

【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6部門第1区分

【発行日】令和6年6月21日(2024.6.21)

【公開番号】特開2023-153895(P2023-153895A)

【公開日】令和5年10月18日(2023.10.18)

【年通号数】公開公報(特許)2023-196

【出願番号】特願2023-122354(P2023-122354)

【国際特許分類】

G 0 1 N 3 3 / 5 3 ( 2 0 0 6 . 0 1 )

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3 ( 2 0 0 6 . 0 1 )

C 0 7 K 1 6 / 2 8 ( 2 0 0 6 . 0 1 )

C 0 7 K 1 6 / 4 6 ( 2 0 0 6 . 0 1 )

10

【F I】

G 0 1 N 3 3 / 5 3 N Z N A

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3 5 0 1 A

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3 5 0 1 H

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 0 7 K 1 6 / 4 6

20

【手続補正書】

【提出日】令和6年6月12日(2024.6.12)

【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】

活性化可能抗体の活性化レベルを定量化する方法であって、

30

i) 装填されたキャピラリーまたは装填されたキャピラリーの集団を活性化可能抗体、活性化された活性化可能抗体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上の成分を含む生体試料と接触させることであって、前記生体試料が癌を有する対象から単離されているか、または前記生体試料が癌を有する対象から単離された試料に由来し、前記装填されたキャピラリーまたは装填されたキャピラリーの集団は積層マトリックスおよび分離マトリックスが事前に装填される、接触させることと、

ii) 各キャピラリー内で前記生体試料の1つ以上の高分子量(MW)成分を前記生体試料の1つ以上の低分子量(MW)成分から分離することであって、少なくとも1つの高MW成分が活性化可能抗体を含み、かつ少なくとも1つの低MW成分が活性化された抗体を含む、分離することと、

40

iii) 各キャピラリー内で前記1つ以上の高MW成分および前記1つ以上の低MW成分を固定することと、

iv) 各キャピラリーを少なくとも1つの活性化可能抗体に特異的である少なくとも第1の試薬で免疫プローブすることと、

v) 各キャピラリーまたはキャピラリーの集団における前記第1の試薬のレベルを検出し定量化することと

を含む、方法。

【請求項2】

ステップi)の前に、少なくとも1つのキャピラリーまたはキャピラリーの集団に積層マトリックスおよび分離マトリックスを装填して、少なくとも1つの装填されたキャピラ

50

リーまたは装填されたキャピラリーの集団を作製することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ i i ) が、キャピラリー電気泳動により各キャピラリー内で前記生体試料の前記 1 つ以上の高分子量成分を前記生体試料の前記 1 つ以上の低分子量成分から分離することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記分離するステップが、少なくとも 35 分、または少なくとも 36 分、または少なくとも 37 分、または少なくとも 38 分の分離時間にわたって実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ i i i ) が、UV 光を使用して前記生体試料の前記 1 つ以上の高 MW 成分および前記 1 つ以上の低 MW 成分を固定化することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記活性化可能抗体が、結合型活性化可能抗体、多重特異性活性化可能抗体、および結合型多重特異性活性化可能抗体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ i v ) における前記第 1 の試薬が、前記少なくとも 1 つの活性化可能抗体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 の試薬が、抗イディオタイプ抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗イディオタイプ抗体またはその抗原結合断片が、少なくとも 1 つの活性化可能抗体、結合型活性化可能抗体、多重特異性活性化可能抗体、結合型多重特異性活性化可能抗体、またはそれらの組み合わせの可変軽鎖 ( V L ) C D R に結合し、前記 V L C D R が、V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 の試薬が、検出可能な試薬である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ i v ) が、各キャピラリーに前記第 1 の試薬に特異的に結合する第 2 の試薬を装填することをさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 2 の試薬が、二次抗体を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 2 の試薬が、検出可能な標識を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 の試薬が、検出可能な標識に結合された二次抗体を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記検出可能な標識が、蛍光標識である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記検出可能な標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) およびアルカリホスファターゼからなる群から選択されるレポーター酵素である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記レポーター酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記二次抗体が、検出可能な標識に結合されない、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記二次抗体が、一組の第 1 の結合タグおよび第 2 の結合タグの第 1 の結合タグに結合され、前記第 1 の結合タグが前記第 2 の結合タグに結合可能である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

ステップ i v ) が、各キャピラリーに前記第 2 の試薬に特異的に結合する第 3 の試薬を装填することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。 10

【請求項 2 1】

前記第 3 の試薬が、前記第 2 の結合タグに結合されたレポーター酵素を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記レポーター酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 1 の結合タグおよび第 2 の結合タグが、それぞれ、ビオチンおよびストレプトアビジン、ストレプトアビジンおよびビオチン、ビオチンおよびアビジン、ならびにアビジンおよびビオチンからなる群から選択される、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。 20

【請求項 2 4】

前記第 2 の試薬が、ビオチンに結合された二次抗体であり、かつ前記第 3 の試薬が、ストレプトアビジンに結合されたレポーター酵素である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第 2 の試薬が、ストレプトアビジンに結合された二次抗体であり、かつ前記第 3 の試薬が、ビオチンに結合されたレポーター酵素である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記レポーター酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択される、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 2 7】

前記第 3 の試薬が、検出可能な三次抗体を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 8】

ステップ i v ) が、各キャピラリーに化学発光基質および比色基質からなる群から選択される基質を装填することをさらに含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記基質が、化学発光基質であり、かつステップ v ) が、各キャピラリーまたはキャピラリーの集団における化学発光のレベルを検出することを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記化学発光基質が、ルミノールであり、かつステップ i v ) が、各キャピラリーに過酸化物を装填することをさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。 40

【請求項 3 1】

ステップ i ) が、 $1 \sim 500 \text{ ng}$  の生体試料を装填することを含む、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

ステップ i ) が、 $5 \sim 40 \text{ ng}$  の生体試料を装填することを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記生体試料が、分子量分離をもたらすのに十分な量で 1 つ以上の SDS 含有緩衝液を 50

用いて調製される、請求項 1 ~ 3.2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3.4】

前記生体試料が、体液である、請求項 1 ~ 3.3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3.5】

前記体液が、血液、血漿、および血清からなる群から選択される、請求項 3.4 に記載の方法。

【請求項 3.6】

前記生体試料が、病変組織である、請求項 1 ~ 3.3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3.7】

前記病変組織が、溶解物である、請求項 3.6 に記載の方法。

10

【請求項 3.8】

前記病変組織が、腫瘍組織である、請求項 3.7 に記載の方法。

【請求項 3.9】

v) 各キャピラリーまたはキャピラリーの集団における前記第 1 の試薬のレベルを定量化することが、直接的にまたは間接的にのいずれかで検出される、第 1 の試薬のレベルを、活性化可能抗体についておよび活性化された活性化可能抗体についての標準曲線と、比較することを含む、請求項 1 ~ 3.8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4.0】

アミノ酸配列 S Y G M S (配列番号 4.3.8) を含む可変重鎖相補性決定領域 1 (CDRH1); アミノ酸配列 T I S P S G I Y T Y Y P V T V K G (配列番号 4.3.9) を含む可変重鎖相補性決定領域 2 (CDRH2); アミノ酸配列 H H P N Y G S T Y L Y Y I D Y (配列番号 4.4.0) を含む可変重鎖相補性決定領域 3 (CDRH3); アミノ酸配列 K S S Q S V F S S S N Q K N Y L A (配列番号 4.4.1) を含む可変軽鎖相補性決定領域 1 (CDRL1); アミノ酸配列 W A F T R E S (配列番号 4.4.2) を含む可変軽鎖相補性決定領域 2 (CDRL2); およびアミノ酸配列 Y Q Y L S S L T (配列番号 4.4.3) を含む可変軽鎖相補性決定領域 3 (CDRL3) を含む、請求項 1 ~ 3.9 のいずれか一項に記載の方法に用いるための単離された抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 4.1】

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 4.2.9 のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む、請求項 4.0 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 4.2】

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 4.3.1 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、請求項 4.0 または請求項 4.1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4.3】

配列番号 4.2.9 のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む、請求項 1 ~ 3.9 のいずれか一項に記載の方法に用いるための単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4.4】

配列番号 4.3.1 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、請求項 4.3 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4.5】

配列番号 4.3.1 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、請求項 1 ~ 3.9 のいずれか一項に記載の方法に用いるための単離された抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 4.6】

配列番号 4.2.9 のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む、請求項 4.3 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4.7】

(i) 活性化可能抗体の標準曲線試薬;

(ii) 活性化された活性化可能抗体の標準曲線試薬; および

(iii) 前記活性化可能抗体に対する結合特異性を有する抗 id 一次抗体を含む、請求項 1 ~ 3.9 のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキット。

50