは患者が臓器に損傷を発症し得ることを決定する工程。いくつかの態様において、臓器損傷は腎損傷である。いくつかの態様において、ITスコアは、クレアチンをさらに含めることによって得られる。いくつかの態様において、ITスコアは、プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量、体液試料中に存在するクレアチニン、1種もしくは複数種の炎症マーカー（例えば、CXCL10）、1種もしくは複数種のアポトーシスマーカー（例えば、クラスタリンのような腎尿細管損傷マーカー）、クレアチニン、および/または1種もしくは複数種のDNAメチル化マーカーの量を使用して、数学モデルを使用することによって得られる。

【本発明1001】

細胞溶解を阻害しかつ体液中のヌクレアーゼを阻害するために十分な濃度で、ホルムアルデヒドドナー、キレート剤、アウリントリカルボン酸、およびポリエチレングリコール

(PEG)を含む、溶液。

[本発明1002]

ホルムアルデヒドドナーがジアソリジニル尿素である、本発明1001の溶液。

[本発明1003]

キレート剤がEDTAである、本発明1001の溶液。

[本発明1004]

アジ化ナトリウムをさらに含む、本発明1001の溶液。

[本発明1005]

緩衝剤を含む、本発明1001または1004の溶液。

[本発明1006]

体液試料をさらに含む、本発明1001～1005のいずれかの溶液。

[本発明1007]

体液試料が、臓器移植を受けたことがあるかまたは腎疾患を有する患者に由来する、本発明1001～1006のいずれかの溶液。

[本発明1008]

臓器移植が腎移植である、本発明1007の溶液。

[本発明1009]

以下の工程を含む、体液試料中のセルフリーDNA (cfDNA) 内のAluコピー数を検出する方法：

ヒトから体液試料を得る工程；

体液試料からcfDNAを抽出する工程；

核酸プローブに相補的であるcfDNAに核酸プローブがハイブリダイズすることを可能にする条件下で、cfDNAを核酸プローブと接触させることによって、反応混合物を形成させる工程であって、核酸プローブが、3'末端および5'末端を有する核酸配列を有し、核酸プローブが、SEQ ID NO:1の20～292個の連続ヌクレオチドに相補的であり、3'末端または5'末端が、検出可能な標識に共有結合で連結されている、工程；

該プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量を定量化し、それによって、体液試料中のセルフリーDNA (cfDNA) 内のAluコピー数を検出する工程。

[本発明1010]

前記プローブがSEQ ID NO:2の少なくとも50個の連続ヌクレオチドに相補的である、本発明1009の方法。

[本発明1011]

反応混合物を形成させる前に本発明1001の溶液を体液試料と混合する工程をさらに含む、本発明1009または1010の方法。

[本発明1012]

体液試料が尿試料であり、

前記方法が、反応混合物中のクレアチニンの量を定量化する工程をさらに含む、本発明1009の方法。

[本発明1013]

前記プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量を、尿試料中のクレアチニンの量に対して正規化して、ハイブリダイズしたDNAの正規化された量を得る工程を含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

ハイブリダイズしたcfDNAの正規化された量を、腎臓状態を示すカットオフ値と比較する工程をさらに含む、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記プローブにハイブリダイズしたcfDNAの検出された量またはcfDNAの正規化された量がカットオフ値より大きい場合、患者が腎損傷を有すると決定する工程をさらに含む、本発明1014の方法。

[本発明1016]

ヒトが腎移植を受けたことがある患者であり、腎損傷が、患者が急性拒絶エピソードを有することを示す、本発明1015の方法。

[本発明1017]

ヒトが腎移植を受けたことがある患者であり、

前記方法が、cfDNAの正規化された量と、尿試料が患者から採取された時点での腎臓移植からの期間とに基づき、腎臓の健康を決定するための予測スコアを生成する工程をさらに含む、

本発明1015の方法。

[本発明1018]

予測スコアが予測スコアのカットオフ値より大きい時、患者が急性拒絶エピソードを有すると決定される、本発明1017の方法。

[本発明1019]

尿試料が、BKウイルス性腎炎、巣状分節性糸球体硬化症、急性尿細管壊死、IgA疾患、および糖尿病性腎疾患からなる群より選択される疾患によって引き起こされた腎損傷を有すると推測される個体に由来する、本発明1014の方法。

[本発明1020]

CXCL10の量を定量化する工程をさらに含む、本発明1009の方法。

[本発明1021]

前記プローブが、SEQ ID NO:1に相補的な50～150ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、本発明1009の方法。

[本発明1022]

前記プローブが、SEQ ID NO:1に相補的な70～100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、本発明1009の方法。

[本発明1023]

前記プローブが、SEQ ID NO:1に相補的な80～90ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、本発明1009の方法。

[本発明1024]

ヌクレオチド配列が正確に81個のヌクレオチドを有する、本発明1023の方法。

[本発明1025]

検出可能な標識がビオチンであり、

前記方法が、ストレプトアビジンと連結されたシグナル生成剤と、検出可能な標識とを接触させる工程を含む、

本発明1009～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

シグナル生成剤が、化学発光、色、または蛍光を生成する、本発明1009の方法。

[本発明1027]

患者の腎移植受容から0～400日後または10～100日後または20～50日後または移植腎の寿命中に、尿試料が採取される、本発明1009～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

(i) 尿試料から抽出された未増幅のセルフリーDNA (cfDNA) と、

(ii) 核酸配列を有し3'末端および5'末端を有する核酸プローブとを含む反応混合物であって、

核酸プローブがSEQ ID NO:1の20～292個の連続ヌクレオチドに相補的であり、3'末端または5'末端が検出可能な標識に共有結合で連結されている、反応混合物。

[本発明1029]

臓器移植が肺移植である、本発明1007の溶液。

[本発明1030]

体液試料が気管支肺胞洗浄 (BAL) 液試料であり、

前記方法が、BAL液の全体積を定量化する工程をさらに含む、本発明1009の方法。



[本発明1031]

前記プローブにハイブリダイズしたcfDNAの量を、全BAL液試料体積に対して正規化して、ハイブリダイズしたDNAの正規化された量を得る工程を含む、本発明1030の方法。

[本発明1032]

ハイブリダイズしたcfDNAの正規化された量を、肺状態を示すカットオフ値と比較する工程をさらに含む、本発明1031の方法。

[本発明1033]

プローブにハイブリダイズしたcfDNAの検出された量またはcfDNAの正規化された量が、カットオフ値より大きい場合、患者が肺損傷を有すると決定する工程をさらに含む、本発明1032の方法。

[本発明1034]

ヒトが肺移植を受けたことがある患者であり、肺損傷が、患者が拒絶エピソードを有することを示す、本発明1033の方法。

[本発明1035]

以下の工程を含む、臓器損傷を検出する方法：

損傷を有すると推測されるかまたは損傷を発症する可能性が高い臓器から採取された体液試料において、cfDNAの量および1種または複数種のマーカーの量を測定する工程であって、1種または複数種のマーカーが、

( i ) 1種または複数種の炎症マーカー、

( ii ) 1種または複数種のアポトーシスマーカー、

( iii ) 全タンパク質、および

( iv ) DNAメチル化マーカーのうちの1つまたは複数

からなる群より選択される、工程；

cfDNAの量および1種または複数種のマーカーの量を使用して、ITスコアを得る工程；

ITスコアが所定のカットオフより高い場合、患者が臓器に損傷を有するかまたは患者が臓器に損傷を発症し得ることを決定する工程。