

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7619939号
(P7619939)

(45)発行日 令和7年1月22日(2025.1.22)

(24)登録日 令和7年1月14日(2025.1.14)

(51)国際特許分類		F I	
G O 1 N	33/68 (2006.01)	G O 1 N	33/68
G O 1 N	33/50 (2006.01)	G O 1 N	33/50
G O 1 N	33/15 (2006.01)	G O 1 N	33/15
G O 1 N	30/72 (2006.01)	G O 1 N	30/72
G O 1 N	30/88 (2006.01)	G O 1 N	30/88
		Z N A	
		Z	
		Z	
		C	
		J	
		請求項の数 15 (全129頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-518442(P2021-518442)	(73)特許権者	514204772
(86)(22)出願日	令和1年10月4日(2019.10.4)		シアトル チルドレンズ ホスピタル ド
(65)公表番号	特表2022-512591(P2022-512591 A)		ゥーイング ビジネス アズ シアトル チ
(43)公表日	令和4年2月7日(2022.2.7)		ルドレンズ リサーチ インスティテュート
(86)国際出願番号	PCT/US2019/054856	(73)特許権者	522256406
(87)国際公開番号	WO2020/072996		フレッド ハッチンソン キャンサー セ
(87)国際公開日	令和2年4月9日(2020.4.9)		ンター
審査請求日	令和4年10月3日(2022.10.3)		アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0
(31)優先権主張番号	62/742,161		9 シアトル フェアビュー アベニュー
(32)優先日	平成30年10月5日(2018.10.5)		ノース 1 1 0 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	110001173
			弁理士法人川口国際特許事務所
		(72)発明者	ハーン, シホーン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 原発性免疫不全症、シスチン症、及びウィルソン病に関する新生児スクリーニング

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における重症複合免疫不全症（S C I D）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（W A S）、X連鎖無ガンマグロブリン血症（X L A）、シスチン症、及び／又はウィルソン病（W D）をスクリーニングする方法であって、

- (a) 対象に由来する乾燥血液スポット（D B S）試料を得ることと；
- (b) 前記 D B S の血液由来のタンパク質を酵素で消化して1つ以上のペプチドを生成することと；
- (c) ペプチドを濃縮することであって、

配列番号1のS C I DのC D 3 εシグネチャーペプチドを、前記C D 3 εシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号22のC D R 1、配列番号23のC D R 2、及び配列番号24のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号25のC D R 1、配列番号26のC D R 2、及び配列番号27のC D Rを含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号2のW A Sの第1のW A S pシグネチャーペプチドを、前記第1のW A S pシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号28のC D R 1、配列番号29のC D R 2、及び配列番号30のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号31のC D R 1、配列番号32のC D R 2、及び配列番号33のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号4のX L Aの第1のB T Kシグネチャーペプチドを、前記第1のB T Kシグネ

チャーペプチドに結合し、かつ配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列GDIのCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、及び配列番号38のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号6のシスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号7または8のシスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号9のシスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

及び／又は

配列番号11または21のWDのATP7Bシグネチャーペプチドを、前記ATP7Bシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；濃縮することと；

（d）前記濃縮ペプチドに対して液体クロマトグラフィーー多重反応モニタリング質量分析（LC-MRM-MS）を実行して、前記ペプチドの濃度を決定することと；

（e）前記対象が、

前記CD3εシグネチャーペプチドの前記濃度が所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記CD3εシグネチャーペプチドが存在しない場合は、SCID；

前記第1のWASPシグネチャーペプチドの前記濃度が所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記第1のWASPシグネチャーペプチドが存在しない場合は、WAS；

前記第1のBTkシグネチャーペプチドの前記濃度が対応する所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記第1のBTkシグネチャーペプチドが存在しない場合は、XLA；

前記第1のCTNSシグネチャーペプチド、第2のCTNSシグネチャーペプチド、及び／若しくは第1のSHPKシグネチャーペプチドの前記濃度が所定の閾値濃度よりも低い場合、または第1のCTNSシグネチャーペプチド、第2のCTNSシグネチャーペプチド、及び／若しくは第1のSHPKシグネチャーペプチドが存在しない場合は、シスチン症；並びに／又は

前記ATP7Bシグネチャーペプチド前記濃度が所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記ATP7Bシグネチャーペプチドが存在しない場合は、WD；

を有すると決定することと；

を含む、前記方法。

【請求項2】

対象における重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、及び／またはX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）をスクリーニングする方法であって、

（a）対象に由来する乾燥血液スポット（DBS）試料を得ることと；

（b）前記DBSの血液由来のタンパク質を酵素で消化して1つ以上のペプチドを生成

10

20

30

40

50

することと；

(c) ペプチドを濃縮することであって、

配列番号1のSCIDのCD3εシグネチャーペプチドを、前記CD3εシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号22のCDR1、配列番号23のCDR2、及び配列番号24のCDR3を含む、重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号25のCDR1、配列番号26のCDR2、及び配列番号27のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号2のWASの第1のWASPシグネチャーペプチドを、前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号28のCDR1、配列番号29のCDR2、及び配列番号30のCDR3を含む、重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号31のCDR1、配列番号32のCDR2、及び配列番号33のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／又は

配列番号4のXLAの第1のBTKシグネチャーペプチドを、前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列番号36のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号37のCDR1、配列番号38のCDR2、及び配列番号39のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

濃縮することと；

(d) 内因性ATP7Bペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、前記内因性ATP7Bペプチドを濃縮することと；

(e) 前記濃縮ペプチドに対して液体クロマトグラフィー-多重反応モニタリング質量分析(LC-MRM-MS)を実行して、前記ペプチドの濃度を決定することと；

(f) シグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率を、各シグネチャーペプチドについて計算することと；

(g) CD3εシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率が対応する所定の閾値比よりも低い場合、またはCD3εシグネチャーペプチドが存在しない場合は、SCID；

前記第1のWASPシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率が対応する所定の閾値比よりも低い場合、または前記第1のWASPシグネチャーペプチドが存在しない場合は、WAS；及び／若しくは

前記第1のBTKシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率が対応する所定の閾値比よりも低い場合、または前記第1のBTKシグネチャーペプチドが存在しない場合は、XLA

を対象が有すると、決定することと、並びに、

場合によっては、

(h) ペプチドを濃縮することであって、

配列番号6のシスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号7または8のシスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

及び／若しくは

配列番号9のシスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号5

10

20

30

40

50

4のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；濃縮することと；

（i）シグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率を、各シグネチャーペプチドについて計算することと；

（j）前記第1のCTNSシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率、前記第2のCTNSシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率、及び／若しくは第1のSHPKシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率が対応する所定の閾値比よりも低い場合、並びに／又は、前記第1のCTNSシグネチャーペプチド、前記第2のCTNSシグネチャーペプチド、及び／若しくは第1のSHPKシグネチャーペプチド濃度CD3εシグネチャーペプチドが存在しない場合は、シスチン症を対象が有すると、決定することを含む、前記方法。

【請求項3】

重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、及び／またはX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）の1つ以上のシグネチャーペプチドを1つ以上の乾燥血液スポット（DBS）サンプル中で検出する方法であって、

（a）1つ以上の乾燥血液スポット（DBS）試料を得ることと；

（b）各DBSの血液からタンパク質を酵素で消化して、1つ以上のペプチドを生成することと；

（c）ペプチドを濃縮することであって、：

配列番号1のSCIDのCD3εシグネチャーペプチドを、前記CD3εシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号22のCDR1、配列番号23のCDR2、及び配列番号24のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号25のCDR1、配列番号26のCDR2、及び配列番号27のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号2のWASの第1のWASPシグネチャーペプチドを、前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号28のCDR1、配列番号29のCDR2、及び配列番号30のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号31のCDR1、配列番号32のCDR2、及び配列番号33のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／又は

配列番号4のXLAの第1のBTKシグネチャーペプチドを、前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列番号36のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号37のCDR1、配列番号38のCDR2、及び配列番号39のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；濃縮することと；

（d）前記濃縮ペプチドに対して液体クロマトグラフィー多重反応モニタリング質量分析（LC-MRM-MS）を実行し、1つ以上のDBSサンプル中でSCID、WAS、及びXLAの1つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと；及び
場合によっては、

（e）シスチン症の1つ以上のシグネチャーペプチドを検出することであって、

配列番号6のシスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメインならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

配列番号7または8のシスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽

10

20

30

40

50

鎖可変（V L）ドメインを含む抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／又は配列番号 9 のシスチン症の第 1 の S H P K シグネチャーペプチドを、前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号 5 1 の C D R 1、配列番号 5 2 の C D R 2、及び配列番号 5 3 の C D R 3 を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号 5 4 の C D R 1、配列番号 5 5 の C D R 2、及び配列番号 5 6 の C D R 3 を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

濃縮することにより、シスチン症の 1 つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと；

（f）前記濃縮されたペプチドに対して液体クロマトグラフィー—多重反応モニタリング質量分析（L C — M R M — M S）を実行し、これによって 1 つ以上の D B S サンプルでシスチン症の 1 つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと；及び
場合によっては、

10

（g）ウィルソン病（W D）の 1 つ以上のシグネチャーペプチドを検出することであって、

配列番号 1 1 または 2 1 の W D の A T P 7 B シグネチャーペプチドを、前記 A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合し、かつ配列番号 5 7 の C D R 1、配列番号 5 8 の C D R 2、及び配列番号 5 9 の C D R 3 を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号 6 0 の C D R 1、配列番号 6 1 の C D R 2、及び配列番号 6 2 の C D R 3 を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

濃縮することにより、ウィルソン病（W D）の 1 つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと；

20

（h）前記濃縮されたペプチドに対して液体クロマトグラフィー—多重反応モニタリング質量分析（L C — M R M — M S）を実行し、これによって 1 つ以上の D B S サンプルで W D の 1 つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと；

を含む、前記方法。

【請求項 4】

前記方法が、フェニルケトン尿症、原発性先天性甲状腺機能低下症、嚢胞性線維症、及び鎌状赤血球症のうちの 1 つ以上について前記対象をさらにスクリーニングする、新生児スクリーニング（N B S）の一部として実施される、又は
前記対象において S C I D、W A S、及び／または X L A の臨床症状がない状態で実施される、

30

請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記酵素がトリプシンである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

S C I D の C D 3 ε シグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 6 3 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する V H ドメイン、及び配列番号 6 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する V L ドメインを含む；

又は

W A S の第 1 の W A S p シグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、（i）配列番号 6 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する V H ドメイン、及び配列番号 6 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する V L ドメインを含むか、若しくは（i i）配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号 9 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖を含む；

40

又は

X L A の第 1 の B T K シグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、（i）配列番号 6 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する V H ドメイン、及び配列番号 6 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する V L ドメインを含むか、若しくは（i i）配列番号 9 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号 1 0 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖を含む；

50

又は

シスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、(i)配列番号69と少なくとも90%の配列同一性を有するVHドメイン、及び配列番号70と少なくとも90%の配列同一性を有するVLドメインを含むか、若しくは(ii)配列番号106と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む：

又は

シスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、(i)配列番号71と少なくとも90%の配列同一性を有するVHドメイン、及び配列番号72と少なくとも90%の配列同一性を有するVLドメインを含むか、若しくは(ii)配列番号116と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号121と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む：

又は

シスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、(i)配列番号73と少なくとも90%の配列同一性を有するVHドメイン、及び配列番号74と少なくとも90%の配列同一性を有するVLドメインを含むか、若しくは(ii)配列番号126と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号131と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む：

又は

WDのATP7Bシグネチャーペプチドを濃縮するために使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、(i)配列番号75と少なくとも90%の配列同一性を有するVHドメイン、及び配列番号76と少なくとも90%の配列同一性を有するVLドメインを含むか、若しくは(ii)配列番号136と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号141と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む：

請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

各シグネチャーペプチドについて前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団由来のDBS中の各シグネチャーペプチドの平均濃度の標準偏差から計算され、

正常な対照対象の集団由来のDBSにおける配列番号1のSCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドの平均濃度が、70 pmol/L～400 pmol/Lの範囲の濃度を含む、又は

正常な対照対象の集団由来のDBS中における配列番号2のWASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの平均濃度が、600 pmol/L～5000 pmol/Lの範囲の濃度を含む、又は

正常な対照対象の集団由来のDBSにおける配列番号4のXLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの平均濃度が、350 pmol/L～2500 pmol/Lの範囲の濃度を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

各シグネチャーペプチドの前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団由来のDBS中の各シグネチャーペプチドの平均濃度の標準偏差から計算され、

正常な対照対象の集団由来のDBSにおける配列番号6のシスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの平均濃度が、40 pmol/L～250 pmol/Lの範囲の濃度を含む、又は正常な対照対象の集団由来のDBSにおける配列番号9のシスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドの平均濃度が、100 pmol/L～8000 pmol/Lの範囲の濃度を含む、

請求項1に記載の方法。

【請求項9】

各シグネチャーペプチドの前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団由来のDBS中の各シグネチャーペプチドの平均濃度の標準偏差から計算され、

正常な対照対象の集団由来のDBSにおける配列番号11または21のWDの前記ATP7Bシグネチャーペプチドの平均濃度が、 $90 \text{ pmol/L} \sim 400 \text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

各所定の閾値比率が、サンプルの集団における各ペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の平均比率の標準偏差から計算される、請求項2に記載の方法。

【請求項11】

前記内因性ATP7Bペプチドが、

配列番号10のATP7Bペプチド；

配列番号11または21のATP7Bペプチドであって、但し、配列番号11または21のATP7Bペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含むVHドメイン、及び配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含むVLドメインを含む；

配列番号16のATP7Bペプチド；

配列番号17のATP7Bペプチド；

配列番号18のATP7Bペプチド；

配列番号19のATP7Bペプチド；又は

配列番号20のATP7Bペプチド；

である、請求項2に記載の方法。

【請求項12】

重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、対象のX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）、シスチン症、及び／またはウィルソン病（WD）のスクリーニングのためのアッセイであって：

（i） 配列番号22のCDR1、配列番号23のCDR2、及び配列番号24のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号25のCDR1、配列番号26のCDR2、及び配列番号27のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、配列番号1のSCIDのCD3εシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号28のCDR1、配列番号29のCDR2、及び配列番号30のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号31のCDR1、配列番号32のCDR2、及び配列番号33のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、配列番号2のWASのWASPシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列GDIのCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、及び配列番号38のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、配列番号4のXLAのBTLSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含むVHドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含むVLドメインを含む、配列番号6のシスチン症のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含むVHドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含むVLドメインを含む、配列番号7または8のシスチン症のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含むVHドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含むVLドメインを含む、配列番号9のシスチン症のSHPKシグ

10

20

30

40

50

ネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；
及び／若しくは

配列番号 57 の C D R 1、配列番号 58 の C D R 2、及び配列番号 59 の C D R 3 を含
む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号 60 の C D R 1、配列番号 61 の C D R
2、及び配列番号 62 の C D R 3 を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、配列番号 11
もしくは 21 の A T P 7 B ペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；
並びに

場合によっては、

（i i）配列番号 3 の W A S の W A S p シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくは
その抗原結合フラグメント；

配列番号 5 の X L A の B T K シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結
合フラグメント；

配列番号 10 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合
フラグメント；

配列番号 12 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フ
ラグメント；

配列番号 13 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フ
ラグメント；

配列番号 14 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フ
ラグメント；

配列番号 15 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フ
ラグメント；

配列番号 16 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合
フラグメント；

配列番号 17 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合
フラグメント；

配列番号 18 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合
フラグメント；

配列番号 19 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合
フラグメント；

配列番号 20 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フ
ラグメント；及び／若しくは

配列番号 21 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合
フラグメント；

並びに／又は

（i i i）以下を含む参照シグネチャーペプチド：

配列番号 1 の S C I D の C D 3 ε ペプチド；

配列番号 2 の W A S の W A S p ペプチド；

配列番号 3 の W A S の W A S p ペプチド；

配列番号 4 の X L A の B T K ペプチド；

配列番号 5 の X L A の B T K ペプチド；

配列番号 6 のシスチン症の C T N S ペプチド；

配列番号 7 もしくは 8 のシスチン症の C T N S ペプチド；

配列番号 12 のシスチン症の C T N S ペプチド；

配列番号 13 のシスチン症の C T N S ペプチド；

配列番号 9 のシスチン症の S H P K ペプチド；

配列番号 14 のシスチン症の S H P K ペプチド；

配列番号 15 のシスチン症の S H P K ペプチド；

配列番号 10 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む W D の
A T P 7 B ペプチド；

10

20

30

40

50

配列番号 11 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド；

配列番号 16 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド；

配列番号 17 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド；

配列番号 18 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド；

配列番号 19 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド；

配列番号 20 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド；及び／若しくは

配列番号 21 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む WD の ATP7B ペプチド、を含む、前記アッセイ。

【請求項 13】

単離された抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

(a) 配列番号 22 の CDR1、配列番号 23 の CDR2、及び配列番号 24 の CDR3 を含む重鎖可変 (VH) ドメイン、ならびに配列番号 25 の CDR1、配列番号 26 の CDR2、及び配列番号 27 の CDR3 を含む軽鎖可変 (VL) ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント；又は

(b) 配列番号 28 の CDR1、配列番号 29 の CDR2、及び配列番号 30 の CDR3 を含む VH ドメイン、ならびに配列番号 31 の CDR1、配列番号 32 の CDR2、及び配列番号 33 の CDR3 を含む VL ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント；又は

(c) 配列番号 34 の CDR1、配列番号 35 の CDR2、及び配列番号 36 の CDR3 を含む VH ドメイン、ならびに配列番号 37 の CDR1、配列番号 38 の CDR2、及び配列番号 39 の CDR3 を含む VL ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント；又は

(d) 配列番号 40 の CDR1、配列番号 41 の CDR2、及び配列番号 42 の CDR3 を含む VH ドメイン、ならびに配列番号 43 の CDR1、配列番号 44 の CDR2、及び配列番号 45 の CDR3 を含む VL ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント；又は

(e) 配列番号 46 の CDR1、配列番号 47 の CDR2、及び配列番号 48 の CDR3 を含む VH ドメイン、ならびに配列番号 49 の CDR1、配列番号 50 の CDR2、及び配列番号 51 の CDR3 を含む VL ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント；又は

(f) 配列番号 52 の CDR1、配列番号 53 の CDR2、及び配列番号 54 の CDR3 を含む VH ドメイン、ならびに配列番号 55 の CDR1、配列番号 56 の CDR2、及び配列番号 57 の CDR3 を含む VL ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント；又は

(g) 配列番号 58 の CDR1、配列番号 59 の CDR2、及び配列番号 60 の CDR3 を含む VH ドメイン、ならびに配列番号 61 の CDR1、配列番号 62 の CDR2、及び配列番号 63 の CDR3 を含む VL ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 14】

(a) VH ドメインが、配列番号 64 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VL ドメインが、配列番号 65 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(b) VH ドメインが、配列番号 66 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含み、V Lドメインが、配列番号66と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖が、配列番号86と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖が、配列番号91と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(c) V Hドメインが、配列番号67と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Lドメインが、配列番号68と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖が、配列番号96と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖が、配列番号101と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(d) V Hドメインが、配列番号69と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Lドメインが、配列番号70と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖が、配列番号106と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖が、配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(e) V Hドメインが、配列番号71と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Lドメインが、配列番号72と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖が、配列番号116と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖が、配列番号121と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(f) V Hドメインが、配列番号73と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Lドメインが、配列番号74と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖が、配列番号126と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖が、配列番号131と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；又は

(g) V Hドメインが、配列番号75と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V Lドメインが、配列番号76と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖が、配列番号136と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖が、配列番号141と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

請求項13に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

キットであって、

(i)

配列番号22のC D R 1、配列番号23のC D R 2、及び配列番号24のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号25のC D R 1、配列番号26のC D R 2、及び配列番号27のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、配列番号1のS C I DのC D 3 εシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号28のC D R 1、配列番号29のC D R 2、及び配列番号30のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号31のC D R 1、配列番号32のC D R 2、及び配列番号33のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、配列番号2のW A SのW A S pシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号34のC D R 1、配列番号35のC D R 2、及び配列G D IのC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号36のC D R 1、配列番号37のC D R 2、及び配列番号38のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、配列番号4のX L AのB T Kシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号39のC D R 1、配列番号40のC D R 2、及び配列番号41のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号42のC D R 1、配列番号43のC D R 2、及び配列番号44のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、配列番号6のシスチン症のC T N Sシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号 45 の C D R 1、配列番号 46 の C D R 2、及び配列番号 47 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 48 の C D R 1、配列番号 49 の C D R 2、及び配列番号 50 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインを含む、配列番号 7 または 8 のシスチン症の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

配列番号 51 の C D R 1、配列番号 52 の C D R 2、及び配列番号 53 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 54 の C D R 1、配列番号 55 の C D R 2、及び配列番号 56 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインを含む、配列番号 9 のシスチン症の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；ならびに／あるいは

配列番号 57 の C D R 1、配列番号 58 の C D R 2、及び配列番号 59 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 60 の C D R 1、配列番号 61 の C D R 2、及び配列番号 62 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインを含む、配列番号 11 または 21 の A T P 7 B ペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント、並びに

場合によっては、

(i i) 配列番号 3 の W A S の W A S p シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 5 の X L A の B T K シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 12 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 13 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 14 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 15 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 10 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 16 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 17 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 18 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 19 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

配列番号 20 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；及び／または

配列番号 11 又は 21 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

並びに／又は

(i i i) 参照シグネチャーペプチドであって、

配列番号 1 の S C I D の C D 3 ε ペプチド；

配列番号 2 の W A S の W A S p ペプチド；

配列番号 3 の W A S の W A S p ペプチド；

配列番号 4 の X L A の B T K ペプチド；

配列番号 5 の X L A の B T K ペプチド；

配列番号 6 のシスチン症の C T N S ペプチド；

配列番号 7 または 8 のシスチン症の C T N S ペプチド；
配列番号 1 2 のシスチン症の C T N S ペプチド；
配列番号 1 3 のシスチン症の C T N S ペプチド；
配列番号 9 のシスチン症の S H P K ペプチド；
配列番号 1 4 のシスチン症の S H P K ペプチド；
配列番号 1 5 のシスチン症の S H P K ペプチド；
配列番号 1 0 の W D の A T P 7 B ペプチド；
配列番号 1 1 の W D の A T P 7 B ペプチド；
配列番号 1 6 の W D の A T P 7 B ペプチド；
配列番号 1 7 の W D の A T P 7 B ペプチド；
配列番号 1 8 の W D の A T P 7 B ペプチド；
配列番号 1 9 の W D の A T P 7 B ペプチド；
配列番号 2 0 の W D の A T P 7 B ペプチド；及び／または
配列番号 2 1 の W D の A T P 7 B ペプチド、
を含む前記参照シグネチャーペプチド、
を備え、
場合によっては、

10

前記キットは、濾紙カード、パンチツール、消化酵素、消化緩衝液、抗体またはその抗原結合フラグメントの固体支持体、及び溶出緩衝液のうちの 1 つ以上をさらに含み、又は、前記参照シグネチャーペプチドが同位体標識されており、又は、前記抗体またはその抗原結合フラグメントが磁気ビーズに付着している、前記キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、本明細書に完全に記載されているかのようにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018年10月5日に出願された米国仮特許出願第62／742,161号の優先権を主張する。

【0002】

連邦政府が後援する研究または開発に関する声明

30

本発明は、全て国立衛生研究所によって授与された助成金番号1R21HD069890-01A1、付与番号AI106784-01A1、及び助成金番号R01AI123135の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表に関する声明

本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は2698490__ST25.txtである。テキストファイルは146KBで、2019年10月1日に作成され、EFS-Webを介して電子的に提出されている。

【0004】

40

開示の分野

現在の開示は、原発性免疫不全症、シスチン症、及びウィルソン病に関する新生児スクリーニングを提供している。新生児スクリーニングでは、出生時にすでに日常的に収集されている乾燥血液スポットからこれらの障害を検出し得る。これらの障害の早期発見では、一旦症状が現れれば、それぞれが致命的となる可能性があるため、患者の転帰が大幅に改善される。

【背景技術】

【0005】

本開示の背景

利用可能な効果的な治療を伴う多くの疾患が存在する。しかし、これらの病気の多くで

50

は、一旦、症状が現れると、その疾患は既に致命的であるか、不可逆的な損傷をもたらしている。このような疾患の例としては、原発性免疫不全症（PIDD）、シスチン症、及びウィルソン病（WD）が挙げられる。

【0006】

PIDDとは、免疫系の欠如、障害、または機能不全を特徴とする、生命を脅かす遺伝性または遺伝性先天性疾患の群である。PIDDの例としては、重症複合免疫不全症（SCID）、ウイスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、及びX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）が挙げられる。

【0007】

SCIDとは、T細胞及びB細胞などの感染と戦う免疫細胞の発達及び機能に關与する異なる遺伝子の突然変異によって引き起こされるまれな障害の群である。SCID患者は通常、人生の早い段階で重度の細菌、ウイルス、または真菌感染症に冒されており、肺の瘢痕、慢性下痢、及び成長障害に苦しんでいることが多い。乳児が造血幹細胞の移植、遺伝子治療、または酵素療法などの免疫回復治療を受けない限り、この状態は致命的であり、通常は生後1～2年以内である。

【0008】

WASとは、主に男性に影響を与える免疫不全であり、血小板の数及びサイズの減少に起因する、血小板を形成する能力の低下を特徴とする。この血小板の異常は、通常、誕生から存在し、あざができやすいこと、及び軽度の外傷に続いて出血が長引く症状発現にもつながり、これは、場合によっては生命を脅かす。WASの個体は、感染症、自己免疫障害、及び特定の種類のがんを発症するリスクも高くなる。WAS患者では、免疫グロブリン注入及び抗生物質を使用して感染を予防し得、重症の場合は、幹細胞移植が治癒をもたらし得る。別の代替治療法として遺伝子治療も検討されている。

【0009】

XLAは、主に男性にも影響を与える遺伝性の免疫不全症である。XLAでは、身体は、細菌、ウイルス、その他の異物から防御するために必要な抗体を生成し得る。XLAの子供は、出生前に取得した母体の抗体によって保護されているため、通常、生後1～2か月は健康である。しかし、この時間の後、母体の抗体は体から排除され、罹患した子供は臓器の損傷につながる感染症を再発する。一旦その疾患が検出されれば、免疫グロブリン注入によって免疫系を強化するための標準的な治療法を提供し、抗生物質を投与して細菌感染と戦うことが可能になる。ただし、診断が下されるまでに、臓器の損傷がすでに発生している場合もある。

【0010】

シスチン症は、アミノ酸シスチンが細胞に入るが、シスチノシンンと呼ばれるシスチン特異的輸送体の欠陥に起因して出ることができないまれな代謝障害である。シスチンの輸送に欠陥があるせいで、細胞は細胞内の細胞小器官であるリソソームの結晶にシスチンを蓄積し、早期の細胞死を引き起す。シスチン症は、腎臓、肝臓、目、筋肉、及び脳などの体内の臓器をゆっくりと破壊する。幼児期のシスチン症の子供は、出生時には正常に見えるが、生後9～10か月までに、過度の喉の渇き及び排尿、ならびに成長障害などの症状が現れる。システアミンは、細胞からシスチンを除去することにより、シスチン症の進行を遅らせる処置である。ただし、システアミン治療を病気の進行の十分に早い段階で開始しない場合は、通常、腎移植が必要である。

【0011】

WDは、銅が肝臓、腎臓、及び脳などの重要な臓器に蓄積する銅輸送障害である。WDの進行は遅く、臨床症状の範囲が広いので、WDの診断は困難である。したがって、処置が利用可能であるという事実にもかかわらず、多くの患者は、診断時に依然として不可逆的な多臓器損傷を示している。

【0012】

臨床症状が出現する前に診断を行うことができれば、上記の疾患のそれぞれの処置は有意に強化されるであろう。新生児スクリーニング（NBS）は、米国で毎年生まれる40

10

20

30

40

50

0万人の乳児を対象とした標準的な公的予防必須スクリーニング検査である。NBSでは通常、生後24～48時間に血液検査が行われる。スクリーニングでは、濾紙に付着した新生児のかかとからの数滴の血液を使用する。乾燥血液スポット（DBS）を含む紙は、検査が行われるまで保管してもよい。

【0013】

NBS評価を実施するために、DBSから乾燥血液のパンチを採取し、臨床検査を実施して、出生時には明らかではないが、後年の深刻な健康問題の原因となる障害を示す血液内の特定の物質（マーカーまたはバイオマーカーと呼ばれる）の有無を検出する。スクリーニングされる障害は状態ごとに異なるが、ほとんどの状態では、フェニルケトン尿症、原発性先天性甲状腺機能低下症、嚢胞性線維症、及び鎌状赤血球症がスクリーニングされる。NBSは、患者の転帰を改善し、罹患した個体の長期的な障害を回避すると同時に、医療費を削減するのに非常に効果的であることが証明されている。

10

【0014】

SCIDは最近NBSパネルに追加された。ただし、SCIDの現在の分子検査では、晩発性及び遅発性のアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症、ZAP70欠損症、及びMHCクラスII欠損症などのSCID様障害のある全ての患者を確実に特定することはできない。残念ながら、他の生命を脅かすが治療可能な「非SCID」免疫不全症のほとんどについては、現在、広範囲にわたる費用効果の高い利用可能なスクリーニング方法はない。

20

【0015】

スクリーニングするのに有益な多くの障害があるという1つの理由は、利用可能な検査が不足しているために、臨床検査では障害に関連するマーカーを確実に測定できなかったということである。これができない理由の1つは、この障害がマーカーの欠如または非常に低いレベルのマーカーに関連していることである。このシナリオでは、臨床的に関連する結果を隠す可能性のある、多くの検査技術に関連する「バックグラウンドノイズ」に起因して、マーカーの欠如を確実に検出することが難しい場合がある。

【0016】

選択された反応モニタリング質量分析（immuno-SRM）と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮は、少量のマーカーの正確な定量を可能にする方法である。immuno-SRMの利用には、一般的に次のステップが含まれる：（i）障害の有無を示すマーカーの選択；（ii）マーカーが存在する場合、マーカーを含む生物学的試料を酵素で処理して、生物学的試料中の全てのタンパク質をペプチドと呼ばれるより小さなフラグメントに消化すること；（iii）選択したマーカーに由来するペプチドの濃縮、ならびに（iv）質量分析計での目的の濃縮ペプチドの分析及び定量化。

30

【0017】

最近、Jungら（J. Proteome Res. 2017；16：862－871）は、DBS由来のWDに関連するタンパク質マーカーATP7Bを定量化するためのimmuno-SRMの使用について説明した。これは、immuno-SRMを使用して、保存されたDBSから少量のマーカーを確実に検出できることを示した最初の実証であり、このアプローチを使用して、より幅広い障害パネルをスクリーニングする可能性が開かれた。

40

【0018】

Jung及び同僚は、immuno-SRMアッセイでDBSを使用して、WDに罹患した個体と罹患していない個体を区別することの実現可能性を実証したが、そのようなアッセイの多くの態様は、診断される障害、各障害で利用可能なバイオマーカー、目的のペプチドを濃縮し得る分子実体を開発する能力、及び質量分析計での目的の各ペプチドの挙動に依存する。臨床症状が出現する前にDBSを使用してNBSパネルの障害を確実に検出し得るアッセイを実現するには、これら全ての態様及びその他の態様を慎重に検討し、実験する必要がある。

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0019】

【文献】 Jungら (J. Proteome Res. 2017; 16: 862-871)

【発明の概要】

【0020】

本開示の要旨

現在の開示は、重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA)、シスチン症、及びウィルソン病 (WD) について新生児をスクリーニングするために使用され得る多重化アッセイの開発について説明している。このアッセイは、壊滅的でしばしば致命的な臨床症状が現れる前にこれらの障害を確実に診断することにより、影響を受けた個体の転帰を大幅に改善し得る。アッセイは、既存の新生児スクリーニング (NBS) 手順の一部としてすでに慣用的に収集されている乾燥血液スポット (DBS) を使用して、これらの障害に関連するマーカーの有無を検出し得る。

10

【0021】

本開示は、選択された反応モニタリング質量分析 (immuno-SRM) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮を使用して確実に検出及び定量化され得る、各障害に関連するペプチドを記載している。本開示はまた、ペプチドを濃縮するために使用され得る高親和性抗体、及びアッセイのスループットを増大させるためにペプチドをタグ付けする方法を提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1-1】重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA)、シスチン症、及びウィルソン病 (WD) を診断するために、選択された反応モニタリング質量分析 (immuno-SRM-MS) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に使用されるタンパク質標的及びペプチド配列。総質量、親イオン質量、及び娘イオン質量も示される。++は、二重に荷電された親イオンを示す。娘イオンのイオンタイプは括弧内にある。*先頭のKアミノ酸残基を有する不規則な末端配列を検出する場合の総質量及び親イオン質量。

【図1-2】重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA)、シスチン症、及びウィルソン病 (WD) を診断するために、選択された反応モニタリング質量分析 (immuno-SRM-MS) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に使用されるタンパク質標的及びペプチド配列。総質量、親イオン質量、及び娘イオン質量も示される。++は、二重に荷電された親イオンを示す。娘イオンのイオンタイプは括弧内にある。*先頭のKアミノ酸残基を有する不規則な末端配列を検出する場合の総質量及び親イオン質量。

30

【図1-3】重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA)、シスチン症、及びウィルソン病 (WD) を診断するために、選択された反応モニタリング質量分析 (immuno-SRM-MS) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に使用されるタンパク質標的及びペプチド配列。総質量、親イオン質量、及び娘イオン質量も示される。++は、二重に荷電された親イオンを示す。娘イオンのイオンタイプは括弧内にある。*先頭のKアミノ酸残基を有する不規則な末端配列を検出する場合の総質量及び親イオン質量。

40

【図1-4】重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA)、シスチン症、及びウィルソン病 (WD) を診断するために、選択された反応モニタリング質量分析 (immuno-SRM-MS) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に使用されるタンパク質標的及びペプチド配列。総質量、親イオン質量、及び娘イオン質量も示される。++は、二重に荷電された親イオンを示す。娘イオンのイオンタイプは括弧内にある。*先頭のKアミノ酸残基を有する不規則な末端配列を検出する場合の総質量及び親イオン質量。

50

【図1-5】重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、X連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）、シスチン症、及びウィルソン病（WD）を診断するために、選択された反応モニタリング質量分析（immuno-SRM-MS）と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に使用されるタンパク質標的及びペプチド配列。総質量、親イオン質量、及び娘イオン質量も示される。⁺⁺は、二重に荷電された親イオンを示す。娘イオンのイオンタイプは括弧内にある。^{*}先頭のKアミノ酸残基を有する不規則な末端配列を検出する場合の総質量及び親イオン質量。

【図1-6】重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、X連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）、シスチン症、及びウィルソン病（WD）を診断するために、選択された反応モニタリング質量分析（immuno-SRM-MS）と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に使用されるタンパク質標的及びペプチド配列。総質量、親イオン質量、及び娘イオン質量も示される。⁺⁺は、二重に荷電された親イオンを示す。娘イオンのイオンタイプは括弧内にある。^{*}先頭のKアミノ酸残基を有する不規則な末端配列を検出する場合の総質量及び親イオン質量。

【図2A】図2A～図2E。マルチプレックス免疫多重反応モニタリング（MRM）アッセイによって測定されたペプチドの応答曲線。1回の質量分析（MS）実施で複数の親イオンをモニタリングする場合、このタイプの分析は、多重反応モニタリング（MRM）と呼ばれる。MRM分析を使用すると、1回の質量分析実施で複数のタンパク質及びタンパク質の複数の領域（シグネチャーペプチド）をモニタリングし得る。応答曲線は、乾燥血液スポット（DBS）から抽出された消化タンパク質のバックグラウンドマトリックスで測定された、重いペプチド濃度の関数としての重：軽のピーク面積比をプロットする。この曲線により、アッセイの線形範囲及び感度を決定し得る。各データポイントは、灰色のボックスとしてプロットされ、線形回帰は線としてプロットされる。回帰適合パラメーターは、各プロットの隅に報告される。各プロットの重み付けは $1/x$ である。（図2A）BTk 407；（図2B）BTk 545；（図2C）CD3ε 197；（図2D）WASP 274；（図2E）WASP 289。

【図2B】図2A～図2E。マルチプレックス免疫多重反応モニタリング（MRM）アッセイによって測定されたペプチドの応答曲線。1回の質量分析（MS）実施で複数の親イオンをモニタリングする場合、このタイプの分析は、多重反応モニタリング（MRM）と呼ばれる。MRM分析を使用すると、1回の質量分析実施で複数のタンパク質及びタンパク質の複数の領域（シグネチャーペプチド）をモニタリングし得る。応答曲線は、乾燥血液スポット（DBS）から抽出された消化タンパク質のバックグラウンドマトリックスで測定された、重いペプチド濃度の関数としての重：軽のピーク面積比をプロットする。この曲線により、アッセイの線形範囲及び感度を決定し得る。各データポイントは、灰色のボックスとしてプロットされ、線形回帰は線としてプロットされる。回帰適合パラメーターは、各プロットの隅に報告される。各プロットの重み付けは $1/x$ である。（図2A）BTk 407；（図2B）BTk 545；（図2C）CD3ε 197；（図2D）WASP 274；（図2E）WASP 289。

【図2C】図2A～図2E。マルチプレックス免疫多重反応モニタリング（MRM）アッセイによって測定されたペプチドの応答曲線。1回の質量分析（MS）実施で複数の親イオンをモニタリングする場合、このタイプの分析は、多重反応モニタリング（MRM）と呼ばれる。MRM分析を使用すると、1回の質量分析実施で複数のタンパク質及びタンパク質の複数の領域（シグネチャーペプチド）をモニタリングし得る。応答曲線は、乾燥血液スポット（DBS）から抽出された消化タンパク質のバックグラウンドマトリックスで測定された、重いペプチド濃度の関数としての重：軽のピーク面積比をプロットする。この曲線により、アッセイの線形範囲及び感度を決定し得る。各データポイントは、灰色のボックスとしてプロットされ、線形回帰は線としてプロットされる。回帰適合パラメーターは、各プロットの隅に報告される。各プロットの重み付けは $1/x$ である。（図2A）BTk 407；（図2B）BTk 545；（図2C）CD3ε 197；（図2D）WASP 274；（図2E）WASP 289。

【図2D】図2A～図2E。マルチプレックス免疫多重反応モニタリング（MRM）アッセイによって測定されたペプチドの応答曲線。1回の質量分析（MS）実施で複数の親イオンをモニタリングする場合、このタイプの分析は、多重反応モニタリング（MRM）と呼ばれる。MRM分析を使用すると、1回の質量分析実施で複数のタンパク質及びタンパク質の複数の領域（シグネチャーペプチド）をモニタリングし得る。応答曲線は、乾燥血液スポット（DBS）から抽出された消化タンパク質のバックグラウンドマトリックスで測定された、重いペプチド濃度の関数としての重：軽のピーク面積比をプロットする。この曲線により、アッセイの線形範囲及び感度を決定し得る。各データポイントは、灰色のボックスとしてプロットされ、線形回帰は線としてプロットされる。回帰適合パラメーターは、各プロットの隅に報告される。各プロットの重み付けは $1/x$ である。（図2A）BTK 407；（図2B）BTK 545；（図2C）CD3ε 197；（図2D）WASp 274；（図2E）WASp 289。

10

【図2E】図2A～図2E。マルチプレックス免疫多重反応モニタリング（MRM）アッセイによって測定されたペプチドの応答曲線。1回の質量分析（MS）実施で複数の親イオンをモニタリングする場合、このタイプの分析は、多重反応モニタリング（MRM）と呼ばれる。MRM分析を使用すると、1回の質量分析実施で複数のタンパク質及びタンパク質の複数の領域（シグネチャーペプチド）をモニタリングし得る。応答曲線は、乾燥血液スポット（DBS）から抽出された消化タンパク質のバックグラウンドマトリックスで測定された、重いペプチド濃度の関数としての重：軽のピーク面積比をプロットする。この曲線により、アッセイの線形範囲及び感度を決定し得る。各データポイントは、灰色のボックスとしてプロットされ、線形回帰は線としてプロットされる。回帰適合パラメーターは、各プロットの隅に報告される。各プロットの重み付けは $1/x$ である。（図2A）BTK 407；（図2B）BTK 545；（図2C）CD3ε 197；（図2D）WASp 274；（図2E）WASp 289。

20

【図3A】図3A～図3E。内部標準（左パネル）及び内因性（右パネル）シグネチャーペプチドのMRMトレース：（図3A）CD3ε 197；（図3B）BTK 407；（図3C）BTK 545；（図3D）WASp 274；（図3E）WASp 289。

【図3B】図3A～図3E。内部標準（左パネル）及び内因性（右パネル）シグネチャーペプチドのMRMトレース：（図3A）CD3ε 197；（図3B）BTK 407；（図3C）BTK 545；（図3D）WASp 274；（図3E）WASp 289。

30

【図3C】図3A～図3E。内部標準（左パネル）及び内因性（右パネル）シグネチャーペプチドのMRMトレース：（図3A）CD3ε 197；（図3B）BTK 407；（図3C）BTK 545；（図3D）WASp 274；（図3E）WASp 289。

【図3D】図3A～図3E。内部標準（左パネル）及び内因性（右パネル）シグネチャーペプチドのMRMトレース：（図3A）CD3ε 197；（図3B）BTK 407；（図3C）BTK 545；（図3D）WASp 274；（図3E）WASp 289。

【図3E】図3A～図3E。内部標準（左パネル）及び内因性（右パネル）シグネチャーペプチドのMRMトレース：（図3A）CD3ε 197；（図3B）BTK 407；（図3C）BTK 545；（図3D）WASp 274；（図3E）WASp 289。

【図4A】図4A～図4D。測定されたPIDDPペプチド濃度の実験室間相関。（図4A）WASp 274；（図4B）CD3ε 197；（図4C）BTK 407；（図4D）ATP7B 1056。

40

【図4B】図4A～図4D。測定されたPIDDPペプチド濃度の実験室間相関。（図4A）WASp 274；（図4B）CD3ε 197；（図4C）BTK 407；（図4D）ATP7B 1056。

【図4C】図4A～図4D。測定されたPIDDPペプチド濃度の実験室間相関。（図4A）WASp 274；（図4B）CD3ε 197；（図4C）BTK 407；（図4D）ATP7B 1056。

【図4D】図4A～図4D。測定されたPIDDPペプチド濃度の実験室間相関。（図4A）WASp 274；（図4B）CD3ε 197；（図4C）BTK 407；（図4D）ATP7B 1056。

50

) ATP7B 1056。

【図5】WASp 289の実験室間分析検証。

【図6A】図6A～図6E。患者間のシグネチャーペプチドレベルの相違 (Pt)。(図6A) BTK 545；(図6B) BTK 407；(図6C) CD3ε 197；(図6D) WASp 274；(図6E) WASp 289 (SCID: n=3、WAS: n=11、BTK: n=26) 及び通常の対照 (NC、n=40)。*** $p < 0.0001$ 、* $p < 0.05$ 。

【図6B】図6A～図6E。患者間のシグネチャーペプチドレベルの相違 (Pt)。(図6A) BTK 545；(図6B) BTK 407；(図6C) CD3ε 197；(図6D) WASp 274；(図6E) WASp 289 (SCID: n=3、WAS: n=11、BTK: n=26) 及び通常の対照 (NC、n=40)。*** $p < 0.0001$ 、* $p < 0.05$ 。

【図6C】図6A～図6E。患者間のシグネチャーペプチドレベルの相違 (Pt)。(図6A) BTK 545；(図6B) BTK 407；(図6C) CD3ε 197；(図6D) WASp 274；(図6E) WASp 289 (SCID: n=3、WAS: n=11、BTK: n=26) 及び通常の対照 (NC、n=40)。*** $p < 0.0001$ 、* $p < 0.05$ 。

【図6D】図6A～図6E。患者間のシグネチャーペプチドレベルの相違 (Pt)。(図6A) BTK 545；(図6B) BTK 407；(図6C) CD3ε 197；(図6D) WASp 274；(図6E) WASp 289 (SCID: n=3、WAS: n=11、BTK: n=26) 及び通常の対照 (NC、n=40)。*** $p < 0.0001$ 、* $p < 0.05$ 。

【図6E】図6A～図6E。患者間のシグネチャーペプチドレベルの相違 (Pt)。(図6A) BTK 545；(図6B) BTK 407；(図6C) CD3ε 197；(図6D) WASp 274；(図6E) WASp 289 (SCID: n=3、WAS: n=11、BTK: n=26) 及び通常の対照 (NC、n=40)。*** $p < 0.0001$ 、* $p < 0.05$ 。

【図7-1】ATP7B 1056シグネチャーペプチド濃度。

【図7-2】ATP7B 1056シグネチャーペプチド濃度。

【図7-3】ATP7B 1056シグネチャーペプチド濃度。

【図8-1】盲検コホート研究由来の正常対照におけるシグネチャーペプチドの定量化。

【図8-2】盲検コホート研究由来の正常対照におけるシグネチャーペプチドの定量化。

【図9-1】盲検化された患者コホート研究におけるシグネチャーペプチドの濃度。

【図9-2】盲検化された患者コホート研究におけるシグネチャーペプチドの濃度。

【図9-3】盲検化された患者コホート研究におけるシグネチャーペプチドの濃度。

【図10A】PIDDのimmuno-SRMの診断性能を示す受信者動作特性 (ROC) プロット。(図10A) BTK 407、BTK 545、CD3ε 197、WASp 274、及びWASp 289のROCプロット。ますます厳しくなるカットオフ値について、真陽性率及び偽陽性率をプロットしている。同一性のラインは、患者と対照を区別できない試験を示す。

【図10B】PIDDのimmuno-SRMの診断性能を示す受信者動作特性 (ROC) プロット。(図10B) 図10Aに示されるペプチドの曲線下面積 (AUC) 値及びp値。

【図11-1】ワシントン州の新生児スクリーニング研究所から入手したDBSのシグネチャーペプチドレベル。

【図11-2】ワシントン州の新生児スクリーニング研究所から入手したDBSのシグネチャーペプチドレベル。

【図12-1】盲検コホート研究におけるATP7Bペプチド及び患者診断に対するシグネチャーペプチドの比率。

【図12-2】盲検コホート研究におけるATP7Bペプチド及び患者診断に対するシグ

10

20

30

40

50

ネチャーペプチドの比率。

【図13】患者及び正常対照試料中のCTNS及びSHPKタンパク質の濃度。黒で概説された試料は、突然変異状態を確認したが、灰色で概説された試料は57kbの欠失についてホモ接合であると予測される。試料CTNS00001-CTNS00013は、盲検化されており、予測される遺伝子型はimmuno-SRMによって証明されるタンパク質レベルに基づいている。

【図14】CTNS 115のマイクロフローイオンキー検出法及び新しいナノフロー法の両方を使用して達成されたシグナル対ノイズ(S/N)比の比較。ナノリットル/分の流量は、CTNS 115標的ペプチドによって生成されるシグナルをブーストする。

【図15】DBSのCTNS 115及びSHPK 363濃度を測定し、immuno-SRMによって遺伝子型を予測した。ペプチドのシグナル対ノイズ比が10未満の場合、ペプチドは検出されなかった(N.D.)と見なされた。*は、現時点で未知の変異を示している。

【図16】図16A～図16D。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を使用した、WASp 274(図16B及び16D)及びBTk 407(図16A及び16C)の両方のペプチド捕捉時に生成された内部標準ペプチドピーク面積。ピーク面積は、ブランク対照試料のみ(すなわち、患者の血液なし、図16C、16D)、及び患者とブランク対照試料の両方の集計セット(図16A及び16B)で測定された。

【図17】シスチン症のスクリーニングにおける患者及び正常対照(NC)試料のシグネチャーCTNS 115及びSHPK 363ペプチドレベル。この研究は、図13及び表8に示される研究の拡張である。

【図18A】図18A～図18C。16人のWD患者の研究(NC:正常対照;Pt:ウィルソン病患者)。(図18A)NC及びWD患者におけるATP7B 1056濃度。第1の列の50NCは、実験室で基準範囲を設定するために個別に実行した。中央の列の3つのNCは、品質管理として16人のWD患者全員と一緒に実行した。(図18B)NC及びWD患者におけるATP7B 214濃度。(図18C)NC及びWD患者におけるATP7B 887濃度。

【図18B】図18A～図18C。16人のWD患者の研究(NC:正常対照;Pt:ウィルソン病患者)。(図18A)NC及びWD患者におけるATP7B 1056濃度。第1の列の50NCは、実験室で基準範囲を設定するために個別に実行した。中央の列の3つのNCは、品質管理として16人のWD患者全員と一緒に実行した。(図18B)NC及びWD患者におけるATP7B 214濃度。(図18C)NC及びWD患者におけるATP7B 887濃度。

【図18C】図18A～図18C。16人のWD患者の研究(NC:正常対照;Pt:ウィルソン病患者)。(図18A)NC及びWD患者におけるATP7B 1056濃度。第1の列の50NCは、実験室で基準範囲を設定するために個別に実行した。中央の列の3つのNCは、品質管理として16人のWD患者全員と一緒に実行した。(図18B)NC及びWD患者におけるATP7B 214濃度。(図18C)NC及びWD患者におけるATP7B 887濃度。

【図19-1】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-2】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-3】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-4】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-5】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-6】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-7】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-8】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-9】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-10】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

【図19-11】本開示を裏付ける配列(配列番号22～76及び78～141)。

10

20

30

40

50

【図19-12】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-13】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-14】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-15】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-16】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-17】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-18】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-19】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-20】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-21】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-22】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-23】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-24】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-25】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【図19-26】本開示を裏付ける配列（配列番号22～76及び78～141）。
【発明を実施するための形態】

10

【0023】

詳細な説明

利用可能な効果的な処置を伴う多くの疾患が存在する。しかし、これらの疾患の多くでは、一旦症状が出現すれば、その疾患はすでに致命的であるか、または不可逆的な損傷をもたらしている。このような疾患の例としては、原発性免疫不全症（PIDD）、シスチン症、及びウィルソン病（WD）が挙げられる。

20

【0024】

PIDDは、以下を含む、免疫応答の欠如または障害を特徴とする多様な先天性疾患のコレクションである：常染色体劣性CD3ε関連の重症複合免疫不全症（SCID、OMIM#615615）；X連鎖ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS、OMIM#301000）；及びX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA、OMIM#300755）。遺伝的及び臨床的に不均一であるが、これらの障害は、早期に検出及び治療されない限り、致命的な感染症につながる。PIDDの早期発見は命を救うことができるが、残念ながら、ほとんどの罹患した乳児は、深刻な感染症を発症した後にのみ診断される。

30

【0025】

SCIDは、T細胞及びB細胞などの感染と戦う免疫細胞の発達及び機能に関与する異なる遺伝子の突然変異によって引き起こされる一群のまれな障害である。1ダースを超える遺伝子がSCIDに関係している。ほとんどの場合、SCIDは常染色体劣性パターンで遺伝し、特定の遺伝子の両方のコピー（1つは母親から、もう1つは父親から継承）に欠陥が含まれている。常染色体劣性SCIDの最もよく知られている形態は、乳児がT細胞の生存に必要なADA酵素を欠いている、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症によって引き起こされる。X染色体上の遺伝子の突然変異によって引き起こされるX連鎖SCIDは、主に男性に罹患する。このタイプのSCIDの少年は、異常に成長及び発達する白血球を有する。結果として、それらはT細胞とナチュラルキラー細胞の数が少なく、それらのB細胞は機能しない。SCID患者は通常、人生の早い段階で重度の細菌、ウイルス、または真菌感染症に冒されており、肺の瘢痕、慢性下痢、及び成長障害に苦しんでいる場合が多い。乳児が造血幹細胞の移植、遺伝子治療、または酵素療法などの免疫回復治療を受けない限り、この状態は致命的であり、通常は生後1～2年以内である。

40

【0026】

WASは、血小板の数及びサイズの減少を特徴とする免疫不全症である。WASは、WASPタンパク質（WASP）を産生するWAS遺伝子の変異によって引き起こされ、X連鎖性血小板減少症及び重度の先天性好中球減少症という2つの他の障害を伴う疾患スペクトルの一部と見なされる場合が多い。これらの状態には、重複する兆候及び症状があり、同じ遺伝的原因がある。

50

【0027】

WASに関連する血小板の数及びサイズの減少は、血餅を形成する能力の低下をもたらす。これにより、あざができやすく、軽度の外傷に続いて出血が長引く症状発現につながり、これは、場合によっては生命を脅かすものである。WASの個体はまた、感染症、自己免疫障害（例えば、湿疹）、及び特定のがん（リンパ腫など）に対する感受性も高くなる。一旦、診断されると、WASの処置が利用可能になる。例示的な処置としては、免疫グロブリン注入、抗生物質、及び幹細胞移植が挙げられる。WASの処置選択肢として遺伝子治療も検討されている。

【0028】

XLAは、B細胞が正常に発達するのを妨げる遺伝性免疫不全症である。XLAは、ブルトン型チロシンキナーゼ（BT K）と呼ばれる遺伝子の変異によって引き起こされる。XLAでは、細菌、ウイルス、その外来物質から防御するために必要な抗体を生成できなくなる。XLAの子供は、出生前に取得した母体の抗体によって保護されているため、通常、生後1～2か月は健康である。しかし、この時間の後、母体の抗体は体から排除され、罹患した子供は再発性感染症を発症する。再発性感染症は臓器の損傷につながる場合がある。一旦、診断されれば、XLAを処置するために抗体注入と抗生物質の形態での処置が利用可能である。

【0029】

シスチン症は、アミノ酸シスチンが細胞に入るが、シスチノシンと呼ばれるシスチン特異的輸送体の欠陥に起因して出ることができない、まれな代謝障害である。シスチンの輸送に欠陥があるので、細胞は細胞内の細胞小器官であるリソソームの結晶にシスチンを蓄積し、早期の細胞死を引き起す。シスチノシン（CTNS）遺伝子または領域では90を超える変異が報告されている。西洋の集団におけるシスチン症の異形の遺伝子の約半分は、CTNS遺伝子の一部から隣接するSHPK及びTRPV1（カプサイシン受容体）遺伝子の最初の部分を通じて広がる大きな染色体欠失によって引き起こされる。シスチン症は、腎臓、肝臓、目、筋肉、及び脳など、身体の臓器をゆっくりと破壊する。乳児のシスチン症の子供は、出生時には正常に見えるが、生後9～10か月までに、過度の喉の渇き及び排尿、ならびに成長障害などの症状が現れる。早期に診断されれば、細胞からシスチンを除去することでシスチン症の進行を遅らせるシスチン枯渇剤であるシステアミンによる処置が可能である。十分に早期に診断されない場合、腎移植が必要とされる場合が多い。

【0030】

ウィルソン病（WD）は、過剰な銅が適切に排除されず、肝臓、腎臓、及び脳などの重要な臓器に蓄積する、緩徐で進行性の銅輸送障害である。WDは、ATP7B遺伝子の遺伝的欠陥によって引き起こされる。WDは、早期に診断及び治療されない場合、不可逆的な神経障害及び肝硬変を引き起す。残念ながら、WDは進行が遅く、症状の臨床的範囲が広いと、依然として困難である。したがって、多くの患者は、診断時に不可逆的で、時には致命的な多臓器障害を依然として示している。十分に早期に診断された場合、利用可能な処置としては、D-ペニシラミン、トリエンチン、亜鉛塩が挙げられる。

【0031】

臨床症状が出現する前に診断を行うことができれば、上記の疾患のそれぞれの処置は有意に増強されるであろう。新生児スクリーニング（NBS）は、米国で毎年生まれる400万人の乳児を対象とした標準的な公的予防必須スクリーニング検査である。NBSでは通常、生後24～48時間に血液検査を行う。スクリーニングでは、濾紙に付着した新生児のかかと由来の数滴の血液を使用する。乾燥血液スポット（DBS）を含む紙は、検査が行われるまで保管してもよい。

【0032】

NBS評価を実施するために、乾燥血液のパンチをDBSから採取して、出生時に明らかではないが後年、深刻な健康問題を引き起す障害を示す、血液内の特定の物質（マーカーまたはバイオマーカーと呼ばれる）の有無を検出するために臨床検査を行う。スクリーニングされる障害は状態ごとに異なるが、ほとんどの状態で、フェニルケトン尿症、原発

10

20

30

40

50

性先天性甲状腺機能低下症、嚢胞性線維症、及び鎌状赤血球症をスクリーニングする。NBSは、患者の転帰を改善し、罹患した個体の長期的な障害を回避すると同時に、医療費を削減するのに非常に効果的であることが証明されている。

【0033】

濾紙上の乾燥血液スポット（DBS）からのT細胞受容体切除サークル（TREC）分析及びカップ欠失エレメント組換えサークル（KREC）スクリーニングが、SCID及びいくつかのX連鎖または常染色体劣性無ガンマグロブリン血症について最近導入された。ただし、他のPIDDのNBS法は存在しない。

【0034】

タンデム質量分析（MS/MS）は、1990年代に最初にNBSに適用され、出生時に収集されたDBS試料からの複数の代謝物、したがっていくつかの疾患の迅速なスクリーニングへの道を開いた。Chace J Mass Spectrom. Wiley-Blackwell; 2009; 44:163-170; Millington et al. J. Inherit. Metab. Dis. 1990; 13:321-324; Sweetman et al. Pediatrics. 2006; 117:S308-S314; Almannai et al. Curr. Opin. Pediatr. 2016; 28:694-699; Watson et al. Genet. Med. Nature Publishing Group; 2006. pp. 1S-252S; Chace et al. Clin. Chem. 1993; 39:66-71。トリプル四重極質量分析計で実行される選択された反応モニタリング質量分析（SRM-MS）により、特定のバイオマーカーの正確で高スループットの分析的に口バストな定量がさらに可能になった。そのため、現在、世界中の臨床NBS検査室での標準治療となっている。Chace DH J Mass Spectrom. Wiley-Blackwell; 2009; 44:163-170; Chace & Kalas. Clinical Biochemistry. 2005; 38:296-309. Dott et al. American Journal of Medical Genetics Part A. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2006; 140:837-842。

【0035】

MS/MSは、特定の酵素欠損を伴う様々な先天性代謝異常を検出するために、濃縮された上流代謝産物の測定に依存している。これによって、蓄積された代謝物が存在しないか、または現在検証されていない、PIDDなどの疾患への適用が除外される。このため、フローサイトメトリーまたはウエスタンブロッティングなどのタンパク質ベースのアッセイは、WAS及びその軽度の表現型であるX連鎖血小板減少症（XLT）などの疾患の第一選択の調査方法として使用されており、ほとんどの変異が存在しないかまたはタンパク質生成物を減少した。Qasim et al. Br. J. Haematol. 2001; 113:861-865; Jin et al. Blood. American Society of Hematology; 2004; 104:4010-4019。これらのアプローチでは、患者からのインタクトな血液試料または細胞が利用可能である必要があり、資源の乏しい地域からの患者の集団ベースのスクリーニングまたは検査が不可能になる。

【0036】

SRM-MSは、目的のタンパク質の化学量論的代理として、タンパク質分解的に生成されたシグネチャーペプチドを利用する。これは、次に、試料中のそのタンパク質を発現する特定の細胞型の数を推定するために使用され得る（すなわち、血中のCD3+T細胞の量を示すためのCD3εの定量化）。各シグネチャーペプチドに対するMSの高い特異性は、その質量、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分離時の保持時間、及び結果として生じる標的特異的フラグメンテーションパターンという3つの物理化学的特性によってもたらされる。Kennedy et al. Nat. Methods. 2014; 11:149-155。これらの進歩にもかかわらず、100~1000 ng タンパク質／

10

20

30

40

50

mLの範囲の定量限界があり、血液または血漿などの複雑なマトリックスを使用すると、SRM-MSベースのアッセイによる少量の標的の正確な定量が不可能になる場合が多い。これにより、SCID、WAS、XLAなどの多くのPIDDへの適用が制限され、細胞内でのみ発現する標的タンパク質がなくなるか、またはそのレベルが低下する。de Saint Basile et al. J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation; 2004; 114: 1512-1517。

【0037】

安定同位体標準及び抗ペプチド抗体による捕捉 (Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies) (SISCAPA) と呼ばれる、SRM (immuno-SRM) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮は、SRM-MS分析の前に、抗ペプチド抗体を利用して複雑な生物学的試料から目的のペプチドを精製及び濃縮することにより、SRM-MSアッセイの感度を高める。Zhao et al. J Vis Exp. 2011; 53: 2812; Whiteaker et al. Mol. Cell Proteomics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2010; 9: 184-196; Whiteaker et al. Mol. Cell Proteomics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2012; 11: M111. 015347; Kuhn et al. Clin. Chem. 2009; 55: 1108-1117; Anderson et al. J Proteome Res. 2004; 3 (2): 235-244。この追加のペプチド濃縮ステップは、SRM-MSと組み合わせて、検出限界を1mLの血漿から低pgタンパク質/mLの範囲に下げ、これは、DBSなどの複雑なマトリックス中の非常に少量のタンパク質の正確な定量に適している。Whiteaker et al. Mol. Cell Proteomics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2010; 9: 184-196; Hoofnagle et al. Clin. Chem. 2008; 54: 1796-1804; Netzel et al. Clin. Chem. 2016; 62: 297-299; Razavi et al. Bioanalysis. Future Science Ltd London, UK; 2016; 8: 1597-1609。

【0038】

タンパク質分解的に消化されたヒト末梢血単核細胞 (PMBC) 溶解物中のCD3ε、WASp、及びBTKからシグネチャーペプチドを検出するLC-MS/MSの能力は、以前に実証されている。盲検の研究では、ペプチドレベルは正常な対照PMBCで定量化されたが、罹患した患者では疾患特異的な方法ではほとんど検出不能であった。Kerfoot et al. Proteomics Clin Appl. 2012; 6: 394-402。同じプロテオミクス法を適用して、ピリドキシン依存性発作の患者のDBSにおけるα-アミノアジピン酸セミアルデヒドアンチキチン (α-AASA) 及びピペリدين-6-カルボキシレート (P6C) のレベルの上昇を示し、NBSへのその適用の可能性を明らかにした。Jung et al. Mol. Genet. Metab. 2013; 110: 237-240。アッセイの感度と再現性を向上させるために、immuno-SRMプラットフォームを利用して、ウィルソン病 (WD) 患者のATP7Bタンパク質の代理ペプチドなどのDBS中の非常に少量のペプチドの定量を可能にした。その結果は、低ピコモル (pmol) 範囲のATP7Bペプチドを検出し、WD患者と罹患していない個体との間を再現性よく区別するimmuno-SRMの能力を示した。Jung et al. 2017, (上記)。

【0039】

罹患していない個体から特定の疾患に冒された個体を区別するためにimmuno-SRMアッセイにおいてDBSを使用することの実現可能性は確立されているが、アッセイ

の多くの態様は、診断される障害、各障害に利用可能なバイオマーカー、目的のペプチドを濃縮し得る分子実体を開発する能力、及び質量分析計での目的の各ペプチドの挙動に依存する。臨床症状が出現する前にDBSを使用してNBSパネルの障害を確実に検出できる信頼性の高いアッセイを実現するには、これら全ての態様及びその他の態様を慎重に検討及び実験する必要がある。

【0040】

本開示は、乾燥血液スポット（DBS）からSCID、WAS、XLA、シスチン症、及びWDを確実に診断するための多重immuno-SRM法を提供する。本明細書に開示される多重immuno-SRMアッセイは、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及びWDにおいて減少または欠如しているタンパク質のペプチドに対して生成された抗ペプチド抗体を利用し得る。

10

【0041】

本開示の以下の態様を、ここでより詳細に説明する：（I）DBSの収集及び処理；（II）SCID、WAS、XLA、シスチン症、及びウィルソン病のペプチドマーカー；（III）DBSにおけるタンパク質の酵素的消化；（IV）ペプチドマーカーを濃縮するための抗体；（V）ペプチドの濃縮戦略；（VI）液体クロマトグラフィー（LC）；（VII）質量分析（MS）；（VIII）キット；（IX）使用方法；（X）例示的な実施形態；ならびに（XI）実験例。

【0042】

（I）DBSの収集及び処理。特定の実施形態では、本開示の方法で使用される試料は、DBSである。特定の実施形態では、対象由来の全血は、血液を濾紙カード上に置き、血液を乾燥させることによって調製され得る。

20

【0043】

特定の実施形態では、対象由来の全血をACD（酸性クエン酸塩デキストロース）チューブに収集してもよく、DBSは、50～100 μ L（例えば、70 μ L）の血液／スポットを濾紙カード（例えば、Protein Saver（商標）903（登録商標）Card, Whatman Inc, Piscataway, NJ）上にピペティングすることによって調製し、室温で乾燥させてもよい。特定の実施形態では、血液を濾紙カード上で一晚乾燥させる。DBSは、例えば、使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで密封されたビニール袋に保管してもよい。特定の実施形態では、DBS丸ごとを本開示のimmuno-SRMアッセイで使用してもよい。特定の実施形態では、DBS由来の1つ以上の3mmのパunchを、本開示のimmuno-SRMアッセイで使用してもよい。

30

【0044】

（II）SCID、WAS、XLA、シスチン症、及びWDのためのペプチドマーカー。標的タンパク質由来の多くの理論的なタンパク質分解ペプチドがある。それらは、モノクローナル抗体産生の潜在的な候補となり得る。それにもかかわらず、MS／MSによってそれらの特徴をスクリーニングした後、最良の潜在的な候補ペプチドを選択した。最高の感度及び特異性を有するこれらのシグネチャーペプチドを選択して、対応するモノクローナル抗体を開発し、臨床試料を使用して検証した。特定の実施形態では、SRMアッセイの感度及び特異性を最大化するために、複数のペプチド及び抗体を多重分析に含めてもよい。

40

【0045】

典型的には、目的のタンパク質に固有であり、MS実験で一貫して観察される1つまたは2つのシグネチャープロテオティピックペプチドを、目的のタンパク質を化学量論的に表すために選択する。Mallik et al. Nat Biotechnol 2007；25：125-131。シグネチャーペプチドは、以前のMS実験での検出、MSで観察可能な可能性が最も高いペプチドを予測するための計算ツールの使用、またはその両方の組み合わせによって選択され得る。特定の実施形態では、中程度の疎水性を有する長さ8～22のアミノ酸のトリプシンペプチドを選択してもよい。極めて親水性及び極めて疎水性のペプチドは、HPLCでの保持時間の変動及び表面への損失に起因して、安定

50

性が低下する可能性がある。特定の実施形態では、メチオニン残基（酸化）、N末端グルタミン（環化）、アスパラギンに続くグリシンまたはプロリン（脱アミド化の傾向がある）、及び二塩基性末端（例えば、KK、KR、RR、RKなどの隣接するリジンまたはアルギニン残基は、消化効率の変動する可能性がある）は望ましくない場合がある。Whiteaker及びPaulovich Clin Lab Med. 2011; 31(3): 385-396。より短いペプチド及びプロリン残基を含むペプチドは、SRMのより良い標的となり得る。Lange et al. Molecular Systems Biology 2008; 4: 222。

【0046】

特定の実施形態では、ペプチドは、CD3ε、WASp、BTK、CTNS、SHPK及び／またはATP7Bの一部を含む。特定の実施形態では、ペプチドは、配列番号1〜21を含む。

【0047】

特定の実施形態では、本開示のペプチドとしては、以下が挙げられる：SCID用のCD3ε 197；WAS用のWASp 274；WAS用のWASp 289；XLA用のBTK 407；XLA用のBTK 545；シスチン症用のCTNS 115；シスチン症用のCTNS 120；シスチン症用のCTNS 194；シスチン症用のCTNS 360；シスチン症用のSHPK 44；シスチン症用のSHPK 363；シスチン症用のSHPK 388；WD用のATP7B 214；WD用のATP7B 325；WD用のATP7B 466；WD用のATP7B 589；WD用のATP7B 621；WD用ATP7B 887；WD用ATP7B 1056；及びWD用のATP7B 1061。特定の実施形態では、本開示の方法に有用なタンパク質分解的に生成されたシグネチャーペプチドとしては、図1のペプチド：CD3ε 197（DLYSGLNQR、配列番号1）；WASp 274（AGISEAQLTDAETSK、配列番号2）；WASp 289（LIYDFIEDQGGLAVR、配列番号3）；BTK 407（ELGTGQFGVVK、配列番号4）；BTK 545（YVLDD EYTSSVGS K、配列番号5）；CTNS 115（FLVIR、配列番号6）；CTNS 360（RPGYDQLN（配列番号7）及びKRPGYDQLN（配列番号8））；SHPK 363（DTHLTITPTVLGER、配列番号9）；ATP7B 325（VSLPDGAEGSGTDHR、配列番号10）；及びATP7B 1056（VLAVVGTAEEASSEHPLGVAVTK、配列番号11）が挙げられる。特定の実施形態では、本開示の方法に有用な追加のペプチドとしては、表1の以下が挙げられる。

【0048】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 本開示の追加の例示的なペプチド

ペプチド名	配列
CTNS 120-151 “CTNS 120”	SSAISIIINQVIGWIYFVAWSISFY PQVIMNWR (配列番号12)
CTNS 194-228 “CTNS 194”	YPNGVNPVNSNDVFFSLHAVVLTLLIIIVQC(CAM)C(CAM)LYER(配列番号13)
SHPK 44-58 “SHPK 44”	AEAAVESAVAGPQGR(配列番号14)
SHPK 388-400 “SHPK 388”	ISSSDL SLGHVTR(配列番号15)
ATP7B 214-226 “ATP7B 214”	VAPLSLGPIDIER(配列番号16)
ATP7B 466-477 “ATP7B 466”	LPANHAPDILAK(配列番号17)
ATP7B 589-603 “ATP7B 589”	TNGITYASVALATSK(配列番号18)
ATP7B 621-634 “ATP7B 621”	IIIEEIGFHASLAQR(配列番号19)
ATP7B 887-901 “ATP7B 887”	ATHVGNDTTLAQIVK(配列番号20)
ATP7B 1061-1077 “ATP7B 1061”	GTAEASSEHPLGVAVTK(配列番号21)

【0049】

(III) DBSにおけるタンパク質の酵素的消化。DBSのタンパク質を、タンパク質分解に供してペプチドを生成してもよく、これはLC-SRM-MSによる分析の前に免疫親和性精製によってさらに選択してもよい。タンパク質分解は、ペプシン、arg-Cプロテイナーゼ、asp-Nエンドペプチダーゼ、BNPS-スカトール、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、キモトリプシン、クロストリパイン(クロストリジオペプチダーゼB)、エンテロキナーゼ、Xa因子、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムB、lysC、プロリンエンドペプチダーゼ、プロテイナーゼK、ブドウ球菌ペプチダーゼI、サーモリシン、トロンビン及びトリプシンなどの部

位特異的エンドプロテアーゼを使用して達成され得る。部位を特異的に切断する化学物質も使用してもよい。酵素及び／または化学物質の組み合わせを使用して、望ましい分析物を得てもよい。

【0050】

特定の実施形態では、DBS中のタンパク質は、トリプシンでペプチドに消化してもよい。トリプシンは、アルギニン及びリジン残基のC末端を独占的に切断し、生成されたペプチドの質量がほとんどの質量分析計の検出能力（最大2000m/z）と適合していることと、理論的なトリプシン生成ペプチドのデータベースの生成に利用可能な効率的なアルゴリズムがあるという理由のため、ペプチドを生成するための好ましい選択となり得る。高い切断特異性、利用可能性、及びコストは、トリプシンの他の利点である。タンパク質をトリプシンで処理することによって形成されるペプチドは、トリプシンペプチドとして公知である。

【0051】

(IV) ペプチドマーカーを濃縮するための抗体。抗体は、天然であるか、または部分的もしくは完全に合成的に産生されたかにかかわらず、免疫グロブリン遺伝子（複数可）、またはそのフラグメントによって実質的にコードされるポリペプチドリガンドを含む。抗体は、エпитープ（例えば、抗原）に特異的に（または選択的に）結合して認識する。抗体は、免疫グロブリン結合ドメインと相同または大部分が相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を含み得る。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであってもよい。抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEなどの任意のヒトのクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ及びラムダ軽鎖定常領域遺伝子、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー重鎖定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。抗体の「Fc」部分は、1つ以上の重鎖定常領域ドメイン、CH1、CH2及びCH3を含むが、重鎖可変領域を含まない免疫グロブリン重鎖のその部分を指す。

【0052】

インタクトな抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重鎖（H）鎖及び2つの軽鎖（L）鎖を含み得る。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_HまたはV_Hと略される）及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域には、CH1、CH2、及びCH3という3つのドメインが含まれる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_LまたはV_Lと略される）及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域には、1つのドメインC_Lが含まれる。V_H及びV_L領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域（フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が点在する）にさらに細分化され得る。各V_H及びV_Lは、3つのCDR及び4つのFRで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置されている。重鎖及び軽鎖の可変領域には、抗原と相互作用する結合ドメインが含まれている。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第1の成分（C1q）を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【0053】

所定のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、以下によって記載されたものを含む、いくつかの周知のスキームのいずれかを使用して容易に決定され得る：Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (カバット (Kabat) ナンバリングスキーム) ; Al-Lazikani et al. (1997) J Mol Biol 273:927-948 (Chothiaナンバリングスキーム) ; MacCallum et al. (1996) J Mol Biol 262:732-745 (コンタクト (Contact) ナンバリングスキーム) ; Martin et al. (1989) Proc. Natl. Acad. S

10

20

30

40

50

c i . , 86 : 9268 - 9272 (AbMナンバリングスキーム) ; L e f r a n c M P e t a l . (2003) Dev Comp Immunol 27 (1) : 55 - 77 (IMGTナンバリングスキーム) ; ならびに H o n e g g e r 及び P l u c k t h u n (2001) J Mol Biol 309 (3) : 657 - 670 (「Aho」ナンバリングスキーム)。所定のCDRまたはFRの境界は、識別に使用されるスキームによって異なる場合がある。例えば、K a b a t スキームは構造アラインメントに基づいているが、C h o t h i a スキームは構造情報に基づいている。K a b a t スキームと C h o t h i a スキームの両方のナンバリングは、最も一般的な抗体領域の配列の長さに基づいており、挿入は「30a」などの挿入文字に対応し、一部の抗体では欠失が表示される。2つのスキームでは、特定の挿入及び欠失(「インデル」)を異なる位置に配置し、異なるナンバリングをする。接触スキームは、複雑な結晶構造の分析に基づいており、多くの点でC h o t h i a のナンバリングスキームと類似している。特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体CDR配列は、K a b a t ナンバリングによる。

【0054】

抗体フラグメントは、完全長未満である抗体の任意の誘導体または部分を含む。特定の実施形態では、抗体フラグメントは、結合パートナーとしての全長抗体の特異的結合能力の少なくともかなりの部分を保持している。抗体フラグメントの例としては、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b₂)一本鎖可変フラグメント(s c F v)、F v、d s F v ダイアボディ、及びF d フラグメント、ならびに／または本明細書に記載のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリンの任意の生物学的に有効なフラグメントが挙げられる。抗体または抗体フラグメントとしては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、及び線状抗体の全部または一部が挙げられる。

【0055】

一本鎖可変フラグメント(s c F v)は、短いリンカーペプチドに接続された免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域の融合タンパク質である。F v フラグメントには、抗体の単一のアームのV L ドメイン及びV H ドメインが含まれる。F v フラグメントの2つのドメイン、V L 及びV H は、別個の遺伝子によってコードされているが、それらは、例えば、組換え法を使用して、それらを単一のタンパク質鎖として作製することを可能にする合成リンカーによって結合されてもよく、ここでは、V L 領域とV H 領域が対になって、一価分子(一本鎖F v (s c F v))を形成する。F v 及びs c F v に関する追加情報については、例えば、B i r d , e t a l . , Science 242 (1988) 423 - 426 ; H u s t o n , e t a l . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879 - 5883 ; P l u e c k t h u n , in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York), (1994) 269 - 315 ; WO1993/16185 ; 米国特許第5, 571, 894号 ; 及び米国特許第5, 587, 458号を参照のこと。

【0056】

F a b フラグメントは、V L、V H、C L 及びC H1 ドメインを含む一価の抗体フラグメントである。F (a b')₂ フラグメントは、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのF a b フラグメントを含む2価フラグメントである。インビボ半減期が延長したF a b 及びF (a b')₂ フラグメントの考察に関しては、米国特許第5, 869, 046号を参照のこと。ダイアボディには、二価であってもよい2つのエピトープ結合部位が含まれる。例えば、欧州特許第0404097号 ; WO1993/01161 ; 及び H o l l i g e r , e t a l . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444 - 6448 を参照のこと。二重親和性再標的化抗体(Dual affinity retargeting antibodies) (DART (商標)) ; ダイアボディフォーマットに基づくが、追加の安定化のためのC末端ジスルフィドブリッジを特徴とする(Moore et al., Blood 117, 4542 - 51 (2

011))も使用してもよい。抗体フラグメントには単離されたCDRも含まれ得る。抗体フラグメントのレビューについては、Hudson, et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134を参照のこと。

【0057】

抗体フラグメントは、任意の手段によって産生され得る。例えば、抗体フラグメントは、インタクトな抗体の断片化によって酵素的もしくは化学的に生成されてもよいし、または部分的な抗体配列をコードする遺伝子から組換え的に生成されてもよい。あるいは、抗体フラグメントは、全体的または部分的に合成的に産生され得る。抗体フラグメントは、一本鎖抗体フラグメントを含んでもよい。別の実施形態では、このフラグメントは、例えば、ジスルフィド結合によって一緒に連結されている複数の鎖を含んでもよい。このフラグメントはまた、多分子複合体を含んでもよい。機能的抗体フラグメントは、典型的には少なくとも50アミノ酸を含み得、より典型的には少なくとも200アミノ酸を含む。

【0058】

特定の実施形態では、組換え免疫グロブリンを産生し得る。Cabilly、米国特許第4,816,567号、及びQueen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10033 (1989)を参照のこと。

【0059】

示されるように、特定の実施形態では、操作された抗体または抗原結合フラグメントの結合ドメインは、リンカーを介して結合され得る。リンカーは、操作された抗体の結合ドメインまたは抗原結合フラグメントの間の高次構造移動のための可塑性及び余地を提供し得るアミノ酸配列である。任意の適切なリンカーを使用してもよい。リンカーの例は、Chen et al., Adv Drug Deliv Rev. 2013 Oct 15; 65 (10): 1357-1369に見出され得る。リンカーは、標的への所望の機能ドメインの提示に応じて、可塑性であっても、固定であっても、または半固定であってもよい。一般的に使用される柔軟なリンカーとしては、GGSGGGSGSG (配列番号142)、GGSGGGSGSG (配列番号143)及びGGSGGGSG (配列番号144)などのGly-Serリンカーが挙げられる。追加の例としては以下が挙げられる：GGGGSGGGGS (配列番号145)；GGGGSGGGGS (配列番号146)；及びGGSGGS (配列番号147)。CH3単独またはCH2CH3配列などの1つ以上の抗体ヒンジ領域及び／または免疫グロブリン重鎖定常領域を含むリンカーもまた使用してもよい。

【0060】

いくつかの状況において、可塑性リンカーは、特定の使用に必要な結合ドメインの距離または配置を維持できない場合がある。これらの例では、固定または半固定のリンカーが役立つ場合がある。固定または半固定のリンカーの例としては、プロリンリッチリンカーが挙げられる。特定の実施形態では、プロリンリッチのリンカーは、偶然のみに基づいて予想されるよりも多くのプロリン残基を有するペプチド配列である。特定の実施形態では、プロリンリッチのリンカーは、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも48%、少なくとも50%、または少なくとも51%のプロリン残基を有するリンカーである。プロリンリッチのリンカーの特定の例としては、プロリンリッチな唾液タンパク質 (PRP) のフラグメントが挙げられる。

【0061】

抗体が様々な翻訳後修飾を受け得ることも当業者によって理解されるであろう。これらの修飾の種類及び程度は、抗体の発現に使用される宿主細胞株及び培養条件に依存する場合が多い。このような修飾としては、グリコシル化、メチオニン酸化、ジケトピペラジン形成、アスパラギン酸異性化、及びアスパラギン脱アミド化の変化を含み得る。

【0062】

モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を含み、すなわち、集団を含む個々の抗体は、モノクローナル抗体の産生中に生じ得る可能性のあるバリア

10

20

30

40

50

ント（そのようなバリエーションは一般的には少量で存在する）を除いて、同一であるか、及び／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられている。このタイプの抗体は、単一の抗体産生ハイブリドーマの娘細胞によって産生される。モノクローナル抗体は通常、結合する任意のエピトープに対して単一の結合親和性を示す。

【0063】

修飾因子「モノクローナル」は、抗体の均一な集団から得られるものとしての抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。モノクローナル抗体は1種類の抗原のみを認識する。本明細書のモノクローナル抗体としては、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖（複数可）の残りの部分は、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列、ならびにそのような抗体のフラグメントと同一または相同である、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）が挙げられる。抗体を産生するための技術は、当該技術分野で周知であり、例えば、Harlow and Lane “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Harlow and Lane “Using Antibodies: A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999; Tickler et al. JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation. 2009; 14 (5): 303-307; Babcock et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996; 93: 7843-7848; 及び米国特許第5,627,052号に記載されている。

【0064】

特定の実施形態では、「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の合計の強さを指す。特に明記しない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体及びペプチド）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（ K_D ）または結合定数（ K_A ）で表され得る。親和性は、当該技術分野で公知の一般的な方法によって測定され得る。

【0065】

特定の実施形態では、「結合」とは、抗体の結合ドメインが、 $10^{-8} M$ 以下の解離定数（ K_D ）、特定の実施形態では $10^{-5} M \sim 10^{-13} M$ 、特定の実施形態では $10^{-5} M \sim 10^{-10} M$ 、特定の実施形態では $10^{-5} M \sim 10^{-7} M$ 、特定の実施形態では $10^{-8} M \sim 10^{-13} M$ 、または特定の実施形態では $10^{-9} M \sim 10^{-13} M$ という解離定数（ K_D ）でその標的ペプチドと会合することを意味する。この用語はさらに、結合ドメインが、存在する他の生体分子に結合しないことを示すために使用されてもよい（例えば、それは、 $10^{-4} M$ 以上、特定の実施形態では $10^{-4} M \sim 1 M$ という解離定数（ K_D ）を有する他の生体分子に結合する。

【0066】

特定の実施形態では、「結合」とは、抗体の結合ドメインが、 $10^7 M^{-1}$ 以上の親和性定数（すなわち、会合定数、 K_A ）、特定の実施形態では $10^5 M^{-1} \sim 10^{13} M^{-1}$ 、特定の実施形態では $10^5 M^{-1} \sim 10^{10} M^{-1}$ 、特定の実施形態では $10^5 M^{-1} \sim 10^8 M^{-1}$ 、特定の実施形態では $10^7 M^{-1} \sim 10^{13} M^{-1}$ 、または特定の実施形態では $10^7 M^{-1} \sim 10^8 M^{-1}$ という親和性定数でその標的ペプチドと会合することを意味する。この用語はさらに、結合ドメインが存在する他の生体分子に結合しないことを示すために使用されてもよい（例えば、それは、 $10^4 M^{-1}$ 以下の会合定数（ K_A ）、特定の実施形態では $10^4 M^{-1} \sim 1 M^{-1}$ の会合定数）で他の生体分子に結合する）。

【0067】

本開示の抗体は、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及びWDの診断のためのSRMアッセイで検出された、本明細書に記載のペプチドの免疫親和性濃縮に使用してもよい。高親和性抗体の特定の実施形態としては、抗CD3 ϵ 197、抗WASp 274、抗WASp 289、抗BTK 407、抗BTK 545、抗CTNS 115、抗CTNS 120、抗CTNS 194、抗CTNS 194、抗CTNS 360、抗SHPK 44、抗SHPK 363、抗SHPK 388、抗ATP7B 214、抗ATP7B 325、抗ATP7B 466、抗ATP7B 589、抗ATP7B 621、抗ATP7B 887、抗ATP7B 1056、及び抗ATP7B 1061が挙げられる。

【0068】

特定の実施形態において、例示的な抗体としては、表2に提示されるCDRが挙げられる。

【0069】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 本開示の例示的な抗ペプチド抗体 CDR :

抗体／疾患	VH CDR類	VL CDR類
抗 CD3 ε 197/SCID	CDR1: EYV I H (配列番号 22) CDR2: GFNPNI GGTNYNQR FKG (配列番号 23) CDR3: GGPYYYAMDY (配列番号 24)	CDR1: RSSQSIVHSSG NTYLE (配列番号 25) CDR2: KVSNRFS (配列番号 26) CDR3: FQGSHVPWT (配列番号 27)
抗 WASp 274/WAS	CDR1: TYAMT (配列番号 28) CDR2: SFYIEGSASYANWA NGR (配列番号 29) CDR3: GNPGGSSAV (配列番号 30)	CDR1: QSSETVYKNNY LA (配列番号 31) CDR2: WASKLAS (配列番号 32) CDR3: AGYQSNIVDGT A (配列番号 33)
抗 BTK 4 07/XLA	CDR1: RNEIS (配列番号 34) CDR2: GIGSPGRAYATWA KSR (配列番号 35) CDR3: GDI	CDR1: QSSQSVYNNNR LA (配列番号 36) CDR2: SASTLAS (配列番号 37) CDR3: LGSYDCSTADC NA (配列番号 38)
抗 CTNS 115/シ ン症	CDR1: TRDGV C (配列番号 39) CDR2: CIYRGISATTSYAS WAKGR (配列番号 40) CDR3: AWDL (配列番号 41)	CDR1: QASQSIGSDLS (配列番号 42) CDR2: KASKVET (配列番号 43) CDR3: QSIDFSKSYIG GA (配列番号 44)
抗 CTNS 360/シ ン症	CDR1: NNDGIC (配列番号 45) CDR2: CIGSTSGRIYYASW AKGR (配列番号 46) CDR3: EPYGSGSMAFDL (配列番号 47)	CDR1: QASQSIWNNNF LS (配列番号 48) CDR2: EASKLAS (配列番号 49) CDR3: QGEFSCSIADC VA (配列番号 50)
抗 SHPK 363/シ ン症	CDR1: SNYFMC (配列番号 51) CDR2: CILVGSGRTTFASW AKGR (配列番号 52) CDR3: AWAL (配列番号 53)	CDR1: QASQSVYNNND LA (配列番号 54) CDR2: GASTLVS (配列番号 55) CDR3: QGGYDPRNYP (配列番号 56)
抗 ATP7B 1056/W D	CDR1: SYWII (配列番号 57) CDR2: SSGPSGSAYYTSWV KG (配列番号 58) CDR3: AGGSDYDWFDL (配列番号 59)	CDR1: QSSPSVANNNW LS (配列番号 60) CDR2: GASTLAS (配列番号 61) CDR3: AGGHKTAENP (配列番号 62)

【0070】

特定の実施形態では、例示的な抗体は、表 3 に提示される可変の重いドメイン及び可変の軽いドメインを含む。

【0071】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. 本開示の例示的な抗ペプチド抗体可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメイン：

抗体／疾患	VHドメイン	VLドメイン
抗CD3ε 197／SCID	EVQLQQSGPDLVKPGASV KISCKTSGYIFIEYVIHW VKQSHGKSLEWIGGFNPN IGGTNYNQRFKKGKATLTV DKSSSTAYMELRSLTSED SAVYYCVRGGPYYYAMDY WGQGTSVTVSS (配列番号63)	DVLMTQNPLSLPVSL GDQASISCRSSQSIV HSSGNTYLEWYLQKP GQSPKVL IYKVS NRF SGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPWTFGG GTKLEIK (配列番号64)
抗WASP 274／WAS	QSVEESGGRLVTPGTPLT LTCTVSGFSLSTYAMTWV RQAPGKGLQWIGSFYIEG SASYANWANGRFTISKTS STVNLKMTSPTVADTASY FCARGNPGGSSAVWGQGT LVTVSS (配列番号65)	IVLTQTPASVSAAVG GTVTISCQSSETVYK NNYLAWYQQKLGQPP KLLIYWASKLASGVP SRFKGSGSGTQFTLT ISDVVCADAGTY YCA GYQSNIVDGTAFGGG TEVVVN (配列番号66)
抗BTK 407／XLA	QSVKESEGGFLFKPTDTLT VTCTVSGFSLSRNEISWF RQAPGNGLWIGGIGSPG RAYYATWAKSRSTITRNT NLNTVTLKMTSLTAADTA TYFCARGDIWGPGTVVTV SS (配列番号67)	QVLTQTVSPVSAAVG STVTINCQSSQSVYN NNRLAWYQQKPGQPP KGLIYSASTLASGVS SRFKGSGSGTQFTLT ISDVQCDDAATYYCL GSYDCSTADCN AFGG GTEVVVK (配列番号68)
抗CTNS 115／シスチン症	QEQLVESGGGLVQPEGSL TLTCKASGFSFSTRDGV WVRQAPGKGLEWIA CIYR GISATTSYASWAKGRFTI SKTSSTTVTLQMTSLTAA DTATYFCARAWDLWGPGT LVTVSS (配列番号69)	DVVM TQTPASVSEP VGGTVTIKCQASQSIG SDLSWYQQKPGQPPK RLIYKASKVETGVPS RFSGSGSGTEFTLT ISDLECA DASTYYCQS IDFSKSYIGGA FGGG TEVVVK (配列番号70)

10

20

30

40

50

抗CTNS 360／シスチン症	QSLEESGGGLFQPGASLT LTCTASGFSFSNNDGICW VRQAPGKGLEWIGCIGST SGRIYYASWAKGRLTISK TSSTTVILQMTSLTAADT ATYFCASEPYGSGSMAFD LWGPGLTVTVSS (配列番号71)	QVLTQTASSVSAAVG GTVTVNCQASQS IWN NNFLSWYQQKPGQPP KLLIYEASKLASGVP SRFSGSGSGTQFTLT ISGVQCDDAATYYCQ GEFSCSIADCVAFGG GTEVVVR (配列番号72)
抗SHPK 363／シスチン症	QEQIEESGGGLVKPEGSL TLTCKVSGFDFSSNYFMC WVRQAPGKGLEWIGCILV GSGRTTFASWAKGRFTIS KTSSTTVTLQMTSLTAAD TATYFCARAWALWGPGLT VTVSS (配列番号73)	QVLTQTTPSPVSAAVG GTVTISCQASQSVYN NNDLAWYQQKPGQPP KLLIYGASTLVSGVP SRFSGSGSGAQFTLT ISDLECDDAATYYCQ GGYDPRNYPFGGGTE VVVK (配列番号74)
抗ATP7B 1056／WD	QSLEESGGRLVTPGGS LT VTCTVSGFSLSSYWI IWV RQAPGEGLEWIGSSGPSG SAYYTSWVKGRFTISKTS TTVDLKMTGLTTEDTATY FCARAGGSDYDWF DLWGQ GTLVTVSS (配列番号75)	QVLTQTTPSPVSAAVG GTVTINCQSSPSVAN NNWLSWFQQKPGQRP KLLIYGASTLASGVP SRFKGSGSGTQFTLT ISDVQCDDAATYYCA GGHKTAENPFGGGT EVVK (配列番号76)

【0072】

特定の実施形態では、例示的な抗体のアミノ酸配列には、以下が含まれる：リーダー配列を有する抗CD3ε 197重鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号79）；リーダー配列を有する抗CD3ε 197軽鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号81）；リーダー配列を有する抗WASP 274重鎖アミノ酸配列（配列番号83）；リーダー配列を有する抗WASP 274重鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号85）；リーダー配列を含まない抗WASP 274重鎖アミノ酸配列（配列番号86）；リーダー配列を有する抗WASP 274軽鎖アミノ酸配列（配列番号88）；リーダー配列を有する抗WASP 274軽鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号90）；リーダー配列を含まない抗WASP 274軽鎖アミノ酸配列（配列番号91）；リーダー配列を有する抗BTK 407重鎖アミノ酸配列（配列番号93）；リーダー配列を有する抗BTK 407重鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号95）；リーダー配列を含まない抗BTK 407重鎖アミノ酸配列（配列番号96）；リーダー配列を有する抗BTK 407軽鎖アミノ酸配列（配列番号98）；リーダー配列を有する抗BTK 407軽鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号100）；リーダー配列を含まない抗BTK 407軽鎖アミノ酸配列（配列番号101）；リーダー配列を有する抗CTNS 115重鎖アミノ酸配列（配列番号103）；リーダー配列を有する抗CTNS 115重鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号105）；リーダー配列を含まない抗CTNS 115重鎖アミノ酸配列（配列番号106）；リーダー配列を有する抗CTNS 115軽鎖アミノ酸配列（配列番号108）；リーダー配列を有する抗CTNS 115軽鎖可変ドメインアミノ酸配列（配列番号110）；リーダー配列を含まない抗CTNS 115軽鎖アミノ酸配列（配列番号111）；リーダー配列を有する抗CTNS 360重鎖アミノ酸配列（配列

番号 113) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 重鎖可変ドメインアミノ酸配列 (配列番号 115) ; リーダー配列を含まない抗 CTNS 360 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 116) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 118) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列 (配列番号 120) ; リーダー配列を含まない抗 CTNS 360 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 121) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 123) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 重鎖可変ドメインアミノ酸配列 (配列番号 125) ; リーダー配列を含まない抗 SHPK 363 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 126) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 128) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列 (配列番号 130) ; リーダー配列を含まない抗 SHPK 363 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 131) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 133) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 重鎖可変ドメインアミノ酸配列 (配列番号 135) ; リーダー配列を含まない抗 ATP7B 1056 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 136) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 138) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列 (配列番号 140) ; 及びリーダー配列を含まない抗 ATP7B 1056 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 141) 。

【0073】

特定の実施形態では、例示的な抗体のコード配列には、以下が含まれる：リーダー配列を有する抗 CD3ε 197 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 78) ; リーダー配列を有する抗 CD3ε 197 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 80) ; リーダー配列を有する抗 WASp 274 重鎖コード配列 (EB0603-2F8-H2) (配列番号 82) ; リーダー配列を有する抗 WASp 274 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 84) ; リーダー配列を有する抗 WASp 274 軽鎖コード配列 (EB0603-2F8-K2) (配列番号 87) ; リーダー配列を有する抗 WASp 274 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 89) ; リーダー配列を有する抗 BTK 407 重鎖コード配列 (EB0602-1G5-H2) (配列番号 92) ; リーダー配列を有する抗 BTK 407 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 94) ; リーダー配列を有する抗 BTK 407 軽鎖コード配列 (EB0602-1G5-K1) (配列番号 97) ; リーダー配列を有する抗 BTK 407 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 99) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 115 重鎖コード配列 (EB0606-3H8-H5) (配列番号 102) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 115 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 104) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 115 軽鎖コード配列 (EB0606-3H8-K7) (配列番号 107) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 115 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 109) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 重鎖コード配列 (EB0604-4E3-H4) (配列番号 112) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 114) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 軽鎖コード配列 (EB0604-4E3-K1) (配列番号 117) ; リーダー配列を有する抗 CTNS 360 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 119) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 重鎖コード配列 (EB0605B-6G12-H1) (配列番号 122) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 124) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 軽鎖コード配列 (EB0605B-6G12-K1) (配列番号 127) ; リーダー配列を有する抗 SHPK 363 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 129) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 重鎖コード配列 (EB0601-H3-1) (配列番号 132) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 重鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 134) ; リーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 軽鎖コード配列 (EB0601-K3-2) (配列番号 137) ; 及びリーダー配列を有する抗 ATP7B 1056 軽鎖可変ドメインコード配列 (配列番号 139) 。

10

20

30

40

50

【0074】

(V) ペプチドの濃縮（富化）戦略。SRMの前の所望のペプチド標的の濃縮は、当該技術分野で公知の任意の手段によって達成され得る。試料からの豊富なタンパク質種の免疫吸着ベースの枯渇、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動、溶媒分配、免疫沈降、免疫電気泳動、及び免疫クロマトグラフィーを含む、多くの濃縮手順が利用可能である。特定の実施形態では、試料の消化物からの個々のトリプシンペプチドの特異的抗体ベースの捕捉のためのSISCAPA法を使用してもよい。Anderson et al., J. Proteome Research 2004; 3: 235-244; 米国特許第7,632,686号。

【0075】

特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体などのペプチドマーカに結合する抗体は、固体支持体に付着され得る。特定の実施形態は、抗体がクロマトグラフィー媒体に共有結合しているアフィニティークラムを使用する。特定の実施形態では、POROS (Applied Biosystems, Foster City, CA) ナノカラムを、SISCAPA濃縮で使用してもよく、高い結合能力、標的ペプチドの迅速な濃縮を可能にする比較的高濃度の抗体、及び様々な官能化基によってカラムを調製する能力を特徴とする。あるいは、抗体は、ビーズ、磁気ビーズ、または他の固体粒子に付着されてもよい。付着の1つの手段は、ビーズ上にコーティングされたタンパク質への抗体の結合である。例えば、プロテインGでコーティングされた粒子は、好ましい方向で抗体の結合を提供する。ビーズを抗体で直接コーティングするなど、他の付着手段を使用してもよい。磁性粒子は、抗体への結合を可能にする多様な化学物質で利用し得る。粒子に付着した抗体で濃縮すると、試料の並列処理が可能になる。磁粉処理は、質量分析による分析のためにプレートで溶出するSISCAPA濃縮ステップ用に96ウェルプレートで自動化されている。他の特定の実施形態は、ナノフロークロマトグラフィーシステムに沿ってビーズ処理ステップを実行するために開発された新規のビーズトラップデバイスを使用する。Anderson et al. Mol Cell Proteomics 2009; 8 (5): 995-1005。これにより、溶出ステップと分析ステップの間の容器へのペプチドの損失が最小限に抑えられる。ペプチド濃縮は、ピペットチップに抗ペプチド抗体を固定化することによっても実行され得る。Nelson et al. Anal Chem. 1995; 67 (7): 1153-1158。遊離ペプチドから抗体結合ペプチドを分離した後、結合ペプチドを溶出し得る。任意の溶出手段を使用してもよい。効率的であることがわかっている1つの溶出手段は、5%酢酸/3%アセトニトリルである。特定のペプチドに効率的であるように、他の酸を含む他の溶出手段、及び他の濃度の酢酸を使用してもよい。

【0076】

(VI) 液体クロマトグラフィー (LC)。特定の実施形態では、1つ以上のLC精製ステップを、SRM-MSの前に実行する。濃縮ペプチドの混合物（移動相）は、材料が充填されたカラム（固定相）を通過して、カラムの移動相と固定相に対する重量と親和性に基づいてペプチドを分離し得る。従来のLC分析は、試料成分とカラム充填物質との間の化学的相互作用に依存しており、カラムを通過する試料の層流が、試験試料から目的的分析物を分離するための基礎である。当業者は、そのようなカラムでの分離が拡散プロセスであることを理解するであろう。試料のクロマトグラフィー分離にはさまざまなカラムパッキング材料が利用可能であり、適切な分離プロトコルの選択は、試料の特性、目的的分析物、存在する干渉物質及びその特性などに依存する経験的プロセスである。さまざまなパッキングケミストリーを、必要に応じて使用してもよい（例えば、精製される化合物の構造、極性、溶解性）。特定の実施形態では、カラムは、極性、イオン交換（カチオン及びアニオンの両方）、疎水性相互作用、フェニル、C-2、C-8、C-18カラム、多孔質ポリマー上の極性コーティング、またはその他の市販されているものである。クロマトグラフィーの間、材料の分離は、溶離液（「移動相」としても知られる）の選択、勾配溶出の選択、及び勾配条件、温度などの変数の影響を受ける。特定の実施形態では、分

10

20

30

40

50

析物は、目的の分析物がカラムパッキング材料によって可逆的に保持され、1つ以上の他の材料が保持されない条件下で、試料をカラムにアプライすることによって精製され得る。これらの実施形態では、目的の分析物がカラムによって保持される第1の移動相条件を使用してもよく、その後、保持されていない材料が一旦洗浄されれば、第2の移動相条件を使用して、保持された材料をカラムから除去してもよい。あるいは、分析物は、目的の分析物が1つ以上の他の材料と比較して異なる速度で溶出する、移動相条件下でカラムに試料をアプライすることによって精製され得る。上記のように、そのような手順は、試料の他の1つ以上の成分と比較して、目的の1つ以上の分析物の量を濃縮し得る。特定の実施形態では、LCは、ナノフローLC（ナノLC）である。ナノフローLC（nanoflow LC）では、クロマトグラフィー分離は、毎分低ナノリットルの範囲の流量を使用して実行され、このタイプのクロマトグラフィーによって得られる高い濃縮効率に起因して、高い分析感度を得られる。Cutillas, Current Nanoscience, 2005; 1: 65-71。

【0077】

（VII）質量分析（MS）。質量分析計には、気相イオンの質量電荷（ m/z ）比に変換できるパラメーターを測定する気相イオン分光計が備えられている。質量分析とは、質量分析計を使用して気相イオンを検出することを指す。質量分析計には通常、イオン源及び質量分析計が含まれる。質量分析計の例は、飛行時間型（TOF）、磁気セクター、四重極フィルター、イオントラップ、イオンサイクロトロン共鳴、静電セクターアナライザー、及びこれらのハイブリッドである。レーザー脱離質量分析計には、分析物を脱離、揮発、及びイオン化する手段としてレーザーエネルギーを使用する質量分析計が備えられる。タンデム質量分析計には、イオン混合物中のイオンを含むイオンの m/z ベースの識別または測定のための2つの連続した段階を実行し得る任意の質量分析計を備える。このフレーズには、 m/z ベースの識別またはイオンの空間的タンデム測定のための2つの連続した段階を実行し得る2つの質量分析計を備えた質量分析計が含まれる。このフレーズはさらに、 m/z ベースの識別またはイオンの時間的タンデム測定のための2つの連続する段階を実行し得る単一の質量分析器を有する質量分析計を含む。したがって、このフレーズには、QQ-TOF質量分析計、イオントラップ質量分析計、イオントラップ-TOF質量分析計、TOF-TOF質量分析計、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計、静電セクター-磁気セクター質量分析計、及びそれらの組み合わせが明示的に含まれる。

【0078】

質量分析におけるイオン化には、試料中の分析物がイオン化されるプロセスを含む。このような分析物は、さらなる分析に使用される荷電分子になる場合がある。例えば、試料のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化（ESI）、レーザースプレーイオン化（LSI）、大気圧化学イオン化（APCI）、光イオン化、電子イオン化、高速原子衝撃（FAB）/液体二次イオン化（LSIMS）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）、フィールドイオン化、フィールド脱離、サーモスプレー/プラズマスプレーイオン化、及び粒子ビームイオン化によって実行され得る。当業者は、イオン化方法の選択が、測定される分析物、試料のタイプ、検出器のタイプ、ポジティブモード対ネガティブモードの選択などに基づいて決定され得ることを理解するであろう。

【0079】

質量分析器は、イオン化された質量を取り、それらを m/z 比に基づいて分離し、それらを検出器に出力し、ここでそれらが検出され、後でデジタル出力に変換される質量分析計の構成要素を備える。 m/z 比を決定するための適切な質量分析計としては、四重極質量分析計、飛行時間型（TOF）質量分析計、磁気または静電セクター質量分析計、及びイオントラップ（例えば、イオンサイクロトロン共鳴）質量分析計が挙げられる。

【0080】

選択された反応モニタリング（SRM）-MSアッセイは、目的の所定のタンパク質について所定のペプチドのセットを標的とする。SRMは、タンデム質量分析の第1段階で特定の質量のイオン（親イオンまたはプリカーサーイオン）を選択し、検出のための第2

質量分析ステージでプリカーサーイオンのフラグメンテーション反応のイオン生成物を選択するタンデム質量分析モードである。選択したプリカーサーイオン及びフラグメントイオンに関連付けられた m/z 値の特定のペアは、トランジションと呼ばれる。各シグネチャーペプチドについて、最適なシグナル強度を提供し、試料に存在する他の種から標的されたペプチドを区別するフラグメントイオンが識別される。最適化されたトランジションは、効果的なSRMアッセイに貢献する。このようないくつかのトランジション（プリカーサー／フラグメントイオン対）を経時的にモニターし、特定のトランジションの保持時間及びシグナル強度を座標として有する一連のクロマトグラフィートレースが生成される。シグネチャーペプチドのSRM-MS分析は、通常、トリプル四重極質量分析計（QQQ-MS）で実行され、これは、シグネチャーペプチドの m/z に対応するプリカーサーイオンを選択的に分離し、ペプチド特異的なフラグメントイオンを選択的にモニターする機能を備えた機器である。SRM分析では、特異性は複数の質量分析計（質量フィルター）に依存する。最初の四重極は、所望の親イオンまたはプリカーサーイオンを選択するためである。第3の四重極は、（1つ以上の）フラグメントイオン（複数可）をモニターするためである。フラグメントイオン（複数可）は、第2の四重極で衝突によって誘発される解離によって生成される。共溶出するバックグラウンドイオンが非常に効果的にろ過されるので、2つのレベルの質量選択により高い選択性が可能になる。試料中の全ての分析物を調査する従来のタンデム質量分析（MS/MS）実験とは異なり、SRM分析は、特定の分析物を選択的に標的（フィルター）し、これは、従来の「フルスキャン」技術と比較して感度が1桁または2桁向上することを意味する。さらに、SRMは、最大5桁の広いダイナミックレンジにわたって線形応答を提供する。これにより、非常に複雑な混合物中の少量のタンパク質の検出が可能になる。したがって、SRMは、バックグラウンド干渉が少ない、非常に特殊な検出／モニタリング方法である。1回のMS実施で複数の親イオンをモニタリングする場合、このタイプの分析は、マルチプルリアクションモニタリング（MRM）として公知である。MRM分析を使用すると、1回の質量分析実施で複数のタンパク質及びタンパク質の複数の領域（シグネチャーペプチド）をモニタリングし得る。選択された反応モニタリング／多重反応モニタリング質量分析（SRM/MRM-MS）は、例えば、米国特許第8,383,417号、WO2013/106603、及び米国特許出願公開第2013/105684号に記載されている。

【0081】

特定の実施形態では、以下のパラメーターを使用して、特定のLC-SRM-MSシステム下でのタンパク質のLC-SRM-MSアッセイを特定し得る：（1）所定のタンパク質のトリプシンペプチドの濃縮；（2）LCカラムでのペプチドの保持時間（RT）；（3）ペプチドプリカーサーイオンの m/z 値；（4）プリカーサーイオンをイオン化するために使用されるデクラスティングポテンシャル；（5）ペプチドプリカーサーイオンから生成されたフラグメントイオンの m/z 値；及び（6）特定のペプチド用に最適化されたペプチドプリカーサーイオンをフラグメント化するために使用される衝突エネルギー（CE）。RTには、分析物の注入から溶出までの経過時間が含まれる。デクラスティングポテンシャル（DP）には、イオンクラスターを溶解及び解離するための電位が含まれる。これは、製造業者次第で、「フラグメント電圧」または「イオントランスファーキャピラリオフセット電圧」としても公知である。衝突エネルギー（CE）には、プリカーサーイオンが衝突セルに加速されるときに受け取るエネルギーの量が含まれる。

【0082】

本明細書に開示される方法によるペプチドの正確な定量化を容易にするために、目的のペプチドの同位体標識された合成バージョンのセットを、内部標準として使用するために既知の量で試料に添加してもよい。同位体標識ペプチドは、対応する代理のペプチドと同一の物理的及び化学的特性を有するので、クロマトグラフィーカラムから共溶出し、得られたマススペクトルで容易に識別可能である。Gerber et al. Proc. Natl. Assoc. Sci. 2003; 100: 6940-6945; Kirkpatrick et al. Methods 2005; 35: 265-273。所定のペプチドの

10

20

30

40

50

アミノ酸を標識できる同位体としては、 ^{13}C 、 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、及び ^{34}S が挙げられる。特定の実施形態では、ペプチドは、 ^{13}C 及び／または ^{15}N の重同位体で標識されている。標識標準の添加は、タンパク質分解消化の前または後に行ってもよい。特定の実施形態では、標識された内部標準ペプチドを、LC-MRM-MSアッセイの前に加える。同位体標識されたペプチドを合成する方法は、当業者に公知であろう。したがって、特定の実施形態では、実験試料は、内部標準ペプチドを含む。特定の実施形態では、内部標準ペプチドは、参照シグネチャーペプチドを含む。特定の実施形態では、シグネチャーペプチド濃度は、以下を組み合わせることによって決定され得る：(i) シグネチャーペプチドのピーク面積を、LC-MRM-MSアッセイから得られたその対応する参照シグネチャーペプチドのピーク面積と比較することから計算された比、及び(ii) 参照シグネチャーペプチドの既知の濃度。参照標準として選択され、定量に適したペプチドは、量子型ペプチド(Q-ペプチド)と呼ばれることもある。Q-ペプチドは、プロテオタイプペプチドの全ての特性を含むが、人工的な修飾及び／または不完全な切断を根絶するために参照ペプチドを構成し得る残基にも制限を課す。Holman et al. *Bioanalysis* 2012; 4(14): 1763-1786.

【0083】

所定のタンパク質(複数可)の絶対定量的レベルは、SRM/MRM方法論によって決定され得、それにより、1つの生物学的試料中の所定のタンパク質からの個々のペプチドのSRM/MRMシグネチャーピーク面積を、既知量の「スパイクされた」内部標準のSRM/MRMシグネチャーピーク面積と比較する。特定の実施形態では、内部標準は、1つ以上の重い同位体で標識された1つ以上のアミノ酸残基を含む同じ正確なペプチドの合成バージョンである。このような同位体標識内部標準は、質量分析がネイティブペプチドシグネチャーピークとは異なっており、かつ別個であり、コンパレータピークとして使用され得る、予測可能でかつ一貫性のあるSRM/MRMシグネチャーピークを生成するように合成される。したがって、内部標準を生物学的試料由来のタンパク質調製物に既知の量でスパイクし、質量分析によって分析すると、ネイティブペプチドのシグネチャーピーク面積が内部標準ペプチドのシグネチャーピーク面積と比較され、この数値比較が、生物学的試料からの元のタンパク質調製物に存在する天然ペプチドの絶対モル濃度及び／または絶対重量のいずれかを示す。フラグメントペプチドの絶対定量データは、試料ごとに分析されたタンパク質の量に従って表示される。絶対定量を、多くのペプチド、したがってタンパク質にわたって、単一の試料で同時に、及び／または多くの試料にわたって実行して、個々の生物学的試料及び個々の試料のコホート全体におけるタンパク質の絶対量に関する洞察を得てもよい。

【0084】

ペプチドの絶対定量のための別の戦略は、イコライザーペプチドによる等モル性である。この方法論では、同位体標識された目的のQペプチドをジペプチドとして化学的に合成することを含む。一般的なアミノ酸配列は、Q-ペプチドのN末端に位置し、イコライザーペプチドと呼ばれる。可溶化及びタンパク質分解消化後、Q-ペプチドの量は、単一の光標識ペプチドを参照することにより正確に決定され得る。次に、適切な量の各標準ペプチドを目的の試料に追加して(前消化またはタンパク質分解前のいずれか)、絶対定量を容易にする。Holzmann et al. *Anal. Chem.* 2009; 81: 10254-10261。絶対定量には、定量コンカテマー(QconCAT)タンパク質を使用してもよい。Beynon et al. *Nat. Methods* 2005; 2: 587-589; Johnson et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009; 20: 2211-2220; Ding et al. *J. Proteome Res.* 2011; 10: 3652-3659; Carroll et al. *Molecular & Cellular Proteomics* 2011; Sep 19: mcp-M111。この戦略では、親和性のタグ付けされた、目的のいくつかのタンパク質由来の標準ペプチドの連結である組換え人工タンパク質が、安定した同位体濃縮培地で増殖した*Escherichia coli*で異種生産される。次に、QconCATタンパク

質は、アフィニティー精製され、試料と共消化され、それを構成する全ての「重い」Qペプチドの化学量論的混合物が生成され、ネイティブタンパク質由来のタンパク質分解ペプチド及び内部標準を、その後分析する。ペプチド連結型標準 (peptide-concatenated standards) (PCS) と呼ばれるQconCATアプローチの変形は、内因性環境を反映する人工タンパク質配列内のQペプチド間の隣接領域を使用する。Kito et al. J. Proteome Res. 2007; 6: 792-800。他の特定の実施形態は、絶対定量化 (PSAQ) のためにタンパク質標準を使用する。Brun et al. Mol. Cell. Proteomics 2007; 6: 2139-2149。PSAQは、組換えタンパク質を使用するが、いくつかのタンパク質からのペプチドの連結ではなく、定量されるタンパク質全体が、安定な同位体標識された形で発現される。次に、1つ以上のPSAQを、試料の前消化に追加して、定量を容易にしてもよい。

【0085】

特定の実施形態は、強度ベースの測定 (America and Cordewener, Proteomics 2008; 8: 731-749) またはスペクトルカウント (Lundgren et al. Expert Rev. Proteomics 2010; 7: 39-53) などのタンパク質定量化のための標識なしの戦略を使用する。

【0086】

所定のペプチドの相対的定量的レベルを取得するために、1つの生物学試料における所定のタンパク質からの個々のペプチドまたは複数のペプチドの質量分析由来のシグネチャーピーク面積 (またはピークが十分に分解されている場合はピーク高さ) を、同じSRM/MRM手法を使用して、1つ以上の追加のかつ異なる生物学的試料で、同じペプチドまたは同じタンパク質由来のペプチドに対して決定されたシグネチャーピーク面積と比較してもよい。このようにして、所定のタンパク質由来の特定のペプチド (複数可) の量は、同じ実験条件下での2つ以上の生物学的試料にまたがり同じペプチドまたは同じタンパク質由来のペプチドと比較して決定される。さらに、SRM/MRM手法により、その所定のタンパク質のそのペプチドのシグネチャーピーク面積を、生物学的試料由来の同じタンパク質調製物内の異なるタンパク質由来の別の及び異なるペプチド (複数可) についてのシグネチャーピーク面積に対して比較することにより、単一の試料内の単一のタンパク質由来の所定のペプチド (複数可) について、相対定量を決定し得る。このようにして、所定のタンパク質由来の特定のペプチドの量、したがって所定のタンパク質の量を、同じ試料内の別のタンパク質と比較して決定する。これらのアプローチは、所定のタンパク質由来の個々のペプチド (複数可) を、試料間及び試料内の同じタンパク質由来または異なるタンパク質由来の別のペプチド (複数可) の量に対して定量し、ここで、シグネチャーピーク面積によって決定される量は、この生物学的試料由来のタンパク質調製物中のペプチドの絶対重量対容積または重量対重量の量に関係なく、互いに相対的である。異なる試料間の個々のシグネチャーピーク面積に関する相対的な定量データは、試料ごとに分析されたタンパク質の量に正規化してもよい。相対定量を、単一の試料中で同時に多くのペプチドにわたって、及び／または多くの試料にわたって実行して、相対的なタンパク質量についての洞察を得てもよい。

【0087】

シグネチャーペプチドレベルは、濃度単位 (例えば、pmol/L) で表してもよい。特定の実施形態では、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDについてスクリーニングされている対象に由来する試験試料中のシグネチャーペプチドの平均濃度を、正常な対照試料中の対応するペプチドの平均濃度と比較してもよい。特定の実施形態では、正常対照試料は、1つ以上の正常な対照対象から、または正常な対照対象の集団から誘導され得る。特定の実施形態では、正常な対照対象としては、SCID、WAS、XLA、シスチン症、またはWDを有さないか、または有することが知られていない対象が挙げられる。特定の実施形態では、正常な対照対象としては、SCID、WAS、XLA、シスチン症、またはWDに関連する遺伝子変異を有さない対象が挙げられる。

【0088】

特定の実施形態において、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるCD3εシグネチャーペプチドの平均濃度は、70 pmol/L～400 pmol/Lの範囲、80 pmol/L～300 pmol/Lの範囲、及び90 pmol/L～200 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のCD3εシグネチャーペプチドの平均濃度は、70 pmol/L、80 pmol/L、90 pmol/L、100 pmol/L、110 pmol/L、120 pmol/L、130 pmol/L、140 pmol/L、150 pmol/L、160 pmol/L、170 pmol/L、180 pmol/L、190 pmol/L、200 pmol/L、210 pmol/L、220 pmol/L、230 pmol/L、240 pmol/L、250 pmol/L、260 pmol/L、270 pmol/L、280 pmol/L、290 pmol/L、300 pmol/L、310 pmol/L、320 pmol/L、330 pmol/L、340 pmol/L、350 pmol/L、360 pmol/L、370 pmol/L、380 pmol/L、390 pmol/L、400 pmol/L以上の濃度を含む。

10

【0089】

特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるWASP 274シグネチャーペプチドの平均濃度は、600 pmol/L～5000 pmol/Lの範囲、700 pmol/L～3000 pmol/Lの範囲、及び800 pmol/L～2500 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるWASP 274シグネチャーペプチドの平均濃度は、600 pmol/L、700 pmol/L、800 pmol/L、900 pmol/L、1000 pmol/L、1100 pmol/L、1200 pmol/L、1300 pmol/L、1400 pmol/L、1500 pmol/L、1600 pmol/L、1700 pmol/L、1800 pmol/L、1900 pmol/L、2000 pmol/L、2100 pmol/L、2200 pmol/L、2300 pmol/L、2400 pmol/L、2500 pmol/L、2600 pmol/L、2700 pmol/L、2800 pmol/L、2900 pmol/L、3000 pmol/L、3100 pmol/L、3200 pmol/L、3300 pmol/L、3400 pmol/L、3500 pmol/L、3600 pmol/L、3700 pmol/L、3800 pmol/L、3900 pmol/L、4000 pmol/L、4100 pmol/L、4200 pmol/L、4300 pmol/L、4400 pmol/L、4500 pmol/L、4600 pmol/L、4700 pmol/L、4800 pmol/L、4900 pmol/L、5000 pmol/L以上の濃度を含む。

20

30

【0090】

特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のWASP 289シグネチャーペプチドの平均濃度は、5500 pmol/L～15000 pmol/Lの範囲、6000 pmol/L～14000 pmol/Lの範囲、及び6500 pmol/L～13000 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるWASP 289シグネチャーペプチドの平均濃度は、5500 pmol/L、5600 pmol/L、5700 pmol/L、5800 pmol/L、5900 pmol/L、6000 pmol/L、6100 pmol/L、6200 pmol/L、6300 pmol/L、6400 pmol/L、6500 pmol/L、6600 pmol/L、6700 pmol/L、6800 pmol/L、6900 pmol/L、7000 pmol/L、7100 pmol/L、7200 pmol/L、7300 pmol/L、7400 pmol/L、7500 pmol/L、7600 pmol/L、7700 pmol/L、7800 pmol/L、7900 pmol/L、8000 pmol/L、8100 pmol/L、8200 pmol/L、8300 pmol/L、8400 pmol/L、8500 pmol/L、8600 pmol/L、8700 pmol/L、8800 pmol/L、8900 pmol/L、9000 pmol/L、9800 pmol/L

40

50

L、9900 pmol/L、10000 pmol/L、10100 pmol/L、10200 pmol/L、10300 pmol/L、10400 pmol/L、10500 pmol/L、10600 pmol/L、10700 pmol/L、10800 pmol/L、10900 pmol/L、11000 pmol/L、11100 pmol/L、11200 pmol/L、11300 pmol/L、11400 pmol/L、11500 pmol/L、11600 pmol/L、11700 pmol/L、11800 pmol/L、11900 pmol/L、12000 pmol/L、12100 pmol/L、12200 pmol/L、12300 pmol/L、12400 pmol/L、12500 pmol/L、12600 pmol/L、12700 pmol/L、12800 pmol/L、12900 pmol/L、13000 pmol/L、13100 pmol/L、13200 pmol/L、13300 pmol/L、13400 pmol/L、13500 pmol/L、13600 pmol/L、13700 pmol/L、13800 pmol/L、13900 pmol/L、14000 pmol/L、14100 pmol/L、14200 pmol/L、14300 pmol/L、14400 pmol/L、14500 pmol/L、14600 pmol/L、14700 pmol/L、14800 pmol/L、14900 pmol/L、15000 pmol/L以上の濃度を含む。

【0091】

特定の実施形態において、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるBT K 407シグネチャーペプチドの平均濃度は、350 pmol/L~2500 pmol/Lの範囲、450 pmol/L~2400 pmol/Lの範囲、及び550 pmol/L~2300 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のBT K 407シグネチャーペプチドの平均濃度は、350 pmol/L、400 pmol/L、450 pmol/L、500 pmol/L、550 pmol/L、600 pmol/L、650 pmol/L、700 pmol/L、750 pmol/L、800 pmol/L、850 pmol/L、900 pmol/L、1000 pmol/L、1100 pmol/L、1200 pmol/L、1300 pmol/L、1400 pmol/L、1500 pmol/L、1600 pmol/L、1700 pmol/L、1800 pmol/L、1900 pmol/L、2000 pmol/L、2100 pmol/L、2200 pmol/L、2300 pmol/L、2400 pmol/L、2500 pmol/L以上の濃度を含む。

【0092】

特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のBT K 545シグネチャーペプチドの平均濃度は、550 pmol/L~1600 pmol/Lの範囲、650 pmol/L~1500 pmol/Lの範囲、及び750 pmol/L~1400 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のBT K 545シグネチャーペプチドの平均濃度は、550 pmol/L、600 pmol/L、650 pmol/L、700 pmol/L、750 pmol/L、800 pmol/L、850 pmol/L、900 pmol/L、950 pmol/L、1000 pmol/L、1050 pmol/L、1100 pmol/L、1150 pmol/L、1200 pmol/L、1250 pmol/L、1300 pmol/L、1350 pmol/L、1400 pmol/L、1450 pmol/L、1500 pmol/L、1550 pmol/L、1600 pmol/L以上の濃度を含む。

【0093】

特定の実施形態において、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるCTNS 115シグネチャーペプチドの平均濃度は、40 pmol/L~250 pmol/Lの範囲、50 pmol/L~200 pmol/Lの範囲、及び60 pmol/L~150 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるCTNS 115シグネチャーペプチドの平均濃度は、40 pmol/L、45 pmol/L、50 pmol/L、55 pmol/L、60 pmol/L、65 pmol/L、70 pmol/L、75 pmol/L、80 pmol/L、85 pmol/L、90 p

mol/L、95 pmol/L、100 pmol/L、110 pmol/L、120 pmol/L、130 pmol/L、140 pmol/L、150 pmol/L、160 pmol/L、170 pmol/L、180 pmol/L、190 pmol/L、200 pmol/L、210 pmol/L、220 pmol/L、230 pmol/L、240 pmol/L、250 pmol/L以上の濃度を含む。

【0094】

特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のSHPK 363シグネチャーペプチドの平均濃度は、100 pmol/L～8000 pmol/Lの範囲、300 pmol/L～7000 pmol/Lの範囲、及び500 pmol/L～6000 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるSHPK 363シグネチャーペプチドの平均濃度は、100 pmol/L、200 pmol/L、300 pmol/L、400 pmol/L、500 pmol/L、600 pmol/L、700 pmol/L、800 pmol/L、900 pmol/L、1000 pmol/L、1500 pmol/L、2000 pmol/L、2500 pmol/L、3000 pmol/L、3500 pmol/L、4000 pmol/L、4500 pmol/L、5000 pmol/L、5500 pmol/L、6000 pmol/L、6500 pmol/L、7000 pmol/L、7500 pmol/L、8000 pmol/L以上の濃度を含む。

【0095】

特定の実施形態において、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるATP7B 214シグネチャーペプチドの平均濃度は、30 pmol/L～100 pmol/Lの範囲、40 pmol/L～90 pmol/Lの範囲、及び50 pmol/L～80 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団におけるDBS中のATP7B 214シグネチャーペプチドの平均濃度は、30 pmol/L、35 pmol/L、40 pmol/L、45 pmol/L、50 pmol/L、55 pmol/L、60 pmol/L、65 pmol/L、70 pmol/L、75 pmol/L、80 pmol/L、85 pmol/L、90 pmol/L、95 pmol/L、100 pmol/L以上の濃度を含む。

【0096】

特定の実施形態において、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるATP7B 887シグネチャーペプチドの平均濃度は、200 pmol/L～500 pmol/Lの範囲、250 pmol/L～450 pmol/L、及び300 pmol/L～400 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のATP7B 887シグネチャーペプチドの平均濃度は、200 pmol/L、210 pmol/L、220 pmol/L、230 pmol/L、240 pmol/L、250 pmol/L、260 pmol/L、270 pmol/L、280 pmol/L、290 pmol/L、300 pmol/L、310 pmol/L、320 pmol/L、330 pmol/L、340 pmol/L、350 pmol/L、360 pmol/L、370 pmol/L、380 pmol/L、390 pmol/L、400 pmol/L、410 pmol/L、420 pmol/L、430 pmol/L、440 pmol/L、450 pmol/L、460 pmol/L、470 pmol/L、480 pmol/L、490 pmol/L、500 pmol/L以上の濃度を含む。

【0097】

特定の実施形態において、正常な対照対象の集団由来のDBSにおけるATP7B 1056シグネチャーペプチドの平均濃度は、90 pmol/L～400 pmol/Lの範囲、100 pmol/L～300 pmol/Lの範囲、及び150 pmol/L～250 pmol/Lの範囲の濃度を含む。特定の実施形態では、正常な対照対象の集団由来のDBS中のATP7B 1056シグネチャーペプチドの平均濃度は、90 pmol/L、100 pmol/L、110 pmol/L、120 pmol/L、130 pmol/L、140 pmol/L、150 pmol/L、160 pmol/L、170 pmol/L、

10

20

30

40

50

180 pmol/L、190 pmol/L、200 pmol/L、210 pmol/L、220 pmol/L、230 pmol/L、240 pmol/L、250 pmol/L、260 pmol/L、270 pmol/L、280 pmol/L、290 pmol/L、300 pmol/L、310 pmol/L、320 pmol/L、330 pmol/L、340 pmol/L、350 pmol/L、360 pmol/L、370 pmol/L、380 pmol/L、390 pmol/L、400 pmol/L以上の濃度を含む。

【0098】

1つ以上の標準ペプチドは、当該分野で公知の任意の方法で合成され得る。そのような合成ペプチドは、1つ以上の天然修飾を有するアミノ酸をさらに含み得る。このような自然な修飾としては、グルタミン及びアスパラギンの脱アミノ化、アミノ化、酸化、ならびにヒドロキシル化が含まれ得る。

10

【0099】

(VII) 使用方法。本開示の方法は、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDのうちの1つ以上を有する個体を同定することを含む。特定の実施形態では、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDを有する個体の診断は、例えば、NBSの一部として、または障害の症状が個体に明らかになる前に、早期に行われる。

【0100】

本開示の方法は、DBS試料を取得することを含む。特定の実施形態では、DBSは、上記の方法に従って得られる。特定の実施形態では、DBSは、将来の試験のためにDBSを格納するDBSのリポジトリまたは実験室から入手される。

20

【0101】

本開示の方法は、消化酵素を用いてDBS中のタンパク質を消化することを含む。特定の実施形態では、DBSの1つ以上のパンチまたはDBS全体を適切な緩衝液に可溶化し得、上記の適切な消化酵素を添加して、DBSに存在するタンパク質をペプチドフラグメントに消化し得る。特定の実施形態では、DBSは、50mMの重炭酸アンモニウム(pH8)中の0.1%のProteaseMax(商標)で可溶化され、トリプシンで消化され得る。

【0102】

本開示の方法は、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDのスクリーニングに使用されるシグネチャーペプチドの濃縮を含む。シグネチャーペプチドとしては、SCID用のCD3ε 197；WAS用のWASP 274；WAS用のWASP 289；XLA用のBTK 407；XLA用のBTK 545；シスチン症用のCTNS 115；シスチン症用のCTNS 120；シスチン症用のCTNS 194；シスチン症用のCTNS 360；シスチン症用のSHPK 44；シスチン症用のSHPK 363；シスチン症用のSHPK 388；WD用のATP7B 214；WD用のATP7B 325；WD用のATP7B 466；WD用のATP7B 589；WD用のATP7B 621；WD用のATP7B 887；WD用のATP7B 1056；及びWD用のATP7B 1061が挙げられる。特定の実施形態では、シグネチャーペプチドとしては、図1に開示されているペプチド：SCID用のCD3ε 197；WAS用のWASP 274；WAS用のWASP 289；XLA用のBTK 407；XLA用のBTK 545；シスチン症用のCTNS 115；シスチン症用のCTNS 360；シスチン症用のSHPK 363；WD用のATP7B 325；及びWD用のATP7B 1056が挙げられる。特定の実施形態において、シグネチャーペプチドとしては、表1のペプチド：シスチン症用のCTNS 120；シスチン症用のCTNS 194；シスチン症用のSHPK 44；シスチン症用のSHPK 388；WD用のATP7B 214；WD用のATP7B 466；WD用のATP7B 589；WD用のATP7B 621；WD用のATP7B 887；及びWD用のATP7B 1061が挙げられる。特定の実施形態では、シグネチャーペプチドの濃縮には、消化されたDBS由来のペプチドフラグメントの混合物を、シグネチャーペプチドを認識する1つ以上の結合実体と接触させることが含ま

30

40

50

れる。特定の実施形態では、結合実体は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。特定の実施形態では、この抗体としては、上記の表 2 及び 3 に開示されているものが挙げられる。特定の実施形態では、本開示の抗体のアミノ酸配列としては、配列番号 79、81、83、85、86、88、90、91、93、95、96、98、100、101、103、105、106、108、110、111、113、115、116、118、120、121、123、125、126、128、130、131、133、135、136、138、140、及び 141 が含まれる。特定の実施形態では、本開示の抗体のコード配列には、配列番号 78、80、82、84、87、89、92、94、97、99、102、104、107、109、112、114、117、119、122、124、127、129、132、134、137、及び 139 を含む。特定の実施形態では、この抗体としては、CD3 ϵ 197、WASp 274、WASp 289、BTK 407、BTK 545、CTNS 115、CTNS 120、CTNS 194、SHPK 44、SHPK 363、SHPK 388、ATP7B 214、ATP7B 325、ATP7B 466、ATP7B 589、ATP7B 621、ATP7B 887、ATP7B 1056、及び ATP7B 1061 に結合する抗体が挙げられる。

【0103】

特定の実施形態では、配列番号 22～27、63、及び 64 を含む抗体を使用して、配列番号 1 を含む CD3 ϵ ペプチドを濃縮する。

【0104】

特定の実施形態では、配列番号 28～33、65 及び 66 を含む抗体を使用して、配列番号 2 を含む WASp ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、抗体を使用して、配列番号 3 を含む WASp ペプチドを濃縮する。

【0105】

特定の実施形態では、配列番号 34～38、67、及び 68 を含む抗体を使用して、配列番号 4 を含む BTK ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、抗体を使用して、配列番号 5 を含む BTK ペプチドを濃縮する。

【0106】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、SCID、WAS、及び XLA をスクリーニングし得る：配列番号 1 を含む、CD3 ϵ ペプチドに結合する、配列番号 22～27、63、及び 64 を含む抗体；配列番号 2 を含む、WASp ペプチドに結合する、配列番号 28～33、65 及び 66 を含む抗体；配列番号 3 を含む、WASp ペプチドに結合する抗体；配列番号 4 を含む、BTK ペプチドに結合する、配列番号 34～38、67、及び 68 を含む抗体；ならびに配列番号 5 を含む、BTK ペプチドに結合する抗体。

【0107】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、SCID、WAS、及び XLA をスクリーニングし得る：配列番号 1 を含む、CD3 ϵ ペプチドに結合する、配列番号 22～27、63、及び 64 を含む抗体；配列番号 2 を含む、WASp ペプチドに結合する、配列番号 28～33、65 及び 66 を含む抗体；配列番号 3 を含む、WASp ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 4 を含む、BTK ペプチドに結合する配列番号 34～38、67、及び 68 を含む抗体。

【0108】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、SCID、WAS、及び XLA をスクリーニングし得る：配列番号 1 を含む、CD3 ϵ ペプチドに結合する、配列番号 22～27、63、及び 64 を含む抗体；配列番号 2 を含む、WASp ペプチドに結合する、配列番号 28～33、65 及び 66 を含む抗体；配列番号 4 を含む、BTK ペプチドに結合する、配列番号 34～38、67、及び 68 を含む抗体；ならびに配列番号 5 を含む BTK ペプチドに結合する抗体。

【0109】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、SCID、WAS、及び X

L Aをスクリーニングし得る：配列番号 1 を含む、C D 3 ε ペプチドに結合する、配列番号 2 2 ～ 2 7、6 3、及び 6 4 を含む抗体；配列番号 2 を含む、W A S p ペプチドに結合する、配列番号 2 8 ～ 3 3、6 5 及び 6 6 を含む抗体；ならびに配列番号 4 を含む、B T K ペプチドに結合する、配列番号 3 4 ～ 3 8、6 7、及び 6 8 を含む抗体。

【0110】

特定の実施形態では、配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体を使用して、配列番号 6 を含む C T N S ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1 及び 7 2 を含む抗体は、配列番号 7 及び 8 を含む C T N S ペプチドを濃縮するために使用される。特定の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の C T N S ペプチドを濃縮するために使用される。特定の実施形態では、抗体は、配列番号 1 3 の C T N S ペプチドを濃縮するために使用される。

10

【0111】

特定の実施形態では、配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体を使用して、配列番号 9 を含む S H P K ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、抗体を使用して、配列番号 1 4 の S H P K ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、抗体を使用して、配列番号 1 5 の S H P K ペプチドを濃縮する。

【0112】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、C T N S ペプチドに結合する、配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

20

【0113】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、C T N S ペプチドに結合する、配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する、配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；ならびに配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

30

【0114】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する、配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する、配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

40

【0115】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

【0116】

50

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

50

る抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；ならびに配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0123】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；ならびに配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0124】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；ならびに配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0125】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；ならびに配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0126】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0127】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0128】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0129】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0130】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 7 及び 8 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

【0 1 3 1】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

10

【0 1 3 2】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

20

【0 1 3 3】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

【0 1 3 4】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 1 2 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

30

【0 1 3 5】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む C T N S ペプチドに結合する配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 9 を含む、S H P K ペプチドに結合する配列番号 5 1 ～ 5 6、7 3、及び 7 4 を含む抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

40

【0 1 3 6】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、及び 7 0 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 4 5 ～ 5 0、7 1、及び 7 2 を含む抗体；配列番号 1 3 を含む、C T N S ペプチドに結合する抗体；配列番号 1 4 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 1 5 を含む、S H P K ペプチドに結合する抗体。

【0 1 3 7】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、C T N S ペプチドに結合する配列番号 3 9 ～ 4 4、6 9、

50

及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0138】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

10

【0139】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

【0140】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

20

【0141】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；ならびに配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体。

30

【0142】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；ならびに配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体。

【0143】

当業者は、以下から選択される抗体の他の組み合わせを使用して、シスチン症をスクリーニングし得ることを認識し得る：配列番号 6 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 39～44、69、及び 70 を含む抗体；配列番号 7 及び 8 を含む、CTNS ペプチドに結合する配列番号 45～50、71、及び 72 を含む抗体；配列番号 12 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 13 を含む、CTNS ペプチドに結合する抗体；配列番号 9 を含む、SHPK ペプチドに結合する配列番号 51～56、73、及び 74 を含む抗体；配列番号 14 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 15 を含む、SHPK ペプチドに結合する抗体。

40

【0144】

特定の実施形態では、抗体を使用して、配列番号 10 を含む ATP7B ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、配列番号 57～62、75、及び 76 を含む抗体を使用して、配列番号 11 または 21 を含む ATP7B ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、抗体を使用して、配列番号 16 の ATP7B ペプチドを濃縮する。特定の実施形態では、

50

【 0 1 4 5 】

10

20

30

【 0 1 4 9 】

40

50

【 0 1 5 1 】

10

【 0 1 5 2 】

20

【 0 1 5 3 】

【 0 1 5 4 】

30

【 0 1 5 5 】

40

【 0 1 5 6 】

【 0 1 5 7 】

50

【 0 1 5 8 】

10

【 0 1 5 9 】

20

【 0 1 6 0 】

【 0 1 6 1 】

30

【 0 1 6 2 】

40

【 0 1 6 3 】

【 0 1 6 4 】

50

【 0 1 6 5 】

10

【 0 1 6 6 】

【 0 1 6 7 】

20

【 0 1 6 8 】

30

【 0 1 6 9 】

【 0 1 7 0 】

40

【 0 1 7 1 】

50

；配列番号 16 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 17 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 19 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 21 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体。

【0172】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、WD をスクリーニングし得る：配列番号 10 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 11 または 21 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する配列番号 57 ~ 62、75、及び 76 を含む抗体；配列番号 16 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 17 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 18 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 21 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体。

10

【0173】

特定の実施形態では、以下の抗体の組み合わせを使用して、WD をスクリーニングし得る：配列番号 11 または 21 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する配列番号 57 ~ 62、75、及び 76 を含む抗体；配列番号 16 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 20 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体。

【0174】

当業者は、以下から選択される抗体の他の組み合わせを使用して、WD をスクリーニングし得ることを認識し得る：配列番号 10 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 11 または 21 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する配列番号 57 ~ 62、75、及び 76 を含む抗体；配列番号 16 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 17 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 18 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 19 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；配列番号 20 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体；ならびに配列番号 21 を含む、A T P 7 B ペプチドに結合する抗体。

20

【0175】

本開示の方法は、MS 分析の前にペプチドを分離するために、免疫親和性に富むペプチドに対して必要に応じて液体クロマトグラフィーを実施することを含む。液体クロマトグラフィーは、カラムの移動相及び固定相に対するその重量及び親和性に基づいてペプチドを分離し得る。

【0176】

本開示の方法は、所定のシグネチャーペプチドの量を定量化するために、免疫親和性で濃縮したペプチドに対して SRM-MS または MRM-MS を実行することを含む。特定の実施形態では、SRM-MS または MRM-MS は、上記のように実行される。特定の実施形態において、シグネチャーペプチドの定量化は、既知の量でアッセイに導入される参照ペプチドを使用することを含む。特定の実施形態において、参照ペプチドは、参照ペプチドをシグネチャーペプチドから区別するために、例えば、1 つ以上の重い同位体で示差的に標識されていることを除いて、あらゆる点でシグネチャーペプチドと同一であり得る。

30

【0177】

特定の実施形態では、SRM-MS または MRM-MS は、CD3ε ペプチドの減少または非存在を検出する。特定の実施形態では、CD3ε ペプチドは、配列番号 1 を含む。

40

【0178】

特定の実施形態では、SRM-MS または MRM-MS は、WASP ペプチドの減少または非存在を検出する。特定の実施形態では、WASP ペプチドは、配列番号 2 を含む。特定の実施形態では、WASP ペプチドは、配列番号 3 を含む。

【0179】

特定の実施形態では、SRM-MS または MRM-MS は、BTK ペプチドの減少または非存在を検出する。特定の実施形態では、BTK ペプチドは、配列番号 4 を含む。特定の実施形態では、BTK ペプチドは、配列番号 5 を含む。

【0180】

50

特定の実施形態では、SRM-MSまたはMRM-MSは、CTNSペプチドの減少または非存在を検出する。特定の実施形態では、CTNSペプチドは、配列番号6を含む。特定の実施形態では、CTNSペプチドは、配列番号7及び8を含む。特定の実施形態では、CTNSペプチドは、配列番号12を含む。特定の実施形態では、CTNSペプチドは配列番号13を含む。

【0181】

特定の実施形態では、SRM-MSまたはMRM-MSは、SHPKペプチドの減少または非存在を検出する。特定の実施形態では、SHPKペプチドは、配列番号9を含む。特定の実施形態では、SHPKペプチドは、配列番号14を含む。特定の実施形態では、SHPKペプチドは、配列番号15を含む。

【0182】

特定の実施形態では、SRM-MSまたはMRM-MSは、ATP7Bペプチドの減少または非存在を検出する。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号10を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号11または21を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号16を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号17を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号18を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号19を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号20を含む。特定の実施形態では、ATP7Bペプチドは、配列番号21を含む。

【0183】

特定の実施形態では、予め決定されたカットオフ値が、所定のシグネチャーペプチドの閾値として使用される。閾値を超える所定のシグネチャーペプチドの濃度は、アッセイされたDBSが、SCID、WAS、XLA、シスチン症、またはWDに罹患していない個体由来であることを示す。閾値を下回る、または存在しない所定のシグネチャーペプチドの濃度は、アッセイされたDBSがSCID、WAS、XLA、シスチン症、またはWDに罹患している個体由来であることを示す。特定の実施形態では、この閾値は、正常対照の集団の分析及びこの集団における所定のシグネチャーペプチドの濃度の標準偏差(SD)の計算によって決定し得る。閾値は、所定のシグネチャーペプチドの平均濃度から特定のSDで設定し得る。特定の実施形態では、閾値は、所定のシグネチャーペプチドの平均濃度から-1SD、-1.1SD、-1.2SD、-1.3SD、-1.4SD、-1.5SD、-1.6SD、-1.7SD、-1.8SD、-1.9SD、-2.0SD、-2.1SD、-2.2SD、-2.3SD、-2.4SD、-2.5SD、-2.6SD、-2.7SD、-2.8SD、-2.9SD、-3.0SD、またはそれ以上のSDである。特定の実施形態では、SCID、WAS、XLA、またはシスチン症の診断またはスクリーニングのために、閾値は、正常対照の集団の分析、及びこの集団におけるATP7Bの内因性濃度に対する所定のシグネチャーペプチドの濃度の比の標準偏差(SD)の計算によって決定され得る。各PIDDのペプチド濃度カットオフは、各シグネチャーペプチドの平均濃度またはATP7Bの内因性濃度に対する特定のシグネチャーペプチドの濃度の比率から導出される特定のSDに設定され得る。

【0184】

特定の実施形態において、CD3ε 197ペプチドの閾値濃度は、正常な対照の集団におけるCD3ε 197の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、CD3ε 197ペプチドの閾値濃度は、60 pmol/L以下、55 pmol/L以下、50 pmol/L以下、45 pmol/L以下、40 pmol/L以下、

39 pmol/L以下、38 pmol/L以下、37 pmol/L以下、36 pmol/L以下、35 pmol/L以下、34 pmol/L以下、33 pmol/L以下、32 pmol/L以下、31 pmol/L以下、30 pmol/L以下を含む。

【0185】

特定の実施形態では、WASp 274ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるWASp 274の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、WASp 274ペプチドの閾値濃度としては、220 pmol/L以下、215 pmol/L以下、210 pmol/L以下、205 pmol/L以下、200 pmol/L以下、195 pmol/L以下、190 pmol/L以下、185 pmol/L以下、180 pmol/L以下、175 pmol/L以下、170 pmol/L以下、165 pmol/L以下、160 pmol/L以下、155 pmol/L以下、150 pmol/L以下を含む。

10

【0186】

特定の実施形態では、WASp 289ペプチドの閾値濃度は、正常な対照集団におけるWASp 289の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、WASp 289ペプチドの閾値濃度は、2500 pmol/L以下、2490 pmol/L以下、2480 pmol/L以下、2470 pmol/L以下、2460 pmol/L以下、2450 pmol/L以下、2440 pmol/L以下、2430 pmol/L以下、2420 pmol/L以下、2410 pmol/L以下、2400 pmol/L以下を含む。

20

30

【0187】

特定の実施形態では、BTK 407ペプチドの閾値濃度は、正常な対照集団におけるBTK 407の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、BTK 407ペプチドの閾値濃度としては、80 pmol/L以下、75 pmol/L以下、70 pmol/L以下、65 pmol/L以下、60 pmol/L以下、55 pmol/L以下、50 pmol/L以下、49 pmol/L以下、48 pmol/L以下、47 pmol/L以下、46 pmol/L以下、45 pmol/L以下、44 pmol/L以下、43 pmol/L以下、42 pmol/L以下、41 pmol/L以下、40 pmol/L以下、35 pmol/L以下、30 pmol/L以下を含む。

40

【0188】

特定の実施形態では、BTK 545ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるBTK 545の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-

50

1. 35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、BT K 545ペプチドの閾値濃度としては、110 pmol/L以下、109 pmol/L以下、108 pmol/L以下、107 pmol/L以下、106 pmol/L以下、105 pmol/L以下、104 pmol/L以下、103 pmol/L以下、102 pmol/L以下、101 pmol/L以下、100 pmol/L以下を含む。
【0189】

10

特定の実施形態において、CTNS 115ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるCTNS 115の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、CTNS 115ペプチドの閾値濃度としては、60 pmol/L以下、59 pmol/L以下、58 pmol/L以下、57 pmol/L以下、56 pmol/L以下、55 pmol/L以下、54 pmol/L以下、53 pmol/L以下、52 pmol/L以下、51 pmol/L以下、50 pmol/L以下を含む。
【0190】

20

特定の実施形態において、SHPK 363ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるSHPK 363の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、SHPK 363ペプチドの閾値濃度としては、2000 pmol/L以下、1950 pmol/L以下、1900 pmol/L以下、1850 pmol/L以下、1800 pmol/L以下、1750 pmol/L以下、1700 pmol/L以下、1650 pmol/L以下、1600 pmol/L以下、1550 pmol/L以下、1500 pmol/L以下を含む。
【0191】

30

特定の実施形態において、ATP7B 1056ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるATP7B 1056の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、ATP7B 1056ペプチドの閾値濃度としては、90 pmol/L以下、85 pmol/L以下、80 pmol/L以下、75 pmol/L以下、70 pmol/L以下、65 pmol/L以下、60 pmol/L以下、55 pmol/L以下、50 pmol/L以下、45 pmol/L以下、40 pmol/L以下、35

40

50

pmol/L以下、30 pmol/L以下を含む。

【0192】

特定の実施形態において、ATP7B 214ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるATP7B 214の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、ATP7B 214ペプチドの閾値濃度としては、30 pmol/L以下、29 pmol/L以下、28 pmol/L以下、27 pmol/L以下、26 pmol/L以下、25 pmol/L以下、24 pmol/L以下、23 pmol/L以下、22 pmol/L以下、21 pmol/L以下、20 pmol/L以下を含む。

10

【0193】

特定の実施形態において、ATP7B 887ペプチドの閾値濃度としては、正常な対照集団におけるATP7B 887の平均濃度から-1.0SD、-1.25SD、-1.3SD、-1.35SD、-1.4SD、-1.45SD、-1.5SD、-1.55SD、-1.6SD、-1.65SD、-1.7SD、-1.75SD、-1.8SD、-1.85SD、-1.9SD、-1.95SD、-2.0SD、-2.25SD、-2.3SD、-2.35SD、-2.4SD、-2.45SD、-2.5SD、-2.55SD、-2.6SD、-2.65SD、-2.7SD、-2.75SD、-2.8SD、-2.85SD、-2.9SD、-2.95SD、-3.0SD、またはそれ以上を含む。特定の実施形態では、ATP7B 887ペプチドの閾値濃度としては、190 pmol/L以下、185 pmol/L以下、180 pmol/L以下、175 pmol/L以下、170 pmol/L以下、165 pmol/L以下、160 pmol/L以下、155 pmol/L以下、150 pmol/L以下、145 pmol/L以下、140 pmol/L以下を含む。

20

【0194】

特定の実施形態では、シグネチャーペプチドは、所定の疾患の診断またはスクリーニングのための主要なバイオマーカーと見なしてもよい。一次シグネチャーペプチドには、所定の疾患を診断またはスクリーニングするために最初に使用されるペプチドを含めてもよい。特定の実施形態では、一次マーカーは、対応するタンパク質の消化から再現性よく得ることができ、免疫親和性濃縮のための高親和性抗体を有するか、及び／または独立した液体クロマトグラフィーカラム及び／または質量分析機器にまたがって再現可能である。特定の実施形態では、シグネチャーペプチドは、所定の疾患の診断またはスクリーニングのための二次マーカーと見なしてもよい。二次シグネチャーペプチドは、一次マーカーで所定の疾患の診断またはスクリーニングを確認するために二番目に使用されるペプチドを含んでもよい。特定の実施形態では、BTk 545は、XLAを診断する際のBTk 407の二次マーカーとなり得る。特定の実施形態では、WASP 289は、WASPを診断する際のWASP 274の二次マーカーとなり得る。

30

40

【0195】

特定の実施形態では、本開示の抗体はまた、生化学的結果が曖昧な患者、及び遺伝子検査によって有意性が不明のバリエーションを有する患者について原発性の免疫不全、シスチン症及びWDの診断のための相補的な臨床試験でも使用され得る。

【0196】

本明細書に開示される方法は、本明細書に開示される組成物及び方法による、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDのスクリーニングの結果に基づく対象（例えば、ヒト）の治療を含む。対象の治療には、治療上有効な量の送達が含まれる。治療有効量としては、有効量、予防的処置及び／または治療的処置を提供する量が含まれる。

50

【0197】

「有効量」は、対象において所望の生理学的変化をもたらすのに必要な組成物の量である。例えば、有効量は、症状の緩和、症状の除去、またはSCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／もしくはWDの治療を提供し得る。有効量は研究目的で投与される場合が多い。本明細書に開示される有効量は、疾患の発達、進行、及び／または解消の評価に関連する動物モデルまたはインビトロアッセイにおいて統計的に有意な効果を引き起こし得る。

【0198】

特定の実施形態は、「予防的処置」として組成物を投与することを含み得る。予防的処置としては、その処置が、障害を発症するリスクを軽減または低減する目的で施される、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／もしくはWDの兆候もしくは症状を示さないか、またはSCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／もしくはWDの初期の兆候もしくは症状のみを示す対象に施される処置が含まれる。したがって、予防的処置は、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDに対する予防的処置として機能する。

【0199】

特定の実施形態では、予防的処置は、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDの発症を予防、遅延、または低減し得る。特定の実施形態では、予防的処置は、WAS及びXLAのための抗生物質の使用などの他の予防措置の前に、同時に、または後に行ってもよい。特定の実施形態では、予防的処置は、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDに関連する症状または合併症の重症度を予防または軽減し得る。SCIDの症状及び合併症には、次のようなものが挙げられ得る：成長不全；湿疹のように見える発疹；慢性下痢；再発性の口腔カンジダ；及びニューモシスチス肺炎。WASの症状及び合併症には、以下が挙げられ得る：出血；湿疹；血性下痢；及び再発性感染症。XLAの症状及び合併症には、以下が挙げられ得る：感染；下痢；成長不全；関節疾患；腎炎症；赤血球の分解；ならびに皮膚及び筋肉の炎症。シスチン症の症状及び合併症には以下が挙げられ得る：多尿症；多飲症；脱水；嘔吐；代謝性アシドーシス；低リン酸血症性くる病；便秘；成長障害；発熱の再発発作；熱不耐症；及び食欲不振／食欲減退。WDの症状及び合併症としては、以下が挙げられ得る：疲労；食欲不振または腹痛；黄疸；黄金色の目の変色（カイザー・フライシャーリング）；脚または腹部の水分の蓄積；発話、嚥下または身体的協調の問題；ならびに制御されていない動きまたは筋肉の拘縮。

【0200】

「治療的処置」としては、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDの症状または徴候を示す対象に施され、SCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDの徴候または症状を軽減または排除する目的で対象に施される処置が挙げられる。特定の実施形態では、治療的処置は、SCID、WAS、及び／またはXLAと診断された対象に免疫機能を提供し得る。特定の実施形態では、治療的処置は、シスチン症に罹患している対象の細胞におけるシスチン蓄積を減少し得る。特定の実施形態では、この治療的処置は、WDに罹患している対象の臓器における銅の蓄積を低減し得る。特定の実施形態では、この治療的処置は、上記のようなSCID、WAS、XLA、シスチン症、及び／またはWDの症状及び合併症を低減、制御、または排除し得る。

【0201】

予防的処置及び治療的処置は、相互に排他的である必要はなく、特定の実施形態において、投与された投薬量は、複数の処置タイプを達成し得る。

【0202】

特定の実施形態では、治療有効量は、SCID、WAS、及び／またはXLAを有すると診断された対象に免疫系機能を提供する。したがって、特定の実施形態では、本明細書に開示される処置の方法としては、SCID、WAS、及びXLAなどの障害に対する幹細胞移植、免疫グロブリン注入、抗生物質注入、及び／または遺伝子治療が挙げられる。特定の実施形態では、処置の方法には、SCIDの酵素療法が含まれる。免疫機能の提供

としては、細菌、ウイルス、または寄生虫感染の頻度または数の減少、平均余命の延長、及び／または成長の増大が挙げられる。

【0203】

特定の実施形態において、治療有効量は、シスチン症を有すると診断された対象の細胞におけるシスチンの蓄積を防止する。特定の実施形態では、処置の方法は、シスチン症のためにシステアミンを提供することを含む。特定の実施形態では、システアミンを提供することは、上記のようにシスチン症の症状を軽減または排除する。

【0204】

特定の実施形態において、治療有効量は、WDを有すると診断された対象の器官における銅の蓄積を防止する。特定の実施形態では、処置の方法には、WDのためのD-ペニシラミン、トリエンチン、亜鉛塩、及び／または肝移植が含まれる。特定の実施形態では、臓器における銅の蓄積を防止することは、上記のように、WDの症状を軽減または排除する。

【0205】

特定の実施形態では、治療用組成物の投与は、別個のアジュバントの投与を伴ってもよい。例示的なアジュバントとしては、ミョウバン、ベントナイト、ラテックス、及びアクリル粒子；不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント；水酸化アルミニウムなどのアルミニウムベースの塩；カルシウムベースの塩；シリカまたは任意のTLR生物学的リガンド（複数可）；シグマアジュバントシステム（Sigma Adjuvant System）（SAS）；Ribiアジュバントが挙げられる。

【0206】

投与について、治療有効量（本明細書では用量とも呼ばれる）は、インビトロアッセイ及び／または動物モデル研究からの結果に基づいて最初に推定され得る。そのような情報は、目的の対象における有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。特定の対象に投与される実際の投与量は、標的、体重、状態の重症度、以前または同時の治療的介入、対象の突発性疾患及び投与経路を含む物理的及び生理学的要因などのパラメーターを考慮して、医師、獣医または研究者によって決定され得る。

【0207】

治療上有効な量の細胞は、 10^4 細胞/kg～ 10^9 細胞/kgの範囲であり得る。特定の実施形態では、治療有効量の細胞としては、 10^4 細胞/kg、 10^5 細胞/kg、 10^6 細胞/kg、 10^7 細胞/kg、 10^8 細胞/kg、 10^9 細胞/kg、またはそれ以上を含んでもよい。

【0208】

有用な用量は、 $0.1 \sim 5 \mu\text{g/kg}$ または $0.5 \sim 1 \mu\text{g/kg}$ の範囲であり得る。特定の実施形態では、用量としては、 $1 \mu\text{g/kg}$ 、 $15 \mu\text{g/kg}$ 、 $30 \mu\text{g/kg}$ 、 $50 \mu\text{g/kg}$ 、 $55 \mu\text{g/kg}$ 、 $70 \mu\text{g/kg}$ 、 $90 \mu\text{g/kg}$ 、 $150 \mu\text{g/kg}$ 、 $350 \mu\text{g/kg}$ 、 $500 \mu\text{g/kg}$ 、 $750 \mu\text{g/kg}$ 、 $1000 \mu\text{g/kg}$ 、 $0.1 \sim 5 \text{mg/kg}$ 、または $0.5 \sim 1 \text{mg/kg}$ を含み得る。特定の実施形態では、用量としては、 1mg/kg 、 10mg/kg 、 30mg/kg 、 50mg/kg 、 70mg/kg 、 100mg/kg 、 300mg/kg 、 500mg/kg 、 700mg/kg 、 1000mg/kg 以上を含み得る。

【0209】

治療有効量は、治療レジメンの過程に単回または複数回投与することによって達成され得る（例えば、毎日、隔日、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月、2か月ごと、3か月ごと、4か月ごと、5か月ごと、6か月ごと、7か月ごと、8か月ごと、9か月ごと、10か月ごと、11か月ごと、または毎年）。

【0210】

（IX）キット。先天性障害を試験するためのキットも提供されている。キットには、血液を刺すためのランセット、血液滴を収集するためのフィルターカード、DBSを可溶化するための溶液、ならびにDBS内のマーカータンパク質を消化するための適切な緩衝

10

20

30

40

50

液及び酵素を備え得る。キットは、CD3ε、WASp、BTK、CTNS、SHPK及び／またはATP7Bの非存在または減少を評価するための抗ペプチド結合剤（例えば、抗体）及び／または試薬または供給品を含む1つ以上の容器をさらに備えてもよい。特定の実施形態では、このキットは、以下の抗ペプチド抗体を含む1つ以上の容器を備える：抗CD3ε 197、抗WASp 274、抗WASp 289、抗BTK 407、抗BTK 545、抗CTNS 115、抗CTNS 120、抗CTNS 194、抗CTNS 360、抗SHPK 44、抗SHPK 363、抗SHPK 388、抗ATP7B 214、抗ATP7B 325、抗ATP7B 466、抗ATP7B 589、抗ATP7B 621、抗ATP7B 887、抗ATP7B 1056、及び／または抗ATP7B 1061。抗体は、カラムまたはビーズなどの固体支持体に固定してもよい。キットには、抗体からペプチドを放出するための溶出緩衝液をさらに備えてもよい。特定の実施形態では、キットは、シグネチャーペプチドの絶対定量化を実行するために、1つ以上の標識された参照ペプチドを備えてもよい。特定の実施形態では、キットはまた、ガーゼ、滅菌接着ストリップ、手袋、チューブなどのような、キットを効果的に使用するために必要な必須の実験室及び／または医療用品のいくつかまたは全てを備えてもよい。本明細書に記載されているキットのいずれの内容にも変更を加えてもよい。

【0211】

キットの構成要素は、保管及び後で使用するために調製し得る。そのような容器（複数可）に関連するのは、キットの製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知であり得、この通知は、必要に応じて、製造、使用、または販売の機関による承認を反映する。

【0212】

必要に応じて、キットは、この方法においてキットを使用するための説明書をさらに含む。様々な実施形態において、この説明書は、このキットの使用に関連する結果を解釈するための適切な指示；関連する廃棄物の適切な処分；などを含んでもよい。この説明書は、キット内で提供される印刷された説明書の形態であってもよいし、またはこの説明書はキット自体の一部に印刷されてもよい。説明書は、シート、パンフレット、小冊子、CD-ROM、もしくはコンピューターで読み取り可能なデバイスの形式である場合もあれば、Webサイトなどの離れた場所にある説明書への指示を提供する場合もある。

【0213】

本明細書に開示及び言及される配列のバリエーションも含まれる。生物学的活性を損なうことなくどのアミノ酸残基を置換、挿入、または削除できるかを決定する際のガイダンスは、DNASTAR（商標）（Madison, Wisconsin）ソフトウェアなどの当該技術分野で周知のコンピュータープログラムを使用して見出され得る。好ましくは、本明細書に開示されるタンパク質バリエーションにおけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電されたアミノ酸または非荷電アミノ酸の置換である。保守的なアミノ酸の変更には、側鎖に関連するアミノ酸ファミリーの1つの置換が含まれる。

【0214】

ペプチドまたはタンパク質において、アミノ酸の適切な保存的置換は、当該技術分野の当業者に公知であり、一般に、得られる分子の生物学的活性を変えずに行ってもよい。この分野の当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は、生物学的活性を実質的に変化させないことを認識している（例えば、Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照のこと）。天然に存在するアミノ酸は、一般的に次のように保存的置換ファミリーに分類される：グループ1：アラニン（Ala）、グリシン（Gly）、セリン（Ser）、及びスレオニン（Thr）；グループ2：（酸性）：アスパラギン酸（Asp）、及びグルタミン酸（Glu）；グループ3：（酸性；極性の負に荷電した残基及びそれらのアミドとしても分類される）：アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、Asp、及びGlu；グループ4：Gln及びAsn；グループ5：（塩基性；極性の正に

荷電した残基としても分類される) : アルギニン (Arg)、リジン (Lys)、及びヒスチジン (His) ; グループ6 (大きな脂肪族、非極性残基) : イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)、バリン (Val)、及びシステイン (Cys) ; グループ7 (非荷電極性) : チロシン (Tyr)、Gly、Asn、Gln、Cys、Ser、及びThr ; グループ8 (大きな芳香族残基) : フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、及びTyr ; グループ9 (非極性) : プロリン (Pro)、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Met、及びTrp ; グループ11 (脂肪族) : Gly、Ala、Val、Leu、及びIle ; グループ10 (小さな脂肪族、非極性、またはわずかに極性の残基) : Ala、Ser、Thr、Pro、及びGly ; ならびにグループ12 (硫黄含有) : Met及びCys。追加情報は、Creighton (1984) Proteins, W. H. Freeman and Companyに見出され得る。

10

【0215】

そのような変更を行う際に、アミノ酸のハイドロパシー指数を考慮し得る。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する際のハイドロパシーアミノ酸インデックスの重要性は、当該技術分野で一般的に理解されている (Kyte and Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157 (1), 105-32)。各アミノ酸には、その疎水性及び電荷特徴に基づいてハイドロパシーインデックスが割り当てられている (Kyte and Doolittle, 1982)。これらの値は次のとおりである。Ile (+4.5) ; Val (+4.2) ; Leu (+3.8) ; Phe (+2.8) ; Cys (+2.5) ; Met (+1.9) ; Ala (+1.8) ; Gly (-0.4) ; Thr (-0.7) ; Ser (-0.8) ; Trp (-0.9) ; Tyr (-1.3) ; Pro (-1.6) ; His (-3.2) ; グルタミン酸塩 (-3.5) ; Gln (-3.5) ; アスパラギン酸塩 (-3.5) ; Asn (-3.5) ; Lys (-3.9) ; 及びArg (-4.5)。

20

【0216】

特定のアミノ酸が、同様のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換され得、それでも同様の生物学的活性を有するタンパク質をもたらし得る、すなわち、生物学的に機能的に同等のタンパク質を依然として得ることが当該技術分野で公知である。このような変更を行う際には、ハイドロパシー指数が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、±0.5以内のアミノ酸の置換がさらに特に好ましい。同様のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて効果的に行うことができることも当該技術分野で理解されている。

30

【0217】

米国特許第4,554,101号に詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている : Arg (+3.0) ; Lys (+3.0) ; アスパラギン酸塩 (+3.0±1) ; グルタミン酸塩 (+3.0±1) ; Ser (+0.3) ; Asn (+0.2) ; Gln (+0.2) ; Gly (0) ; Thr (-0.4) ; Pro (-0.5±1) ; Ala (-0.5) ; His (-0.5) ; Cys (-1.0) ; Met (-1.3) ; Val (-1.5) ; Leu (-1.8) ; Ile (-1.8) ; Tyr (-2.3) ; Phe (-2.5) ; Trp (-3.4)。アミノ酸は、同様の親水性値を有する別のアミノ酸で置換されてもよく、それでも生物学的に同等の、特に免疫学的に同等のタンパク質を得ることができることが理解される。そのような変化において、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内のものが特に好ましく、そして±0.5内のものがさらに特に好ましい。

40

【0218】

上記で概説したように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づき得る。

【0219】

他の場所で示されるように、遺伝子配列のバリエーションとしては、コドン最適化バリエーション

50

ト、配列多型、スプライスバリエント、及び／またはコード化産物の機能に統計的に有意な程度に影響を及ぼさない突然変異が挙げられる。

【0220】

本明細書に開示されるタンパク質、核酸、及び遺伝子配列のバリエントとしてはまた、本明細書に開示されるタンパク質、核酸、または遺伝子配列に対して、少なくとも70%の配列同一性、80%の配列同一性、85%の配列同一性、90%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を有する配列も挙げられる。

【0221】

「%配列同一性」とは、配列を比較することによって決定される、2つ以上の配列間の関係を指す。当該技術分野において、「同一性」はまた、そのような配列のストリング間の一致によって決定される、タンパク質、核酸、または遺伝子配列間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」（しばしば「類似性」と呼ばれる）は、以下に記載されているものを含む（ただしこれらに限定されない）公知の方法によって容易に計算され得る：Computational Molecular Biology (Lesk, AM., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., 及び Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987); 及び Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. 及び Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992)。同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列の間の最適適合を得るように設計される。同一性及び類似性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムに体系化されている。配列アラインメント及びパーセント同一性計算は、LASERGENE バイオインフォマティクスコンピューティングスイート (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) の Megalign プログラムを使用して実行され得る。配列のマルチプルアラインメントは、Clustal のアラインメント方法 (Higgins and Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989)) をデフォルトのパラメーター (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10) で使用しても実行され得る。関連するプログラムとしてはまた、プログラムの GCG スイート (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); 及び Smith-Waterman アルゴリズムを組み込んだ FASTA プログラム (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandoz. Publisher: Plenum, New York, N. Y.)。この開示の文脈内で、配列分析ソフトウェアが分析に使用される場合、分析の結果は、参照されるプログラムの「デフォルト値」に基づいていることが理解されよう。本明細書で使用される「デフォルト値」とは、元々最初に初期化されたときソフトウェアをロードする任意の設定の値またはパラメーターを意味する。

【0222】

バリエントはまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本明細書に開示される配列にハイブリダイズし、参照配列と同じ機能を提供する核酸分子を含む。例示

10

20

30

40

50

的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、50%ホルムアミド、5X SSC (750mMのNaCl、75mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、及び20 µg / mlの変性、剪断されたサーモン精子DNAを含む溶液中で42℃で一晩インキュベートすること、その後、50℃で0.1X SSCでフィルターを洗浄することを含む。ハイブリダイゼーション及びシグナル検出のストリンジェンシーの変化は、主にホルムアミド濃度 (ホルムアミドの割合が低いとストリンジェンシーが低下する) ; 塩の状態、または温度の操作によって達成される。例えば、適度に高いストリンジェンシー条件には、6X SSPE (20X SSPE = 3M NaCl ; 0.2MのNaH₂PO₄ ; 0.02MのEDTA、pH 7.4)、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100 µg / mlサケ精子ブロックDNAを含む溶液中で、37℃で一晩インキュベートすること ; その後、1X SSPE、0.1% SDSで、50℃で洗浄することを含む。さらに、より低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジェントなハイブリダイゼーションに続いて実行される洗浄は、より高い塩濃度 (例えば、5X SSC)で行ってもよい。上記の条件の変化は、ハイブリダイゼーション実験でバックグラウンドを抑制するために使用される代替のブロッキング試薬の包含及び／または置換によって達成され得る。典型的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNA、及び市販の独自の製剤が挙げられる。特定のブロッキング試薬を含めるには、適合性の問題に起因して、上記のハイブリダイゼーション条件の変更が必要になる場合がある。

【0223】

(X) 例示的な実施形態。

1. 対象における重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、及び／またはX連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) をスクリーニングする方法であって、前記方法は、

対象に由来する乾燥血液スポット (DBS) 試料を取得することと ;

DBSの血液由来のタンパク質を酵素で消化して1つ以上のペプチドを生成することと ; 濃縮することであって、以下 :

SCIDのCD3εシグネチャーペプチドを、前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて ;

WASの第1のWAS pシグネチャーペプチドを、前記第1のWAS pシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて ;

WASの第2のWAS pシグネチャーペプチドを、前記第2のWAS pシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて ;

XLAの第1のBT Kシグネチャーペプチドを、前記第1のBT Kシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて ; 及び／あるいは

第2のBT Kシグネチャーペプチドを、前記第2のBT Kシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて ;

前記濃縮 (富化) することと ;

前記濃縮ペプチドに対して液体クロマトグラフィー-多重反応モニタリング質量分析 (LC-MRM-MS) を実行して、ペプチドの濃度を決定することと ;

対象を診断することであって、以下 :

前記CD3εシグネチャーペプチドの濃度が所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記CD3εシグネチャーペプチドが存在しない場合は、SCID ;

前記第1及び／または第2のWAS pシグネチャーペプチドの濃度が対応する所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記第1及び／または第2のWAS pシグネチャーペプチドが存在しない場合は、WAS ; ならびに／あるいは

前記第1及び／または第2のBT Kシグネチャーペプチドの濃度が対応する所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記第1及び／または第2のBT Kシグネチャーペプチドが存在しない場合は、XLA、

を有すると対象を前記診断することと、を含む。

【0224】

2. 実施形態1の方法であって、ここで、
前記SCIDのCD3εシグネチャーペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列によってコードされ；

WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列によってコードされ；

WASの前記第2のWASPシグネチャーペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列によってコードされ；

XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列によってコードされているか；及び／または

XLAの前記第2のBTKシグネチャーペプチドが、配列番号5に記載のアミノ酸配列によってコードされる、前記方法。

10

【0225】

3. 実施形態1または2に記載の方法であって、

前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号22のCDR1、配列番号23のCDR2、及び配列番号24のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号25のCDR1、配列番号26のCDR2、及び配列番号27のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号28のCDR1、配列番号29のCDR2、及び配列番号30のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号31のCDR1、配列番号32のCDR2、及び配列番号33のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；
ならびに／あるいは

20

前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列GDIのCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、及び配列番号38のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、
前記方法。

【0226】

4. 実施形態1～3のいずれか1項に記載の方法であって、フェニルケトン尿症、原発性先天性甲状腺機能低下症、嚢胞性線維症、及び鎌状赤血球症の1つ以上について対象をさらにスクリーニングする、新生児スクリーニング(NBS)の一部として実施される、
前記方法。

30

【0227】

5. 前記対象において、SCID、WAS、及び／またはXLAの臨床症状がない状態で実施される、実施形態1～4のいずれか1項に記載の方法。

【0228】

6. 前記酵素がトリプシンである、実施形態1～5のいずれか1項に記載の方法。

【0229】

7. 各シグネチャーペプチドの前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団由来のDBS中の各シグネチャーペプチドの平均濃度の標準偏差から計算される、実施形態1～6のいずれか1項に記載の方法。

40

【0230】

8. 前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団由来のDBSにおける各シグネチャーペプチドの平均濃度から-1標準偏差(SD)、-1.1SD、-1.2SD、-1.3SD、-1.4SD、-1.5SD、-1.6SD、-1.7SD、-1.8SD、-1.9SD、-2.0SD、-2.1SD、-2.2SD、-2.3SD、-2.4SD、-2.5SD、-2.6SD、-2.7SD、-2.8SD、-2.9SD、-3.0SD、またはそれ以上のSDである、実施形態1～7のいずれか1項に記載の方法。

50

【0231】

9. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドの濃縮に使用される抗前記体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号63のVHドメインを含む、実施形態1～8のいずれか1項に記載の方法。

【0232】

10. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号64のVLドメインを含む、実施形態1～9のいずれか1項に記載の方法。

【0233】

11. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号65のVHドメインを含む、実施形態1～10のいずれか1項に記載の方法。

10

【0234】

12. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号66のVLドメインを含む、実施形態1～11のいずれか1項に記載の方法。

【0235】

13. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号86の重鎖を含む、実施形態1～12のいずれか1項に記載の方法。

20

【0236】

14. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号91の軽鎖を含む、実施形態1～13のいずれか1項に記載の方法。

【0237】

15. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号67のVHドメインを含む、実施形態1～14のいずれか1項に記載の方法。

【0238】

16. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号68のVLドメインを含む、実施形態1～15のいずれか1項に記載の方法。

30

【0239】

17. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号96の重鎖を含む、実施形態1～16のいずれか1項に記載の方法。

【0240】

18. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号101の軽鎖を含む、実施形態1～17のいずれか1項に記載の方法。

40

【0241】

19. 実施形態1～18のいずれか1項に記載の方法であって、濃縮することであって、以下：

シスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第3のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第3のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第4のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第4のCTNSシグネチャー

50

ーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第2のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第2のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／あるいは

シスチン症の第3のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第3のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

前記濃縮することによって、シスチン症のスクリーニングすることと；

前記第1のCTNS、前記第2のCTNS、前記第3のCTNS、前記第4のCTNS、前記第1のSHPK、前記第2のSHPK、及び／もしくは前記第3のSHPKシグネチャーペプチドの濃度が、対応する所定の閾値濃度よりも低い場合、または前記第1のCTNS、前記第2のCTNS、前記第3のCTNS、前記第4のCTNS、前記第1のSHPK、前記第2のSHPK、及び／もしくは前記第3のSHPKシグネチャーペプチドが存在しない場合、シスチン症を有すると対象を診断することと、

をさらに含む、前記方法。

【0242】

20．実施形態19に記載の方法であって、ここで、

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号6に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号7または8に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第3のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号12に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第4のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号13に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号9に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第2のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号14に記載のアミノ酸配列によってコードされており、及び／または

シスチン症の前記第3のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号15に記載のアミノ酸配列によってコードされている、方法。

【0243】

21．実施形態19または20の方法であって、

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含み；

前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含み；ならびに／あるいは

前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、前記方法。

【0244】

22．シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記

抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 69 の V H ドメインを含む、実施形態 19～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0245】

23．シスチン症の前記第 1 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 70 の V L ドメインを含む、実施形態 19～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0246】

24．シスチン症の前記第 1 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 106 の重鎖を含む、実施形態 19～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0247】

25．シスチン症の前記第 1 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 111 の軽鎖を含む、実施形態 19～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0248】

26．シスチン症の前記第 2 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 71 の V H ドメインを含む、実施形態 19～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0249】

27．シスチン症の前記第 2 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 72 の V L ドメインを含む、実施形態 19～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0250】

28．シスチン症の前記第 2 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 116 の重鎖を含む、実施形態 19～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0251】

29．シスチン症の前記第 2 の C T N S シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 121 の軽鎖を含む、実施形態 19～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0252】

30．シスチン症の前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 73 の V H ドメインを含む、実施形態 19～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0253】

31．シスチン症の前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 74 の V L ドメインを含む、実施形態 19～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0254】

32．シスチン症の前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 126 の重鎖を含む、実施形態 19～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0255】

33．シスチン症の前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 131 の軽鎖を含む、実施形態 19～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0256】

34．実施形態 1～33 のいずれか 1 項に記載の方法であって、濃縮することであって、以下：

第 1 の A T P 7 B シグネチャーペプチドを、前記第 1 の A T P 7 B シグネチャーペプチ

10

20

30

40

50

ドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第2のA T P 7 Bシグネチャーペプチドを、前記第2のA T P 7 Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第3のA T P 7 Bシグネチャーペプチドを、前記第3のA T P 7 Bシグネチャーペプチドに結合する抗体または抗原結合フラグメントを用いて；

第4のA T P 7 Bシグネチャーペプチドを、前記第4のA T P 7 Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第5のA T P 7 Bシグネチャーペプチドを、前記第5のA T P 7 Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第6のA T P 7 Bシグネチャーペプチドを、前記第6のA T P 7 Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；ならびに／あるいは

第7のA T P 7 Bシグネチャーペプチドを、抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、

前記濃縮することによってウィルソン病（WD）をスクリーニングすることと；

前記第1のA T P 7 B、前記第2のA T P 7 B、前記第3のA T P 7 B、前記第4のA T P 7 B、前記第5のA T P 7 B、前記第6のA T P 7 B、及び／または前記第7のA T P 7 Bシグネチャーペプチドの濃度が対応する所定の閾値濃度よりも低い場合、あるいは前記第1のA T P 7 B、前記第2のA T P 7 B、前記第3のA T P 7 B、前記第4のA T P 7 B、前記第5のA T P 7 B、前記第6のA T P 7 B、及び／または前記第7のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが存在しない場合、WDを有すると対象を診断することと、
をさらに含む、前記方法。

【0257】

35．実施形態34の方法であって、ここで、

WDの前記第1のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号10に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第2のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号11または21に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第3のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号16に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第4のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号17に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第5のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号18に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第6のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号19に記載のアミノ酸配列によってコードされており、及び／または

WDの前記第7のA T P 7 Bシグネチャーペプチドが、配列番号20に記載のアミノ酸配列によってコードされる、
前記方法。

【0258】

36．実施形態34または35の方法であって、前記第2のA T P 7 Bシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、
前記方法。

【0259】

37．WDの前記第2のA T P 7 Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号75のVHドメインを含む、実施形態34～36のいずれか1項に記載の方法。

【0260】

38. WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号76のVLDメインを含む、実施形態34～37のいずれか1項に記載の方法。

【0261】

39. WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号136の重鎖を含む、実施形態34～38のいずれか1項に記載の方法。

【0262】

40. WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号141の軽鎖を含む、実施形態34～39のいずれか1項に記載の方法。

【0263】

41. 前記ペプチドの前記濃度が、LC-MRM-MSの前に添加された対応する既知の濃度の参照シグネチャーペプチドから決定される、実施形態1～40のいずれか1項に記載の方法。

【0264】

42. 正常な対照対象の集団由来のDBS中の前記CD3 α シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、70 pmol/L～400 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～41のいずれか1項に記載の方法。

【0265】

43. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第1のWASPシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、600 pmol/L～5000 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～42のいずれか1項に記載の方法。

【0266】

44. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第2のWASPシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、5500 pmol/L～15000 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～43のいずれか1項に記載の方法。

【0267】

45. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第1のBTkシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、350 pmol/L～2500 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～44のいずれか1項に記載の方法。

【0268】

46. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第2のBTkシグネチャーペプチドの前記平均濃度が550 pmol/L～1600 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～45のいずれか1項に記載の方法。

【0269】

47. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、40 pmol/L～250 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～46のいずれか1項に記載の方法。

【0270】

48. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、100 pmol/L～8000 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～47のいずれか1項に記載の方法。

【0271】

49. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、90 pmol/L～400 pmol/Lの範囲の濃度を含む、実施形態7～48のいずれか1項に記載の方法。

【0272】

50. 正常な対照対象の集団由来のDBSにおける前記第3のATP7Bシグネチャーペプチドの前記平均濃度が、30 pmol/L～100 pmol/Lの範囲の濃度を含む

10

20

30

40

50

、実施形態 7～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0273】

51. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第 7 の ATP7B シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 200 pmol/L ～ 500 pmol/L の範囲の濃度を含む、実施形態 7～50 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0274】

52. 重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、及び／または X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) を対象においてスクリーニングする方法であって；

前記対象に由来する乾燥血液スポット (DBS) 試料を取得することと；

前記 DBS の血液由来のタンパク質を酵素で消化して 1 つ以上のペプチドを生成することと；

濃縮することであって、以下：

SCID の CD3ε シグネチャーペプチドを、前記 CD3ε シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

WAS の第 1 の WAS p シグネチャーペプチドを、前記第 1 の WAS p シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

WAS の第 2 の WAS p シグネチャーペプチドを、第 2 の WAS p シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

XLA の第 1 の BTK シグネチャーペプチドを、前記第 1 の BTK シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／あるいは

第 2 の BTK シグネチャーペプチドを、前記第 2 の BTK シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

前記濃縮 (富化) することと；

内因性 ATP7B ペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて前記内因性 ATP7B ペプチドを濃縮することと；

前記濃縮ペプチドに対して液体クロマトグラフィー-多重反応モニタリング質量分析 (LC-MRM-MS) を実行して、前記ペプチドの濃度を決定することと；

シグネチャーペプチド濃度：内因性 ATP7B ペプチド濃度の比率を各シグネチャーペプチドに関して計算することと；

前記対象を、以下：

CD3ε シグネチャーペプチド濃度：内因性 ATP7B ペプチド濃度の前記比が、対応する所定の閾値比よりも低い場合、または前記 CD3ε シグネチャーペプチドが存在しない場合は、SCID；

前記第 1 及び／または第 2 の WAS p シグネチャーペプチド濃度：内因性 ATP7B ペプチド濃度の比が、対応する所定の閾値比よりも低い場合、または前記第 1 及び／または第 2 の WAS p シグネチャーペプチドが存在しない場合は、WAS；ならびに／あるいは

前記第 1 及び／または第 2 の BTK シグネチャーペプチド濃度：内因性 ATP7B ペプチド濃度の比が、対応する所定の閾値比よりも低い場合、または前記第 1 及び／または第 2 の BTK シグネチャーペプチドが存在しない場合は、XLA、

を有すると診断することと、

を含む、前記方法。

【0275】

53. 実施形態 52 に記載の方法であって、ここで、

SCID の前記 CD3ε シグネチャーペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WAS の前記第 1 の WAS p シグネチャーペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WAS の前記第 2 の WAS p シグネチャーペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

10

20

30

40

50

X L Aの前記第1のB T Kシグネチャーペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列によってコードされており、及び／または

X L Aの前記第2のB T Kシグネチャーペプチドが、配列番号5に記載のアミノ酸配列によってコードされている、前記方法。

【0276】

54．実施形態52または53の方法であって、ここで、

前記C D 3 εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントは：配列番号22のC D R 1、配列番号23のC D R 2、及び配列番号24のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに、配列番号25のC D R 1、配列番号26のC D R 2、及び配列番号27のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含み；

前記第1のW A S pシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号28のC D R 1、配列番号29のC D R 2、及び配列番号30のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号31のC D R 1、配列番号32のC D R 2、及び配列番号33のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含み、及び／または

前記第1のB T Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号34のC D R 1、配列番号35のC D R 2、及び配列G D IのC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号36のC D R 1、配列番号37のC D R 2、及び配列番号38のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、前記方法。

【0277】

55．前記内因性A T P 7 Bペプチドが、配列番号10、配列番号11、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、または配列番号21に記載のアミノ酸配列によってコードされる、実施形態42～44のいずれか1項に記載の方法。

【0278】

56．実施形態42～45のいずれか1項に記載の方法であって、前記内因性A T P 7 Bペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが以下：配列番号57のC D R 1、配列番号58のC D R 2、及び配列番号59のC D R 3を含む重鎖可変（V H）ドメイン、ならびに配列番号60のC D R 1、配列番号61のC D R 2、及び配列番号62のC D R 3を含む軽鎖可変（V L）ドメインを含む、前記方法。

【0279】

57．各所定の閾値比が、試料の集団における各ペプチド濃度：内因性A T P 7 Bペプチド濃度の前記平均比の前記標準偏差から計算される、実施形態52～56のいずれか1項に記載の方法。

【0280】

58．実施形態52～57のいずれか1項に記載の方法であって、フェニルケトン尿症、原発性先天性甲状腺機能低下症、嚢胞性線維症、及び鎌状赤血球症の1つ以上について対象をさらにスクリーニングする新生児スクリーニング（N B S）の一部として実施される、前記方法。

【0281】

59．対象において、S C I D、W A S、及び／またはX L Aの臨床症状がない状態で前記方法が実施される、実施形態52～58のいずれか1項に記載の方法。

【0282】

60．前記酵素がトリプシンである、実施形態52～59のいずれか1項に記載の方法。

【0283】

61．S C I Dの前記C D 3 εシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号63のV Hドメインを含む、実施形態52～60のいずれか1項に記載の方法。

【0284】

62. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号64のVLドメインを含む、実施形態52～61のいずれか1項に記載の方法。

【0285】

63. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号65のVHドメインを含む、実施形態52～62のいずれか1項に記載の方法。

【0286】

64. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号66のVLドメインを含む、実施形態52～63のいずれか1項に記載の方法。

【0287】

65. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号86の重鎖を含む、実施形態52～64のいずれか1項に記載の方法。

【0288】

66. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号91の軽鎖を含む、実施形態52～65のいずれか1項に記載の方法。

【0289】

67. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号67のVHドメインを含む、実施形態52～66のいずれか1項に記載の方法。

【0290】

68. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号68のVLドメインを含む、実施形態52～67のいずれか1項に記載の方法。

【0291】

69. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号96の重鎖を含む、実施形態52～68のいずれか1項に記載の方法。

【0292】

70. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号101の軽鎖を含む、実施形態52～69のいずれか1項に記載の方法。

【0293】

71. 実施形態52～70のいずれか1項に記載の方法であって、濃縮することであって、以下：

シスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第3のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第3のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第4のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第4のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第2のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第2のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／または

10

20

30

40

50

シスチン症の第3のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第3のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、前記濃縮することによって、シスチン症をスクリーニングすることと；

シグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率を各シグネチャーペプチドについて計算することと；

前記対象を診断することであって、前記第1のCTNSペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度、前記第2のCTNSペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度、前記第3のCTNSペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度、前記第4のCTNSペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度、前記第1のSHPKペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度、前記第2のSHPKペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度、及び／または前記第3のSHPKシグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比が、対応する所定の閾値比よりも低い場合、あるいは前記第1のCTNS、前記第2のCTNS、前記第3のCTNS、前記第4のCTNS、前記第1のSHPK、前記第2のSHPK、及び／または前記第3のSHPKシグネチャーペプチドが存在しない場合、シスチン症を有すると前記対象を前記診断することと、をさらに含む、前記方法。

【0294】

72. 実施形態71に記載の方法であって、ここで、

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号6に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号7または8に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第3のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号12に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第4のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号13に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号9に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第2のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号14に記載のアミノ酸配列によってコードされており；及び／または

シスチン症の前記第3のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号15に記載のアミノ酸配列によってコードされている、前記方法。

【0295】

73. 実施形態71または72に記載の方法であって、ここで、

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含み；

前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含み、ならびに／あるいは

前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、前記方法。

【0296】

74. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号69のVHドメインを含む、実施形態71～73のいずれか1項に記載の方法。

【0297】

75. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号70のVLドメインを含む、実施形態71～74のいずれか1項に記載の方法。

【0298】

76. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号106の重鎖を含む、実施形態71～75のいずれか1項に記載の方法。

【0299】

77. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号111の軽鎖を含む、実施形態71～76のいずれか1項に記載の方法。

【0300】

78. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号71のVHドメインを含む、実施形態71～77のいずれか1項に記載の方法。

【0301】

79. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号72のVLドメインを含む、実施形態71～78のいずれか1項に記載の方法。

【0302】

80. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号116の重鎖を含む、実施形態71～79のいずれか1項に記載の方法。

【0303】

81. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号121の軽鎖を含む、実施形態71～80のいずれか1項に記載の方法。

【0304】

82. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号73のVHドメインを含む、実施形態71～81のいずれか1項に記載の方法。

【0305】

83. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号74のVLドメインを含む、実施形態71～82のいずれか1項に記載の方法。

【0306】

84. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号126の重鎖を含む、実施形態71～83のいずれか1項に記載の方法。

【0307】

85. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号131の軽鎖を含む、実施形態71～84のいずれか1項に記載の方法。

【0308】

86. 前記内因性ATP7Bペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号75のVHドメインを含む、実施形態52～85のいずれか1

10

20

30

40

50

項に記載の方法。

【0309】

87. 前記内因性 ATP7B シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 76 の VLD メインを含む、実施形態 52～86 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0310】

88. 前記内因性 ATP7B シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 136 の重鎖を含む、実施形態 52～87 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0311】

89. 前記内因性 ATP7B シグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 141 の軽鎖を含む、実施形態 52～88 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0312】

90. 前記ペプチドの前記濃度が、LC-MRM-MS の前に添加された、参照シグネチャーペプチドの対応する既知の濃度から決定される、実施形態 52～89 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0313】

91. 重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、及び／または X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) の 1 つ以上のシグネチャーペプチドを 1 つ以上の乾燥血液スポット (DBS) 試料中で検出する方法であって、以下：
前記 1 つ以上の乾燥血液スポット (DBS) 試料を取得することと；

各 DBS の血液由来のタンパク質を酵素で消化して、1 つ以上のペプチドを生成することと；

濃縮することであって、以下：

SCID の CD3ε シグネチャーペプチドを、前記 CD3ε シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

WAS の第 1 の WAS p シグネチャーペプチドを、前記第 1 の WAS p シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

WAS の第 2 の WAS p シグネチャーペプチドを、前記第 2 の WAS p シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

XLA の第 1 の BTK シグネチャーペプチドを、前記第 1 の BTK シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、及び／あるいは

第 2 の BTK シグネチャーペプチドを、前記第 2 の BTK シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、前記濃縮することと；

前記濃縮されたペプチドに対して液体クロマトグラフィー-多重反応モニタリング質量分析 (LC-MRM-MS) を実行して、前記ペプチドの濃度を決定することと；

前記濃縮されたペプチドに対して液体クロマトグラフィー-多重反応モニタリング質量分析 (LC-MRM-MS) を実行して、1 つ以上の DBS 試料で SCID、WAS、及び XLA のうち 1 つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと、
を含む、前記方法。

【0314】

92. 実施形態 91 の方法であって、ここで、

SCID の前記 CD3ε シグネチャーペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WAS の前記第 1 の WAS p シグネチャーペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WAS の前記第 2 の WAS p シグネチャーペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

XLA の前記第 1 の BTK シグネチャーペプチドが、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

によってコードされており、及び／または

X L Aの前記第2のB T Kシグネチャーペプチドが、配列番号5に記載のアミノ酸配列によってコードされている、

前記方法。

【0315】

93. 実施形態91または92の方法であって、ここで、

前記C D 3 εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号22のC D R 1、配列番号23のC D R 2、及び配列番号24のC D R 3を含む重鎖可変(V H)ドメイン、ならびに配列番号25のC D R 1、配列番号26のC D R 2、及び配列番号27のC D R 3を含む軽鎖可変(V L)ドメインを含み；

前記第1のW A S pシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号28のC D R 1、配列番号29のC D R 2、及び配列番号30のC D R 3を含む重鎖可変(V H)ドメイン、ならびに配列番号31のC D R 1、配列番号32のC D R 2、及び配列番号33のC D R 3を含む軽鎖可変(V L)ドメインを含み、ならびに／あるいは

前記第1のB T Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号34のC D R 1、配列番号35のC D R 2、及び配列G D IのC D R 3を含む重鎖可変(V H)ドメイン、ならびに配列番号36のC D R 1、配列番号37のC D R 2、及び配列番号38のC D R 3を含む軽鎖可変(V L)ドメインを含む、

前記方法。

【0316】

94. 前記酵素がトリプシンである、実施形態91～93のいずれか1項に記載の方法。

【0317】

95. S C I Dの前記C D 3 εシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号63のV Hドメインを含む、実施形態91～94のいずれか1項に記載の方法。

【0318】

96. S C I Dの前記C D 3 εシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号64のV Lドメインを含む、実施形態91～95のいずれか1項に記載の方法。

【0319】

97. W A Sの前記第1のW A S pシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号65のV Hドメインを含む、実施形態91～96のいずれか1項に記載の方法。

【0320】

98. W A Sの前記第1のW A S pシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号66のV Lドメインを含む、実施形態91～97のいずれか1項に記載の方法。

【0321】

99. W A Sの前記第1のW A S pシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号86の重鎖を含む、実施形態91～98のいずれか1項に記載の方法。

【0322】

100. W A Sの前記第1のW A S pシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号91の軽鎖を含む、実施形態91～99のいずれか1項に記載の方法。

【0323】

101. X L Aの前記第1のB T Kシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号67のV Hドメインを含む、実施形態91～100のいずれか1項に記載の方法。

【0324】

102. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号68のVLDメインを含む、実施形態91～101のいずれか1項に記載の方法。

【0325】

103. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号96の重鎖を含む、実施形態91～102のいずれか1項に記載の方法。

【0326】

104. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号101の軽鎖を含む、実施形態91～103のいずれか1項に記載の方法。

【0327】

105. 実施形態91～104のいずれか1項に記載の方法であって、濃縮することであって、以下：

シスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第3のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第3のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第4のCTNSシグネチャーペプチドを、前記第4のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

シスチン症の第2のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第2のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；ならびに／あるいは

シスチン症の第3のSHPKシグネチャーペプチドを、前記第3のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、

前記濃縮することにより、シスチン症の1つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと；

前記濃縮ペプチドに対して液体クロマトグラフィー—多重反応モニタリング質量分析（LC—MRM—MS）を実行し、これによって1つ以上のDBS試料でシスチン症の1つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと、

をさらに含む、前記方法。

【0328】

106. 実施形態105に記載の方法であって、ここで、

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号6に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号7または8に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第3のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号12に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第4のCTNSシグネチャーペプチドが、配列番号13に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号9に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

シスチン症の前記第2のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号14に記載のアミノ酸配列によってコードされており、及び／または

シスチン症の前記第3のSHPKシグネチャーペプチドが、配列番号15に記載のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列によってコードされている、前記方法。

【0329】

107. 実施形態105または106に記載の方法であって、ここで、

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み、ならびに／あるいは

前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、前記方法。

【0330】

108. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号69のVHドメインを含む、実施形態105～107のいずれか1項に記載の方法。

【0331】

109. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号70のVLドメインを含む、実施形態105～108のいずれか1項に記載の方法。

【0332】

110. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号106の重鎖を含む、実施形態105～109のいずれか1項に記載の方法。

【0333】

111. シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号111の軽鎖を含む、実施形態105～110のいずれか1項に記載の方法。

【0334】

112. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号71のVHドメインを含む、実施形態105～111のいずれか1項に記載の方法。

【0335】

113. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号72のVLドメインを含む、実施形態105～112のいずれか1項に記載の方法。

【0336】

114. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号116の重鎖を含む、実施形態105～113のいずれか1項に記載の方法。

【0337】

115. シスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号121の軽鎖を含む、実施形態105～114のいずれか1項に記載の方法。

【0338】

116. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号73のVHドメインを含む、実施形態105～115のいずれか1項に記載の方法。

【0339】

117. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号74のVLドメインを含む、実施形態105～116のいずれか1項に記載の方法。

【0340】

118. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号126の重鎖を含む、実施形態105～117のいずれか1項に記載の方法。

10

【0341】

119. シスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号131の軽鎖を含む、実施形態105～118のいずれか1項に記載の方法。

【0342】

120. 実施形態91～119のいずれか1項に記載の方法であって、さらに：
内因性ATP7Bペプチドを、前記内因性ATP7Bペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて濃縮することと；
シグネチャーペプチド濃度：内因性ATP7Bペプチド濃度の比率を、各シグネチャーペプチドに関して計算することと、を含む、前記方法。

20

【0343】

121. 前記内因性ATP7Bペプチドが、配列番号10、配列番号11、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、または配列番号21に記載のアミノ酸配列によってコードされる、実施形態120に記載の方法。

【0344】

122. 前記内因性ATP7Bペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3、を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、実施形態120または121に記載の方法。

30

【0345】

123. 実施形態91～122のいずれか1項に記載の方法であって、濃縮することであって、以下：

第1のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記第1のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第2のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第3のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記第3のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体または抗原結合フラグメントを用いて；

40

第4のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記第4のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第5のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記第5のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

第6のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記第6のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；及び／あるいは

第7のATP7Bシグネチャーペプチドを、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて；

前記濃縮することにより、ウィルソン病(WD)の1つ以上のシグネチャーペプチドを検

50

出することと；

前記濃縮されたペプチドに対して液体クロマトグラフィー－多重反応モニタリング質量分析（LC－MRM－MS）を実行し、1つ以上のDBS試料においてWDの1つ以上のシグネチャーペプチドを検出することと、
をさらに含む、前記方法。

【0346】

124．実施形態123に記載の方法であって、ここで

WDの前記第1のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号10に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号11または21に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第3のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号16に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第4のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号17に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第5のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号18に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

WDの前記第6のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号19に記載のアミノ酸配列によってコードされており、及び／または

WDの前記第7のATP7Bシグネチャーペプチドが、配列番号20に記載のアミノ酸配列によってコードされている、前記方法。

【0347】

125．実施形態123または124の方法であって、前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインを含む、前記方法。

【0348】

126．WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号75のVHドメインを含む、実施形態123～125のいずれか1項に記載の方法。

【0349】

127．WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号76のVLドメインを含む、実施形態123～126のいずれか1項に記載の方法。

【0350】

128．WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号136の重鎖を含む、実施形態123～127のいずれか1項に記載の方法。

【0351】

129．WDの前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドの濃縮に使用される前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号141の軽鎖を含む、実施形態123～128のいずれか1項に記載の方法。

【0352】

130．各シグネチャーペプチドの前記濃度を対応する所定の閾値濃度と比較することをさらに含む、実施形態91～129のいずれか1項に記載の方法。

【0353】

131．前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団における各シグネチャーペプチドの前記平均濃度から－1標準偏差（SD）、－1.1SD、－1.2SD、－1.3SD、－1.4SD、－1.5SD、－1.6SD、－1.7SD、－1.8SD

10

20

30

40

50

、 $-1.9SD$ 、 $-2.0SD$ 、 $-2.1SD$ 、 $-2.2SD$ 、 $-2.3SD$ 、 $-2.4SD$ 、 $-2.5SD$ 、 $-2.6SD$ 、 $-2.7SD$ 、 $-2.8SD$ 、 $-2.9SD$ 、 $-3.0SD$ 、またはそれ以上の SD である、実施形態130に記載の方法。

【0354】

132. 各シグネチャーペプチドの前記対応する所定の閾値濃度が、正常な対照対象の集団における各シグネチャーペプチドの平均濃度の標準偏差から計算される、実施形態130または131に記載の方法。

【0355】

133. 正常な対照対象の集団由来の DBS 中の前記 $CD3\epsilon$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $70\text{ pmol/L} \sim 400\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132に記載の方法。

10

【0356】

134. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第1の $WASP$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $600\text{ pmol/L} \sim 5000\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132または133に記載の方法。

【0357】

135. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第2の $WASP$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $5500\text{ pmol/L} \sim 15000\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～134のいずれか1項に記載の方法。

【0358】

20

136. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第1の BTk シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $350\text{ pmol/L} \sim 2500\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～135のいずれか1項に記載の方法。

【0359】

137. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第2の BTk シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $550\text{ pmol/L} \sim 1600\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～136のいずれか1項に記載の方法。

【0360】

138. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第1の $CTNS$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $40\text{ pmol/L} \sim 250\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～137のいずれか1項に記載の方法。

30

【0361】

139. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第1の $SHPK$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $100\text{ pmol/L} \sim 8000\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～138のいずれか1項に記載の方法。

【0362】

140. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第2の $ATP7B$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $90\text{ pmol/L} \sim 400\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～139のいずれか1項に記載の方法。

【0363】

40

141. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第3の $ATP7B$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $30\text{ pmol/L} \sim 100\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～140のいずれか1項に記載の方法。

【0364】

142. 正常な対照対象の集団由来の DBS における前記第7の $ATP7B$ シグネチャーペプチドの前記平均濃度が、 $200\text{ pmol/L} \sim 500\text{ pmol/L}$ の範囲の濃度を含む、実施形態132～141のいずれか1項に記載の方法。

【0365】

143. 前記ペプチドの前記濃度が、 $LC-MRM-MS$ の前に添加された参照シグネチャーペプチドの対応する既知の濃度から決定される、実施形態91～142のいずれか

50

1 項に記載の方法。

【0366】

144. 対象における、重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、X連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）、シスチン症、またはウィルソン病（WD）のスクリーニングのためのアッセイであって、前記アッセイは：

（I）（i）SCIDのCD3εシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

（ii）WASの第1のWASpシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（iii）WASの第2のWASpシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（iv）XLAの第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（v）XLAの第2のBTKシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（vi）シスチン症の第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（vii）シスチン症の第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（viii）シスチン症の第3のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（ix）シスチン症の第4のCTNSシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（x）シスチン症の第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xi）シスチン症の第2のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xii）シスチン症の第3のSHPKシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xiii）WDの第1のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xiv）WDの第2のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xv）WDの第3のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xvi）WDの第4のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xvii）WDの第5のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

（xviii）WDの第6のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；及び／または

（xix）WDの第7のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント；

ならびに／あるいは

（II）前記対応する参照シグネチャーペプチド、を含む、前記アッセイ。

【0367】

145. 実施形態144に記載のアッセイであって、ここで、

（i）前記CD3εシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

（ii）前記第1のWASpシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャー

10

20

30

40

50

ーペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(i i i) 前記第 2 の W A S p シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列によってコードされており、

(i v) 前記第 1 の B T K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列によってコードされており、及び／または

(v) 前記第 2 の B T K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列によってコードされており、

(v i) 前記第 1 の C T N S シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(v i i) 前記第 2 の C T N S シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 7 または 8 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(v i i i) 前記第 3 の C T N S シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(i x) 前記第 4 の C T N S シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x) 前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i) 前記第 2 の S H P K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i i) 前記第 3 の S H P K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i i i) 前記第 1 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i v) 前記第 2 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 1 または 2 1 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v) 前記第 3 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v i) 前記第 4 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v i i) 前記第 5 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v i i i) 前記第 6 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列によってコードされており、ならびに／または

(x i x) 前記第 7 の A T P 7 B シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列によってコードされている、前記アッセイ。

【 0 3 6 8 】

1 4 6 . 実施形態 1 4 4 または 1 4 5 に記載のアッセイであって、ここで、

前記 C D 3 ε シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号 2 2 の C D R 1、及び配列番号 2 3 の C D R 2、及び配列番号 2 4 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 2 5 の C D R 1、配列番号 2 6 の C D R 2、及び配列番号 2 7 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインが含まれ；

前記第 1 の W A S p シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号 2 8 の C D R 1、配列番号 2 9 の C D R 2、及び配列番号 3 0 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 3 1 の C D R 1、配列番号 3 2 の C D R 2、及び配列番号 3 3 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインが含まれ、

前記第 1 の B T K シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号 3 4 の C D R 1、配列番号 3 5 の C D R 2、及び配列 G D I の C D

R 3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、及び配列番号38のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインが含まれ；

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインが含まれ；

前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインが含まれ；

10

前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインが含まれ、ならびに／あるいは

前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含む重鎖可変（VH）ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変（VL）ドメインが含まれる、前記アッセイ。

20

【0369】

147. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号63のVHドメインを含む、実施形態144～146のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0370】

148. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号64のVLドメインを含む、実施形態144～147のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0371】

30

149. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号65のVHドメインを含む、実施形態144～148のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0372】

150. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号66のVLドメインを含む、実施形態144～149のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0373】

151. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号86の重鎖を含む、実施形態144～150のいずれか1項に記載のアッセイ。

40

【0374】

152. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号91の軽鎖を含む、実施形態144～151のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0375】

153. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号67のVHドメインを含む、実施形態144～152のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0376】

50

154. XLAの前記第1のBT Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号68のV Lドメインを含む、実施形態144~153のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0377】

155. XLAの前記第1のBT Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号96の重鎖を含む、実施形態144~154のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0378】

156. XLAの前記第1のBT Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号101の軽鎖を含む、実施形態144~155のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0379】

157. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号69のV Hドメインを含む、実施形態144~156のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0380】

158. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号70のV Lドメインを含む、実施形態144~157のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0381】

159. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号106の重鎖を含む、実施形態144~158のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0382】

160. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号111の軽鎖を含む、実施形態144~159のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0383】

161. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号71のV Hドメインを含む、実施形態144~160のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0384】

162. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号72のV Lドメインを含む、実施形態144~161のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0385】

163. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号116の重鎖を含む、実施形態144~162のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0386】

164. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCT N Sシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号121の軽鎖を含む、実施形態144~163のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0387】

165. 配列番号9のシスチン症の前記第1のS H P Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号73のV Hドメインを含む、実施形態144~164のいずれか1項に記載のアッセイ。

【0388】

166. 配列番号9のシスチン症の前記第1のS H P Kシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号74のV Lドメインを含む、実

10

20

30

40

50

施形態 144～165 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0389】

167. 配列番号 9 のシスチン症の前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 126 の重鎖を含む、実施形態 144～166 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0390】

168. 配列番号 9 のシスチン症の前記第 1 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 131 の軽鎖を含む、実施形態 144～167 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0391】

169. 配列番号 11 または 21 の W D の前記第 2 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 75 の V H ドメインを含む、実施形態 144～168 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0392】

170. 配列番号 11 または 21 の W D の前記第 2 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 76 の V L ドメインを含む、実施形態 144～169 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0393】

171. 配列番号 11 または 21 の W D の前記第 2 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 136 の重鎖を含む、実施形態 144～170 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0394】

172. 配列番号 11 または 21 の W D の前記第 2 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 141 の軽鎖を含む、実施形態 144～171 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0395】

173. 前記参照シグネチャーペプチドが同位体標識されている、実施形態 144～172 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0396】

174. 前記抗体またはその抗原結合フラグメントが磁気ビーズに付着している、実施形態 144～173 のいずれか 1 項に記載のアッセイ。

【0397】

175. 配列番号 22 の C D R 1、配列番号 23 の C D R 2、及び配列番号 24 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 25 の C D R 1、配列番号 26 の C D R 2、及び配列番号 27 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0398】

176. 前記 V H ドメインが配列番号 63 を含む、実施形態 175 の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0399】

177. 前記 V L ドメインが配列番号 64 を含む、実施形態 175 または 176 の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0400】

178. 配列番号 28 の C D R 1、配列番号 29 の C D R 2、及び配列番号 30 の C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) ドメイン、ならびに配列番号 31 の C D R 1、配列番号 32 の C D R 2、及び配列番号 33 の C D R 3 を含む軽鎖可変 (V L) ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0401】

179. 前記 V H ドメインが配列番号 65 を含む、実施形態 178 の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

20

30

40

50

【0402】

180. 前記V Lドメインが配列番号66を含む、実施形態178または179の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0403】

181. 前記重鎖が配列番号86を含む、実施形態178～180のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0404】

182. 前記軽鎖が配列番号91を含む、実施形態178～181のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0405】

183. 配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列GDIのCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、及び配列番号38のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0406】

184. 前記VHドメインが配列番号67を含む、実施形態183の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0407】

185. 前記V Lドメインが配列番号68を含む、実施形態183または184に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0408】

186. 前記重鎖が配列番号96を含む、実施形態183～185のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0409】

187. 前記軽鎖が配列番号101を含む、実施形態183～186のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0410】

188. 配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0411】

189. 前記VHドメインが配列番号69を含む、実施形態188に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0412】

190. 前記V Lドメインが配列番号70を含む、実施形態188または189に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0413】

191. 前記重鎖が配列番号106を含む、実施形態188～190のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0414】

192. 前記軽鎖が配列番号111を含む、実施形態188～191のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0415】

193. 配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0416】

194. 前記VHドメインが配列番号71を含む、実施形態193に記載の単離された

10

20

30

40

50

抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0417】

195. 前記V Lドメインが配列番号72を含む、実施形態193または194に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0418】

196. 前記重鎖が配列番号116を含む、実施形態193～195のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0419】

197. 前記軽鎖が配列番号121を含む、実施形態193～196のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【0420】

198. 配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0421】

199. 前記VHドメインが配列番号73を含む、実施形態198に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0422】

200. 前記V Lドメインが配列番号74を含む、実施形態198または199に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【0423】

201. 前記重鎖が配列番号126を含む、実施形態198～200のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0424】

202. 前記軽鎖が配列番号131を含む、実施形態198～201のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0425】

203. 配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【0426】

204. 前記VHドメインが配列番号75を含む、実施形態203に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0427】

205. 前記V Lドメインが配列番号76を含む、実施形態203または204に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0428】

206. 前記重鎖が配列番号136を含む、実施形態203～205のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【0429】

207. 前記軽鎖が配列番号141を含む、実施形態203～206のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【0430】

208. キットであって、以下：

(I) (i) SCIDのCD3εシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(ii) WASの第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

50

(i i i) W A S の第 2 の W A S p シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(i v) X L A の第 1 の B T K シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(v) X L A の第 2 の B T K シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(v i) シスチン症の第 1 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(v i i) シスチン症の第 2 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(v i i i) シスチン症の第 3 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(i x) シスチン症の第 4 の C T N S シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x) シスチン症の第 1 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x i) シスチン症の第 2 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x i i) シスチン症の第 3 の S H P K シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x i i i) W D の第 1 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x i v) W D の第 2 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x v) W D の第 3 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x v i) W D の第 4 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x v i i) W D の第 5 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；

(x v i i i) W D の第 6 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント；ならびに／あるいは

(x i x) W D の第 7 の A T P 7 B シグネチャーペプチドに結合する抗体またはその抗原結合フラグメント

ならびに／あるいは

(I I) 前記対応する参照シグネチャーペプチド；及び

(I I I) 前記キットの内容物の使用の使用説明書を備える、
前記キット。

【 0 4 3 1 】

2 0 9 . 実施形態 2 0 8 のキットであって、ここで、

(i) 前記 C D 3 ε シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(i i) 前記第 1 の W A S p シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(i i i) 前記第 2 の W A S p シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(i v) 前記第 1 の B T K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；及び／または

(v) 前記第 2 の B T K シグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(v i) 前記第1のCTNSシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号6に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(v i i) 前記第2のCTNSシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号7または8に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(v i i i) 前記第3のCTNSシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号12に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(i x) 前記第4のCTNSシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号13に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x) 前記第1のSHPKシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号9に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i) 前記第2のSHPKシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号14に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i i) 前記第3のSHPKシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号15に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i i i) 前記第1のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号10に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x i v) 前記第2のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号11または21に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v) 前記第3のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号16に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v i) 前記第4のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号17に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v i i) 前記第5のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号18に記載のアミノ酸配列によってコードされており；

(x v i i i) 前記第6のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号19に記載のアミノ酸配列によってコードされており；
ならびに／または

(x i x) 前記第7のATP7Bシグネチャーペプチド及び／もしくはその参照シグネチャーペプチドが、配列番号20に記載のアミノ酸配列によってコードされている、前記キット。

【0432】

210. 実施形態208または209のキットであって、ここで

前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号22のCDR1、配列番号23のCDR2、及び配列番号24のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号25のCDR1、配列番号26のCDR2、及び配列番号27のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号28のCDR1、配列番号29のCDR2、及び配列番号30のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号31のCDR1、配列番号32のCDR2、及び配列番号33のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2、及び配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、及び配列番号38のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

シスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号39のCDR1、配列番号40のCDR2、及び配列番号41のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号42のCDR1、配列番号43のCDR2、及び配列番号44のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号45のCDR1、配列番号46のCDR2、及び配列番号47のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号48のCDR1、配列番号49のCDR2、及び配列番号50のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み；

前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号51のCDR1、配列番号52のCDR2、及び配列番号53のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号54のCDR1、配列番号55のCDR2、及び配列番号56のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含み、ならびに／あるいは

前記第2のATP7Bシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントには、配列番号57のCDR1、配列番号58のCDR2、及び配列番号59のCDR3を含む重鎖可変(VH)ドメイン、ならびに配列番号60のCDR1、配列番号61のCDR2、及び配列番号62のCDR3を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む、前記キット。

【0433】

211. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号63のVHドメインを含む、実施形態208～210のいずれか1項に記載のキット。

【0434】

212. SCIDの前記CD3εシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号64のVLドメインを含む、実施形態208～211のいずれか1項に記載のキット。

【0435】

213. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号65のVHドメインを含む、実施形態208～212のいずれか1項に記載のキット。

【0436】

214. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号66のVLドメインを含む、実施形態208～213のいずれか1項に記載のキット。

【0437】

215. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号86の重鎖を含む、実施形態208～214のいずれか1項に記載のキット。

【0438】

216. WASの前記第1のWASPシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号91の軽鎖を含む、実施形態208～215のいずれか1項に記載のキット。

【0439】

217. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号67のVHドメインを含む、実施形態208～216のいずれか1項に記載のキット。

【0440】

218. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号68のVLドメインを含む、実施形態208～217のいずれか1項に記載のキット。

【0441】

219. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号96の重鎖を含む、実施形態208～218のいずれか1項に記載のキット。

10

20

30

40

50

【0442】

220. XLAの前記第1のBTKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号101の軽鎖を含む、実施形態208～219のいずれか1項に記載のキット。

【0443】

221. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号69のVHドメインを含む、実施形態208～220のいずれか1項に記載のキット。

【0444】

222. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号70のVLドメインを含む、実施形態208～221のいずれか1項に記載のキット。

10

【0445】

223. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号106の重鎖を含む、実施形態208～222のいずれか1項に記載のキット。

【0446】

224. 配列番号6のシスチン症の前記第1のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号111の軽鎖を含む、実施形態208～223のいずれか1項に記載のキット。

20

【0447】

225. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号71のVHドメインを含む、実施形態208～224のいずれか1項に記載のキット。

【0448】

226. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号72のVLドメインを含む、実施形態208～225のいずれか1項に記載のキット。

【0449】

227. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号116の重鎖を含む、実施形態208～226のいずれか1項に記載のキット。

30

【0450】

228. 配列番号7または8のシスチン症の前記第2のCTNSシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号121の軽鎖を含む、実施形態208～227のいずれか1項に記載のキット。

【0451】

229. 配列番号9のシスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号73のVHドメインを含む、実施形態208～228のいずれか1項に記載のキット。

40

【0452】

230. 配列番号9のシスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号74のVLドメインを含む、実施形態208～229のいずれか1項に記載のキット。

【0453】

231. 配列番号9のシスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号126の重鎖を含む、実施形態208～230のいずれか1項に記載のキット。

【0454】

232. 配列番号9のシスチン症の前記第1のSHPKシグネチャーペプチドに結合す

50

る前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 131 の軽鎖を含む、実施形態 208～231 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0455】

233. 配列番号 11 または 21 の WD の前記第 2 の ATP7B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 75 の VH ドメインを含む、実施形態 208～323 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0456】

234. 配列番号 11 または 21 の WD の前記第 2 の ATP7B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 76 の VL ドメインを含む、実施形態 208～233 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0457】

235. 配列番号 11 または 21 の WD の前記第 2 の ATP7B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 136 の重鎖を含む、実施形態 208～234 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0458】

236. 配列番号 11 または 21 の WD の前記第 2 の ATP7B シグネチャーペプチドに結合する前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号 141 の軽鎖を含む、実施形態 208～235 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0459】

237. 濾紙カード、パンチツール、消化酵素、消化緩衝液、抗体の固体支持体またはそれらの抗原結合フラグメントのうちの 1 つ以上；及び溶出緩衝液をさらに備える、実施形態 208～236 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0460】

238. 前記参照シグネチャーペプチドが同位体標識されている、実施形態 208～237 のいずれか 1 項に記載のキット。

【0461】

239. 前記抗体またはその抗原結合フラグメントが磁気ビーズに付着している、実施形態 208～238 のいずれか 1 項に記載のキット。

【実施例】

【0462】

(XI) 実験例

【0463】

実施例 1. 要約。研究を行って、選択された反応モニタリング質量分析 (immuno-SRM) と組み合わせたペプチド免疫親和性濃縮に基づくマルチプレックスアッセイが、CD3ε 関連重症複合免疫不全症 (SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、及び X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) を有する罹患した患者を、相互に、及び罹患していない正常対照乾燥血液スポット (DBS) 試料から、確実かつ正確に識別し得るか否かを評価した。42 人の原発性免疫不全障害 (PID) 患者、40 人の正常な成人対照、及び 62 人の正常な新生児からの DBS 試料における CD3ε、WASP、及び BTK (それぞれ、SCID、WAS、及び XLA) からタンパク質分解的に生成されたペプチドの盲検化多重分析を実施した。immuno-SRM アッセイは、アッセイ内及びアッセイ間の精度 (11～22% 及び 11～43%)、直線性 (1.39～2000 fmol ペプチド)、及び安定性 (72 時間で 0.09% 以下の差) など、DBS 内の標的ペプチドを確実に定量化した。シグネチャーペプチドの分析により、対照群と比較して、罹患した患者のペプチドレベルの統計的に有意な減少 (または欠如) が見られた (SCID: $p=0.05$ 、WAS 及び BTK: $p=0.0001$)。DBS における CD3ε、WASP、及び BTK からのタンパク質分解性ペプチドの immuno-SRM ベースの定量化は、関連する PID 症例を対照から区別する。このアプローチは、選択的 PID の大規模な多重新生児スクリーニングを実施するために使用され得る。

【0464】

材料及び方法。患者の試料。PIDD及び正常な対照血液試料は、Seattle Children's Immunology Diagnostic Laboratory（シアトルチルドレンズ免疫学診断研究所）から入手した。新生児DBSは、Institutional Review Board（施設内審査委員会）の承認後、Washington State Newborn Screening Laboratory（ワシントン州の新生児スクリーニング研究所）（Shoreline, WA）から回収された。XLA DBSは、疑いのあるベトナム人20人の患者から収集され、通常の郵便でSeattle Children's Hospital（シアトル小児病院）に発送された。サンガーシーケンシングによるこれらの患者の遺伝子型は、以前にSegundo et al. Front Immunol. Frontiers; 2018; 9: 289で報告された。合計で、42人のPIDD患者及び40人の正常な対照からDBS試料を得た。正常対照及びPIDD患者DBSは、70 µLの血液／12mmスポットを濾紙カード（Protein Saver 903 Card, Whatman, Piscataway, NJ）にピペティングして調製し、室温で一晩乾燥させ、使用するまで-80℃で密封されたビニール袋に保管した。罹患した患者の試料は、収集場所から発送され、使用するまで-80℃で保管した。

【0465】

代理ペプチドの選択及び抗体産生。CD3ε、WASP、及びBTKの代理ペプチドは、インシリコでトリプシン消化及びNCBI BLASTツールによって選択された。最終的なペプチドの選択は、ペプチドの長さ、転写後修飾の欠如、及び前述のようなBLAST検索によるヒトゲノムの独自性を含む、immuno-SRM開発の受け入れられた主要な基準に従って行った。Kerfoot et al. Proteomics Clin Appl. 2012; 6: 394-402; Abbatiello et al. Mol. Cell Proteomics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2015; 14: 2357-2374; Hoofnagle et al. Clin. Chem. 2016; 62: 48-69。ATP7Bシグネチャーペプチドのペプチド選択及びモノクローナル抗体産生は以前に報告されている。Jung et al. 2017、上記。次に、粗ペプチドを経験的にスクリーニングして、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）によって検出及び定量の適合性を判断した。

【0466】

アフィニティー精製されたウサギポリクローナル抗体（pAb）またはモノクローナル抗体（mAb）は、Pacific Immunology（Ramona, CA）またはFred Hutchinson Cancer Research Center Immunology Lab（フレッドハッチンソン癌研究センター免疫学研究室）（Seattle WA）によって5つのペプチドに対して首尾よく生成された。簡単に説明すると、シグネチャーペプチドは、C末端伸長（GSGC、配列番号77）またはN末端システイン伸長で合成され、免疫化のためにキーホールリンペットヘモシアニン（KHL）に結合された。ペプチドごとに2匹のニュージーランド白ウサギまたは5匹のマウスを注射した。選択した全てのペプチドのpAbまたはmAbは、25mLの抗血清からのアフィニティー精製に成功した。

【0467】

免疫-SRMアッセイ試薬。Protease MAX（商標）界面活性剤（番号V2072）及びプロテオミクスグレードのトリプシン（番号V5113）は、Promega（Madison, WI）から購入した。ウシ血清アルブミン標準（200mg/mL）、及び（3-[3-コラミドプロピル）=ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート）（Pierce（商標）CHAPS、番号PI28300）界面活性剤は、Thermo Fisher Scientific（Waltham, MA）から入手した。重炭酸アンモニウム（40867-50G-F）は、Fluka Analytical（Munich, Germany）から購入した。アセトニトリル（番号A955）、水（

番号W6、LCMS optimaグレード)、ギ酸(番号PI28905)、及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS、番号10010-023)は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) から入手した。

【0468】

重く安定な同位体標識ペプチドを、Anaspec (Fremont, CA) から入手した。安定同位体標識ペプチドを、HPLCによって>95%超まで精製し、C末端のアルギニンまたはリジンを ^{13}C 及び ^{15}N 原子で標識した結果、それぞれ+8または+10 Daの質量シフトが生じた。アリコートは、使用するまで-20℃で5%アセトニトリル/0.1%ギ酸中に保存した。

【0469】

抗体は、2.8 μm のDynabeadsプロテインG磁気ビーズ(番号10004D、Invitrogen, Carlsbad, CA)に、1 μg の抗体対2.5 μL というビーズ比で固定化された。簡単に説明すると、250 μL のビーズを1.5 mLエッペンドルフチューブ(022363204エッペンドルフ)に加え、250 μL の1×PBSで2回洗浄した後、100 μg の抗体と1×PBS+0.03%CHAPS(番号28300、Thermo Scientific, Waltham, MA)を加えて、合計250 μL の容積を得た。その抗体を4℃でタンブリングしながら一晩ビーズに結合させた。翌日、抗体は化学的架橋によりビーズに固定した。要するに、磁気プルダウンを使用して抗体ビーズを収集し、過剰なPBSを廃棄し、300 μL の新たに調製した20 mMのDMP(ジメチルピメリミデート二塩酸塩、番号D8388、Sigma Aldrich, St. Louis, MO)含有の200 mMトリエタノールアミン、pH 8.5(番号T58300、Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を添加した。その試料を室温で30分間タンブリングさせ、トリエタノールアミン中のDMPを廃棄した。250 μL の150 mMモノエタノールアミン(番号411000、Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を添加し、そのビーズを室温で30分間回タンブリングさせた。抗体ビーズを、250 μL の5%酢酸+0.03%CHAPSを使用して2回洗浄し(毎回室温で5分間、タンブリング)、250 μL の1×PBS+0.03%CHAPSを使用してもう一度洗浄した。次に、CD3 ϵ 、WASP、及びBTK抗体結合ビーズを洗浄し、5%酢酸+3%アセトニトリル(ACN)でインキュベートし、250 μL の1×PBS+0.03%CHAPSで洗浄し、後の2つのステップを1回繰り返した。中性pH(7.0)に達するまで、全ての抗体結合ビーズを250 μL の1×PBS+0.03%CHAPSで洗浄した。次に、洗浄した抗体結合ビーズを、抗真菌特性のために250 μL の1×PBS+0.03%CHAPS及び2.5 μL のNaN₃(52002-5G Sigma Aldrich)に再懸濁し、使用するまで4℃で保存した。

【0470】

DBSタンパク質抽出及びトリプシン消化。各試料(盲検化された正常な対照または患者)について、70 μL の血液を含む1つのDBSスポット(13 mm)全体に、標準の革製パンチツールを使用して直径3 mmの17個のパンチに穿孔した。最終的な試料表現は、SCID:n=3、WAS:n=11、XLA:n=26、及び通常の対照(n=40)であった。パンチを1.5 mLのエッペンドルフチューブに入れ、50 mM重炭酸アンモニウム(pH 8)中の490 μL の0.1%Protease Max(商標)を各チューブに加えた。そのチューブを、Eppendorf MixMate(Eppendorf, Hamburg, Germany)で1時間ボルテックスした後、各試料10 μL をアリコートして、ブラッドフォードアッセイ用に200倍に希釈してタンパク質濃度を測定した。ジスルフィド結合の還元は、5 mMの2 M DTTで行い、37℃の水浴で30分間インキュベートする前に、50 mM重炭酸アンモニウム(pH 8)中の0.1%Protease Max(商標)490 μL を各チューブに追加した。次に、トリプシンを、1:50の酵素対タンパク質比(w/w)で添加し、アセトニトリルを最終濃度が15%になるように添加した。その混合物を37℃の水浴で一晩インキュベートして消化した

10

20

30

40

50

後、13,000RPMで10分間遠心分離した後、各上清を新しいチューブに移し、Savant (商標) Speed Vac (商標) 高容量濃縮器 (High Capacity Concentrator) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で乾燥させた)。全てのトリプシン処理されたDBS消化物を、使用するまで -80°C で保存した。

【0471】

ワシントン州のNBS研究所から分析された試料については、5つまたは6つの3mmパンチを、タンパク質の抽出及び消化に使用した ($n=62$)。手順は、前の試料の手順と同じであるが、次のように容積を減らした：各添加について150 μL の0.1% Protease Max (商標) 及び0.78 μL のDTT。

【0472】

ペプチド免疫親和性濃縮。DBS消化物を、 $1\times\text{PBS}+0.03\%\text{CHAPS}$ に再懸濁して、名目上1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のタンパク質消化物濃度を得た。架橋された抗体コーティングビーズを、各標的について総質量2 $\mu\text{g pAb}$ となるように添加した。次いで、20 μL の1M Tris pH8.0 (15568-025 UltraPure, Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加した。同位体標識ペプチドを内部標準 (IS) として追加した。この懸濁液を、 4°C でタンブリングしながら一晩インキュベートして、ペプチドの捕捉を達成した。翌日、抗体ビーズ：ペプチド複合体を、100 μL $\text{PBS}+0.01\%\text{CHAPS}$ で2回、100 μL 0.01% $\text{PBS}+0.01\%\text{CHAPS}$ で1回洗浄した。最後に、ペプチドは30 μL の5%酢酸/3%ACNでのインキュベーションによって溶出された。放出されたペプチドは、分析まで -80°C で保存した。ワシントン州NBS実験室から分析された試料の手順は、容積を以下のように減少したことを除いて、以前の試料の手順と同じであった：58.1 μL の $1\times\text{PBS}+0.03\%\text{CHAPS}$ 、各ペプチドの0.59 $\mu\text{g pAb}$ 、3.13 μL の内部標準 (IS)、及び12.5 μL のTRIS。

【0473】

液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析。濃縮された試料を、2つの実験室サイトで分析し、2つの別々のLC-MS/MSシステム及び機器構成 (以下で説明) を利用して、データ収集における実験室間の変動を調べた。次に、測定されたペプチド濃度を方法確認のために比較した。ペプチドの親イオンと娘イオンのスペクトルは、以前に報告されている。Kerfoot et al. Proteomics Clin Appl. 2012; 6: 394-402。

【0474】

実験室サイト1：機器は、Waters M-Class勾配及びLoadingポンプ (Waters, Milford, MA) に接続されたイオンキースソース技術を備えたWaters Xevo TQ-XS MSを含んだ。クロマトグラフィー溶媒は、A： $\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{FA}$ 及びB：ACN+0.1%FAであった。最初に、ペプチド混合物を、98：2のA：Bの一定流量を20 $\mu\text{L}/\text{分}$ で3分間使用して、M-Class Trap Symmetry 300 $\mu\text{m}\times 50\text{mm}$ C18カラム (100 $\text{\AA}$ 、5 μm) にロードした。続いて、流れを逆にし、150 $\mu\text{m}\times 100\text{mm}$ のBEH C18 ikey (130 $\text{\AA}$ 、1.7 μm) を横切る勾配フローを使用して、ペプチドを分離した。勾配プログラミング法を表4に示す。この場所でモニターされたペプチドは、CD3 ϵ 197、WASP 274、WASP 289、BTK 407、及びATP7B 1056であった。

【0475】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 実験室サイト 1 及び実験室サイト 2 でのシグネチャーペプチド分離のための LC 法の設定。

A=H₂O+0. 1%ギ酸、B=B:ACN+0. 1%ギ酸。

実験室サイト 1		実験室サイト 2	
時間	B%	時間	B%
0	5	0	1
1	5	4	1
1 1	4 5	2 4	4 0
1 3	8 5	2 5	9 0
1 5	8 5	2 6	9 0
1 7	5	2 7	1
2 0	5	3 5	1

【0 4 7 6】

トランジション及び衝突エネルギー (CE) のパラメーターは、Skylineにおいて以前に最適化された値及びイオン化時に最も強いフラグメントを同定するために Waters インタリスタート技術を使用して生成された値の線形回帰から得られた。SRM トランジションは、Q1 と Q3 の両方の四重極でユニット／ユニット分解能で取得され、滞留時間は 5 ミリ秒、質量範囲間で休止時間は 3 ミリ秒で、サイクルタイムは 1. 5 秒になった。全ての試料は盲検方式で実行した。

【0 4 7 7】

実験室サイト 2: LC-MS は、Eksigent 425 LC 及び Nanoflex Chip システムとインターフェースされた SCIEX 5500 QTRAP 質量分析計で実施した。クロマトグラフィー溶媒は、A: H₂O+0. 1%FA 及び B: 90%ACN+0. 1%FA であった。ペプチドを 0. 2×0. 5mM トラップカラム (Reprosil-Pur AQ C18、3 μm、120 Å) に 2% B で、4 μL/分の流速を用いて 4 分間ロードした。ペプチドは、0. 075×150mm カラム (Reprosil-Pur AQ C18、3 μm、120 Å) で 300 nL/分で溶出した。勾配プログラムを表 4 に示す。衝突エネルギー設定は、Skyline から取得された。MacLean et al. Bioinformatics. 2010; 26: 966-968。トランジションは、ユニット／ユニットの分解能で取得され、滞留時間は 10 ミリ秒、質量範囲間で停止は 5 ミリ秒で、サイクルタイムは 0. 75 秒になった。全てのデータは盲検形式で取得された。

【0 4 7 8】

方法性能評価。DBS のバックグラウンドマトリックスにおけるアッセイの直線性及び感度を決定するために、応答曲線を実行した。通常の対照 DBS 由来のパンチ (1 試料あたり 4 パンチ) は、抽出緩衝液 (Protease Max (商標)、重炭酸アンモニウム) を使用して 3 回抽出した。抽出したタンパク質に対してトリプシン消化を行い、消化物をプールして共通のバックグラウンドマトリックスを作成した。重安定同位体標準を消化物にスパイクし、段階的に希釈して、さまざまなペプチド量 (2000、200、12. 5、4. 17、1. 39、0. 69 fmol) の試料を作成した。磁性プロテイン G ビーズに共有結合した各抗体 2 マイクログラムを、バックグラウンドマトリックスに添加し、一晩インキュベートした。その抗体ビーズを PBS で洗浄し、溶出液を SRM で分析した。

【0 4 7 9】

再現性ならびにアッセイ内及びアッセイ間の精度は、5 つの別々の日にわたって内因性 (軽) ペプチドシグナルの測定を実施することによって特徴付けられた。各試料は、1 日あたり 5 回の完全なプロセス複製 (パンチ、抽出、分解、濃縮、及び質量分析を含む) で分析された。

【0480】

最後に、安定性は、室温で1日及び3日間保存されたDBSで検出された内因性（軽）ペプチドを、密封容器内で、 -80°C で、DBSで検出されたペプチドと比較することによって評価した。各試料は、上記のように3回のプロセスで処理した。パーセント差は、各時点で計算した。

【0481】

分析アッセイの研究所間検証。DBS抽出、トリプシン消化、及び患者試料のペプチド捕捉は全て、実験室サイト1で実行した。抗体ビーズから溶出されたペプチド溶液は、アッセイの分析性能の実験室間検証のために、実験室サイト1と実験室サイト2で分析するために2つの $15\mu\text{L}$ アリコートに分割した。

【0482】

データ分析。全てのSRMデータは、Skyline (MacCoss Lab Software、オープンソース、Seattle, WA) を使用して分析及びプロットされた。MacLean et al. Bioinformatics. 2010; 26: 966–968。内因性標的ペプチド濃度は、シグネチャーペプチドのピーク面積と既知の濃度 (100fmol) で添加されたそのISとの比率を比較することによって定量化された。統計は、Graphpad Prism (San Diego, CA) を使用して生成された。受信者動作特性 (ROC) 曲線は、Graphpad Prism及び95%信頼区間を使用して作成した。

【0483】

結果。ペプチドの選択及び抗体の開発。選択されたペプチド配列、分子量、親イオン、及び娘イオンを図1に列挙している。目的のペプチドの断片化パターンは以前に報告されている。Kerfoot et al. Proteomics Clin Appl. 2012; 6: 394–402。アフィニティー精製されたポリクローナル抗体 (Pacific Immunology, Ramona, CA) を、5つのペプチド全てに対して生成し、標的配列を首尾よく捕捉できる能力、及び同時精製されたペプチド混入物質によってもたらされるバックグラウンドシグナルがないことによって、ヒト試料での使用が追求された。Kuhn et al. Clin. Chem. 2009; 55: 1108–1117; Hoofnagle et al. Clin. Chem. 2008; 54: 1796–1804; Whiteaker et al. Mol. Cell Proteomics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2011; 10: M110.005645。

【0484】

方法性能評価。分析性能指数を表5に報告する。全体として、線形応答は $1.39\sim 2000\text{fmol}$ のペプチドの範囲に及んだ (図2A～図2E)。応答曲線上の全てのポイントの変動係数 (CV) の中央値は11%であった。定量下限 (LLOQ) は、 $\text{CV} < 20\%$ をもたらす最低点によって定義された。LLOQは、 $0.69\sim 12.5\text{fmol}$ の範囲であった。DBS試料では、LLOQより上で5つのペプチドが検出された。全てのペプチドにわたって、平均のアッセイ内 (すなわち、日内) 変動は $11\sim 22\%$ の範囲であり、アッセイ間 (すなわち、日間) 変動は、 $11\sim 43\%$ の範囲であった。注目すべきことに、単一のペプチド (BTK 545–558) は、 $20\% \text{CV}$ を超える変動性を示した。

【0485】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5. シグネチャーペプチドの分析性能。

タンパク質	ペプチド	LLOD	ULOD	LLOQ	中央 CV	アッセ イ内 CV	アッセ イ間 CV	相対的相違	
		(fmol)			%			24時間	72時間
CD3ε	CD3ε 197 -205	0.69	2000	0.69	13	12	11	0.17	0.09
BTK	BTK 407- 417	0.69	2000	1.39	10	14	25	0.32	-0.05
	BTK 545- 558	0.69	2000	1.39	12	22	43	0.61	0.06
WASP	WASP 274 -288	0.69	2000	0.69	17	11	12	-0.04	0.01
	WASP 289 -304	1.39	2000	4.17	7	13	17	-0.19	0.03

【0486】

最後に、安定性は、室温で1日及び3日間保存されたDBSで検出された内因性（軽）ペプチドを、密封容器内で、-80℃で保存されたDBSで検出されたペプチドと比較することによって評価された。結果を表5に示す。5つのペプチド全てにLLOQを超える内因性シグナルがあり、経時的な変動はほとんどなかった。各ペプチドの代表的な多重反応モニタリング（MRM）クロマトグラムを図3A～図3Eに示す。

【0487】

全体として、2つの別個の機器分析によって決定された濃度の間に高レベルの一致があった。2つの測定値を比較する相関プロット、図4A～図4Dは、一次ペプチドCD3ε 197（図4B）、WASP 274（図4A）、BTK 407（図4C）、及びATP 7B 1056（図4D）の場合の R^2 値が0.97以上である測定濃度の直線性を示す。WASP 289の測定値は、 $R^2=0.85$ と相関することがわかったので、WASP 274の二次マーカーとして有用であり得る（図5）。

【0488】

ペプチド濃度。分析後、罹患した患者の比較のための正常範囲を定義するために、正常対照を盲検化しないでいた。正常対照からの平均ペプチド濃度は以下のとおりであった（平均±SD）：CD3ε=228.68±150.98 pmol/L、WASP 274=1176.96±456.68 pmol/L、WASP 289=10326.98±4513.13 pmol/L、BTK 407=635.09±260.40 pmol/L、及びBTK 545=1038.44±465.77 pmol/L。シグネチャーペプチドの分析は、それぞれの場合において、対照群と比較して、患者のペプチドレベルの統計的に有意な（ $p<0.05\sim0.0001$ ）減少を見出した（図6A～6E）。罹患した患者の大多数のペプチドレベルは、著しく減少したか、または存在しなかった。各患者について、ATP 7B 1056の濃度も、以前に開発されたimmuno-SRM方法論を使用して決定された。Jung et al. 2017（上記）。これらのタンパク質濃度は、品質管理（QC）測定として機能し、試料間の一貫性を使用して、消化及びプロセスの再現性を評価する（図3A～図3E）。

【0489】

各PIDD診断のためのペプチド濃度カットオフは、-1.25SD（CD3ε）、-2.15SD（WASP 274）、-1.75SD（WASP 289）、-2SD（BTK 545）、及び-2.25SD（BTK 407）で任意に設定した。これらの範囲を使用すると、正常な対照で2つの偽陽性の兆候が生じた。NC4及びNC20は、それぞれWASP及びSCID患者であることが示された。NCシグネチャーペプチド値を図8に示す。PIDDを確実に識別するためのカットオフを、表6に示す。

【0490】

【表 6】

表 6. 濃度によるシグネチャーペプチドのカットオフ。

	BTK 54 5 (pmol/L)	BTK 40 7 (pmol/L)	WASp 2 74 (pmol/L)	WASp 28 9 (pmol/L)	CD3ε 197 (pmol/L)
平均	1038.44	635.09	1176.96	10326.98	228.68
SD	465.77	260.40	456.68	4513.13	150.98
カットオフ	106.90	49.19	195.10	2428.99	39.96

10

【0491】

これらのカットオフを使用して、特定のPIDD診断が各患者について予測された。予測された診断は、図9に示されるように、臨床的または遺伝的診断との優れた一致を示した。WAS及びBTKの分子的に確認された全ての症例は、immuno-SRM分析によっても診断された。無ガンマグロブリン血症と臨床的に診断された2人の患者、患者10及び13は、immuno-SRMによって正常レベルのBTKタンパク質を有していた。分子的には、これらの患者ではBTKの変異は確認されなかった。Segundo et al. Front Immunol. Frontiers; 2018; 9:289。興味深いことに、無ガンマグロブリン血症の患者12は、BTKタンパク質のレベルが低かったが、BTKのコード領域に変異は見られなかった。さらに、X連鎖性低形態SCIDの1例である患者41は、immuno-SRMによって正常であると特定された。利用された各シグネチャーペプチドについて、ROCプロットの曲線下面積(AUC)分析によって、0.015~0.0001の範囲のp値で0.925~0.999の領域が明らかになった(図10A、10B)。全体で97.6%の症例で、臨床診断とimmuno-SRMアッセイの結果の間が一致していた。興味深い外れ値及び不一致の症例については、以下でさらに考察する。

20

【0492】

NBS実験室試料のシグネチャーペプチド濃度を図11に示す。各DBS試料は、以前に設定されたPIDDの診断カットオフを超える有意な測定ペプチド濃度を示し、罹患していない状態を示している。

30

【0493】

DBS由来の3つの生命を脅かすPIDD(すなわち、SCID、WAS、及びXLA)を有する患者の多重検出のための高感度かつ特異的なプロテオミクススクリーニング方法としてのimmuno-SRMが実証されている。その結果は、PIDDの患者を正常な対照と明確に区別し、膜貫通タンパク質CD3εの内因性ペプチドならびに細胞内タンパク質WASp及びBTKの低レベルが標的疾患(それぞれSCID、WAS、及びXLA)と相関している。これらの診断は、1回の実施で行うことが可能で、疾患標的あたりの合計実行時間は20分または6.67分である。開示された結果は、DBSでのペプチドの安定性も示しており、室温で72時間保存した後の濃度の変動は最小限である(表5)。

40

【0494】

immuno-SRMプラットフォームは、この高度に多重化された方法で、正常な対照DBSから内因性ペプチドを確実に検出した。正常対照DBS(N=40)は盲検化されておらず、正常範囲及び潜在的な陽性スクリーニングのカットオフを定義するために利用された(図8)。臨床検査室では、診断試験の基準範囲は、一般集団の正規分布によって決定される。スクリーニング検査の最初のカットオフは通常保守的であり、疾患の発生率に比べて過度に高いスクリーニング陽性率を生み出すことなく、全ての真陽性を検出することを目的としている(表6)。ただし、これらのカットオフは、人口ベースの研究に従って継続的に検証及び調整されている。これらのパラメーターを考慮すると、陽性スク

50

リーニングの結果の定義は、この例のペプチドの平均よりも1.25～2.25標準偏差（SD）低い範囲であった。選択されたカットオフは、2つの偽陽性正常対照であって、1つはWAS（NC4）及び1つはSCID（NC20）を生じた（図8）。NC4の場合、再スクリーニングにより、正常範囲のWASレベルが示された。これらの予備的なカットオフは静的ではなく、より多くの正常な対照及び患者の試料がスクリーニングされるにつれて、より明確に定義されるようになる。

【0495】

これらのカットオフを使用して、広範囲の突然変異をカバーするあらゆる分子的に確認されたWAS及びBTK患者が明確に同定された（図9）。仮説として、ペプチド濃度は、遺伝子型に関係なく、BTK及びWASの症例の大部分で減少している。Qasim et al. Br. J. Haematol. 2001; 113: 861–865; Jin et al. Blood. American Society of Hematology; 2004; 104: 4010–4019; Futatani et al. British Journal of Haematology. 2001; 114 (1): 141–9。したがって、これらのペプチドは、診断及びスクリーニングのためのバイオマーカーを提供する。試験に利用できる3人のSCID患者のうち、2人はCD3ε分析によって陽性に同定された。第3の患者は、正常な対照の大部分と比較してCD3εレベルが低い、定義されたカットオフ内であって、部分的に機能するタンパク質を生成することが知られているIL2RGに「低形態」突然変異があった。これは、患者の総CD3+T細胞数がわずかに少ない（800細胞/μL）ことに反映されているが、古典型のSCIDのように存在しないことには反映されていない。CD3εは末梢血中のCD3+T細胞によってのみ発現されるので、存在するCD3εタンパク質の量はCD3+T細胞の総数を反映している。したがって、低形態型のSCIDの患者、オリゴクローナルT細胞集団を拡大した「漏出」型のSCIDの患者、または母体由来のT細胞を拡大した患者は、ImmunosRMアプローチでは見逃される場合がある。

【0496】

ROC曲線は、immunosRM分析の診断能力を評価するために構築された。これらのプロットは、真の陽性率を偽陽性率に関連付け、カットオフ値がますます厳しくなっている。診断カットオフが低くなると、試験は真の陽性を記録する能力が高くなるが、このプロセスは偽陽性につながる可能性も高くなる。したがって、高い真陽性率及び低い偽陽性率を維持するスクリーニング試験は、グラフがy軸の近くにあり、大きなAUCをもたらすことになる（図10A、図10B）。これらの値によって、PIDDのシグネチャーペプチドのimmunosRM分析の高い診断精度が示される。

【0497】

消化及びプロセス性能のQCモニタリングは、ATP7Bシグネチャーペプチド測定の形態で現在のimmunosRMマルチプレックスに含まれている。検出された全ての代謝物が有用なNBS標的であるとは限らないため、代謝物比の計算及び二次代謝産物分析を使用して、メチルマロン酸尿症におけるC3:C2比及び2-メチルクエン酸分析などの特定の疾患に対するNBSの感度及び特異性を改善する。Lindner et al. J. Inherit. Metab. Dis. 2nd ed. 2008; 31: 379–385。さらに、標的の比率は、試料の収集品質、保存、抽出及び消化の効率、ならびに血液の特性など、多数の要因によってもたらされる試料間のばらつきを説明し得る。Razavi et al. Bioanalysis. Future Science Ltd London, UK; 2016; 8: 1597–1609。ここで、ATP7B濃度は、スクリーニングされた試料全体でほぼ一貫していることがわかった（図7）。ATP7Bがないことは、不適切に処理または取り扱われた検体に警告を与えるのに役立つ場合がある。最初の実験として、各PIDDペプチドを、同じ試料中のATP7Bの内因性濃度に対する比率で比較した。ペプチド濃度に基づいて得られた予測は、臨床診断との完全な一致を示し、immunosRM及びATP7Bの比率がPIDD診断のための効果的かつ補完的なツールであることを実証している（図12及び表7）。これらのタイプの比率

は、選択したペプチドが試料の大規模なコホート全体にわたって遍在し、かつ著しく不変のシグナルであることが証明されている場合、臨床 immuno-SRMスクリーニングで有用である。

【0498】

【表7】

表7. ATP7Bペプチドに対する比率によるシグネチャーペプチドのカットオフ。

	BTK 54 5 ATP7B 比率	BTK 40 7 ATP7B 比率	WASp 2 74 ATP7B 比率	WASp 2 89 ATP7B 比率	CD3ε 197 ATP7B 比率
平均	9.31	5.71	10.71	92.47	2.12
SD	4.62	2.68	5.10	48.79	1.55
カットオフ	1.23	1.16	2.04	24.16	0.33

【0499】

1つの症例は、目的のタンパク質の一次及び二次シグネチャーペプチドの両方を有することの重要性を示した。患者18は、プライマリマーカーBTK407の代わりにBTK545の分析後に、陽性のBTK診断があることが判明した。BTK407のレベルは、平均と比較して有意に減少し、167.86対642.16 pmol/Lであったが、陽性スクリーニングを誘発するほど低くはなかった。対照的に、患者は、シグネチャーペプチド自体に含まれるアミノ酸配列545～558内に位置するp.Y551N突然変異を保有しているので、BTK545レベルはほとんど存在しなかった（図9）。この場合、多重化されたペプチドによって、最初は境界線であった陽性診断の確認が可能になった。

【0500】

サンガーシーケンシングによるBTKの突然変異を欠いた2人の臨床的に定義された無ガンマグロブリン血症患者（試料#10及び#13）において、正常レベルのBTKが見出されたことは注目に値する（図9）。したがって、これらの患者はXLAを持っていない可能性が高いが、より広範な遺伝子検査は行っていないものの、他の常染色体型の無ガンマグロブリン血症を有する場合がある。別の患者（試料#12）は、BTKタンパク質のレベルが低下していたが、BTKに識別可能な変異はなかった。これによって、コーディング領域及びイントロン-エクソン接合部の配列決定中に変異が見落とされたか、またはこの患者が調節エレメント、ポリアデニル化シグナル、もしくはイントロン領域のいずれかに影響を与えるBTK変異を抱えている場合があることが示唆される。これらの症例によって、immuno-SRMの臨床的有用性が強調される。

【0501】

さらに、同じWAS患者の骨髄移植（BMT）前後から2つの試料を得た（それぞれ、図9の試料番号29及び30）。BMT前のimmuno-SRM分析により、患者はWASであることが確認された。BMT後、患者は正常であると特定された。この症例によって、immuno-SRMがBMTの治療過程を追跡して、免疫系の再構成が成功したことを確認する能力が強調されている。同様の原理は、遺伝子治療を受けている単一遺伝子障害の患者にも適用され得る。

【0502】

全体として、分析によって、開示されたアッセイが、DBS中の標的ペプチドの濃度を決定するための広い線形範囲及び許容可能な精度を有することが実証されている（表5）。相関プロットは、2つの別々の実験施設での異なるMS機器による試料分析の有意な一致を示している（図4A～図4D及び5）。5つのペプチドのうち4つ、CD3ε 197、WASp 274、BTK 407、及びATP7B 1056は、分析時に R^2 値>0.97で、ほぼ同一であった。WASp 289は、 R^2 =0.85のオーバーラップで、わずかに変動する能力を示したため、臨床分析を行う際のWASp 274の二次マ

ーカーとなる場合がある。さらに、BTK 545は、20%CVを超える変動性を示し、BTK 407の二次マーカーとして適するものになるであろう。これらの結果、immuno-SRM分析に臨床応用及び移行性があることが示されている。臨床現場では、参照標準及び／またはキャリブレーションの使用は、所見の検査室間検証に役立つ。

【0503】

ワシントン州のNBS研究所によって提供されたランダムに選択された試料を使用して、NBSの状況においてimmuno-SRM分析を利用することの実現可能性を試験した。試料の入手可能性が限られているため、及びより小さな試料からのシグネチャーペプチド分析の有用性を試験するために、使用されるDBSの量を、1スポット全体から5つまたは6つの3mmパンチに減らした。目的のペプチドは、試料処理への変更を最小限に抑えて、容易に濃縮及び分析された。シグネチャーペプチドの濃度は全て、既知の正常対照の分析から得られた事前定義されたカットオフよりも大きかった（図11）。したがって、これらの患者は正常として指定される。試料入力を大幅に削減してこの分析を確実に実行する能力によって、immuno-SRM分析はNBSへの変換にさらに適するものになる。このハイスループット多重化法は、疾患ごとの実行時間を効果的に短縮し得、現在の自動化法の通常の実行時間が3分未満であるNBSに適している。Rashed et al. Clin. Chem. 1997; 43: 1129-1141; Khalid et al. J Med Screen. SAGE Publications, Sage UK: London, England; 2008; 15: 112-117。ベトナムからの従来の郵便で、周囲温度で発送されたDBSを使用したBTK患者の予測の成功によって、DBSの収集及び発送が経済的である資源の乏しい環境での診断試験の潜在的な有用性も強調される。

【0504】

NBSは、現代において最も成功した公衆衛生構想の1つであるが、下流の酵素欠損に起因する、蓄積された代謝産物の検出に依存している。ただし、PIDDDを含む多くの遺伝性障害は、タンパク質の欠如または減少を特徴とし、現在のNBS法の範囲を制限するものである。Qasim et al. Br. J. Haematol. 2001; 113: 861-865; Jin et al. Blood. American Society of Hematology; 2004; 104: 4010-4019。DBSからPIDDD関連ペプチドを検出できることにより、immuno-SRMは、現在のカバレッジのこのギャップを埋め、現在の代謝物バイオマーカーがない治療可能な疾患へのNBSの拡大を可能にする。immuno-SRMは、タンパク質欠乏の定量化された証拠を迅速に提供し、さらに侵襲的な手順を行うことなく、DBSからの初期スクリーニング及び分子分析と同時に実行され得る。これらのシグネチャーペプチドの定量化は、さまざまな先天性疾患の高度に多重化可能なスクリーニング及び診断ツールとしてのimmuno-SRMの基礎を築く。

【0505】

実施例2. DBSを使用するシスチン症のNBSの定量的アッセイの開発。immuno-SRMアッセイは、実施例1に記載されているように実施されたが、シスチン症のシグネチャーペプチドを使用した。CTNS 115ペプチドを認識する抗体を開発し、患者試料のスクリーニングに使用した。このペプチドバイオマーカーは、DBSで16.9 pmol/LまでのCTNSの口バストかつ特異的な検出を提供する（表8）。CTNSの測定濃度は、5.5~79.8 pmol/Lの範囲である。SHPKのレベルは、922.3~5787.6 pmol/Lの範囲である。試料CTNS00001-CTNS00013は盲検的であり、予測される変異状態は、immuno-SRMによって証明されるタンパク質レベルに基づいている。シスチン症の最も一般的な形態は、CTNSタンパク質及び隣接するタンパク質SHPKの喪失をもたらす、57kbの欠失変異に起因する。太字の試料は、ホモ接合性の57kbの欠失変異を含むことが確認または予測されている。ND: 検出されなかった（表8）。

【0506】

【表 8】

表 8. 患者及び正常対照試料中の CTNS 及び SHPK タンパク質の濃度。

サンプル	pmol/L CTNS	pmol/L SHPK	状況	変異
CTNS 209	ND	1026.193	確認	57kb 欠失/c. 838A>G; p. K280R
CTNS 211	ND	3577.042	確認	c. DNA 18656 C<G/c. DNA 21635 C<T
CTNS 212	ND	4563.733	確認	c. 473T>C; p. L158P/c. 530A>G; p. N177S
CTNS 213	ND	3717.015	確認	c. 473T>C; p. L158P/c. 530A>G; p. N177S
CTNS 243	ND	ND	確認	57kb 欠失/57kb 欠失
CTNS 252	ND	ND	確認	57kb 欠失/57kb 欠失
CTNS 00001	ND	1426.654	盲検的	
CTNS 00002	ND	3941.397	盲検的	
CTNS 00003	ND	2736.816	盲検的	
CTNS 00004	ND	5787.633	盲検的	
CTNS 00005	ND	ND	盲検的	予測 - 57kb 欠失/57kb 欠失
CTNS 00006	ND	991.878	盲検的	
CTNS 00007	ND	922.330	盲検的	
CTNS 00008	71.8795 3553	469.439	盲検的	予測 - 正常な対照
CTNS 00009	ND	ND	盲検的	予測 - 57kb 欠失/57kb 欠失
CTNS 0010	ND	ND	盲検的	予測 - 57kb 欠失/57kb 欠失
CTNS 00011	ND	ND	盲検的	予測 - 57kb 欠失/57kb 欠失
CTNS 00012	ND	1087.535	盲検的	
CTNS 00013	79.7992 8237	3401.707	盲検的	予測 - 正常な対照
正常な対照				
NM1	46.2305 2899	1177.935	確認	
NM2	ND	2000.437	確認	
NM3	46.6316 9607	1226.747	確認	
NF1	ND	1784.461	確認	

【0507】

実施例 3. シスチン症の診断のための CTNS 及び SHPK ペプチドの多重 immuno-SRM アッセイ。罹患した DBS 及び正常な対照 DBS 由来の CTNS 及び SHPK のペプチドバイオマーカーの多重定量化は、単一の実験で達成されており、その結果は基礎となる患者の遺伝子型と一致している。CTNS 115 ペプチドを、シスチン症患者試料の多重分析のために、セドヘプツロキナーゼ (SHPK) のシグネチャーペプチドバイオマーカーである SHPK 363 と結合した。これらのアッセイでは、immuno-SRM ワークフローで CTNS 115 及び SHPK 363 の両方の抗体の組み合わせた使用を含んだ。この分析では、4 マイクログラムの CTNS 115 mAb 及び 0.25

マイクログラムのSHPK363mAbを使用した。多重分析は、4人の正常な対照、6人の確認されたシスチン症患者、及び13人の盲検試料で実施した(表8)。CTNS115は、既知の患者試料には完全に存在しない。さらに、57kbの欠失についてホモ接合性であることが確認された患者試料は、SHPK363を欠いているが、ヘテロ接合性の患者試料にはさまざまなレベルのSHPKタンパク質が存在する。興味深いことに、試料CTNS209(57kb欠失及びc.838A>Gの複合ヘテロ接合体;p.K280R)は、欠失が存在しない試料CTNS211-213と比較してSHPKのレベルが低下しており(図13)、遺伝子型とペプチドレベルとの間の相関が示唆される。13の盲検化された試料のうち、2つだけがCTNSの検出可能な濃度を有する。これらの試料は、正常な対照であると予測される。アッセイはまた、試料00005及び00009-00010がCTNS及びSHPKペプチドの両方を欠いているため、ホモ接合性欠失を有する患者由来であることも正確に予測した(表8)。

【0508】

CTNS115及びSHPK363の最初の多重化された定量化に基づいて、CTNS115シグナルを増大させるために増強された感度が必要であると確認された。これにより、WatersIonkeyシステムを使用したLC-MS/MS検出中のマイクロリットル/分の流量から、より感度の高いナノリットル/分のLC-MS/MSアッセイへの移行が促された。この変更により、測定の実感度が大幅に向上した。両方のシステムで分析した場合のCTNS115の直接比較では、ナノフロー分析により、ペプチドのシグナル対ノイズ(S/N)比が123amolで44倍、3amolで16倍、0.3amolで5倍向上することが見出される(図14)。これにより、DBSでのCTNS115の定量限界が有意に低下する。さらに、LC-MS/MS分析に通常注入される試料の1/2を使用して、シグナルの増大を得た。これにより、将来のスクリーニングに必要なDBS試料の量を減らすことが可能になる。

【0509】

この改善されたアッセイにより、9つの盲検試料及び4つの正常対照をスクリーニングした(図15)。9つの試料のうち7つは、CTNS115を完全に欠いていることが見出された。それらの7つのうち6つはさらに、SHPK363を欠いており、両方のタンパク質の産生を損なう57kbのホモ接合性欠失変異を抱えていると予測された。残りの3人の患者はヘテロ接合体であると予測された。予測されたヘテロ接合体のうちの2つは、対照と比較して、CTNS115のレベルが中程度から有意に減少していることが見出された。これらの予測は、3つの複合ヘテロ接合体を含む6つのケースで確認された。残りの3人の患者の配列決定は進行中であるが、immuno-SRMによって57kbの欠失ホモ接合体であると予測されている。正常な対照は、CTNS115及びSHPK363の両方とも相当なレベルを有することが見出された。

【0510】

他のタンパク質からの検証されたペプチドバイオマーカーの組み込みによって、下流のプロセスモニタリング及び分析品質管理のためのロバストな臨床基準範囲の開発が可能になるであろう。WD(ATP7Bタンパク質)及び原発性免疫不全症(BTK及びWASタンパク質)に対する抗体が組み込まれている。これらの範囲は、母集団スクリーニング環境で実行された任意の試料の臨床的妥当性を通知し、一方でそれら自体の関連する病状の診断スクリーニングとしても同時に機能する。

【0511】

実施例4. 追加のCTNS及びSHPKペプチドバイオマーカーが開発されている。ペプチドCTNS120、CTNS194、SHPK44、及びSHPK388は、ロバストな免疫応答及び高いポリクローナル抗体力価の生成を示した。したがって、抗CTNS120、抗CTNS194、抗SHPK44、及び/または抗SHPK388抗体を開示された方法で使用して、シスチン症をスクリーニングしてもよい。SHPK388のポリクローナル抗体は、これまで、正常な対照DBSにこのペプチドが存在し、患者のDBSには存在しないことを示すために利用されてきた。CTNS120、CT

NS 194、SHPK 44、及びSHPK 388のペプチドバイオマーカーのモノクローナル抗体が作成される。これらのマーカーは、既存のマルチプレックスアッセイに組み込まれる。

【0512】

実施例5. ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して、WASp 274またはBTK 407ペプチドを濃縮した。内部標準ペプチドピーク面積は、WASp 274（図16B及び16D）及びBTK 407（図16A及び16C）の両方のペプチド捕捉時に生成された。ピーク面積は、ブランク対照試料のみ（すなわち、患者の血液なし、図16C、16D）、及び患者とブランク対照試料の両方の集計セット（図16A及び16B）で測定された。モノクローナル抗体は、試料マトリックスに関係なく、標的ペプチドを捕捉及び濃縮する、同等または優れた能力を示した。

10

【0513】

実施例6. シスチン症スクリーニングの拡張。実施例2及び3（図13及び表8）に記載されるようなシグネチャーペプチドバイオマーカーCTNS 115及びSHPK 363を使用するシスチン症のスクリーニングは、合計90人の患者を含むように拡張された。分析後、シスチン症患者は、盲検化されておらず、CTNSレベルが対照と比較して著しく低下していることが見出された。大多数（87/90、96.7%）は、変異に関係なく、正常平均より1.5標準偏差低い診断カットオフを下回るCTNS 115のレベルを有する（図17）。さらに、シスチン症患者の変異は、SHPK濃度に基づいて層別化され得る。既知のホモ接合性57kb欠失の遺伝的背景のある患者のうち、26/27（96.3%）は、SHPK 363の検出不可能なレベルであった。これらの患者は、正常平均より1.8標準偏差低い診断カットオフセットを下回った。さらに、単一の57kb欠失変異を持つ複合ヘテロ接合性患者は、この欠失変異のコピーがない患者よりもSHPK 363レベルが有意に低いことが見出された。予想どおり、これらの患者は、遺伝子型に比例してSHPKを首尾よく産生した（図17）。

20

【0514】

実施例7. WD患者に関する研究。immuno-SRMアッセイは、実施例1に記載されているように実施したが、正常対照及び16人のWD患者由来のDBS試料、ならびにWDの以下のシグネチャーペプチドに結合するモノクローナル抗体を使用した：ATP7B 1056、ATP7B 214、及びATP7B 887（図18A～図18C）。この研究では、16人のWD患者全員が、ATP7B 1056のレベルの低下または欠如を示した（正常対照の平均より2.6SD未満；図18A）。ATP7B 214及びATP7B 887ペプチドレベルの両方が、正常対照と比較して同様に減少した（図18B、18C）。いずれの場合も、全てのWD患者は、ATP7Bペプチドバイオマーカーのレベルが正常な対照のレベルを下回っていると特定された。それぞれがNBSスクリーニングツールとしての潜在的な有用性を有しており、一緒になってWD状況のロバストな優遇的確認が得られる。

30

【0515】

当業者によって理解されるように、本明細書に開示される各実施形態は、その特定の記載された要素、ステップ、成分または構成要素を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなってもよい。したがって、「含む（include）」または「含んでいる（including）」という用語は、「含む、からなる、または本質的にからなる」を意味すると解釈されるべきである。移行用語「含む（comprise）」または「含む（comprises）」とは、不特定の要素、ステップ、成分、または構成要素を、たとえ大量であっても、含むがこれらに限定されず可能にすることを意味する。「からなる」という移行句は、指定されていない任意の要素、ステップ、成分、または構成要素を除外する。「本質的にからなる」という移行句は、実施形態の範囲を、特定の要素、ステップ、成分、または構成要素に、及び実施形態に実質的に影響を及ぼさないものに限定する。重大な影響により、新生児から得られたDBS、本明細書に開示された抗体、及びimmuno-SRMを利用して、SCID、WAS、XLA、シスチン症、またはウィル

40

50

ソン病を確実に診断する能力が統計的に有意に低下する。

【0516】

別段示さない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される成分の量、分子量などの特性、反応条件などを表す全ての数字は、全ての場合において「約」という用語によって修飾されると理解されるべきである。したがって、反対に示されない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲に記載された数値パラメーターは、本発明によって得られることが求められる所望の特性に応じて変化し得る近似値である。少なくとも、均等論の適用を請求項の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメーターは、少なくとも報告された有効桁数に照らして、及び通常の丸め手法を適用することによって解釈されるべきである。さらに明確にする必要がある場合、「約」という用語は、記載された数値または範囲と組み合わせて使用される場合、すなわち、記載された値または範囲よりいくらか多いまたはいくらか少ないことを示すとき（記載された値の±20%の範囲内まで；記載値の±19%；記載値の±18%；記載値の±17%；記載値の±16%；記載値の±15%；記載値の±14%；記載値の±13%；記載値の±12%；記載値の±11%；記載値の±10%；記載値の±9%；記載値の±8%；記載値の±7%；記載値の±6%；記載値の±5%；記載値の±4%；記載値の±3%；記載値の±2%；または記載値の±1%）、当業者によって合理的に帰される意味を有する。

10

【0517】

本発明の広い範囲を示す数値範囲及びパラメーターは近似値であるにもかかわらず、特定の実施例に記載される数値は、可能な限り正確に報告される。ただし、数値には本質的に、それぞれの試験測定で見出された標準偏差から必然的に生じる特定の誤差が含まれている。

20

【0518】

本発明を説明する文脈で（特に以下の特許請求の範囲で）使用される用語「a」、「an」、「the」及び同様の指示対象は、本書に別段の記載がない限り、または文脈によって明確に矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈されるべきである。本明細書での値の範囲の列挙は、単に、その範囲内にある各々の個別の値を個別に言及する簡単な方法として機能することを意図している。本明細書に別段の記載がない限り、個々の値は、本明細書に個別に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行され得る。本明細書で提供されるありとあらゆる例、または例示的な言語（例えば、「など」）の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図したものであり、それ以外に特許請求される本発明の範囲を制限するものではない。本明細書のいかなる文言も、本発明の実施に不可欠な特許請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

30

【0519】

本明細書に開示される本発明の代替要素または実施形態の分類は、限定として解釈されるべきではない。各グループのメンバーは、個別に、またはグループの他のメンバーまたは本明細書に見られる他の要素と任意の組み合わせで参照及び請求され得る。グループの1つ以上のメンバーが、利便性及び／または特許性の理由から、あるグループに含まれるか、またはあるグループから削除されることが予想される。そのような包含または削除が発生した場合、本明細書には変更されたグループが含まれていると見なされ、したがって、添付の特許請求の範囲で使用されている全てのマーカッシュ（Markushグループ）の書面による説明が満たされる。

40

【0520】

本発明を実施するために本発明者に知られている最良のモードを含む、本発明の特定の実施形態が本明細書に記載されている。当然ながら、これらの説明された実施形態の変形は、前述の説明を読むと、当業者には明らかになるであろう。本発明者は、当業者がそのような変形を適切に使用することを期待し、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されている以外の方法で本発明を実施することを意図している。したがって、本発明は、適用

50

法令によって許可されるように、本明細書に添付された特許請求の範囲に列挙された主題の全ての変更及び同等物を含む。さらに、その全ての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせは、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明に含まれる。

【0521】

さらに、本明細書全体を通して、特許、印刷された刊行物、雑誌記事、及び他の書面のテキスト（本明細書の参照資料）に対して多数の参照がなされてきた。参照される資料のそれぞれは、それらの参照される教示のために、その全体が参照により本明細書に個別に組み込まれる。

【0522】

最後に、本明細書に開示される本発明の実施形態は、本発明の原理の例示であることが理解されるべきである。使用され得る他の変更は、本発明の範囲内である。したがって、限定ではないが例として、本発明の代替の構成を、本明細書の教示に従って利用し得る。したがって、本発明は、正確に示され、説明されたものに限定されない。

【0523】

本明細書に示される詳細は、例として、本発明の好ましい実施形態の例示的な議論を目的とするものにすぎず、本発明の様々な実施形態の原理及び概念的態様の最も有用かつ容易に理解される説明であると考えられるものを提供する目的で提示される。この点に関して、本発明の基本的な理解に必要であるよりも詳細に本発明の構造の詳細を示す試みはなされておらず、図面及び／または実施例とともに行った説明は、本発明のいくつかの形態が、実際に具体化され得る方法を当業者に明らかにしている。

【0524】

本開示で使用される定義及び説明は、以下の実施例で明確かつ明瞭に変更されない限り、または意味の適用がなんらかの構造を無意味または本質的に無意味にする場合を除いて、なんらかの将来の構造を制御することを意味及び意図する。用語の構成によって意味がなくなるか、または本質的に意味がなくなる場合、定義はWebster's Dictionary、3rd Edition、またはOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Eds. Atwood et al., Oxford University Press, Oxford, 2006)などの当業者に公知の辞書から取得する必要がある。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

疾患	タンパク質的	ペプチド	配列	総量	親イオン質量 (m/z)	娘イオン質量 (m/z)											
重症複合免疫不全症 (SCID)	CD3ε	CD3ε (CD3ε 197*)	DLVSGLN QR (配列番号 1)	1086.54	533.27 ++	L [v8] - 950.5054+	L [v8] - 475.7563++	L [v8] - 302.1816+	L [v8] - 196.5944++	Y [b3] - 332.1816+	Y [b3] - 302.1816+	Y [b3] - 240.1105++	Y [b3] - 240.1105++	Y [b3] - 208.6212++	Y [b3] - 208.6212++	Y [b3] - 325.1632++	Y [b3] - 325.1632++
						Y [v7] - 837.4213+	Y [v7] - 419.2143++	Y [v7] - 479.2136+	Y [v7] - 240.1105++	S [b4] - 479.2136+	S [b4] - 479.2136+	S [b4] - 268.6212++	S [b4] - 268.6212++	S [b4] - 336.2351+	S [b4] - 336.2351+	S [b4] - 325.1632++	S [b4] - 325.1632++
ウィス・コット・アルドリック症候群 (WAS)	WASp	WASp 274-288 (WASp 274*)	AGISEAQL TDAETSK (配列番号 2)	1521.76	760.88 ++	L [v8] - 1063.5286+	L [v8] - 532.2669++	L [v8] - 657.3202+	L [v8] - 329.1638++	L [v8] - 657.3202+	L [v8] - 329.1638++	L [v8] - 385.7058++	L [v8] - 385.7058++	L [v8] - 770.4043+	L [v8] - 770.4043+	L [v8] - 871.4520+	L [v8] - 871.4520+
						Q [v9] - 992.4895+	Q [v9] - 496.7484++	Q [v9] - 432.7191++	Q [v9] - 376.1771++	Q [v9] - 432.7191++	Q [v9] - 376.1771++	Q [v9] - 896.4789+	Q [v9] - 896.4789+	Q [v9] - 1057.5160+	Q [v9] - 1057.5160+	Q [v9] - 1186.5586+	Q [v9] - 1186.5586+

【図 1 - 2】

(続き)

疾患	タンパク質的	ペプチド	配列	総量	親イオン質量 (m/z)	娘イオン質量 (m/z)											
WAS	WASp	WASp 274	AGISEAQL TDAETSK (配列番号 2)	1521.76	760.88 ++	E [v4] - 464.2351+	E [v4] - 232.6212++	E [v4] - 1287.6063+	E [v4] - 644.3068++	T [b13] - 644.3068++	T [b13] - 644.3068++	S [b14] - 687.8228++	S [b14] - 687.8228++	Y [b3] - 196.6230+	Y [b3] - 196.6230+	Y [b3] - 253.1365++	Y [b3] - 253.1365++
						T [v3] - 335.1925+	T [v3] - 168.0999++	T [v3] - 1374.6383+	T [v3] - 687.8228++	S [b14] - 687.8228++	S [b14] - 687.8228++	Y [b3] - 390.2387+	Y [b3] - 390.2387+	D [b4] - 326.6707+	D [b4] - 326.6707+	F [b5] - 326.6707+	F [b5] - 326.6707+
ウィス・コット・アルドリック症候群 (WAS)	WASp	WASp 289-304 (WASp 289*)	LYDFIED QGGLEAV R (配列番号 3)	1638.94	919.47 ++	D [v13] - 1448.7016+	D [v13] - 806.3861++	D [v13] - 390.2387+	D [v13] - 253.1365++	D [b4] - 326.6707+	D [b4] - 326.6707+	F [b5] - 326.6707+	F [b5] - 326.6707+	I [b6] - 383.2127++	I [b6] - 383.2127++	E [b7] - 447.7340++	E [b7] - 447.7340++
						E [v10] - 1073.5222+	E [v10] - 532.2669++	E [v10] - 765.4182+	E [v10] - 447.7340++	E [b7] - 447.7340++	E [b7] - 447.7340++	D [b8] - 505.2475++	D [b8] - 505.2475++	Q [b9] - 569.2768++	Q [b9] - 569.2768++	G [b10] - 597.7875++	G [b10] - 597.7875++

10

20

30

40

50

【図 1 - 3】

(続き)

疾患	タンパク質 質的的	ペプチド	配列	総量	親イオン 質量 (m/z)	娘イオン質量 (m/z)
X連鎖無 ガンマグ ロブリン 血症 (XLA)	BTK (BTK 407) ELGTGQF GVVK (配列 番号 4)	BTK 407- 417 (BTK 407)		1135.63	567.81 ++	L[y10]- 1005.5728+ G[y9]- 892.4887+ T[y8]- 835.4672+ G[y7]- 734.4196+ Q[y6]- 677.3981+ F[y5]- 549.3395+ G[y4]- 402.2711+ V[y3]- 345.2496+ L[y10]- 503.2900++ G[y9]- 446.7480++ T[y8]- 401.2031+ G[y5]- 229.6159++ Q[y6]- 293.6452++ F[y7]- 367.1794++ G[y8]- 395.6901++ V[y9]- 445.2243++ V[y10]- 494.7585++ L[b3]- 188.6152++ D[b4]- 246.1287++ D[b5]- 303.6421++ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						V[y13]- 700.3330++ L[y12]- 650.7988++ D[y11]- 594.2568++ D[y10]- 536.7433++ E[y9]- 957.4524+ Y[b8]- 828.4088+ T[y7]- 685.3464+ S[y6]- 564.2368+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
X連鎖無 ガンマグ ロブリン 血症 (XLA)	BTK (BTK 545) YVLDDY TSSVGSK (配列 番号 5)	BTK 545- 558 (BTK 545)		1583.72	781.88 ++	V[y13]- 700.3330++ L[y12]- 650.7988++ D[y11]- 594.2568++ D[y10]- 536.7433++ E[y9]- 957.4524+ Y[b8]- 828.4088+ T[y7]- 685.3464+ S[y6]- 564.2368+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+
						L[b3]- 376.2231+ D[b4]- 491.2500+ D[b5]- 606.2770+ E[b6]- 735.3196+ Y[b7]- 898.3829+ T[b8]- 999.4306+ S[b9]- 1086.4626+ S[y10]- 1173.4946+

【図 1 - 4】

(続き)

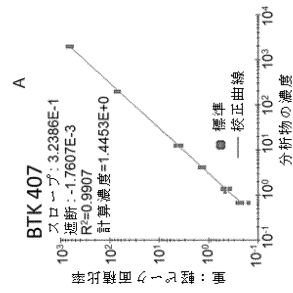
疾患	タンパク質 質的的	ペプチド	配列	総量	親イオン 質量 (m/z)	娘イオン質量 (m/z)
XLA	BTK	BTK 545	YVLDDY TSSVGSK (配列 番号 5)	1583.72	781.88 ++	S[y5]- 477.2687+ V[y4]- 380.2347+ G[y3]- 291.1833+ L[y1]- 500.3555+ V[y3]- 387.2714+ I[y2]- 268.2030+ S[y5]- 477.2687+ V[y4]- 380.2347+ G[y3]- 291.1833+ L[y1]- 500.3555+ V[y3]- 387.2714+ I[y2]- 268.2030+
						S[y5]- 477.2687+ V[y4]- 380.2347+ G[y3]- 291.1833+ L[y1]- 500.3555+ V[y3]- 387.2714+ I[y2]- 268.2030+
シスチン症	CTNS	CTNS 115-119 (CTNS 115)	FLVIR (配列 番号 6)	646.41	324.21 ++	S[y5]- 477.2687+ V[y4]- 380.2347+ G[y3]- 291.1833+ L[y1]- 500.3555+ V[y3]- 387.2714+ I[y2]- 268.2030+ S[y5]- 477.2687+ V[y4]- 380.2347+ G[y3]- 291.1833+ L[y1]- 500.3555+ V[y3]- 387.2714+ I[y2]- 268.2030+
						S[y5]- 477.2687+ V[y4]- 380.2347+ G[y3]- 291.1833+ L[y1]- 500.3555+ V[y3]- 387.2714+ I[y2]- 268.2030+

【図 1 - 5】

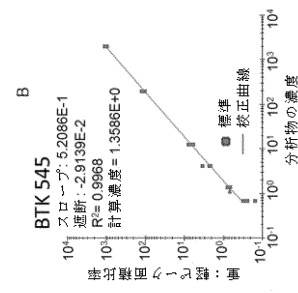
(続き)

疾患	タンパク質 質的的	ペプチド	配列	総量	親イオン 質量 (m/z)	娘イオン質量 (m/z)
シスチン症	CTNS	CTNS 360	KRPQYDQ LN (配列 番号 8)	1089.56	545.29 ++	R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
シスチン症	SHPK	SHPK 363-376 (SHPK 363)	DTHLTTP TVLGER (配列 番号 9)	1551.83	518.28	R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872.4836+ P[y7]- 771.4359+ T[y6]- 674.3832+ V[y5]- 573.3355+ L[y4]- 474.2671+
						R[y8]- 962.4690+ P[y7]- 806.3679+ G[y6]- 709.3151+ L[y5]- 652.2337+ Q[y4]- 480.1204+ Q[y3]- 374.1203+ T[y13]- 1437.8060+ H[y12]- 1336.7583+ L[y11]- 1199.6894+ T[y10]- 1086.6153+ I[y9]- 985.5677+ T[y8]- 872

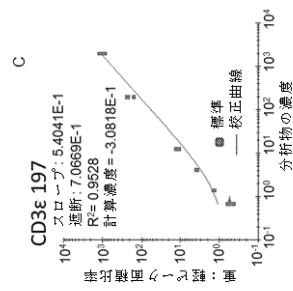
【図 2 A】



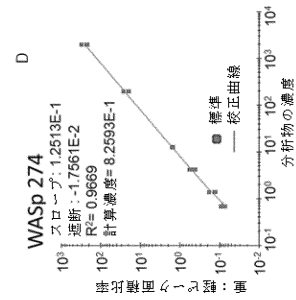
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

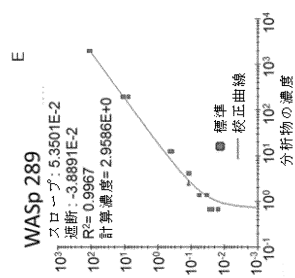
20

30

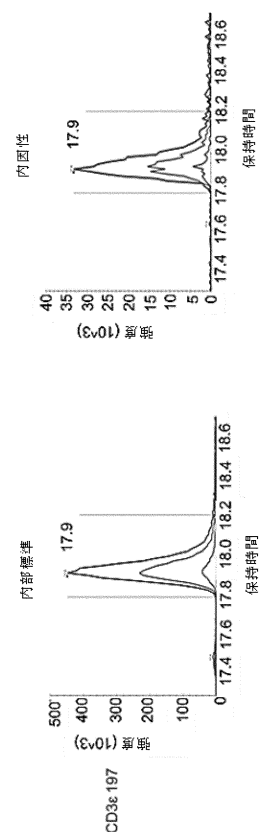
40

50

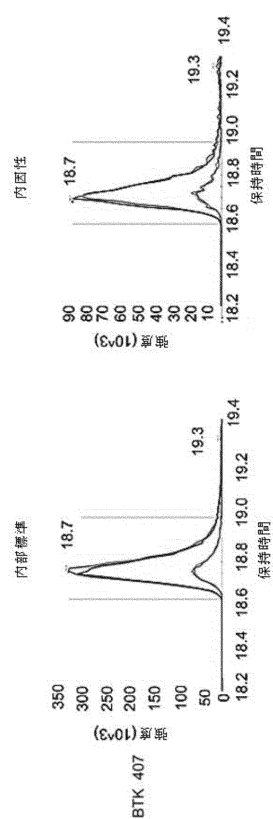
【図 2 E】



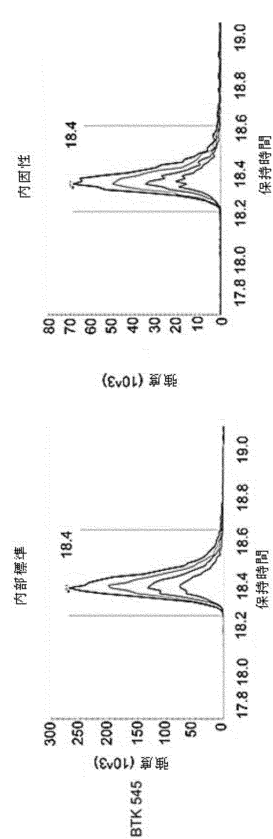
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



10

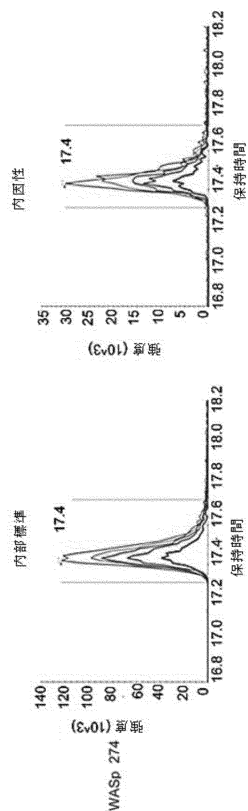
20

30

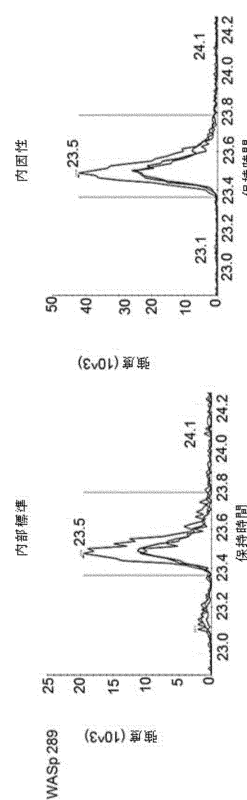
40

50

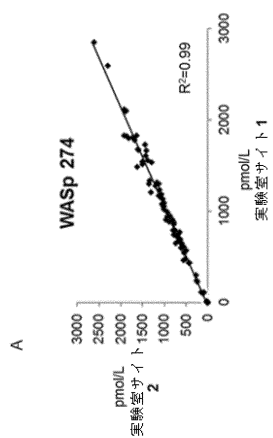
【図 3 D】



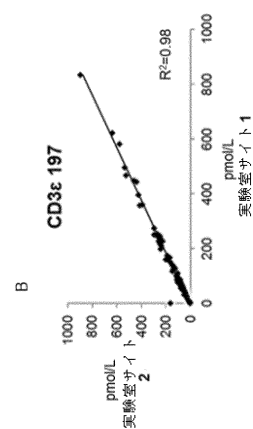
【図 3 E】



【図 4 A】



【図 4 B】



10

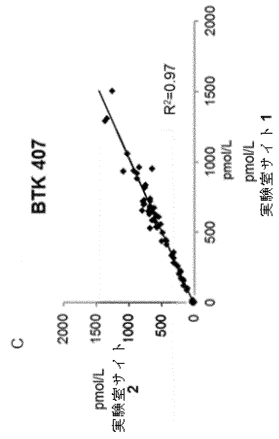
20

30

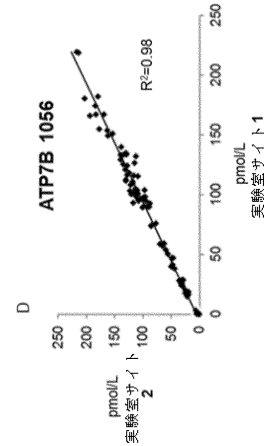
40

50

【図 4 C】

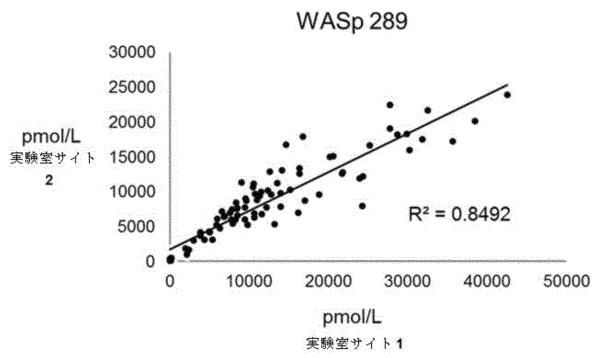


【図 4 D】

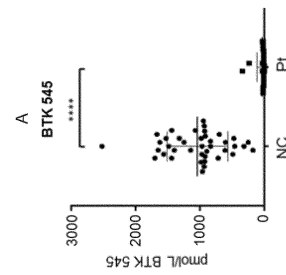


10

【図 5】

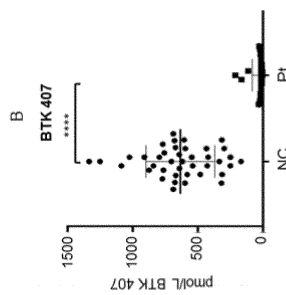


【図 6 A】

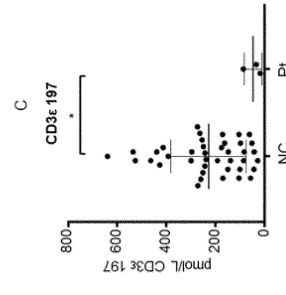


20

【図 6 B】



【図 6 C】

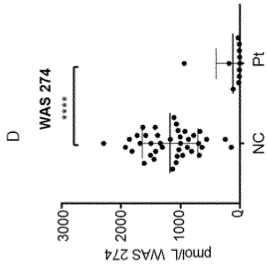


30

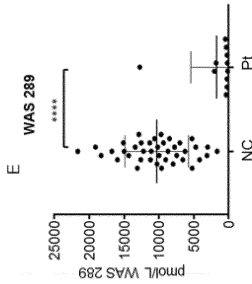
40

50

【図 6 D】



【図 6 E】



【図 7 - 1】

対照 試料	ATP7B 1056 (pmol/L)	患者	ATP7B 1056 (pmol/L)	Immuno- SRM 診断	臨床診断	遺伝型	備考
NC 1	114.29	1	113.07	正常	X連鎖 CGD	CYBB 変異	
NC 2	130.07	2	136.36	正常	X連鎖 CGD	CYBB 変異	
NC 3	110.14	3	217.07	BTK	BTK	BTK c.1587 1589delA (p.N530Tfs26*)	4 番の兄弟
NC 4	129.00	4	107.79	BTK	BTK	BTK c.1587 1589delA (p.N530Tfs26*)	3 番の兄弟
NC 5	65.36	5	183.46	BTK	BTK	BTK c.1940T>C (p.L647P)	
NC 6	96.93	6	30.29	BTK	BTK	BTK c.763C>T (p.R255*)	
NC 7	162.79	7	123.21	BTK	BTK	BTK c.1940T>C (p.L647P)	
NC 8	116.07	8	188.61	BTK	BTK	BTK c.1889T>A (p.M630K)	
NC 9	138.79	9	20.00	BTK	BTK	BTK c.1908+2delTAAAGTGCTT (スプライス)	
NC 10	98.07	10	28.43	正常	BTK	特定された変異はない	
NC 11	115.14	11	21.57	BTK	BTK	BTK c.1768A>T (p.I590F)	
NC 12	127.57	12	32.21	BTK	BTK	特定された変異はない	
NC 13	77.86	13	30.93	正常	BTK	特定された変異はない	

【図 7 - 2】

(続き)

対照 試料	ATP7B 1056 (pmol/L)	患者	ATP7B 1056 (pmol/L)	Immuno- SRM 診断	臨床診断	遺伝型	備考
NC 14	108.57	14	19.43	BTK	BTK	BTK c.1714 1715delTA (p.S52Ifs14*)	
NC 15	162.14	15	25.21	BTK	BTK	BTK c.963C>T (p.S318F)	
NC 16	203.71	16	30.36	BTK	BTK	BTK c.11811028T>G (p.Y40D)	
NC 17	179.93	17	36.29	BTK	BTK	BTK c.629insA (p.P210Tfs5*)	
NC 18	127.36	18	33.50	BTK	BTK	BTK c.1651T>A (p.Y551N)	
NC 19	130.64	19	25.07	BTK	BTK	BTK c.1735G>C (p.D579H)	
NC 20	130.00	20	48.86	BTK	BTK	BTK c.752G>A (p.V251*)	
NC 21	101.64	21	50.71	BTK	BTK	BTK c.117 119delCTA (p.del40Y)	
NC 22	115.21	22	33.64	BTK	BTK	BTK c.521-T>G (スプライス)	
NC 23	109.14	23	31.93	BTK	BTK	BTK c.1876delG (p.A582Lfs4*)	
NC 24	100.71	24	30.86	BTK	BTK	BTK c.763C>T (p.R255*)	
NC 25	134.64	25	62.71	BTK	BTK	BTK c.1782delG (p.K595Rfs52*)	
NC 26	89.07	26	46.14	BTK	BTK	BTK c.1657delA (p.S553Afs2*)	
NC 27	121.43	27	44.79	BTK	BTK	BTK c.1610delT (p.V537Dfs18*)	
NC 28	96.07	28	69.71	BTK	BTK	BTK c.37C>T (p.R13*)	
NC 29	88.36	29	90.25	WAS	WAS	WAS c.1453+2T>A	患者番号 30と同じ (BMTの前)

【図 7 - 3】

(続き)

対照 試料	ATP7B 1056 (pmol/L)	患者	ATP7B 1056 (pmol/L)	Immuno- SRM 診断	臨床診断	遺伝型	備考
NC 30	118.64	30	112.57	正常	WAS	正常な BMT ドナー	患者番号 29と同じ (BMT の前)
NC 31	131.86	31	168.64	WAS	WAS/XLT	WAS c.223G>A (p.V75M)	
NC 32	132.64	32	108.79	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	
NC 33	106.79	33	47.71	WAS	WAS	WAS c.838C>T (p.Q280*)	
NC 34	138.36	34	30.07	WAS	WAS	WAS c.838delC (p.Q280Sfs28*)	
NC 35	92.93	35	31.14	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	36 番の 患者の兄弟
NC 36	120.29	36	60.14	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*) WAS c.1264 1267msCCTTGCTGCGCTCT (p.G422Pfs20*)	36 番の 患者の兄弟
NC 37	85.86	37	55.79	WAS	WAS	WAS c.332 336insCC (p.F113Pfs15*)	
NC 38	124.00	38	7.21	WAS	WAS	WAS c.756G>A (p.W252*)	
NC 39	99.50	39	63.36	WAS	WAS	RAG1 c.2159G>A (p.G720D) - ホモ接合体	
NC 40	117.43	40	139.50	SCID	T-B-NK+ SCID	IL2RG c.460C>T (p.T154S)	
		41	182.79	正常	低形質 T-B+NK+	不明 - 遺伝子パネル でエクスプレッション	
		42	176.79	SCID	SCID		

【図 8 - 1】

試料	BTK 545 (pmol/L)	BTK 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3e 197 (pmol/L)	試料	BTK 545 ATP7B 比率	BTK 407 ATP7B 比率	WASp 274 ATP7B 比率	WASp 289 ATP7B 比率	CD3e 197 ATP7B 比率
1	251.07	252.07	699.43	5245.29	175.14	1	2.20	2.21	6.12	45.90	1.53
2	1485.71	796.57	1504.79	11111.50	149.43	2	11.42	6.12	11.57	85.43	1.15
3	926.79	679.86	966.21	6995.86	242.07	3	8.41	6.17	8.77	63.52	2.20
4	177.93	169.71	145.93	1674.93	51.29	4	1.38	1.32	1.13	12.98	0.40
5	923.00	597.29	1076.21	12230.57	259.71	5	14.12	9.14	16.47	187.13	3.97
6	1322.79	690.50	1445.07	14981.07	427.07	6	13.65	7.12	14.91	154.56	4.41
7	1700.64	1253.00	1928.43	9975.57	104.07	7	10.45	7.70	11.85	61.28	0.64
8	609.36	299.57	684.50	6569.93	84.86	8	5.25	2.58	5.90	56.60	0.73
9	927.43	642.14	1029.29	10630.00	272.07	9	6.68	4.63	7.42	76.59	1.96
10	1145.71	599.36	1068.93	12893.94	362.79	10	11.68	6.11	10.90	131.47	4.01
11	970.29	690.50	986.07	9373.64	536.00	11	8.43	6.00	7.70	81.41	4.66
12	916.93	673.79	927.79	12554.64	413.71	12	7.19	5.28	7.27	98.41	3.24
13	1071.86	582.71	1817.00	15947.21	82.71	13	13.77	7.48	23.34	204.83	1.06
14	834.86	429.21	1861.93	18301.64	57.07	14	7.69	3.95	17.15	168.57	0.53
15	1527.86	705.07	1499.36	11235.71	146.00	15	9.42	4.35	9.25	66.30	0.91
16	932.64	677.64	1171.71	14357.29	251.07	16	4.58	3.33	5.75	70.48	1.23
17	1667.21	764.93	1634.29	19107.36	98.07	17	9.27	4.25	9.08	106.19	0.55
18	601.71	317.00	814.00	8712.79	162.71	18	4.72	2.49	6.39	68.41	1.28
19	2520.93	1336.43	2293.86	21659.43	104.14	19	19.30	10.23	17.56	165.79	0.80
20	967.36	644.50	1059.14	7774.50	27.64	20	7.44	4.96	8.15	59.80	0.21
21	984.00	606.50	1111.43	6288.00	254.43	21	9.86	5.97	10.93	61.86	2.50
22	981.14	549.00	1043.43	13103.14	526.86	22	8.52	4.77	9.06	113.73	4.57
23	1398.86	770.71	1341.07	12621.43	439.79	23	12.82	7.06	12.29	115.64	4.03
24	489.71	319.57	674.57	4735.50	138.29	24	4.86	3.17	6.70	47.02	1.37

10

20

30

40

50

【図 8 - 2】

(続き)

患者	BTk 545 (pmol/L)	BTk 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3ε 197 (pmol/L)	BTk 545 ATP7B 比率	BTk 407 ATP7B 比率	WASp 274 ATP7B 比率	WASp 289 ATP7B 比率	CD3ε 197 ATP7B 比率
25	892.29	541.00	867.29	7971.86	296.29	25	6.63	4.02	6.44	59.21
26	1620.93	911.79	1682.29	16762.21	263.57	26	18.20	10.24	18.89	188.19
27	317.93	251.50	248.21	3036.50	100.43	27	2.62	2.07	2.04	25.01
28	701.71	422.14	1598.29	15102.14	42.29	28	7.30	4.39	16.53	157.20
29	1682.21	875.14	1388.14	10278.71	639.79	29	17.68	9.92	15.69	116.33
30	935.43	483.57	1007.29	10191.71	249.21	30	7.68	4.08	8.49	85.90
31	461.21	336.86	639.00	4190.21	191.57	31	3.50	2.55	4.95	31.78
32	835.93	671.86	780.14	5269.57	243.14	32	6.30	5.07	5.88	39.73
33	1248.43	759.00	1419.71	11329.57	273.50	33	11.69	7.11	13.29	106.10
34	474.43	314.86	563.57	3114.79	171.14	34	3.40	2.26	4.04	22.35
35	1648.64	1089.07	1730.00	9638.43	238.57	35	17.74	11.71	18.62	103.72
36	959.50	773.43	1002.36	9043.00	170.21	36	7.98	6.43	8.33	75.18
37	1440.57	1028.86	1427.57	7468.00	61.79	37	16.78	11.96	16.63	88.98
38	948.21	620.29	1135.29	8464.86	289.50	38	7.65	5.00	9.16	68.43
39	717.21	435.71	1610.86	13417.57	43.07	39	7.21	4.38	16.19	134.85
40	1437.36	843.00	1306.07	9699.21	464.00	40	12.24	7.18	11.12	82.60

【図 9 - 1】

患者	BTk 545 (pmol/L)	BTk 407 (pmol/L)	WASp (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3ε 197 (pmol/L)	Immu- SRM 診断	臨床診断	遺伝子型	備考
1	2221.71	1362.07	2609.43	27763.21	246.07	正常	X-連鎖 CGD	CYBB 変異	
2	1148.86	744.21	1028.71	11880.21	231.00	正常	X-連鎖 CGD	CYBB 変異	
3	3.79	13.79	1919.71	23893.21	86.29	BTk	BTk	BTk c.1587_1589delA (p.N630Tfs26*)	4 番の兄弟
4	11.79	13.93	1623.07	17947.86	200.43	BTk	BTk	BTk c.1587_1589delA (p.N630Tfs26*)	3 番の兄弟
5	26.96	16.96	1280.39	17413.25	99.11	BTk	BTk	BTk c.1940T>C (p.L647P)	
6	20.21	11.36	257.00	4310.21	177.50	BTk	BTk	BTk c.763C>T (p.R255*)	
7	19.64	12.43	1121.29	18177.57	71.57	BTk	BTk	BTk c.1940T>C (p.L647P)	
8	23.36	23.82	637.00	8699.25	103.86	BTk	BTk	BTk c.1889T>A (p.M630K)	
9	21.71	13.36	495.00	6009.64	63.50	BTk	BTk	BTk c.1908+2delTAAGTGC TT	
10	237.64	113.14	548.00	7162.29	65.79	正常	BTk	特定された変異はない BTk c.1768A>T (p.I590F)	
11	10.86	10.93	781.79	9599.00	81.71	BTk	BTk	特定された変異はない BTk c.693C>T (p.S318F)	
12	13.79	11.36	618.50	7024.36	65.64	BTk	BTk	特定された変異はない BTk c.1714_1715delTA (p.S572Iis14*)	
13	339.21	213.00	760.64	7695.14	110.07	正常	BTk	BTk c.1181T028T>G (p.Y40D)	
14	12.71	15.50	776.93	6535.57	94.00	BTk	BTk		
15	10.36	12.07	444.21	3723.29	57.43	BTk	BTk		
16	8.79	13.29	745.00	6118.79	65.93	BTk	BTk		

10

20

【図 9 - 2】

(続き)

患者	BTk 545 (pmol/L)	BTk 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3ε 197 (pmol/L)	Immu- SRM 診断	臨床診断	遺伝子型	備考
17	24.29	32.36	1001.79	7820.93	109.71	BTk	BTk	BTk c.629nsA (p.P210Tfs*)	
18	7.93	167.86	609.71	5347.21	86.57	BTk	BTk	BTk c.1651T>A (p.Y551N)	
19	25.93	28.50	427.29	4181.00	80.07	BTk	BTk	BTk c.1736G>C (p.D579Gfs2G>A (p.W251*))	
20	16.36	23.86	766.50	5407.93	100.57	BTk	BTk	BTk c.117_119delCTA (p.del40Y) (p.Δ27A) (p.Δ27A)	
21	6.93	19.00	801.07	8769.71	77.21	BTk	BTk	BTk c.521+1G>A (p.Δ27A)	
22	18.50	9.29	684.64	5988.29	76.57	BTk	BTk	BTk c.1676delG (p.A582Tfs4*)	
23	4.93	8.29	508.79	5970.86	77.71	BTk	BTk	BTk c.631C>T (p.R255*)	
24	10.57	19.64	537.50	7728.86	91.00	BTk	BTk	BTk c.1657delA (p.S553Afs2*)	
25	13.50	20.36	602.29	6838.79	65.00	BTk	BTk	BTk c.1676delG (p.A582Tfs4*)	
26	9.21	20.36	1030.00	8832.43	147.07	BTk	BTk	BTk c.1657delA (p.S553Afs2*)	
27	10.36	21.71	751.29	6371.79	93.64	BTk	BTk	BTk c.1610delT (p.V537Dfs18*)	
28	14.43	8.21	557.93	5896.29	50.57	BTk	BTk	BTk c.37C>T (p.R13*)	
29	784.25	547.86	182.68	2041.46	360.21	WAS	WAS	WAS c.1463+2T>A (p.Δ27A)	患者番号 30 (B MTの前)
30	1397.93	766.00	938.93	12758.86	105.64	正常	WAS (BMT後)	正常なBMTドナー	患者番号 29 (B MTの後)

【図 9 - 3】

(続き)

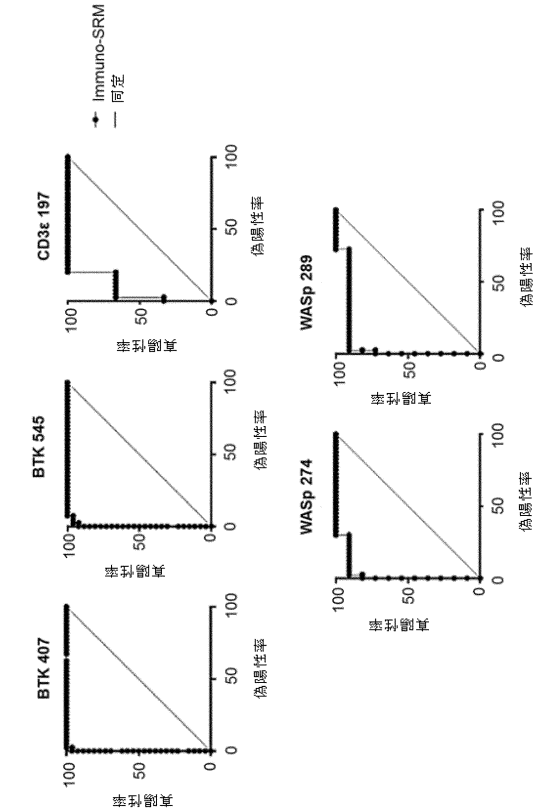
患者	BTk 545 (pmol/L)	BTk 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3ε 197 (pmol/L)	Immu- SRM 診断	臨床診断	遺伝子型	備考
31	415.00	202.36	113.86	1812.00	69.21	WAS	WAS/XLT	WAS c.223G>A (p.V75M)	
32	768.93	492.21	11.29	375.86	82.07	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	
33	342.36	346.86	11.71	248.14	77.43	WAS	WAS	WAS c.838C>T (p.Q280*)	
34	275.57	206.57	10.64	238.50	42.29	WAS	WAS	WAS c.838delC (p.Q280Sfs28*)	
35	258.79	187.50	10.29	204.64	55.43	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	3 6 番の 患者の兄弟
36	448.07	236.00	4.71	237.43	46.29	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	3 5 番の 患者の兄弟
37	307.79	167.00	33.14	476.79	126.14	WAS	WAS	WAS c.1264_1267msCCTT (p.GCCTGCCTCT (p.G424Pfs20*))	
38	123.64	106.21	6.79	148.79	132.36	WAS	WAS	WAS c.332_336msCC (p.F113Pfs15*)	
39	788.79	520.50	20.71	359.36	36.00	WAS	WAS	WAS c.756G>A (p.W282*)	
40	851.71	648.71	624.43	6892.07	33.93	SCID	T-B-NK+ SCID	WAS c.2169G>A (p.S710D) (p.Δ27A)	
41	1012.36	567.14	1285.93	20174.64	86.29	正常	X-SCID - 低形質	IL2RG c.460C>T (p.T154S)	
42	1414.36	872.43	1898.29	16707.14	17.57	SCID	T-B-NK+ SCID	不明ー遺伝子パネル ＆エクソーム解析	

30

40

50

【図 1 0 A】



【図 1 0 B】

ペプチド	曲線下面積	p 値
BTK 407	0.999	<0.0001
BTK 545	0.999	<0.0001
WASp 274	0.971	<0.0001
WASp 289	0.930	<0.0001
CD3ε 197	0.925	<0.0150

10

20

【図 1 1 - 1】

試料	BTK 545 (pmol/L)	BTK 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3ε (pmol/L)	試料	BTK 545 (pmol/L)	BTK 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (pmol/L)	CD3ε (pmol/L)
1	355.71	623.28	1579.24	31.99	82.85	32	224.50	426.40	1009.47	20.97	76.84
2	358.71	649.43	1587.71	16.74	55.14	33	138.51	257.70	688.07	12.57	65.82
3	242.96	424.54	856.51	17.72	98.01	34	219.06	440.13	1221.81	24.63	85.14
4	301.43	522.86	928.86	11.06	64.00	35	263.99	482.34	1316.96	27.65	89.00
5	209.14	366.14	703.14	8.33	49.43	36	213.20	397.64	763.65	15.04	69.54
6	123.86	258.57	601.43	7.44	66.29	37	120.76	205.76	447.29	3.41	51.22
7	196.74	369.88	900.01	6.68	56.52	38	108.89	199.60	433.98	9.06	66.82
8	285.86	486.00	740.00	9.15	71.86	39	107.60	201.18	586.91	12.00	62.53
9	185.41	345.98	696.68	5.40	76.69	40	220.50	379.03	758.07	15.72	69.40
10	231.29	430.14	880.86	10.19	88.14	41	161.69	310.50	671.93	13.94	70.11
11	207.33	352.99	732.31	14.46	73.40	42	249.11	390.48	999.88	6.56	61.10
12	186.14	316.29	690.00	8.27	78.14	43	264.57	350.38	1119.36	23.85	95.01
13	280.42	606.97	1117.93	19.75	90.14	44	759.79	1255.58	2862.29	52.00	137.65
14	252.55	452.72	932.35	18.15	86.42	45	120.48	222.93	432.41	9.28	78.98
15	203.61	393.91	940.65	17.82	99.30	46	816.16	1234.69	2550.93	19.17	255.98
16	281.13	398.35	968.64	4.96	50.94	47	823.46	1307.23	3021.83	22.77	250.97
17	519.83	903.73	933.06	5.65	71.54	48	838.91	1241.70	2014.65	15.96	203.18
18	456.87	553.17	963.40	6.19	71.40	49	623.42	905.98	1295.50	9.37	62.67
19	641.17	1019.63	1579.24	10.76	100.45	50	789.83	1219.09	2700.03	19.75	112.32
20	167.55	334.39	607.69	4.77	52.23	51	454.58	736.89	1234.69	8.24	65.53
21	329.81	614.70	1072.14	7.41	67.54	52	624.14	810.87	805.00	6.36	54.94
22	427.25	656.19	1086.45	7.25	75.84	53	360.58	498.08	785.40	5.39	58.81
23	325.95	447.72	587.37	3.20	93.29	54	166.55	300.91	712.42	4.89	64.82
24	233.52	385.19	486.06	3.55	73.83	55	141.23	267.43	811.15	5.52	72.97
25	255.69	381.47	703.27	5.07	92.72	56	263.71	438.99	975.13	6.85	108.46

【図 1 1 - 2】

(続き)

試料	BTK 545 (pmol/L)	BTK 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (nmol/L)	CD3ε (pmol/L)	試料	BTK 545 (pmol/L)	BTK 407 (pmol/L)	WASp 274 (pmol/L)	WASp 289 (nmol/L)	CD3ε (pmol/L)
26	246.39	365.30	937.78	5.95	86.42	57	163.12	290.75	767.37	5.19	67.11
27	185.30	291.04	786.97	6.13	104.74	58	253.55	448.86	1016.05	6.82	62.53
28	208.91	387.19	755.35	5.42	116.33	59	267.28	507.53	1207.50	7.79	71.69
29	253.98	358.43	865.81	6.67	129.92	60	149.10	269.29	698.54	4.99	63.96
30	168.27	289.03	565.05	4.42	111.03	61	118.33	240.81	555.17	3.92	71.54
31	139.37	274.44	580.07	12.01	52.37	62	244.68	288.03	326.81	2.49	72.12
						平均	300.86	499.05	897.04	11.37	85.25
						SD	191.74	281.62	563.07	8.47	39.49

30

40

50

【図 1 2 - 1】

患者	患者 BTK ATP7B 比率	BTK ATP7B 比率	WASp 289 ATP7B 比率	WASp 274 ATP7B 比率	CD3e 197 ATP7B 比率	Immu- SRM 診断	臨床診断	遺伝子型	備考
1	19.66	12.05	23.08	245.54	2.18	正常	文連順CGD	C7BB変異	
2	8.43	5.46	7.54	87.13	1.69	正常	文連順CGD	BTK c.1587_1589delA (p.N530Tfs28*)	4 番の兄弟
3	0.02	0.06	8.84	110.07	0.40	BTK	BTK	BTK c.1587_1589delA (p.N530Tfs28*)	3 番の兄弟
4	0.11	0.13	15.06	166.51	1.86	BTK	BTK	BTK c.1587_1589delA (p.N530Tfs28*)	
5	0.15	0.09	6.98	94.91	0.54	BTK	BTK	BTK c.1940T>C (p.L647P)	
6	0.67	0.38	8.49	142.32	5.86	BTK	BTK	BTK c.763C>T (p.R255*)	
7	0.16	0.10	9.10	147.53	0.58	BTK	BTK	BTK c.1940T>C (p.L647P)	
8	0.12	0.13	3.38	46.12	0.55	BTK	BTK	BTK c.1889T>A (p.M630K)	
9	1.09	0.67	24.75	300.48	3.18	BTK	BTK	BTK c.1908+2delTAAGTGGCTT	
10	8.36	3.98	19.28	251.94	2.31	正常	BTK	特定された変異はない	
11	0.50	0.51	36.24	444.99	3.79	BTK	BTK	BTK c.1768A>T (p.I590F)	
12	0.43	0.35	19.20	218.05	2.04	BTK	BTK	特定された変異はない	
13	10.97	6.89	24.59	248.80	3.56	正常	BTK	BTK c.1714_1715delTA (p.S572Ifs14*)	
14	0.65	0.80	39.99	336.39	4.84	BTK	BTK	BTK c.953C>T (p.S318F)	
15	0.41	0.48	17.62	147.67	2.28	BTK	BTK	BTK c.1181T028T>G (p.Y40D)	
16	0.29	0.44	24.54	201.56	2.17	BTK	BTK	BTK c.629nsA (p.P210Tfs5*)	
17	0.67	0.89	27.61	215.54	3.02	BTK	BTK	BTK c.1651T>A (p.Y551N)	
18	0.24	5.01	19.20	159.62	2.55	BTK	BTK	BTK c.1735G>C (p.D579H)	
19	1.03	1.14	17.04	166.76	3.19	BTK	BTK	BTK c.752G>A (p.W251*)	
20	0.33	0.49	16.10	110.69	2.06	BTK	BTK	BTK c.117_119delCTA (p.del40Y)	
21	0.14	0.37	15.80	172.92	1.52	BTK	BTK	BTK c.521-G>A (p.Δスプライス)	
22	0.55	0.28	20.35	178.00	2.28	BTK	BTK	BTK c.1876delG (p.A582Lfs4*)	
23	0.15	0.26	15.94	187.01	2.43	BTK	BTK	BTK c.763C>T (p.R255*)	
24	0.34	0.64	17.42	250.47	2.95	BTK	BTK	BTK c.1782delG (p.K595Rfs25*)	
25	0.22	0.32	9.60	109.05	1.04	BTK	BTK	BTK c.1657delA (p.S553Afs2*)	
26	0.20	0.44	22.32	191.41	3.19	BTK	BTK	BTK c.1610delT (p.V537Dfs18*)	
27	0.23	0.48	16.78	142.27	2.09	BTK	BTK		

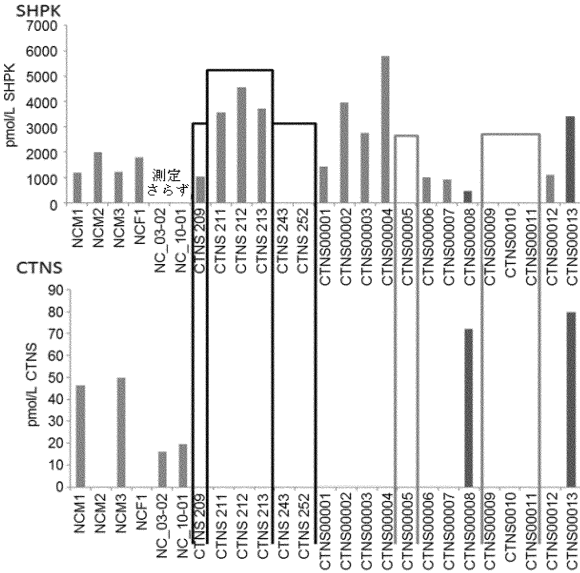
【図 1 2 - 2】

患者	BTK ATP7B 比率	BTK ATP7B 比率	WASp 274 ATP7B 比率	WASp 289 ATP7B 比率	CD3e 197 ATP7B 比率	Immu- SRM 診断	臨床診断	遺伝子型	備考
28	0.21	0.12	8.00	84.58	0.73	BTK	BTK	BTK c.37C>T (p.R13*)	
29	8.69	6.07	2.02	22.62	3.99	WAS	WAS	WAS c.1453+2T>A	患者番号30 と同じ (BMTの前)
30	12.42	6.98	8.34	113.34	0.94	正常	WAS (BMT後)	正常なBMTドナー	患者番号29 と同じ (BMTの後)
31	2.46	1.20	0.68	10.74	0.41	WAS	WAS/XLT	WAS c.223G>A (p.V75M)	
32	7.07	4.52	0.10	3.46	0.75	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	
33	7.18	7.27	0.25	5.20	1.62	WAS	WAS	WAS c.838C>T (p.Q280*)	
34	9.16	6.87	0.35	7.93	1.41	WAS	WAS	WAS c.838delC (p.Q280Sfs28*)	
35	8.31	6.02	0.33	6.57	1.78	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	3 6 番の 患者の兄弟
36	7.45	3.92	0.08	3.95	0.77	WAS	WAS	WAS c.631C>T (p.R211*)	3 5 番の 患者の兄弟
37	5.52	2.99	0.59	8.55	2.26	WAS	WAS	WAS c.1264_1267insGCTTGCGCTCT (p.G422Pfs20*)	
38	17.14	14.72	0.94	20.82	18.35	WAS	WAS	WAS c.332_336insCC (p.F113Pfs15*)	
39	12.45	8.22	0.33	5.67	0.57	WAS	WAS	WAS c.759G>A (p.W252*)	
40	6.11	4.65	4.48	49.41	0.24	SCID	T-B-NK+ SCID	RAG1 c.2159G>A (p.G720D), ホモ接合	
41	5.54	3.10	7.09	110.37	0.47	正常	X-SCID 低形質	IL2RG c.460C>T (p.T154S)	
42	8.00	4.93	10.74	94.51	0.10	SCID	T-B+NK+ SCID	不明 - 遺伝子パネルとエク ソーム陰性	

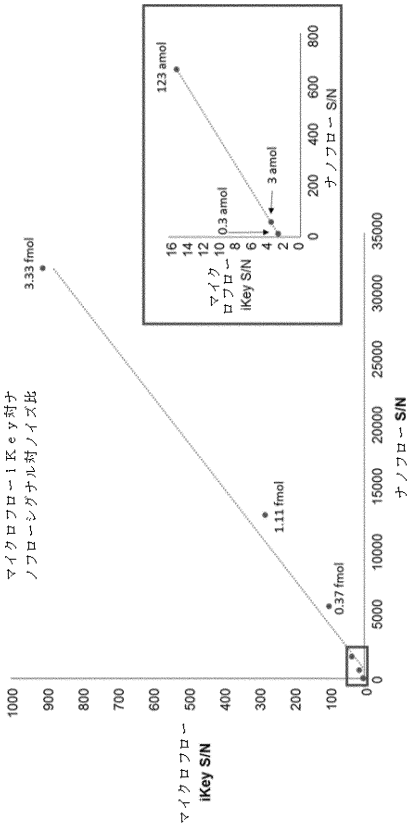
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】



30

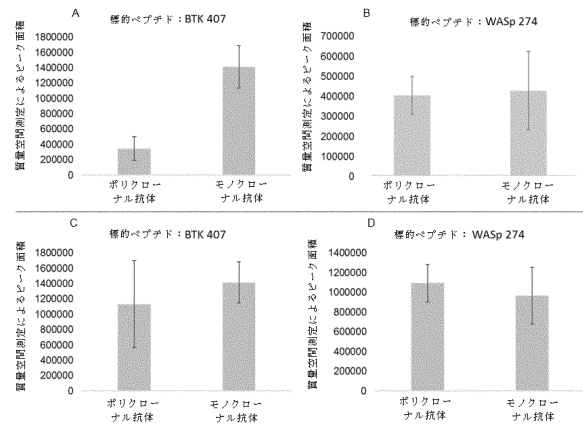
40

50

【図 15】

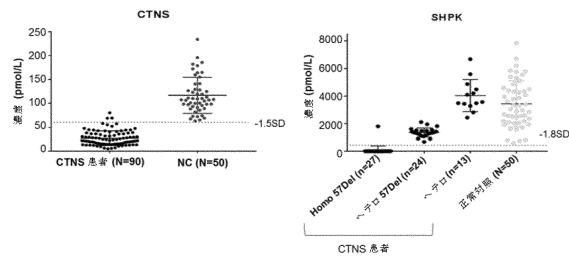
試料	CTNS 115 (pmol/L)	SHPK 363 (pmol/L)	遺伝子型	変異
1	N.D.	N.D.	ホモ接合性	57 kb 欠失
2	N.D.	N.D.	ホモ接合性	57 kb 欠失
3	N.D.	N.D.	ホモ接合性	57 kb 欠失
4	N.D.	939.02	ヘテロ接合性	c.314_317delACTC; p.H105PfsxX12 / 57 kb 欠失
5	9.43	1278.88	ヘテロ接合性	c.473T>C; p.L158P / 57 kb 欠失
6	18.00	1198.74	ヘテロ接合性	c.473T>C; p.L158P / 57 kb 欠失
7	N.D.	N.D.	*	予想：ホモ接合性 57 kb 欠失
8	N.D.	N.D.	*	予想：ホモ接合性 57 kb 欠失
9	N.D.	N.D.	*	予想：ホモ接合性 57 kb 欠失
NC1	20.14	2658.48	-	
NC2	42.43	2842.34	-	
NC3	31.71	2835.91	-	
NC4	26.66	1710.32	-	
NC 平均	30.29	2511.76		
NC SD	8.13	468.56		

【図 16】

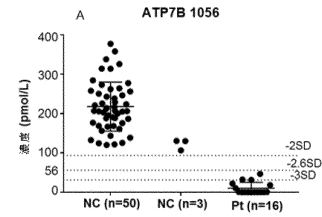


10

【図 17】

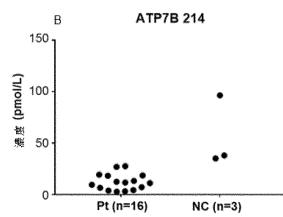


【図 18 A】

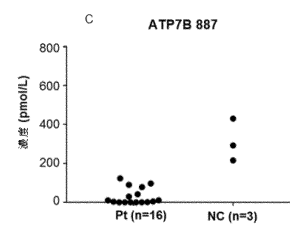


20

【図 18 B】



【図 18 C】



30

40

50

【図 19-1】

>抗CD3ε 197 VH CDR1
EYVIH (配列番号 22)

>抗CD3ε 197 VH CDR2
GFNPNIIGGTNYNQRFKG (配列番号 23)

>抗CD3ε 197 VH CDR3
GGPYYYAMDY (配列番号 24)

>リーダー配列を有する抗CD3ε 197可変重鎖ドメインコード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTTCTCCTGTCAAGGAACGTCAGGTGTCCTCTCTGAGG
TCCAGCTGCAGAGCTCTGGAGCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTCCT
GCAAGACTTCTGGATACATATTCAATTGAATACGTATACACTGGGTGAAGCAGAGCCATTGG
AAAGAGCCTTCTGAGTGGATTGGAGGTTTTAATCCTAACATTGGTGGTACTAACTACAACCAAG
AGGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCTACATGGAG
CTCCGACAGCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGTAAGGGGGGGACCCATT
ACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGCTCTCCTCA (配列番号 78)

>リーダー配列を有する抗CD3ε 197可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MGWSWIFLLSSTAGVLSEVLQSGPDLVKPGASVKISCKTSGYIFIEYVIHWKQSHGKSL
EWIGG**GFNPNIIGGTNYNQRFKG**KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVR**GGPYYYAMD**
YWGGGTSVTYSS (配列番号 79)

>リーダー配列のない抗CD3ε 197可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
CDRは太字にしている。
EVLQSQSGPDLVKPGASVKISCKTSGYIFIEYVIHWKQSHGKSL**EWIGGGFNPNIIGGTNYNQRF**
KGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVR**GGPYYYAMDY**WGQGTSTVTYSS (配列番号
63)

【図 19-3】

(続き)

>抗WASP 274 VH CDR1
TYAMT (配列番号 28)

>抗WASP 274 VH CDR2
SFYIEGSASYANWANGR (配列番号 29)

>抗WASP 274 VH CDR3
GNPGSSAV (配列番号 30)

>リーダー配列を有する抗WASP 274重鎖コード配列
(E B 0 6 0 3-2 F 8-H 2)。リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGGCGTGGCTTCTCCTGGTGGCTGTGCTCAAAGGTGCCAGTGTCAAG
TCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTG
CAGAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTACCTATGCAATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
GAAGGGGCTACAATGGATCGGATCCTTTTATATTGAGGGTAGCGCATCTACGCGAACTG
GGCGAATGGTGTGATTACCATCTCCAAAACCTCGAGTACGGTGAATCTGAAAATGACCACT
CGCAGACTCGCGGACACGGCCAGTTATTTCTGTGCCAGAGGCAATCCTGGTGGTAGTAGT
GCTGTGTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCA
GTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGGCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTCA
CCAATGGGGTAGCGACCTTCCCGTCCGTCGGCGAGTCTCAGGCCCTCTACTCGCTGAGCA
GCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGGCC
ACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGACGACAAGCCCATGTGCCCA
CCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGCTGTGTCTTCACTTCCCCCCTCAAACCCAAAGGACACC
CTCATGATCTCAGGCACCCCGGAGGTCAACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAGGATGAC
CCCGAGGTGCAATTCACATGGTACATAAACACAGCAGCAGGTGCGCAGCCGCCGCCGCCGCC
GCTACGGGAGCAGCATTTCAACAGCAGCATCCGCGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCGCGC
ACCAAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACCTCCCG
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGGACGCCCTGGAGCCGAAGGTCTA
CACCATGGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGGGTGAGCCTGACCTGCATGA
TCAACGGCTTCTACCCCTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAG
GACAACCTACAAGACCAAGCCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGC
AAGCTCTCAGTGGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGGCAGCGTCTTCACTGCTCCGTGAT
GCACGAGGCGCTTGACAACCACTACAGCGAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATG
A (配列番号 62)

>リーダー配列を有する抗WASP 274重鎖ドメインアミノ酸
配列。リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVVEESGGRLVTPGTPPLTLCTVSGFSLST**YAMT**WVRQAPGKG
LQWIG**SFYIEGSASYANWANGR**FTISKTSTVNLKMTSPTVADTASYFCARG**NPGGSSAV**WG
QGTLVTYSSGGQPKAPSVFPLAPCCGDPSSVTYLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFP
SVRQSSGLYLSRVSVTSSQPVTCNVAPATNTKVKT/APSTCSKPMCPPELLGGPSVF
IFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRAPPLREQQFNSTIRVYST
LPIAHQDVLIRGKEFKVKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMI
NGFYPSDISVEWEGKNKAEDNYKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRQDVFTCVMHEA
LHNHYTQKSISRSPGK (配列番号 83)

【図 19-2】

(続き)

>抗CD3ε 197 VL CDR1
RSSQSIVHSSGNTYLE (配列番号 25)

>抗CD3ε 197 VL CDR2
KVSNRFS (配列番号 26)

>抗CD3ε 197 VL CDR3
FQGSHPWT (配列番号 27)

>リーダー配列を有する抗CD3ε 197可変軽鎖ドメインコード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTGGTCTGATGTTCTGGAATTCCTGTTTTTACGCAAGTGTG
TTTTGATGACCCAAATCCACTCTCCCTGCCTGCTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCACTCTCT
TGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAGTGGAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCT
AGAAACCAGGCGAGTCTCCAAAGTCTGATCTACAAGATTCCAACCGATTTTCTGGGGT
CCGACACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTT
GTGGAGGACCAAGCTGGAATCAAA (配列番号 80)

>リーダー配列を有する抗CD3ε 197可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MKLPLRLLVLMFVIPVSSDVLMTQNPLSLPVSLGDAQASISCR**SSQSIVHSSGNTYLE**WYLQKP
GQSPKVL**YKVSNRFS**GVPDFRSGSGSGDTFTLKISRVEAEDLVYYCF**QGSHPWT**FGGT
KLEIK (配列番号 81)

>リーダー配列のない抗CD3ε 197可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
CDRは太字にしている。
DVLMTQNPLSLPVSLGDAQASISCR**SSQSIVHSSGNTYLE**WYLQKPGQSPKVL**YKVSNRFS**GV
PDFRSGSGSGDTFTLKISRVEAEDLVYYCF**QGSHPWT**FGGTGKLEIK (配列番号 64)

【図 19-4】

(続き)

>リーダー配列を有する抗WASP 274可変重鎖ドメインコード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGGCGTGGCTTCTCCTGGTGGCTGTGCTCAAAGGTGCCAGTGTCAAG
TCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTG
CAGAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTACCTATGCAATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
GAAGGGGCTACAATGGATCGGATCCTTTTATATTGAGGGTAGCGCATCTACGCGAACTG
GGCGAATGGTGTGATTACCATCTCCAAAACCTCGAGTACGGTGAATCTGAAAATGACCACT
CGCAGACTCGCGGACACGCCAGTATTTCTGTGCCAGAGGCAATCTCGTGGTAGTAGT
GCTGTGTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTCACCGCTCTCCTCA (配列番号 84)

>リーダー配列を有する抗WASP 274可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVVEESGGRLVTPGTPPLTLCTVSGFSLST**YAMT**WVRQAPGKG
LQWIG**SFYIEGSASYANWANGR**FTISKTSTVNLKMTSPTVADTASYFCARG**NPGGSSAV**WG
QGTLVTYSS (配列番号 85)

>リーダー配列のない抗WASP 274重鎖アミノ酸配列。

CDRは太字にしている。
QSVVEESGGRLVTPGTPPLTLCTVSGFSLST**YAMT**WVRQAPGKLQWIG**SFYIEGSASYANWA**
NGRFTISKTSTVNLKMTSPTVADTASYFCARG**NPGGSSAV**WGQGTLVTVSSGGQPKAPSVFP
LAPCCGDPSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYLSRVSVTS
SSQPVTCNVAPATNTKVDT/APSTCSKPMCPPELLGGPSVFIFFPKPKDITLMISRTPEVTC
VVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRAPPLREQQFNSTIRVYSTLPIAHQDVLIRGKEFKVKVH
NKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEGKNKAE
DNYKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRQDVFTCVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (配列
番号 86)

>リーダー配列のない抗WASP 274可変重鎖ドメインアミノ酸配列。

CDRは太字にしている。
QSVVEESGGRLVTPGTPPLTLCTVSGFSLST**YAMT**WVRQAPGKLQWIG**SFYIEGSASYANWA**
NGRFTISKTSTVNLKMTSPTVADTASYFCARG**NPGGSSAV**WGQGTLVTVSS (配列番号
85)

10

20

30

40

50

【図 19 - 5】

(続き)

>抗WASP 274VL CDR1
QSSEVYKNNYLA (配列番号31)

>抗WASP 274VL CDR2
WASKLAS (配列番号32)

>抗WASP 274VL CDR3
AGYQSNIVDGTA (配列番号33)

>リーダー配列を有する抗WASP 274軽鎖コード配列 (EBO603-2 F8-K2)。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
CACATTGGCCATCGTCTGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGACAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAGTTGGCAGTCCAGTGAGACTGTTATAAGAATAACTACTTAGCCTGGTATC
AGCAGAAACTAGGCAACCCCTCCAAAGCTCCTGATCTACTGGGCATCCAACTGGCATCTG
GGGTCCCATCGCGGTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCAACCATCAGCG
ATGTGGTGTGTGCCGATGCTGGCACTTACTACTGTGCAGGATACAAAGTAATATTGTTGA
TGGTACGGCTTTCCGCCGGAGGACCGAGGTGGTGGTCAACGGTGATCCAGTTGCACCTA
CTGCTCTCATCTTCCCACCACTGCTGATCAGGTGGCACTGGAACAGTCACCATCGTGTG
TGTGGCGAATAAATCTTCCCAGTGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCCA
AACAACTGGCATCGAGAACAGTAAACACCCGAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTC
AGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACTGCAAG
GTGACCCAGGCGACGACCTCAGTCTCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG (配列番号
87)

>リーダー配列を有する抗WASP 274軽鎖アミノ酸配列。リーダー配列には下線を付しており
CDRは太字にしている。
MDTRAPTQLGLLLLWLPGATFAMLTQTPASVSAAVGGTVTISCQSSEVYKNNYLAWYQQKL
GQPKLLIYWASKLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVADAGTYYCAGYQSNIVDGTAFGG
GTEVVNNGDPVAPTVLIFPPADQVATGTVTVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTP
QNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVQSFNRGDC (配列番号88)

>リーダー配列を有する抗WASP 274可変軽鎖ドメインコード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTGCTGCTCCAGGTGC
CACATTGGCCATCGTCTGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGACAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTGAGACTGTTATAAGAATAACTACTTAGCCTGGTATC
AGCAGAAACTAGGCAACCCCTCCAAAGCTCCTGATCTACTGGGCATCCAACTGGCATCTG
GGGTCCCATCGCGGTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCAACCATCAGCG
ATGTGGTGTGTGCCGATGCTGGCACTTACTACTGTGCAGGATACAAAGTAATATTGTTGA
TGGTACGGCTTTCCGCCGGAGGACCGAGGTGGTGGTCAAC (配列番号89)

>リーダー配列を有する抗WASP 274可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MDTRAPTQLGLLLLWLPGATFAMLTQTPASVSAAVGGTVTISCQSSEVYKNNYLAWYQQKL
GQPKLLIYWASKLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVADAGTYYCAGYQSNIVDGTAFGG
GTEVVVN (配列番号90)

【図 19 - 7】

(続き)

>抗BTK 407VH CDR1
RNEIS (配列番号34)

>抗BTK 407VH CDR2
GIGSPRAYATWAKSR (配列番号35)

>抗BTK 407VH CDR3
GDI

>リーダー配列を有する抗BTK 407重鎖コード配列 (EBO602
-1G5-H2)。リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGCCGTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTTGCCAGTGTGAG
TCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTTCAAGCCAACGGATACCCCTGACAGTCACCTGC
ACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGGAATGAAATAAGCTGTTCCGCCAGGCTCCAGGG
AACGGGCTGGAATGGATCGGGGGCATTGGTAGTCTCGGACGCCATCTACTACGCCACCTG
GGCGAAAAGCCGATCCACCATACCCAGAAACACCAACCTGAATACGGTGACTCTGAAAAAT
GACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGGGACATCTGGG
GCCAGGACCCGTGGTCAACGCTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCAC
TGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCCCTGGGCTGCCGTGGTCAAA
GGCTACCTCCCGGAGCCAGTGACCCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGGGT
ACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCTCAGGCCCTACTCTGCTGAGCAGCGTGGTGAG
CGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACTCGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCA
AGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAAGCAAGCCCATGTGCCACCCCCCTGAAC
CTTGGGGGGACCGTCTGTCTTCTATCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCA
CGCACCCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCA
GTTACATGTTACATAAAACACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGC
AGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTGACGACCCCTCCCCATCGCGCACCAAGGACTGG
CTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAAGTCCACAACCAAGGACTCCCGGCCCCCATGCA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGGACGCCCTGGAGCCGAAGGTTACACCATGGGCC
CTCCCGGGAGGAGGTGAGCAGCAGGTGGTCAAGCTGACCTGCATGATCAACGGGCTTC
TACCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGGAAGAAGCGGGGAAGGACAGGACAACCTACAAG
ACCACCGCGGCGTGTGAGACAGCGACGGCTCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTG
CCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTCACTGCTCCGTGATGCGACAGGCGCTT
GCACACCACTACACCGCAAGAGTCACTTCCCGCTCTCCGGTAAATGA (配列番号92)

>リーダー配列を有する抗BTK 407重鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLVAVLKGVQCQSVKESEGGFLKPTDILTITVCTVSGFSLSRNEISWFRQAPGNGL
EWIGGIGSPGRAYATWAKSRSTITRNTNLTNLTLMKMTSLTAADTATYFCARGDIWGPVTVT
VSSQPKAPSVFPLAPCCGTVTSSVITLGLVKGYLFPFVTVTWSGTLTNGVRTFPSPVRGSS
GLYSLSSVSVTSSSQPVTCGNVHPATNTKVDVAPSTCSKPMCPPELLLGGPSVFIFPPKPK
DTLMSRTPEVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVTRARPPLEQQFNSTIRVSTLPIAHQD
WLRGKEFKCKVHNKALPAPIETKISKARGQPLEPKVYTMGPPRELSRSVSLTCMINGFYPSD
ISWEWEKNKAEDNYKTTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQ
KSISRSPGK (配列番号93)

【図 19 - 6】

(続き)

>リーダー配列のない抗WASP 274軽鎖アミノ酸配列。CDRは太字に
している。
MLTQTTPASVSAAVGGTVTISCQSSEVYKNNYLAWYQQKLQPPKLLIYWASKLASGVPSRF
KSGSGTGFTLTISDVVADAGTYYCAGYQSNIVDGTAFGGGTEVVVNGDPVAPTVLIFPPAA
DQVATGTVTVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN
SHKEYTCKVTQGTTSVQSFNRGDC (配列番号91)

>リーダー配列のない抗WASP 274可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
CDRは太字にしている。
MLTQTTPASVSAAVGGTVTISCQSSEVYKNNYLAWYQQKLQPPKLLIYWASKLASGVPSRF
KSGSGTGFTLTISDVVADAGTYYCAGYQSNIVDGTAFGGGTEVVVN (配列番号96)

10

20

【図 19 - 8】

(続き)

>リーダー配列を有する抗BTK 407可変重鎖コード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGCCGTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAG
TCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTTCAAGCCAACGGATACCCCTGACAGTCACTGC
ACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGGAATGAAATAAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AACGGGCTGGAATGGATCGGGGGCATTGGTAGTCTCGGACGGCATACTACGGCACCTG
GGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAACCTGAATACGGTGACTCTGAAAAT
GACCAGTCTGACAGCGCGGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGGGACATCTGGG
GCCAGGCAACCGTGGTCAACGCTCTCTCA (配列番号94)

>リーダー配列を有する抗BTK 407可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLVAVLKGVQCQSVKESEGGFLKPTDILTITVCTVSGFSLSRNEISWFRQAPGNGL
EWIGGIGSPGRAYATWAKSRSTITRNTNLTNLTLMKMTSLTAADTATYFCARGDIWGPVTVT
VSS (配列番号95)

>リーダー配列のない抗BTK 407重鎖アミノ酸配列。CDRは太字に
している。
QSVKESEGGFLKPTDILTITVCTVSGFSLSRNEISWFRQAPGNGLWIGGIGSPGRAYATWA
KSRSTITRNTNLTNLTLMKMTSLTAADTATYFCARGDIWGPVTVTVSSGGQPKAPSVFPLAPCCG
DTPSSVTLGLCVLKVGLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSPVRGSSGLYSLSSVSVTSSSQPV
CNVAPHATNTKVDKTVAPSTCSKPMCPPELLLGGPSVFIFPPKPDTLTMSRTPEVTCVVVDV
QDDPEVQFTWYINNEQVTRARPPLEQQFNSTIRVSTLPIAHQDGLRKEFKCKVHNKALPA
PIETKISKARGQPLEPKVYTMGPPRELSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNKAEDNYKT
PAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (配列番号
96)

>リーダー配列のない抗BTK 407可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
CDRは太字にしている。
QSVKESEGGFLKPTDILTITVCTVSGFSLSRNEISWFRQAPGNGLWIGGIGSPGRAYATWA
KSRSTITRNTNLTNLTLMKMTSLTAADTATYFCARGDIWGPVTVTVSS (配列番号97)

30

40

50

【図 19 - 9】

(続き)

> 抗 BTK 407 VL CDR1
QSSQSVYNNRLA (配列番号 36)

> 抗 BTK 407 VL CDR2
SASTLAS (配列番号 37)

> 抗 BTK 407 VL CDR3
LGSYDCSTADCN (配列番号 38)

> リーダー配列を有する抗 BTK 407 重鎖コード配列 (EBO602-1G5-K1)。リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGC
CACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTGATCGCCCGTGCTGCAGCTGTGGGAAGCAC
AGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAATAACAACCGCTTAGCCTGGTATC
AGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAAGGCCGTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTG
GGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTACCATCAGCG
ACGTGCACTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTACTGC
TGATTGTAATGCTTTGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACC
TACTGCTCTATCTTCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTG
TGTGTGGCGAATAAATACTTTCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACC
CAAAACAATGGCATCGAGAACAGTAAACAACCCGAGAAATCTGCAGATTGTACCTACAACC
TCAGCAGCACTCTGACACTGACCAAGCACACAGTACAACAGCCACAAGAGTACACCTGCA
AGGTGACCCAGGGCAGCACCTCAGTCTGCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTGAG (配列番号 97)

> リーダー配列を有する抗 BTK 407 軽鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。
MDTRAPTQLLGLLLWLPGATFAQVLQTIVSPVSAVGSVTIN**QSSQSVYNNRLAWYQQ**
KPGQPPKGLI**YSASTLAS**GVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATY**YCLGSYDCSTADCN**A
FGGGTEVVVKGDPVAPTIVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVWEVDGTTQTGTIENS
KTPQNSADCTYNLSSLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 98)

> リーダー配列を有する抗 BTK 407 可変軽鎖コード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGC
CACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTGATCGCCCGTGCTGCAGCTGTGGGAAGCAC
AGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAATAACAACCGCTTAGCCTGGTATC
AGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAAGGCCGTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTG
GGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTACCATCAGCG
ACGTGCACTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTACTGC
TGATTGTAATGCTTTGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (配列番号 99)

> リーダー配列を有する抗 BTK 407 可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。
MDTRAPTQLLGLLLWLPGATFAQVLQTIVSPVSAVGSVTIN**QSSQSVYNNRLAWYQQ**
KPGQPPKGLI**YSASTLAS**GVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATY**YCLGSYDCSTADCN**A
FGGGTEVVVK (配列番号 100)

【図 19 - 11】

(続き)

> 抗 CTNS 115 VH CDR1
TRDGV (配列番号 39)

> 抗 CTNS 115 VH CDR2
CIYRGISATTSYASWAKGR (配列番号 40)

> 抗 CTNS 115 VH CDR3
AWDL (配列番号 41)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 115 重鎖コード配列 (EBO606-3H8-H5)。リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGGCTGGCTTCTCTCGTGGTGCCTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
GAGCACTGGTGGAGTCCGGGGAGGACCTGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCAC
CTGCAAGCTCTGGATTCTCCTTCAGTACCAAGATGGCGTATGCTGGGTCCGCGAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGATTTATCGTGATATTAGTGTACCACTTC
CTACGCGAGCTGGGCAAGAGCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTGCACCCAGTGC
TCTGCAATGACCAAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTCGAGAGCCTG
GGACTTATGGGGCCAGCGACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCAACCTAAGGCTCCATC
AGTCTTCCCACTGGCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCAGCGTGACCTGGGCT
GGCTGGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGGCACTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTC
ACCAATGGGGTACGCACTTCCCGTCCGTCGCGGACAGTCTCAGGCTCTACTCTGCTGAGC
AGCGTGGTGAAGCTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACTGCAACGTGGGCCACCCAGC
ACCAACACCAAGTGGACCAAGACCGTTCGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCATGTGGCC
ACCCCTGAACCTCTGGGGGAGCCGTCTGCTTCATCTTCCCCCAAACCCAAAGGACAC
CCTCATGATCTCAGCAACCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCGAGGATGA
CCCCGAGGTGCACTTACATGTTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCCGGCGC
CGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAACACCTCCCATCGCG
CACCAGGACTGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAAGTCCACAACAGGCACTCCC
GGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAAGTCT
ACACCATGGGCCCTCCCGGAGGAGCTGACGAGCAGGTGCGTGACGCTGACCTGACGTGAT
ATCAACGGCTCTCACCCTTCGCATCTCTGGTGGAGTGGGAGGAAGAAGCGGAAGCGCAG
GACAACATACAAGACACGCCGCGCTGCTGGACGAGCAGCGCTCTCACTTCTCTACAGC
AAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGACGCGGGGCGACGCTTCACTGCTCCGTGAT
GCACGAGGCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAATG
A (配列番号 102)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 115 重鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。
METGLRWLLVAVLKGVQCQEQLVESGGGLVQPEGSLTLTKASGFS**STRDGV**WVRQAP
GKGLEWIA**CIYRGISATTSYASWAKGR**FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARAWDLWG
PGTLVTSS (配列番号 103)

【図 19 - 10】

(続き)

> リーダー配列のない抗 BTK 407 軽鎖アミノ酸配列。CDR は太字にしている。
QVLQTIVSPVSAVGSVTIN**QSSQSVYNNRLAWYQQ**KPGQPPKGLI**YSASTLAS**GVSSR
FKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATY**YCLGSYDCSTADCN**AFGGGTEVVVKGDPVAPTIVLIFPP
AADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSLTLTSTQ
YNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 101)

> リーダー配列のない抗 BTK 407 可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。CDR は太字にしている。
QVLQTIVSPVSAVGSVTIN**QSSQSVYNNRLAWYQQ**KPGQPPKGLI**YSASTLAS**GVSSR
FKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATY**YCLGSYDCSTADCN**AFGGGTEVVVK (配列番号 68)

10

20

【図 19 - 12】

続き

> リーダー配列を有する抗 CTNS 115 可変重鎖コード配列
リーダー配列には下線を付している。

ATGGAGACTGGGCTGGCTGGCTTCTCTGGTGCCTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
GAGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGAGGCGCTGGTCCAGCTCAGGGATCCCTGACACTCAC
CTGCAAGAGCTCTGGATTCTCCTTCAGTACCAAGATGGCGTATGCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGATTTATCGTGGTATTAGTGTACCACTTC
CTACGCGAGCTGGGCAAGAGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTGCACCCAGTGC
TCTGCAATGACCAAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTCGAGAGCCTG
GGACTTATGGGGCCAGCGACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCAACCTAAGGCTCCATC
AGTCTTCCCACTGGCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCAGCGTGACCTGGGCT
GGCTGGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGGCACTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTC
ACCAATGGGGTACGCACTTCCCGTCCGTCGCGGACAGTCTCAGGCTCTACTCTGCTGAGC
AGCGTGGTGAAGCTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACTGCAACGTGGGCCACCCAGC
ACCAACACCAAGTGGACCAAGACCGTTCGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCATGTGGCC
ACCCCTGAACCTCTGGGGGAGCCGTCTGCTTCATCTTCCCCCAAACCCAAAGGACAC
CCTCATGATCTCAGCAACCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCGAGGATGA
CCCCGAGGTGCACTTACATGTTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCCGGCGC
CGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAACACCTCCCATCGCG
CACCAGGACTGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAAGTCCACAACAGGCACTCCC
GGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAAGTCT
ACACCATGGGCCCTCCCGGAGGAGCTGACGAGCAGGTGCGTGACGCTGACCTGACGTGAT
ATCAACGGCTCTCACCCTTCGCATCTCTGGTGGAGTGGGAGGAAGAAGCGGAAGCGCAG
GACAACATACAAGACACGCCGCGCTGCTGGACGAGCAGCGCTCTCACTTCTCTACAGC
AAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGACGCGGGGCGACGCTTCACTGCTCCGTGAT
GCACGAGGCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAATG
A (配列番号 104)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 115 可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。

METGLRWLLVAVLKGVQCQEQLVESGGGLVQPEGSLTLTKASGFS**STRDGV**WVRQAP
GKGLEWIA**CIYRGISATTSYASWAKGR**FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARAWDLWG
PGTLVTSS (配列番号 105)

> リーダー配列のない抗 CTNS 115 重鎖アミノ酸配列。CDR は太字にしている。

QEQLVESGGGLVQPEGSLTLTKASGFS**STRDGV**WVRQAPGKGLEWIA**CIYRGISATTSYA**
SWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARAWDLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLA
PCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTNGVRFPPSVROSSGLYSLSSVVSSTSS
QPVTCNV/AHPATNTKV/DKTVAPSTCSKPM/CPPPELLGPGSVVFPPKPKD/LMISRTPEVTCV/
VDVSODDPEV/QFTWYINNEQV/RTARPLREQQFNSTRV/VSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNK
ALPAPIEKTISKARGQLEPKVYTMGPPEELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNKAEDN
YKTTPAVLDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTKQISRSPPGK
(配列番号 106)

> リーダー配列のない抗 CTNS 115 可変重鎖ドメインアミノ酸配列。CDR は太字にしている。

QEQLVESGGGLVQPEGSLTLTKASGFS**STRDGV**WVRQAPGKGLEWIA**CIYRGISATTSYA**
SWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARAWDLWGPGTLVTSS (配列番号 69)

40

50

【図 19-13】

(続き)

> 抗 CTNS 115 VL CDR1
QASQSIGSDLS (配列番号 42)

> 抗 CTNS 115 VL CDR2
KASKVET (配列番号 43)

> 抗 CTNS 115 VL CDR3
QSIDFSKSYIGGA (配列番号 44)

> リーダー配列を有する抗CTNS 115重鎖コード配列 (E B 0 6 0 2 - 3 H 8 - K 7)。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGC
CAGAIGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGCTCGAACCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGCGACTTATCCTGGTATCAGCA
GAAACACAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTACAAGGCATCAAAGTGGAAACTGGGGT
CCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACCTCTCACCATCAGCGACCT
GGAGTGTGCCGATGCTAGCACTTACTACTGTCAAATCTATTGATTTTAGTAAAGTTATATAG
GGGGTGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACT
GTCTCATCTTCCCAAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGT
GTGGCGAATAAATACTTTCCGATGTCAACGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAA
ACAACCTGGCATCGAAGACAGTAAACACCGCAGAAATTTGCAAGATTGTACCTACAACCTCA
CGCAGCACTCTGACACTGACGACACACAGTACAACAGCCACAAGAGTACACCTGCAAGG
TGACCCAGGGCAGCAGCTCAGTCGTCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG
(配列番号 107)

> リーダー配列を有する抗CTNS 115軽鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MDTRAPTQLLLGLLLWLPGARCDVMTQTSPASVSEPVGGTVTIK**QASQSIGSDLS**WYQQKP
GQPPKRLIY**KASKVET**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISDLECADASTYYC**QSIDFSKSYIGGA**FGG
GTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTP
QNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 108)

> リーダー配列を有する抗CTNS 115可変軽鎖コード配列
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGC
CAGAIGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGCTCGAACCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGCGACTTATCCTGGTATCAGCA
GAAACACAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTACAAGGCATCAAAGTGGAAACTGGGGT
CCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACCTCTCACCATCAGCGACCT
GGAGTGTGCCGATGCTAGCACTTACTACTGTCAAATCTATTGATTTAGTAAAGTTATATAG
GGGGTGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (配列番号 109)

> リーダー配列を有する抗CTNS 115可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MDTRAPTQLLLGLLLWLPGARCDVMTQTSPASVSEPVGGTVTIK**QASQSIGSDLS**WYQQKP
GQPPKRLIY**KASKVET**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISDLECADASTYYC**QSIDFSKSYIGGA**FGG
GTEVVVK (配列番号 110)

【図 19-15】

(続き)

> 抗 CTNS 360 VH CDR1
NNDGIC (配列番号 45)

> 抗 CTNS 360 VH CDR2
CIGSTSGRIYYASWAKGR (配列番号 46)

> 抗 CTNS 360 VH CDR3
EPYGSGSMAFDL (配列番号 47)

> リーダー配列を有する抗CTNS 360重鎖コード配列 (E B 0 6 0 4 - 4 E 3 - H 4)。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTCGCGTGGCTTCTCCTGGTGCCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCAG
TCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGTTCAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTG
CACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAACAATGACGGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGATTGGTAGTACTAGTGGTAGGATTATTACGC
GAGCTGGGCGAAAGGCCGACTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCAACGGTGATTCTGCA
AATGACCACTGCTGACAGCCGCGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCGAGCGAACCCATTGG
TAGTGGTAGTATGGCTTTGACTTTGTGGGGCCAGGCACCTCTGGTCACCGTCTCCTCAGG
GCAACCTAAGGCTCATCAGCTCTTCCACTGGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTC
CACGGTGACCTCGGGCTGCTGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCT
GGAACCTCGGGCACCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCGCTCCGGCAGTCTCTCA
GGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCTCACCTG
CAACGTGGCCCCACCCAGCCACCAACCAAAAGTGGACAAGACGTTGCGCCCTCGACATG
CAGCAAGCCCATGTGCCACCCCCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCTGCTTCTATCTTCCC
CCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCAGCACCCCGCAGGTACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCAGGATGACCCGAGGTGCAAGTTACATGGTACATAACAACAGCAGCAGGT
GGCGACCGCCGGCGCCGCTAGCGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCA
GCACCTCTCCCATCGCGCACCAAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTC
CACAAAGAAGGCACTCCCGGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGAGCCAGAGGGCAGCCC
CTGGAGCCGAAAGTCTACACCATGGGCTCCCGGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCT
CAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCTTCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAA
GACGGGAAGGCAGAGGACAACCTACAAGACCAACCGCGCGTGTGACAGCGACGGCT
CCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACAGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGAGCTCT
TCACCTGCTCCGTGATGCAGCAGGCTTGACAAACCACTACACGCAGAAAGTCCATCTCCC
GCTCTCCGGGTAATGA (配列番号 112)

> リーダー配列を有する抗CTNS 360重鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLLVAVLKGVCOSLEESGGGLFQPGASLTLTCTASGFS**NNDGIC**WVRQAPGK
GLEWIG**CIGSTSGRIYYASWAK**RLTISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAS**EPYGS**SMAF
DLWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLEPVPVTVWNSGTLTNG
VRTPSVRQSSGLYLSVVSVTSSQPVTCNVAPATNTKVDKTVAPSTCSKPMCPPELLG
GPSVFIFFPKPKDLMISRTPETVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVVRTAPPLREQQFNSTI
RVVSTLPIAHQDWRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVS
LTCMINGFYPSDISVEWEKNKAEDNYKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDFVTCVS
MHEALHNHYTQKSISRSPGK (配列番号 113)

【図 19-14】

(続き)

> リーダー配列のない抗CTNS 115軽鎖アミノ酸配列。CDRは太字にしている。

DVVMQTSPASVSEPVGGTVTIK**QASQSIGSDLS**WYQQKPGQPPKRLIY**KASKVET**GVPSRFS
GSGSGTEFTLTISDLECADASTYYC**QSIDFSKSYIGGA**FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAAD
QVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNS
HKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 111)

> リーダー配列のない抗CTNS 115可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。CDRは太字にしている。

DVVMQTSPASVSEPVGGTVTIK**QASQSIGSDLS**WYQQKPGQPPKRLIY**KASKVET**GVPSRFS
GSGSGTEFTLTISDLECADASTYYC**QSIDFSKSYIGGA**FGGGTEVVVK (配列番号 70)

【図 19-16】

(続き)

> リーダー配列を有する抗CTNS 360可変重鎖コード配列
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTCGCGTGGCTTCTCCTGGTGCCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCAG
TCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGTTCAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTG
CACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAACAATGACGGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGATTGGTAGTACTAGTGGTAGGATTATTACGC
GAGCTGGGCGAAAGGCCGACTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCAACGGTGATTCTGCA
AATGACCACTGCTGACAGCCGCGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCGAGCGAACCCATTGG
TAGTGGTAGTATGGCTTTGACTTGTGGGGCCAGGCACCTCTGGTCACCGCTCTCCTCA
(配列番号 114)

> リーダー配列を有する抗CTNS 360可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLLVAVLKGVCOSLEESGGGLFQPGASLTLTCTASGFS**NNDGIC**WVRQAPGK
GLEWIG**CIGSTSGRIYYASWAK**RLTISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAS**EPYGS**SMAF
DLWGPGLTVTVSS (配列番号 115)

> リーダー配列のない抗CTNS 360重鎖アミノ酸配列。CDRは太字にしている。

QSLEESGGGLFQPGASLTLTCTASGFS**NNDGIC**WVRQAPGKGLEWIG**CIGSTSGRIYYASW**
AKRLTISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAS**EPYGS**SMAFDLWGPGLTVTVSSGQPKAP
SVFLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLEPVPVTVWNSGTLTNGVRTPFSVRQSSGLYLSVV
SVTSSQPVTCNVAPATNTKVDKTVAPSTCSKPMCPPELLGGPSVFIFFPKPKDLMISRTP
EVTCTVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVVRTAPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWRGKEFK
CKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKN
KAEDNYKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDFVTCVMHEALHNHYTQKSISRSPG
K (配列番号 116)

> リーダー配列のない抗CTNS 360可変重鎖ドメインアミノ酸配列。CDRは太字にしている。

QSLEESGGGLFQPGASLTLTCTASGFS**NNDGIC**WVRQAPGKGLEWIG**CIGSTSGRIYYASW**
AKRLTISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAS**EPYGS**SMAFDLWGPGLTVTVSS
(配列番号 71)

10

20

30

40

50

【図 19-17】

(続き)

> 抗 CTNS 360 VL CDR1
QASQSIWNNNFLS (配列番号 48)

> 抗 CTNS 360 VL CDR2
EASKLAS (配列番号 49)

> 抗 CTNS 360 VL CDR3
QGEFSCSIADCVA (配列番号 50)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 360 重鎖コード配列 (E B 0 6 0 2-4 E 3-1)。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGCTCTCTGCTCTGGCTCCCAAGTGTC
CACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTGCATCGTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCGTCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTGGAAATAACAACCTCTTATCTCGTATC
AGCAGAAACGAGGGCAGCCTCCCAAGCTCTCGATCTACGAAGCATCCAAACTGGCATCTG
GGGTCCCATCGCGGTTTAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCG
GCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAGGCGCAATTTAGTTGTAGTATTGC
TGATTGTGTTGCTTTCCGGCGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAGAGGTGATCCAGTTGCACC
TACTGTCTCATCTTCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCACTGGAACAGTCACCATCGTG
TGTGTGGCGAATAAATCTTTCCCGATGTCACTGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCC
CAAAACAACCTGGCATCGAAGACAGTAAACACCCGCAGAATTCGACAGATTGTACCTACAACC
TCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACAGTACAACAGCCACAAGAGTACACCTGCA
AGGTGACCCAGGGCAGCAGCTCAGTCGTCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG
(配列番号 117)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 360 軽鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。
MDTRAPTQLLLGLLLWLPGATFAQVLQTASSVSAVGGTVTVNC**QASQSIWNNNFLS**WYQQ
KPGQPPKLLI**EASKLAS**GVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC**QGEFSCSIADCVA**
FGGGTEVVRGDPVAPT^{VL}IFPPADQVATGTIVCVANKYFPDVTIVWEVDGTTQTGIIENS
KTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVITGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 118)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 360 可変軽鎖コード配列
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGCTCTCTGCTCTGGCTCCCAAGTGTC
CACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTGCATCGTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCGTCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTGGAAATAACAACCTCTTATCTCGTATC
AGCAGAAACGAGGGCAGCCTCCCAAGCTCTCGATCTACGAAGCATCCAAACTGGCATCTG
GGGTCCCATCGCGGTTTAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCG
GCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAGGCGCAATTTAGTTGTAGTATTGC
TGATTGTGTTGCTTTCCGGCGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAGA (配列番号 119)

> リーダー配列を有する抗 CTNS 360 可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。
MDTRAPTQLLLGLLLWLPGATFAQVLQTASSVSAVGGTVTVNC**QASQSIWNNNFLS**WYQQ
KPGQPPKLLI**EASKLAS**GVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC**QGEFSCSIADCVA**
FGGGTEVVR (配列番号 120)

【図 19-19】

(続き)

> 抗 SHPK 363 VH CDR1
SNYFMC (配列番号 51)

> 抗 SHPK 363 VH CDR2
CILVSGSRTTFASWAKGR (配列番号 52)

> 抗 SHPK 363 VH CDR3
AWAL (配列番号 53)

> リーダー配列を有する抗 SHPK 363 重鎖コード配列 (E B 0 6 0 5 B-6 G 12-H1)。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCTCGTGGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT
CAGGAGCATAGAGAGTCCGGGGGAGGCTGTGTCAGCGCTGAGGGATCCCTGACACTCAC
CTGCAAAGTCTCTGAGTTGCAGTTCAAGTAGTAACATTTATGATGCTGGGTCCCGCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGAGSTGATCGATGATTTCTGTGTGGTAGTGATGAGCACTCTTC
GCGAGCTGGGGCAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAACCTCTGTCGACACAGGTGACTCTG
CAAATGACCACTGTCAGACGCCCGGGACAGCCACCATTTCTGTGCGAGGGCCCTGGGC
CTTGTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGT
CTTCCCACCTGGCCCCCTGCTCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCTGGGCTGCC
TGGTCAAAGGCTACCTCCCGAGGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTGGGCACCCCTCACCA
ATGGGGTACGCACCTTCCGTCCTCGGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCG
TGTTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCTCACCTGCAACGTGGGCCACCCAGCCACCC
AACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCATGTGCCACCC
CCTGAACCTCTGGGGGACCGTCTGTCTTATCTTCCGCCCAAACCCAGAGCACCCCTC
ATGATCTCAGCGACCCCGAGCTCACATCGCTGGTGGTGGCAGCTGAGCAGGATGACCC
CGAGGTGCAGTTACATAGGTGATATAAACAAGCAGGAGTGCGCACCCGCCCGGCCCGCCG
TACGGGAGCAGCAGTTTCAACAGCACGATCCGCTGGTGCAGCACCCCTCCCATCGCGCAC
CAGGACTGGCTGAGGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGC
CCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAAGCCGAAGGTCTACAC
CATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCGTCAAGCTGACCTGCATGATCA
ACGGCTTCTACCCCTCCGACATCTCGGTGGAAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGAC
AACTACAAGACACGCCGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAG
CTCTCAGTGCCACAGTGAAGTGGCAGCGGGGCGAGCTCTTACCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCTTGCACAACCACTACAGCGAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA
(配列番号 122)

> リーダー配列を有する抗 SHPK 363 重鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。
METGLRWLLVAVLKGVQCQEIEESGGGLVKPEGSLLTCKVSGDFSS**SNYFMC**WVRQAPG
KGLEWIG**CILVSGSRTTFASWAKGR**FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR**AWAL**WGPG
TLTVSSGGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGLTNGVRTFPSV
PPKPKDTLMISRTPETCVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVTRARPLREQQFNSTRIVVSLTP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPEELSSRSVSLTMING
FYPSDISVEWKNKAEDNYKTPAVLSDGSFYLSKLSVPTSEWQRGDFVTCVSMHEALH
NHYTQKSISRSPGK (配列番号 123)

【図 19-18】

(続き)

> リーダー配列のない抗 CTNS 360 軽鎖アミノ酸配列。CDR は太字にしている。

QVLQTASSVSAVGGTVTVNC**QASQSIWNNNFLS**WYQQKPGQPPKLLI**EASKLAS**GVPSR
FSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC**QGEFSCSIADCVA**FGGGTEVVRGDPVAPT^{VL}IFPP
AADQVATGTIVCVANKYFPDVTIVWEVDGTTQTGIIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQ
YNHKEYTCKVITGTTSSVVQSFNRGDC (配列番号 121)

> リーダー配列のない抗 CTNS 360 可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。CDR は太字にしている。

QVLQTASSVSAVGGTVTVNC**QASQSIWNNNFLS**WYQQKPGQPPKLLI**EASKLAS**GVPSR
FSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC**QGEFSCSIADCVA**FGGGTEVVR (配列番号 122)

10

20

【図 19-20】

(続き)

> リーダー配列を有する抗 SHPK 363 可変重鎖コード配列。

リーダー配列には下線を付している。

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCTGCTGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT
CAGGAGCATAGAGAGTCCGGGGGAGGCTGTGTCAGCGCTGAGGGATCCCTGACACTCAC
CTGCAAAGTCTCTGAGTTGCAGTTCAAGTAGTAACATTTATGATGCTGGGTCCCGCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGAGGTGATCGGATGATTTCTGTGTGGTAGTGATGAGCACTCTTC
GCGAGCTGGGGCAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAACCTCTGTCGACACAGGTGACTCTG
CAAATGACCACTGTCAGACGCCCGGCACAGCCACCTATTTCTGTGCGAGGGCTGGGC
CTTGTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTCACCGTCTCTCTCA (配列番号 124)

> リーダー配列を有する抗 SHPK 363 可変重鎖ドメインアミノ酸配列。

リーダー配列には下線を付しており、CDR は太字にしている。

METGLRWLLVAVLKGVQCQEIEESGGGLVKPEGSLLTCKVSGDFSS**SNYFMC**WVRQAPG
KGLEWIG**CILVSGSRTTFASWAKGR**FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR**AWAL**WGPG
TLTVSS (配列番号 125)

> リーダー配列のない抗 SHPK 363 重鎖アミノ酸配列。CDR は太字にしている。

QEIEESGGGLVKPEGSLLTCKVSGDFSS**SNYFMC**WVRQAPGKGLEWIG**CILVSGSRTTFAS**
WAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR**AWAL**WGPGTLTVSSGGQPKAPSVFPLAP
CCGDTSPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGLTNGVTRFFSVRGSSGLYLSSSVSVTSSQ
PVTNCVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPMCPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPETCVVW
DVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRARPLREQQFNSTRIVVSLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKA
LPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPEELSSRSVSLTMINGFYPSDISVEWKNKAEDNY
KTPAVLSDGSFYLSKLSVPTSEWQRGDFVTCVSMHEALHNNHYTQKSISRSPGK (配列番号 126)

> リーダー配列のない抗 SHPK 363 可変重鎖ドメインアミノ酸配列。

CDR は太字にしている。

QEIEESGGGLVKPEGSLLTCKVSGDFSS**SNYFMC**WVRQAPGKGLEWIG**CILVSGSRTTFAS**
WAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR**AWAL**WGPGTLTVSS (配列番号 127)

30

40

50

【図 19-21】

(続き)

>抗SHPK 363VL CDR1
QASQSVYNNNDLA (配列番号 54)

>抗SHPK 363VL CDR2
GASTLVS (配列番号 55)

>抗SHPK 363VL CDR3
QGGYDPRNYP (配列番号 56)

>リーダー配列を有する抗SHPK 363重鎖コード配列 (EBO605B-6G12-K1)。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAAGGTGC
CACATTTGCGCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCTGTGCTGCAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAGTTGCCAGGGCCAGTCAGAGTGTTTATAATAACAACGACTTAGCGCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGCAGCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCAATCCACTCTGGTATCT
GGGGTCCCGTCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGGCACAGTTCACTCTCAACATCAG
CGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGGGTATCCAAGTTGCACCTACTGTC
TCACTCTCCCAACCACTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCAACATCGTGTGTGTG
GCGAATAAATACITTTCCGATGTCAACGTCACCTGGGAGGTGGATGGCAACACCCAAACA
ACTGGCATCGAGAACAGTAAACACCGCAAGATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCA
GCACTCTGACACTGACCAAGCACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGA
CCAGGGGCACGACCTCAGTCGCTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG (配列番号
127)

>リーダー配列を有する抗SHPK 363軽鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MDTRAPTQLLLGLLLWLPGATFAQVLQTTPSPVSAVGGTVTISCQASQSVYNNNDLAWYQQ
KPGQPPKLLIYGASTLVS^{GVPSRFSGSGSGAQFLTISDLE}CDDAATYYCQGGYDPRNYPFGG
GTEVVKGDPVAPTVLIFPAAQVATGTIVCVANKYFPDVTVWEVDGTTQTGTIENSKTP
QNSADCTYLNSSLTTLSTQYN^{SHKEYTKV}TGTTSVQSFNRGDC (配列番号 128)

>リーダー配列を有する抗SHPK 363可変軽鎖コード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAAGGTGC
CACATTTGCGCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCTGTGCTGCAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAGTTGCCAGGGCCAGTCAGAGTGTTTATAATAACAACGACTTAGCGCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGCAGCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCAATCCACTCTGGTATCT
GGGGTCCCGTCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGGCACAGTTCACTCTCAACATCAG
CGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGCGGATATGATCCTCGTAAT
TATCCTTTCCGGGGAGGAGCGAGGTGCTGCTGCTCAAAA (配列番号 129)

>リーダー配列を有する抗SHPK 363可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
MDTRAPTQLLLGLLLWLPGATFAQVLQTTPSPVSAVGGTVTISCQASQSVYNNNDLAWYQQ
KPGQPPKLLIYGASTLVS^{GVPSRFSGSGSGAQFLTISDLE}CDDAATYYCQGGYDPRNYPFGG
GTEVVK (配列番号 130)

【図 19-23】

(続き)

>抗ATP7B 1056VH CDR1
SYVII (配列番号 57)

>抗ATP7B 1056VH CDR2
SSGPSAYYTSWWK (配列番号 58)

>抗ATP7B 1056VH CDR3
AGGSDYDWFDL (配列番号 59)

>リーダー配列を有する抗ATP7B 1056重鎖コード配列 (EBO601-H3-1)。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTGCCTGTGCTCAAAAGGTGTCCAGTGTGCTAG
TCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGCTCAGCGCTGGAGGATCCCTGACAGTCAACCTG
TACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATTGGATAATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
GAGGGGCTGGAATGGATGGAGAGCACTGGTCTAGTGGTAGCGCATACTACACGAGCTG
GGTGAAAGGCCGATTCAACATCTCCAAGACCTCGACTACGGTGGATCTGAAATGACCCG
TCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGCTGGTGGTAGTGACTACGA
CTGGTTTGATCTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACGCTCTCTCAGGGCAACCTAAGGC
TCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCGCTGCTCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCTC
GGGCTGCTGTGCAAAAGGCTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGCA
CCCTCACCAATGGGGTACGACACCTTCCCGTCCGTCGGGCAGTCTCAGGGCTCTACTCGC
TGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCGTCACCTGCAACGTTGGCCGAC
CAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGGCCCTCGACATGCAGCAAGGCCACG
TGGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGAGCGCTGTGTTCTATCTTCCGCCAAACCAAGCAAG
GACACCCCTCATGATCTCAACGACCCCGAGGTACATGCTGTGCTGTCGAGCTGAGCCA
GGATGACCCGAGGTGCACTTCACTGATACATAAAACAACGAGCAGGTGCGCAACGCCC
GGCCGCGCTACGGGACGACGATTTCAACAGCACGATCCGCGTGCTGACGACCCCTCCCC
ATCGCGCACCAAGCACTGGCTGAGGGCACGAAGATTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGC
ACTCCCGGCCCATCGAGAAACCATCTCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGA
AGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCTGACGCTGACCTCTCT
TGATGATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAG
GCAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCT
CTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCAGCTCTTCACTGCTGCT
CGTGATGCACGAGCGCTTGACACAACCACTACAGCGAGAAGTCCATCTCCGCTCTCCGGG
TAAATGA (配列番号 132)

>リーダー配列を有する抗ATP7B 1056重鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLLVAVLKGVCQSLSESGGRLVTPGGSLTVTCTVSGFSLSSYWIWVRQAPGEG
LEWIGSSGPSAYYTSWVKGRFTISKSTTVDLKMTGLTTEDATYFCARAGGSDYDWFDLW
GGGLTVTVSSGGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSSVTLGCLVKGYLPEPVTVTVNSGTLTNGVRF
PSVRQSSGLYSLSVSVTSSSQPVTCNVHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPELFGGPSV
FIFPKPKDLMISRTPEVTGVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRARPLREQFNSTIRVVS
TLPIAHQDLWRKEFKCKVHNKALPAIEKTSKARGQFLPKVYTMGPPREELSSRSVSLTQM
INGFYPDSISVEWEKNGAEADNYKTFPAVLDSGGSYFLYSKLVPTSEWQRGDVFTCSVMHEA
LHNHYTQKSISRSPGK (配列番号 133)

【図 19-22】

(続き)

>リーダー配列のない抗SHPK 363軽鎖アミノ酸配列。CDRは太字にしている。
QVLQTTPSPVSAVGGTVTISCQASQSVYNNNDLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTLVS^{GVPSR}
FSGSGSGAQFLTISDLECCDAATYYCQGGYDPRNYPFGGTEVVKGDPVAPTVLIFPAAQ
QVATGTIVCVANKYFPDVTVWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYLNSSLTTLSTQYNS
HKEYTKVGTGTTSVQSFNRGDC (配列番号 131)

>リーダー配列のない抗SHPK 363可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。CDRは太字にしている。
QVLQTTPSPVSAVGGTVTISCQASQSVYNNNDLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTLVS^{GVPSR}
FSGSGSGAQFLTISDLECCDAATYYCQGGYDPRNYPFGGTEVVK (配列番号 74)

10

20

【図 19-24】

(続き)

>リーダー配列を有する抗ATP7B 1056可変重鎖コード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTGCCTGTGCTCAAAAGGTGTCCAGTGTGCTAG
TCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGCTCAGCGCTGGAGGATCCCTGACAGTCAACCTG
TACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATTGGATAATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
GAGGGGCTGGAATGGAATCGGAAGCACTGGTCTAGTGGTAGCGCATACTACACGAGCTG
GGTGAAAGGCCGATTCAACATCTCCAAGACCTCGACTACGGTGGATCTGAAATGACCCG
TCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCGCAGAGCTGGTAGTGACTACCA
CTGGTTTGATCTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACGCTCTCTTGA (配列番号 134)

>リーダー配列を有する抗ATP7B 1056可変重鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、CDRは太字にしている。
METGLRWLLLVAVLKGVCQSLSESGGRLVTPGGSLTVTCTVSGFSLSSYWIWVRQAPGEG
LEWIGSSGPSAYYTSWVKGRFTISKSTTVDLKMTGLTTEDATYFCARAGGSDYDWFDLW
GGGLTVTVSS (配列番号 135)

>リーダー配列のない抗ATP7B 1056重鎖アミノ酸配列。CDRは太字にしている。

QSLEESGGRLVTPGGSLTVTCTVSGFSLSSYWIWVRQAPGEGLEWIGSSGPSAYYTSWV
KGRFTISKSTTVDLKMTGLTTEDATYFCARAGGSDYDWFDLWGQGLTVTVSSGGQPKAPSV
FPLAPCCGDTSPSSVTLGCLVKGYLPEPVTVTVNSGTLTNGVRFPSVRQSSGLYSLSVSV
TSSSQPVTCNVHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPELFGGPSVFIFFPKPKDLMISRTPEV
TCVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRARPLREQFNSTIRVSTLPIAHQDLWRKEFKCK
VHNKALPAIEKTSKARGQFLPKVYTMGPPREELSSRSVSLTQMINGFYPDSISVEWEKNGK
AEDNYKTFPAVLDSGGSYFLYSKLVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
(配列番号 136)

>リーダー配列のない抗ATP7B 1056可変重鎖ドメインアミノ酸配列。CDRは太字にしている。

QSLEESGGRLVTPGGSLTVTCTVSGFSLSSYWIWVRQAPGEGLEWIGSSGPSAYYTSWV
KGRFTISKSTTVDLKMTGLTTEDATYFCARAGGSDYDWFDLWGQGLTVTVSS (配列番号
75)

30

40

50

【図 19-25】

(続き)

>抗A T P 7 B 1 0 5 6 V L C D R 1
QSSPSVANNNWLS (配列番号 60)

>抗A T P 7 B 1 0 5 6 V L C D R 2
GASTLAS (配列番号 61)

>抗A T P 7 B 1 0 5 6 V L C D R 3
AGGHKTAENP (配列番号 62)

>リーダー配列を有する抗A T P 7 B 1 0 5 6 重鎖コード配列 (E B 0 6 0 1-K 3-2)
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
CACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCGGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAACTGCCAGTCCAGTCCGAGTGTGCTAATAACAACCTGGTTATCCTGGTTT
CAGCAGAAACGAGGGCAGCTGCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTGGCATCT
GGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGC
GACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGGTCAAAAACTGCTGAA
AAAAATCCTTTCCGCGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACT
GTCCTCATCTTCCACCGAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGT
GTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAA
ACAACTGGCATCGAGAACAGTAAACACCCGAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACTCA
GCAGCATCTGACACTGACCGACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGG
TGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG (配列番号
137)

>リーダー配列を有する抗A T P 7 B 1 0 5 6 軽鎖アミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、C D R は太字にしている。
MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATEAQVLTQTSPVSAAVGGTVTINCQSSPSVANNNWLSWFQQ
KPGQRPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGGHKTAENPFG
GTEVSVVKGDPVAPTVLIFFPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKT
PQNSADCTYNLSSTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 138)

>リーダー配列を有する抗A T P 7 B 1 0 5 6 可変軽鎖コード配列。
リーダー配列には下線を付している。
ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
CACATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCGGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAACTGCCAGTCCAGTCCGAGTGTGCTAATAACAACCTGGTTATCCTGGTTT
CAGCAGAAACGAGGGCAGCTGCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTGGCATCT
GGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGC
GACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGGTCAAAAACTGCTGAA
AAAAATCCTTTCCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA (配列番号 139)

>リーダー配列を有する抗A T P 7 B 1 0 5 6 可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。
リーダー配列には下線を付しており、C D R は太字にしている。
MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATEAQVLTQTSPVSAAVGGTVTINCQSSPSVANNNWLSWFQQ
KPGQRPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGGHKTAENPFG
GTEVSVVK (配列番号 140)

【図 19-26】

(続き)

>リーダー配列のない抗A T P 7 B 1 0 5 6 軽鎖アミノ酸配列。C D R は太字にしている。

QVLTQTSPVSAAVGGTVTINCQSSPSVANNNWLSWFQQKPGQRPKLLIYGASTLASGVPSR
FKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGGHKTAENPFGGGTEVSVVKGDPVAPTVLIFFPAA
DQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTGTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYN
SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (配列番号 141)

>リーダー配列のない抗A T P 7 B 1 0 5 6 可変軽鎖ドメインアミノ酸配列。C D R は太字にしている。

QVLTQTSPVSAAVGGTVTINCQSSPSVANNNWLSWFQQKPGQRPKLLIYGASTLASGVPSR
FKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGGHKTAENPFGGGTEVSVVK (配列番号 76)

10

20

【配列表】

0007619939000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K	16/40	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 Q	1/37	(2006.01)	C 1 2 Q	1/37	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	9/16	B

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 1、シアトル、ナインス・アベニュー・ 1 9 0 0

(72)発明者 ジョン、サニー

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 1、シアトル、ナインス・アベニュー・ 1 9 0 0

(72)発明者 ホワイトエイカー、ジェフリー

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 9、シアトル、フェアビュー・アベニュー・ノース・ 1 1 0 0

(72)発明者 トーガーソン、トロイ

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 1、シアトル、ナインス・アベニュー・ 1 9 0 0

(72)発明者 パウロビッチ、アマンダ

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 9、シアトル、フェアビュー・アベニュー・ノース・ 1 1 0 0

(72)発明者 コリンズ、クリストファー

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 1、シアトル、ナインス・アベニュー・ 1 9 0 0

(72)発明者 ダユーハ、リムワイリン

アメリカ合衆国、ワシントン・ 9 8 1 0 1、シアトル、ナインス・アベニュー・ 1 9 0 0

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 0 1 3 6 5 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 2 9 0 2 7 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 5 9 5 3 5 (U S , A 1)

Sandra. A Kerfoot et al, Tryptic Peptide Screening for Primary Immunodeficiency Disease by LC/MS-MS, Proteomics - Clinical Applications, 2012年, 6(7-8), 394-402

Sunhee Jung et al, Quantification of ATP7B protein in Dried Blood Spots by Peptide Immuno-SRM as a potential screen for Wilson Disease, Journal of Proteome Research, 2017年, 16(2), 862-871

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)