(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-515267
(P2020-515267A)
(43)公表日　令和2年5月28日(2020.5.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/686	(2018.01)	C12Q	1/686	Z	2G045
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	ZNAN	4B063
G01N 33/542	(2006.01)	G01N	33/542	Z	
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P	
C12Q 1/6851	(2018.01)	C12Q	1/6851	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 98 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-553563 (P2019-553563)
(86)(22)出願日　平成30年3月29日 (2018.3.29)
(85)翻訳文提出日　令和1年11月18日 (2019.11.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/025299
(87)国際公開番号　WO2018/183779
(87)国際公開日　平成30年10月4日 (2018.10.4)
(31)優先権主張番号　62/479,278
(32)優先日　平成29年3月30日 (2017.3.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　503115205
ザ　ボード　オブ　トラスティーズ　オブ　ザ　レランド　スタンフォード　ジュニア　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　９４３０５－２０３８　カリフォルニア州　スタンフォード　メイン　クワッド　ビルディング　１７０　サード　フロア　ピー．オー．ボックス　２０３８６　オフィス　オブ　ザ　ジェネラル　カウンセル
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多重アイソタイプ特異的抗体の検出

(57)【要約】
抗体の多重検出のための方法および試薬が、開示されている。特に、本発明は、疾患関連抗体アイソタイプ、例えば、アレルギー反応、自己免疫疾患、感染症、および炎症に関与する疾患関連抗体アイソタイプを同定および定量化するためのＤＮＡバーコードを担持する抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを用いた抗体の多重検出に関する。本発明は、特定のアイソタイプの抗体の検出のための高感度で、かつ信頼可能な診断アッセイの開発に基づいている。ＤＮＡバーコードを担持する、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、特定の抗体の存在を検出するために使用される。
【選択図】図５

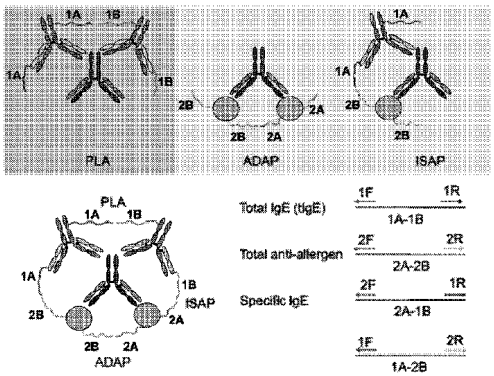


FIG. 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の標的抗体アイソタイプを検出する方法であって、
ａ）前記試料を、ｉ）バーコードの第１の部分を含む第１のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗体結合剤およびｉｉ）バーコードの第２の部分を含む第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗原と接触させることであって、前記抗原が、前記試料中の前記標的抗体アイソタイプに、存在する場合、結合し、前記抗体結合剤が、前記標的抗体アイソタイプに特異的に結合して、複合体の形成をもたらす、接触させることと、
ｂ）前記複合体中で前記第１のＤＮＡ分子を前記第２のＤＮＡ分子に接続することであって、前記バーコードの前記第１の部分および前記バーコードの前記第２の部分を接合して、完全なバーコードを形成する、接続することと、
ｃ）前記試料中の前記標的抗体アイソタイプの存在の指標として前記完全なバーコードを検出することと、を含む、方法。
【請求項２】
前記接続することが、
ａ）前記複合体を、架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記架橋オリゴヌクレオチドが、前記第１のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、前記第２のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、前記第１のＤＮＡ分子および前記第２のＤＮＡ分子が、前記架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、前記複合体中で互いに近接している、接触させることと、
ｂ）前記複合体中で前記第１のＤＮＡ分子を前記第２のＤＮＡ分子に連結して、前記完全なバーコードを含む連結産物を産生することと、を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記接続することが、前記第１のＤＮＡ分子中のヌクレオチド配列の前記第２のＤＮＡ分子中の相補的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記第１および第２のＤＮＡ分子の前記相補的ヌクレオチド配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
ポリメラーゼを用いて、前記ハイブリダイズした第１および第２のＤＮＡ分子を伸長させて、前記完全なバーコードを含む核酸を生成することをさらに含む、請求項３に記載の方法。
【請求項６】
前記ポリメラーゼが、等温条件下で使用される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記標的抗体アイソタイプが、免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）、免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）、および免疫グロブリンＤ（ＩｇＤ）からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記ＩｇＧが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４からなる群から選択される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記抗体結合剤が、前記標的抗体アイソタイプに特異的に結合する、抗体、抗体模倣物、またはアプタマーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記標的抗体アイソタイプに特異的に結合する前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ナノボディ、抗体の組換え断片、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆ$_v$断片、およびｓｃＦ$_v$断片からなる群から選択される、請

求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記標的抗体アイソタイプに特異的に結合する前記抗体が、抗ＩｇＥ抗体、抗ＩｇＭ抗体、抗ＩｇＧ抗体、抗ＩｇＡ抗体、および抗ＩｇＤ抗体からなる群から選択される、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記検出することが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、等温増幅、またはマイクロアレイ分析を用いて実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記標的抗体アイソタイプの量を定量化することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記定量化することが、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を実施することを含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記試料が、免疫障害を有する対象から得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記免疫障害が、アレルギー、感染症、自己免疫障害、炎症性障害からなる群から選択される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記感染症が、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記抗原が、ＨＩＶ－１抗原、ＨＩＶ－２抗原、ＨＩＶ－１／２抗原、ｐ１６、ｐ１４、ｐ２４、ｐ５５、ｇｐｌ２０、ｇｐｌ６０、ｇｐ４１、およびｇｐ３６からなる群から選択される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記試料が、血液、血漿、または血清である、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
前記方法が、０．０１ｎｇ／ｍＬ以上の濃度でＩｇＥを検出することができる、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
複数の抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを前記試料に添加することをさらに含み、各抗体結合剤が、異なるバーコード配列を含むＤＮＡ分子にコンジュゲートされ、各抗体結合剤が、異なる標的抗体アイソタイプに結合することができ、前記試料中の複数の標的抗体アイソタイプの多重検出を可能にする、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
前記抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートが、ＩｇＥの検出用の抗ＩｇＥ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＭの検出用の抗ＩｇＭ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＧの検出用の抗ＩｇＧ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＡの検出用の抗ＩｇＡ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、およびＩｇＤの検出用の抗ＩｇＤ二次抗体ＤＮＡコンジュゲートからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記架橋オリゴヌクレオチドが、配列番号２１のヌクレオチド配列または配列番号２１の配列と少なくとも９５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記架橋オリゴヌクレオチドが、前記二次抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび前記抗原－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡにハイブリダイズすることができる、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
前記方法が、
ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む

架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、

ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、

ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、

ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、

ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、

ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、

ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、

ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、

ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびに

ｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される、請求項１に記載の方法。

【請求項２５】

前記抗原が、アレルゲン、自己免疫疾患抗原、がん抗原、および病原体抗原からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項２６】

近接連結アッセイ（ＰＬＡ）または凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＤＡＰ）を実施することをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項２７】

抗体アイソタイプを検出するために、少なくとも１つの抗原－ＤＮＡコンジュゲート、少なくとも１つの抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、少なくとも１つの架橋オリゴヌクレオチド、および少なくとも一対のＰＣＲプライマーを含む、アイソタイプ特異的凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＩＳＡＰ）を実施するためのキット。

【請求項２８】
配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列、または配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するＤＮＡ配列を含む、抗原－ＤＮＡコンジュゲート。
【請求項２９】
配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列、または配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するＤＮＡ配列を含む、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート。
【請求項３０】
生体試料中の抗体を検出するための組成物であって、
ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、
ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、
ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、
ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、
ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびに
ｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を

含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を含む、組成物。
【請求項３１】
請求項３０に記載の組成物と、抗体を検出するための取扱説明書と、を含む、キット。
【請求項３２】
リガーゼをさらに含む、請求項３１に記載のキット。
【請求項３３】
ＰＣＲを実施するための試薬をさらに含む、請求項３１に記載のキット。
【請求項３４】
試料中のアレルゲン抗体を検出するための方法であって、前記試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、アイソタイプ特異的凝集－ポリメラーゼ連鎖反応（ＩＳＡＰ）を実施することを含む、方法。
【請求項３５】
アレルゲン特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗免疫グロブリンＧ４（ＩｇＧ４）抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いてＩＳＡＰを実施することをさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記試料中の総免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）レベルを検出するために、少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）を実施することをさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
前記試料中の総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために、少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、凝集－ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＤＡＰ）を実施することをさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３８】
ＡＤＡＰが、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、およびＩｇＤの総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために使用される、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ＩｇＧが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４からなる群から選択される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記試料中の総免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）レベルを検出するために、少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）を実施することをさらに含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
前記ＰＬＡの前記実施が、
ａ）前記少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを前記試料に添加することであって、前記少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートが、第１の部位で前記試料中のＩｇＥに結合する第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、第２の部位で同じＩｇＥに結合する第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、を含む、添加することと、
ｂ）前記試料をＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドが、（ｉ）前記第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）前記第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、前記第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび前記第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡが、前

記ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接している、接触させることと、
ｃ）前記第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと前記第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを連結して、ＰＬＡ連結産物を産生することと、
ｄ）前記試料中の前記ＩｇＥの存在の指標として前記ＰＬＡ連結産物を検出することと、を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記ＡＤＡＰの前記実施が、
ａ）前記少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを前記試料に添加することであって、前記少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートが、第１の部位で前記試料中の抗アレルゲン抗体に結合する第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと、第２の部位で同じ抗アレルゲン抗体に結合する第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと、を含む、添加することと、
ｂ）前記試料をＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドが、（ｉ）前記第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）前記第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、前記第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび前記第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡが、前記ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接している、接触させることと、
ｃ）前記第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと前記第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを連結して、ＡＤＡＰ連結産物を産生することと、
ｄ）前記試料中の前記抗アレルゲン抗体の存在の指標として前記ＡＤＡＰ連結産物を検出することと、を含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記ＩＳＡＰの前記実施が、
ａ）少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて前記少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを、前記試料に添加することであって、前記アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートに結合し、前記抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートが、前記同じアレルゲン特異的ＩｇＥに結合して、第１の複合体の形成をもたらす、添加することと、
ｂ）前記第１の複合体を、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドが、（ｉ）前記抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）前記アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、前記抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび前記アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡが、前記ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、前記第１の複合体中で互いに近接している、接触させることと、
ｃ）前記第１の複合体中で前記抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡと前記アレルゲン－ＤＮＡを連結して、第１のＩＳＡＰ連結産物を産生することと、
ｄ）前記試料中の前記アレルゲン特異的ＩｇＥの存在の指標として前記第１のＩＳＡＰ連結産物を検出することと、
ｅ）少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて前記少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを前記試料に添加することであって、前記アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートが、前記試料中の前記アレルゲン特異的ＩｇＧ４に結合し、前記抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートが、同じアレルゲン特異的ＩｇＧ４に結合して、第２の複合体の形成をもたらす、添加することと、
ｆ）前記第２の複合体を、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって

、前記ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドが、（ｉ）前記抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）前記アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、前記抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび前記アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡが、前記ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、前記複合体中で互いに近接している、接触させることと、

ｇ）前記第２の複合体中で前記抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡと前記アレルゲン－ＤＮＡを連結して、第２のＩＳＡＰ連結産物を産生することと、

ｈ）前記試料中の前記アレルゲン特異的ＩｇＧ４の存在の指標として前記第２のＩＳＡＰ連結産物を検出することと、を含む、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

前記ＰＬＡ連結産物、前記ＡＤＡＰ連結産物、前記第１のＩＳＡＰ連結産物、および前記第２のＩＳＡＰ連結産物の前記検出が、多重ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、等温増幅、またはマイクロアレイ分析を用いて実施される、請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記ＰＬＡ連結産物、前記ＡＤＡＰ連結産物、前記第１のＩＳＡＰ連結産物、および前記第２のＩＳＡＰ連結産物の量を定量化することをさらに含む、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

前記定量化することが、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を実施することを含む、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

前記ＰＬＡが、

ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、

ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、

ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、

ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、

ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、

ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、

ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１の

ヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド配列番号２１、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびに
ｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４８】
前記ＡＤＡＰが、
ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、
ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、
ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、
ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、
ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列

番号１４のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびに

ｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される、請求項３７に記載の方法。

【請求項４９】

前記ＩＳＡＰが、

ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、

ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、

ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、

ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、

ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマーおよび配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、

ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、

ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、

ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、

ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびに

ｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択され

る少なくとも一組の試薬を用いて実施される、請求項３４に記載の方法。
【請求項５０】
ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、
ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマーおよび配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマーおよび配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、
ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマーおよび配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、
ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、
ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、
ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、
ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびに
ｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いてＩＳＡＰを実施することをさらに含む、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
請求項４０に記載の方法に従って試料中のピーナッツアレルゲン抗体を検出するための方法であって、前記ＡＤＡＰの前記実施が、前記試料中の総抗Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートを用いることと、前記試料中の総抗Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートを用いることと、前記試料中の総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、

一対のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートを用いることと、を含む、方法。
【請求項５２】
前記ＩＳＡＰの前記実施が、前記試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、前記試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、前記試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いることを含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記ＩＳＡＰの前記実施が、前記試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、前記試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、前記試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いることをさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
ａ）前記ＰＬＡが、前記試料中の総ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマーを用いて実施され、
ｂ）前記ＡＤＡＰが、ｉ）前記試料中の総抗Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）前記試料中の総抗Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｉｉｉ）前記試料中の総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、を用いて実施され、
ｃ）前記ＩＳＡＰが、ｉ）前記試料中のＡｒａ　ｈ１特異的レベルＩｇＥを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）前記試料中のＡｒａ　ｈ２特異的レベルＩｇＥを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉｉｉ）前記試料中のＡｒａ　ｈ３特異的レベルＩｇＥを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配

列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｉｖ）前記試料中のＡｒａ　ｈ１特異的レベルＩｇＧ４を検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｖ）前記試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｖｉ）前記試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、を用いて実施される、請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

ａ）総ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマーを含む、ＰＬＡを実施するための試薬と、

ｂ）ｉ）総抗Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）総抗Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｉｉｉ）総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを含む、ＡＤＡＰを実施するための試薬と、

ｃ）ｉ）Ａｒａ　ｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）Ａｒａ　ｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉｉｉ）Ａｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｉｖ）Ａ

ｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｖ）前記試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｖｉ）Ａｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを含む、ＩＳＡＰを実施するための試薬と、を含む、組成物。

【請求項５６】

請求項５５に記載の組成物と、アレルゲン抗体を検出するための取扱説明書と、を含む、キット。

【請求項５７】

リガーゼをさらに含む、請求項５６に記載のキット。

【請求項５８】

ＰＣＲを実施するための試薬をさらに含む、請求項５６に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

連邦政府支援の研究または開発に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所により授与された契約ＤＫ１０８７８１およびＡＲ０６７１４５下で政府支援を受けてなされたものである。政府は本発明に一定の権利を有する。

【０００２】

本発明は、一般に、免疫学の分野および特定の抗体アイソタイプを検出する方法に関する。特に、本発明は、疾患関連抗体アイソタイプ、例えば、アレルギー反応、自己免疫疾患、感染症、および炎症に関与する疾患関連抗体アイソタイプを同定および定量化するためのＤＮＡバーコードを担持する抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを用いた抗体の多重検出に関する。

【背景技術】

【０００３】

アレルギーは、米国の人口の２０％超に影響を与える一般的な免疫過敏性疾患である（Ｇｕｐｔａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）　Ｐｅｄｉａｔｒｉｃｓ　１２８：ｅ９－ｅ１７、Ａｋｉｎｂａｍｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）　ＮＣＨＳ　Ｄａｔａ　Ｂｒｉｅｆ　９４：１－８）。アレルゲンへの曝露は、アナフィラキシー（Ｃｈｉｎｔｈｒａｊａｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：９８４－９９７）およびアレルギー性喘息（Ｍｉｌｇｒｏｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４１：１９６６－１９７３）などの生命を脅かす障害につながり得る。新規の抗アレルギー療法は、アレルギー反応内の免疫学的因子（ａｃｔｏｒ）を直接修正する（Ｍｉｌｇｒｏｍら、上記参照）。例えば、最近の経口免疫療法の試験では、ピーナッツアレルゲン（Ｓｙｅｄ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：５００－５１０、Ｖｉｃｋｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｓ００９１－６７４９：３０５３１－０）、世界中の何百万人もの患者が患っている最も一般的なアレルギーの１つ（Ｇｕｐｔａら、上記参照）に対する耐性を誘導することへの期待が示されている。これらの刺激的な新しい治療法はすべて、治療に適した患者を特定し、治療に対する反応を追跡

するために、費用効果が高く、感度が高く、信頼できる診断を必要とする。現在、この目的のためにいくつかの技術が展開されていますが、それらは、大量の試料を消費し、アレルギー専門医とそれらの患者の臨床的必要性を満たすための費用対効果に欠けている。

【０００４】

最も一般的なアレルギー検査のうちの１つは、皮膚プリックテストである（ＳＰＴ，Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ａｎｎ Ａｌｌｅｒｇｙ Ａｓｔｈｍａ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１００：Ｓ１－１４８）。このテストは、アレルゲン抽出物を皮下注射し、発生するアレルギー性病変を観察することによってアレルギー反応を測定する。ＳＰＴテストは、安価であり、迅速に実施することができるが、その侵襲性および潜在的なシステムの合併症は、特に小児科集団での幅広い支持を制限する（Ｌｉｃｃａｒｄｉ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ａｌｌｅｒｇｏｌ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６：７５－７８）。さらに、ＳＰＴの結果は、医師が定量化のために標準化が不十分なパラメーターに依存しているため、大きく変動する（Ｆａｔｔｅｈ ｅｔ ａｌ．（２０１４） Ａｌｌｅｒｇｙ Ａｓｔｈｍａ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０（１）：４４）。

【０００５】

分子ツールは、より強力でより信頼性の高い定量力を備えた補完的な診断ツールとして有望である（Ｆｅｒｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．（２０１４） Ｙｏｎｓｅｉ Ｍｅｄ．Ｊ．５５：８３９－８５２）。総ＩｇＥ（ｔＩｇＥ）およびアレルゲン特異的ＩｇＥ（ｓＩｇＥ）の測定は、単純な血液検査、患者が所与のアレルゲンに対するアレルギー反応を示すために必要とされる抗体（ｓＩｇＥ）の種類の存在から確実に特定する（Ｆｅｒｒｅｉｒａら、上記参照）。しかしながら、いくつかの技術的な課題は、ＩｇＥ分子試験の現在の世代の能力が制限されている。血清中のＩｇＥ濃度は、ＩｇＧ（４０～５０ｍｇ／ｍＬ）などの他の非常に豊富で潜在的に干渉するタンパク質と比較して非常に低い（１００～５００ｎｇ／ｍＬ）（Ａｍａｒａｓｅｋｅｒａ ｅｔ ａｌ．（２０１１） Ａｓｉａ Ｐａｃ Ａｌｌｅｒｇｙ １：１２－１５）。濃度の５～６桁の違いは、無関係な血清タンパク質の海の中の微量のＩｇＥを検出するためにアッセイの開発を妨げる。

【０００６】

問題をさらに悪化させているのは、全アレルゲン抽出物からのタンパク質不純物は、しばしば、アレルゲン特異的アッセイを悪化させることである（Ｆｅｒｒｅｉｒａら、上記参照）。これらの不純物は、これらのテストの特異性を低減させるために非アレルギー性抗体と交差反応する（Ｆｅｒｒｅｉｒａら、上記参照）。最近の研究は、根本的なアレルギーと強く相関する正確なアレルゲンタンパク質が特定されている。（抽出物全体とは対照的に）正確なアレルゲンタンパク質を利用するアッセイは、「成分分解アレルギー診断」の基礎を形成する（Ｆｅｒｒｅｉｒａら、上記参照）。これらのテストは、ＩｇＥベースのアレルギーテストに対して大いに改善された精度を示す（Ｆｅｒｒｅｉｒａら、上記参照）。

【０００７】

ＩｍｍｕｎｏＣＡＰプラットフォーム（Ｐｈａｄｉａ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ）は、成分分解アレルギーＩｇＥテストの診断環境を支配している（Ｃｈａｐｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２０１５） Ｃｕｒｒ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ａｓｔｈｍａ Ｒｅｐ．１５：３６）。ＩｍｍｕｎｏＣＡＰの重要な要素は、アレルゲンが含浸した高密度ポリマーである（Ｃｈａｐｍａｎら、上記参照）。ポリマーへの高アレルゲン負荷は、試料からアレルゲン結合抗体の大部分を効率的に捕捉する（Ｃｈａｐｍａｎら、上記参照）。このアプローチは、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰが、ポリマーベースの捕捉方法を使用しない従来のＥＬＩＳＡアッセイ形式よりもはるかに感度が高くなる。しかしながら、アレルゲンの消費量が増加すると、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰテストの費用が増加する（１試料当たり５０ドル）。ピーナッツアレルギーの５成分ＩｍｍｕｎｏＣＡＰ検査は、２５０ドルもの費用を要し、２００μＬの血漿を必要とし得る。高性能成分分解アレルギーテストの感度および特異度が向上しているが、その比較的高い費用および試料消費は、品質が改善された新規の診断技術の

機会を示す。
したがって、感度が高く、特異的、かつ費用対効果の高い抗体の診断検査のより良好な方法が必要である。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｇｕｐｔａ ｅｔ ａｌ．（２０１１） Ｐｅｄｉａｔｒｉｃｓ １２８：ｅ９－ｅ１７
【非特許文献２】Ａｋｉｎｂａｍｉ ｅｔ ａｌ．（２０１２） ＮＣＨＳ Ｄａｔａ Ｂｒｉｅｆ ９４：１－８
【非特許文献３】Ｍｉｌｇｒｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４１：１９６６－１９７３
【非特許文献４】Ｃｈｉｎｔｈｒａｊａｈ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：９８４－９９７
【非特許文献５】Ｓｙｅｄ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：５００－５１０
【非特許文献６】Ｖｉｃｋｅｒｙ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｓ００９１－６７４９：３０５３１－０
【非特許文献７】ＳＰＴ，Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ａｎｎ Ａｌｌｅｒｇｙ Ａｓｔｈｍａ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１００：Ｓ１－１４８
【非特許文献８】Ｌｉｃｃａｒｄｉ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ａｌｌｅｒｇｏｌ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６：７５－７８
【非特許文献９】Ｆａｔｔｅｈ ｅｔ ａｌ．（２０１４） Ａｌｌｅｒｇｙ Ａｓｔｈｍａ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０（１）：４４
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本発明は、特定のアイソタイプの抗体の検出のための高感度で、かつ信頼可能な診断アッセイの開発に基づいている。ＤＮＡバーコードを担持する、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、特定の抗体の存在を検出するために使用される。ＤＮＡバーコードの使用は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、等温増幅、マイクロアレイ分析などの核酸ベースの検出方法によって抗体を特定することができる。特に、本発明の方法は、アレルギー、自己免疫疾患、感染症、または炎症などの免疫障害に関連する疾患関連抗体のモニタリングを可能にし、それにより、より良好な疾患管理を可能にする。
【００１０】
一態様では、本発明は、試料中の標的抗体アイソタイプを検出する方法であって、ａ）試料を、ｉ）バーコードの第１の部分を含む第１のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗体結合剤およびｉｉ）バーコードの第２の部分を含む第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗原と接触させることであって、抗原は、試料中の標的抗体アイソタイプに、存在する場合、結合し、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合して、複合体の形成をもたらす、接触させることと、ｂ）複合体中で第１のＤＮＡ分子を複合体の第２のＤＮＡ分子に接続することであって、バーコードの第１の部分およびバーコードの第２の部分が接合して、完全なバーコードを形成する、接続することと、ｃ）試料中の標的抗体アイソタイプの存在の指標として完全なバーコードを検出することと、を含む、方法を含む。
【００１１】
第１のＤＮＡ分子を第２のＤＮＡ分子と接続することは、様々な方法において達成され得る。一実施形態では、本方法は、ａ）複合体を、架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、架橋オリゴヌクレオチドは、第１のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、第２のＤＮＡ分子に対して十分に相補的で

あり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、第１のＤＮＡ分子および第２のＤＮＡ分子が、架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、複合体中で互いに近接している、接触させることと、ｂ）複合体中で第１のＤＮＡ分子を第２のＤＮＡ分子に連結して、完全なバーコードを含む連結産物を産生することと、を含む。別の実施形態では、本方法は、第１のＤＮＡ分子のヌクレオチド配列の第２のＤＮＡ分子の相補的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーション、およびポリメラーゼを使用して、ハイブリダイズした第１および第２のＤＮＡ分子を伸長させて、完全なバーコードを含む核酸を生成することを含む。ポリメラーゼ反応は、例えば、等温条件下で実施することができる。

【００１２】

ある特定の実施形態では、完全なバーコードは、ＰＣＲ、等温増幅、またはマイクロアレイ分析を用いて検出される。別の実施形態では、本方法は、例えば、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を用いて、標的抗体アイソタイプの量を定量化することをさらに含む。

【００１３】

ある特定の実施形態では、試料は、アレルギー、感染症、自己免疫障害、炎症性障害などの免疫障害を有する対象から得られる。試料は、典型的には、血液、血漿、または血清であるが、抗体を含む任意の試料であり得る。

【００１４】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ＨＩＶ感染症を診断するための抗ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）抗体を検出するために使用される。抗ＨＩＶ抗体の検出では、第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートされた抗原は、ＨＩＶ抗原である。例示的なＨＩＶ抗原には、ＨＩＶ－１抗原、ＨＩＶ－２抗原、ＨＩＶ－１／２抗原、ｐ１６、ｐ１４、ｐ２４、ｐ５５、ｇｐｌ２０、ｇｐｌ６０、ｇｐ４１、およびｇｐ３６が含まれる。

【００１５】

ある特定の実施形態では、標的抗体分析物は、免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）、免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）、および免疫グロブリンＤ（ＩｇＤ）からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブタイプのＩｇＧである。

【００１６】

抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する任意の薬剤であり得る。抗体結合剤の例には、抗体、抗体断片、抗体模倣物、およびアプタマーが含まれるが、これらに限定されない。

【００１７】

ある特定の実施形態では、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する抗体を含む。抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ナノボディ、抗体の組換え断片、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆ$_v$断片、またはｓｃＦ$_v$断片であり得る。ある特定の実施形態では、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する抗体は、抗ＩｇＥ抗体、抗ＩｇＭ抗体、抗ＩｇＧ抗体、抗ＩｇＡ抗体、および抗ＩｇＤからなる群から選択される。

【００１８】

他の実施形態では、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合するアプタマーを含む。例えば、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する、ＤＮＡ、ＲＮＡ、異種核酸（ＸＮＡ）、またはペプチドアプタマーを使用してもよい。

【００１９】

さらに他の実施形態では、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する抗体模倣物を含む。例示的な抗体模倣物には、アフィボディ分子、アフィリン、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アンチカリン、アビマー、ダーピン、フィノマー、およびモノボディが含まれる。

【００２０】

別の実施形態では、本方法は、複数の抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加

することをさらに含み、各抗体結合剤は、異なるバーコード配列を含むＤＮＡ分子にコンジュゲートされ、各抗体結合剤は、異なる標的抗体アイソタイプに結合することができ、試料中の複数の標的抗体アイソタイプの多重検出を可能にする。ある特定の実施形態では、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、ＩｇＥの検出用の抗ＩｇＥ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＭの検出用の抗ＩｇＭ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＧの検出用の抗ＩｇＧ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＡの検出用の抗ＩｇＡ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、およびＩｇＤの検出用の抗ＩｇＤ二次抗体ＤＮＡコンジュゲートからなる群から選択される。

【００２１】

ある特定の実施形態では、本方法は、アレルゲン特異的抗体を検出するために使用され、本方法は、０．０１ｎｇ／ｍＬ以上の濃度でＩｇＥを検出することができる。

【００２２】

ある特定の実施形態では、抗原－ＤＮＡコンジュゲートは、アレルゲン、自己免疫疾患抗原、がん抗原、および病原体抗原からなる群から選択される抗原を含む。

【００２３】

別の実施形態では、本発明は、試料中で標的抗体アイソタイプを検出する方法であって、ａ）第１のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗体結合剤および第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗原を、試料に添加することであって、抗原は、存在する場合、試料中で標的抗体アイソタイプに結合し、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合して、複合体の形成をもたらす、添加することと、ｂ）複合体を、架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、架橋オリゴヌクレオチドは、第１のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、第２のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、第１のＤＮＡ分子および第２のＤＮＡ分子は、架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、複合体中で互いに近接している、接触させることと、ｃ）複合体中で第１のＤＮＡ分子を第２のＤＮＡ分子に連結することと、ｄ）試料中の標的抗体アイソタイプの存在の指標として連結産物を検出することと、を含む、方法を含む。

【００２４】

別の実施形態では、本発明は、試料中で標的抗体アイソタイプを検出する方法であって、ａ）第１のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗体結合剤および第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗原を、試料に添加することであって、抗原は、存在する場合、試料中で標的抗体アイソタイプに結合し、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合して、複合体の形成をもたらし、第１のＤＮＡ分子の一部は第２のＤＮＡ分子の一部とハイブリダイズするのに十分に相補的である、添加することと、ｂ）ハイブリダイズした第１および第２のＤＮＡ分子をＤＮＡポリメラーゼで伸長して、伸長したＤＮＡ産物を産生することと、ｄ）試料中の標的抗体アイソタイプの存在の指標として伸長したＤＮＡ産物を検出することと、を含む、方法を含む。

【００２５】

ＤＮＡ連結産物の検出のための、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、架橋オリゴヌクレオチド、およびＰＣＲプライマーに対する例示的なＤＮＡ配列は、実施例１および配列表の配列番号１～２１に示されている。

【００２６】

特定の実施形態では、抗原－ＤＮＡコンジュゲートは、配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列、または配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するＤＮＡ配列を含む。

【００２７】

ある特定の実施形態では、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列、または配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群か

ら選択されるＤＮＡ配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するＤＮＡ配列を含む。

【００２８】

ある特定の実施形態では、架橋オリゴヌクレオチドは、配列番号２１のヌクレオチド配列または配列番号２１の配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、架橋オリゴヌクレオチドは、二次抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび抗原－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡにハイブリダイズすることができる。

【００２９】

別の実施形態では、本方法は、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【００３０】

別の実施形態では、本発明は、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗

体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を含む生物学的試料中の抗体を検出するための組成物を含む。

【００３１】

別の実施形態では、本発明は、抗体を検出するために、少なくとも１つの抗原－ＤＮＡコンジュゲート、少なくとも１つの抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート（例えば、抗体アイソタイプに特異的な二次抗体またはアプタマー）、少なくとも１つの架橋オリゴヌクレオチド、および少なくとも一対のＰＣＲプライマーを含む、アイソタイプ特異的凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＩＳＡＰ）を実施するためのキットを含む。キットは、抗体を検出するために、ＩＳＡＰを実施するための取扱説明書をさらに含んでもよい。キットは、ＰＣＲを実施するために、リガーゼ、ポリメラーゼ、および／または試薬をさらに含んでもよい。

【００３２】

ＩＳＡＰは、他の抗体検出方法、特に、ＤＮＡバーコードを用いて多重ＰＣＲによって複数の抗体アイソタイプの検出を可能にする他の方法と組み合わせることができる。ある多重アッセイ形式では、ＩＳＡＰは、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）および／または凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＤＡＰ）と組み合わされる。

【００３３】

ある特定の実施形態では、本発明は、試料中のアレルゲン抗体を検出する方法であって、試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ

抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、アイソタイプ特異的凝集－ポリメラーゼ連鎖反応（ＩＳＡＰ）を実施することを含む、方法を含む。

【００３４】

別の実施形態では、本発明は、アレルゲン特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗免疫グロブリンＧ４（ＩｇＧ４）抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いてＩＳＡＰを実施することをさらに含む。

【００３５】

別の実施形態では、本発明は、試料中の総免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）レベルを検出するために、少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）を実施することをさらに含む。

【００３６】

別の実施形態では、本発明は、試料中の総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために、少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、凝集－ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＤＡＰ）を実施することをさらに含む。

【００３７】

別の実施形態では、本発明は、試料中のアレルゲン抗体を検出する方法であって、ａ）試料中の総免疫グロブリンＥ（ＩｇＥ）レベルを検出するために、少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）を実施することと、ｂ）試料中の総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために、少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＤＡＰ）を実施することと、ｃ）試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲンＤＮＡコンジュゲートを用いて、アイソタイプ特異的凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＩＳＡＰ）を実施することと、を含む、方法を含む。本方法は、アレルゲン特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗免疫グロブリンＧ４（ＩｇＧ４）抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いてＩＳＡＰを実施することをさらに含み得る。

【００３８】

ある特定の実施形態では、ＡＤＡＰは、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、およびＩｇＤの総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために使用される。

【００３９】

ある特定の実施形態では、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、もしくはＩｇＧ４サブタイプ、またはそれらの組み合わせのＩｇＧの総抗アレルゲンレベルが、検出される。

【００４０】

別の実施形態では、ＰＬＡの実施は、ａ）前記少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、前記少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、第１の部位で試料中のＩｇＥに結合する第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、第２の部位で同じＩｇＥに結合する第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、を含む、添加することと、ｂ）試料をＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接している、接触させることと、ｃ）第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを連結して、ＰＬＡ連結産物を産生することと、ｄ）試料中のＩｇＥの存在の指標としてＰＬＡ連結産物を検出することと、を含む

。

【００４１】

別の実施形態では、ＡＤＡＰの実施は、ａ）前記少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、前記少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、第１の部位で試料中の抗アレルゲン抗体に結合する第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと、第２の部位で同じ抗アレルゲン抗体に結合する第２の抗アレルゲン抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、を含む、添加することと、ｂ）試料をＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接している、接触させることと、ｃ）第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを連結して、ＡＤＡＰ連結産物を産生することと、ｄ）試料中の抗アレルゲン抗体の存在の指標としてＡＤＡＰ連結産物を検出することと、を含む。

【００４２】

別の実施形態では、ＩＳＡＰの実施は、ａ）少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥに結合し、抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、同じアレルゲン特異的ＩｇＥに結合して、第１の複合体の形成をもたらす、添加することと、ｂ）第１の複合体をＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよびアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、第１の複合体中で互いに近接している、接触させることと、ｃ）第１の複合体中で抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡとアレルゲン－ＤＮＡを連結して、第１のＩＳＡＰ連結産物を産生することと、ｄ）試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥの存在の指標として第１のＩＳＡＰ連結産物を検出することと、ｅ）少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン抗体－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、試料中のアレルゲン特異的ＩｇＧ４に結合し、抗ＩｇＧ４抗体に－ＤＮＡコンジュゲートは、同じアレルゲン特異的ＩｇＧ４に結合して、第２の複合体の形成をもたらす、添加することと、ｆ）第２の複合体をＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートＤＮＡおよびアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、複合体中で互いに近接している、接触させることと、ｇ）第２の複合体中で抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡとアレルゲン－ＤＮＡを連結して、第２のＩＳＡＰ連結産物を産生することと、ｈ）試料中のアレルゲン特異的ＩｇＧ４の存在の指標として第２のＩＳＡＰ連結を検出することと、を含む。

【００４３】

ある特定の実施形態では、ＰＬＡ連結産物、ＡＤＡＰ連結産物、第１のＩＳＡＰ連結産物、および第２のＩＳＡＰ連結産物の検出は、多重ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、等

温増幅、またはマイクロアレイ分析を用いて実施される。本方法は、例えば、ｑＰＣＲを実施することにより、ＰＬＡ連結産物、ＡＤＡＰ連結産物、第１のＩＳＡＰ連結産物、および第２のＩＳＡＰ連結産物の量を定量化することをさらに含み得る。

【００４４】

別の実施形態では、ＰＬＡは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【００４５】

別の実施形態では、ＡＤＡＰは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート

、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【００４６】

別の実施形態では、ＩＳＡＰは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチ

ド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【００４７】

別の実施形態では、ＩＳＡＰは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌ

クレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【００４８】

別の実施形態では、本発明は、試料中のピーナッツアレルゲン抗体を検出するための方法であって、ａ）ＰＬＡは、試料中の総ＩｇＥレベルを検出するために、一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて実施され、ｂ）ＡＤＡＰは、試料中の総抗－Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中の総抗－Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中の総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いて実施され、ｃ）ＩＳＡＰは、試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いて実施される、方法を含む。別の実施形態では、ＩＳＡＰの実施は、試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いることをさらに含む。

【００４９】

別の実施形態では、本方法は、ａ）試料中の総ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマーを用いてＰＬＡを実施することと、ｂ）ｉ）試料中の総抗Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）試料中の総抗Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー

、ならびにｉｉｉ）試料中の総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを用いてＡＤＡＰを実施することと、ｃ）ｉ）試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉｉｉ）試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｉｖ）試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｖ）試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｖｉ）試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを用いてＩＳＡＰを実施することと、を含む。

【００５０】

別の実施形態では、本方法は、ａ）総ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマーを含む、ＰＬＡを実施するための試薬と、ｂ）ｉ）総抗Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）総抗Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｉｉｉ）総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ

ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを含む、ＡＤＡＰを実施するための試薬と、ｃ）ｉ）Ａｒａ　ｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）Ａｒａ　ｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉｉｉ）Ａｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｉｖ）Ａｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｖ）試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｖｉ）Ａｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを含む、ＩＳＡＰを実施するための試薬と、を含む、組成物を含む。

【００５１】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組成物と、アレルゲン抗体を検出するための取扱説明書と、を含む、キットを含む。キットは、ＰＣＲを実施するためのリガーゼおよび試薬をさらに含んでもよい。

【００５２】

本発明のこれらおよび他の実施形態は、本明細書の開示を考慮して当業者に容易に想起されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００５３】

【図１】凝集ＰＣＲ（ＩＳＡＰ）によるアイソタイプ特異的抗体検出の概略図を示す。

【図２】ＩＳＡＰ法が、原則としてＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤを含むあらゆるアイソタイプの抗体を検出するために使用することができ、かつシステムに対応する二次抗体－ＤＮＡコンジュゲートを添加することによって単一のアッセイにおいて２つ以上の異なるアイソタイプを検出するために使用してもよいことを示す。表（右）は、単一のアッセイでＩｇＧ４およびＩｇＥ抗ピーナッツ抗原抗体を検出可能な組成物を示す。

【図３Ａ】ＩＳＡＰ法を使用して、ピーナッツ抗原Ａｒａ　ｈ１（図３Ａ）、Ａｒａ　ｈ２（図３Ｂ）、およびＡｒａ　ｈ３（図３Ｃ）に対するＩｇＥ抗体を検出することができることを示す。これらの結果は、臨床施設での現在の究極の判断基準の使用（ＩｍｍｕｎｏＣＡＰ）とよく相関している。

【図３Ｂ】ＩＳＡＰ法を使用して、ピーナッツ抗原Ａｒａ　ｈ１（図３Ａ）、Ａｒａ　ｈ

２（図３Ｂ）、およびＡｒａ　ｈ３（図３Ｃ）に対するＩｇＥ抗体を検出することができることを示す。これらの結果は、臨床施設での現在の究極の判断基準の使用（ＩｍｍｕｎｏＣＡＰ）とよく相関している。
【図３Ｃ】ＩＳＡＰ法を使用して、ピーナッツ抗原Ａｒａ　ｈ１（図３Ａ）、Ａｒａ　ｈ２（図３Ｂ）、およびＡｒａ　ｈ３（図３Ｃ）に対するＩｇＥ抗体を検出することができることを示す。これらの結果は、臨床施設での現在の究極の判断基準の使用（ＩｍｍｕｎｏＣＡＰ）とよく相関している。
【図４】アレルゲン－ＤＮＡおよび抗体－ＤＮＡコンジュゲートの代表的な銀染色を示す。ＤＮＡコンジュゲートアレルゲンまたは抗体は、非コンジュゲートのアレルゲンまたは抗体よりも質量が大きくなる。
【図５】ＰＣＲベースのタンパク質検出法である近接連結アッセイ（ＰＬＡ）、すべてのサブタイプの抗原特異的免疫グロブリン（ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤ）を検出する凝集ＰＣＲ（ＡＤＡＰ）による抗体検出、および特定のアイソタイプの抗原特異的免疫グロブリンを検出するアイソタイプ特異的凝集ＰＣＲ（ＩＳＡＰ）を含む、ＰＣＲベースのアレルギーアッセイの概要を示す。図５（下）は、単一アッセイへのＰＬＡ、ＡＤＡＰ、およびＩＳＡＰの統合を示す。指定されたプライマー対を用いたＰＣＲは、アレルギーマーカーの多重検出が可能にする。プライマー１Ｆ／１Ｒは、総ＩｇＥを検出し、２Ｆ／２Ｒは、総抗アレルゲン抗体を検出し、２Ｆ／１Ｒまたは１Ｆ／２Ｒは、アレルゲン特異的ＩｇＥを検出する。
【図６Ａ】ＩＳＡＰが緩衝液中の精製抗体を検出し、ＥＬＩＳＡよりも優れていることを示す。図６Ａは、希釈系列の精製された抗ＯＶＡ　ＩｇＥ（黒い四角）、抗ＯＶＡ　ＩｇＧ（濃い灰色の四角）、および非特異的なＩｇＥ（薄い灰色の菱形）のＩＳＡＰ分析を示す。図６Ｂは、希釈系列の精製された抗ＯＶＡ　ＩｇＥのＩＳＡＰ（黒丸）およびＥＬＩＳＡ（灰色の四角）分析を示す。両方のグラフのｘ軸は、抗体のモル量である。ｙ軸は、ブランクと比較したデルタＣｔ値を表す。
【図６Ｂ】ＩＳＡＰが緩衝液中の精製抗体を検出し、ＥＬＩＳＡよりも優れていることを示す。図６Ａは、希釈系列の精製された抗ＯＶＡ　ＩｇＥ（黒い四角）、抗ＯＶＡ　ＩｇＧ（濃い灰色の四角）、および非特異的なＩｇＥ（薄い灰色の菱形）のＩＳＡＰ分析を示す。図６Ｂは、希釈系列の精製された抗ＯＶＡ　ＩｇＥのＩＳＡＰ（黒丸）およびＥＬＩＳＡ（灰色の四角）分析を示す。両方のグラフのｘ軸は、抗体のモル量である。ｙ軸は、ブランクと比較したデルタＣｔ値を表す。
【図７Ａ】統合ＰＣＲベースのアッセイが最小限のクロストークでアレルギーマーカーを検出することを示す。このアッセイでは、総ＩｇＥ（ｔＩｇＥ）、総抗アレルゲン、および特異的ＩｇＥ（ｓＩｇＥ）を多重に検出する。統合アッセイの特異性は、それぞれ、希釈系列の抗ＯＶＡ　ＩｇＧ（図７Ａ）、非特異的ＩｇＥ（図７Ｂ）、および抗ＯＶＡ　ＩｇＥ（図７Ｃ）によって評価される。
【図７Ｂ】統合ＰＣＲベースのアッセイが最小限のクロストークでアレルギーマーカーを検出することを示す。このアッセイでは、総ＩｇＥ（ｔＩｇＥ）、総抗アレルゲン、および特異的ＩｇＥ（ｓＩｇＥ）を多重に検出する。統合アッセイの特異性は、それぞれ、希釈系列の抗ＯＶＡ　ＩｇＧ（図７Ａ）、非特異的ＩｇＥ（図７Ｂ）、および抗ＯＶＡ　ＩｇＥ（図７Ｃ）によって評価される。
【図７Ｃ】統合ＰＣＲベースのアッセイが最小限のクロストークでアレルギーマーカーを検出することを示す。このアッセイでは、総ＩｇＥ（ｔＩｇＥ）、総抗アレルゲン、および特異的ＩｇＥ（ｓＩｇＥ）を多重に検出する。統合アッセイの特異性は、それぞれ、希釈系列の抗ＯＶＡ　ＩｇＧ（図７Ａ）、非特異的ＩｇＥ（図７Ｂ）、および抗ＯＶＡ　ＩｇＥ（図７Ｃ）によって評価される。
【図８Ａ】卵白アルブミン（ＯＶＡ）感作マウスからの血清の統合ＰＣＲベースの分析を示す。０、７、１４、および２１日目にＯＶＡ感作マウスおよび対照マウスから血清を採取した。ＰＣＲシグナルは、各マウスに対して０日目に正規化される。図８Ａ～８Ｃは、ＰＣＲベースの分析が、７日目（図８Ａ）から開始するＩｇＥ、１４日目（図８Ｂ）のｓ

ＩｇＥ、および７日目（図８Ｃ）の総抗ＯＶＡの増強された産生を検出したことを示す。図８Ｄは、血清試料の同じセットでのｓＩｇＥのＥＬＩＳＡ分析を示す。増強された産生は、１４日目に観察される。図８Ｅは、血清および全血試料を用いた総ＩｇＥに対するＰＣＲベースの分析間の相関を示す。血清および全血試料は、０．８６の相関係数（Ｒ）を示した。（＊は０．０５より小さいＰ値を表す）

【図８Ｂ】同上。

【図８Ｃ】同上。

【図８Ｄ】同上。

【図８Ｅ】同上。

【図９Ａ】ピーナッツ感作マウスの血清のＰＣＲベースの分析を示す。図９Ａは、ピーナッツ油で皮膚感作された、ＢＡＬＢ、Ｒａｇノックアウト、およびＪｈノックアウトマウスからの結果を示す。測定されたＰＣＲシグナルは、０日目に正規化される。感作後、ＢＡＬＢマウスにおける総ＩｇＥ、抗Ａｒａ　ｈ１　ＩｇＥ、および総抗Ａｒａ　ｈ３の産生の増加が観察された。図９Ｂは、ＢＡＬＢマウス血清の同じセットでのＥＬＩＳＡによるピーナッツ特異的ＩｇＥ検出を示す。ピーナッツ特異的ＩｇＥの誘導は観察されない。

【図９Ｂ】ピーナッツ感作マウスの血清のＰＣＲベースの分析を示す。図９Ａは、ピーナッツ油で皮膚感作された、ＢＡＬＢ、Ｒａｇノックアウト、およびＪｈノックアウトマウスからの結果を示す。測定されたＰＣＲシグナルは、０日目に正規化される。感作後、ＢＡＬＢマウスにおける総ＩｇＥ、抗Ａｒａ　ｈ１　ＩｇＥ、および総抗Ａｒａ　ｈ３の産生の増加が観察された。図９Ｂは、ＢＡＬＢマウス血清の同じセットでのＥＬＩＳＡによるピーナッツ特異的ＩｇＥ検出を示す。ピーナッツ特異的ＩｇＥの誘導は観察されない。

【図１０Ａ】ピーナッツアレルギーのヒト患者からの血漿のＰＣＲベースの分析を示す。血漿は、ＰＯＩＳＥＤ免疫療法試験からのベースライン試料であった（ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｒ：ＮＣＴ０２１０３２７０）。統合されたＰＣＲベースの分析は、単一のアッセイにおいて、１μＬの血漿からの、ｔＩｇＥ、ｓＩｇＥ－Ａｒａ－ｈ１、ｓＩｇＧ４－Ａｒａ－ｈ１、総抗－Ａｒａ－ｈ１、ｓＩｇＥ－Ａｒａ－ｈ２、ｓＩｇＧ４－Ａｒａ－ｈ２、総抗－Ａｒａ－　ｈ２、ｓＩｇＥ－Ａｒａ－ｈ３、ｓＩｇＧ４－Ａｒａ－ｈ３、総抗Ａｒａ－ｈ３の１０個のアレルギー特性が同時に検出された。図１０Ａ～１０Ｃは、ＰＣＲベースのアッセイとＩｍｍｕｎｏＣＡＰの間の相関関係を示す。ＰＣＲベースのアッセイとＩｍｍｕｎｏＣＡＰ分析の間で高い相関が観察された（図１０Ａ（ｓＩｇＥ　Ａｒａ－ｈ１についてはＲ＝０．６４）、図１０Ｂ（ｓＩｇＥ－Ａｒａ－ｈ２については０．９２）、図１０Ｃ（ｓＩｇＥ　Ａｒａ－ｈ３については０．８８））。図１０Ｄは、ＰＣＲベースのアッセイとピーナッツ抽出物ＩｍｍｕｎｏＣＡＰとの間の相関を示す。Ａｒａ－ｈ１、Ａｒａ－ｈ２、およびＡｒａ－ｈ３のＰＣＲベースのアッセイで測定されたｓＩｇＥシグナルを、ピーナッツエキス全体に対する反応性のプロキシとして集計した。合計ＩＳＡＰシグナル対ピーナッツエキス全体ＩｍｍｕｎｏＣＡＰの相関は高かった（Ｒ＝０．８２）。図１０Ｅは、ＰＣＲベースのアッセイとＩｍｍｕｎｏＣＡＰとの比較を示す。（試料の量および費用は、ＰＣＲベースのアッセイで提供されるすべての１０個のアレルギー特性に基づいている）。

【図１０Ｂ】同上。

【図１０Ｃ】同上。

【図１０Ｄ】同上。

【図１０Ｅ】同上。

【発明を実施するための形態】

【００５４】

本発明の実施は、特に明記しない限り、当該技術分野の範囲内の免疫学、化学、生化学、分子生物学、および組換えＤＮＡ技術の従来の方法を使用する。そのような技術は、参考文献において完全に説明されている。例えば、ＩｇＥ　ａｎｄ　Ａｎｔｉ－ＩｇＥ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｉｎ　Ａｓｔｈｍａ　ａｎｄ　Ａｌｌｅｒｇｉｃ　Ｄｉｓｅａｓｅ（Ｌｕｎｇ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｉｎ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｄｉｓｅａｓｅ，Ｒ．Ｂ．Ｆｉｃ

k and P.M.Jardieu eds.,CRC Press,2002)、Middleton's Allergy:Principles and Practice(N.F.Adkinson,B.S.Bochner,A.W.Burks,W.W.Busse,S.T.Holgate,R.F.Lemanske,and R.E.O'Hehir eds.,Saunders,8th edition,2013)、PCR Technology:Current Innovations(T.Nolan and S.A.Bustin eds.,CRC Press,3rd edition,2013)、Antibodies A Laboratory Manual(E.A.Greenfield ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd Lab edition,2013)、Handbook of Experimental Immunology,Vols.I-IV(D.M.Weir and C.C.Blackwell eds.,Blackwell Scientific Publications)、T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties (W.H.Freeman and Company,1993)、A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,current addition)、M.R.Green andJ.Sambrook Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,4th edition,2012)、Methods In Enzymology(S.Colowick and N.Kaplan eds.,Academic Press,Inc.)を参照のこと。

【００５５】

本明細書で引用したすべての刊行物、特許、および特許出願は、上記または下記にかかわらず、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００５６】

１．定義

本発明の説明において、以下の用語が使用され、以下に示されるように定義されることが意図される。

【００５７】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、内容がそうでないことを明確に示さない限り、複数の指示対象を含むことが留意されなければならない。したがって、例えば、「抗体」への言及には、２つ以上の抗体の混合物などが含まれる。

【００５８】

「約」という用語は、特に所定の量に関して、プラスまたはマイナス５パーセントの偏差を包含することが意図される。

【００５９】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの長さのヌクレオチドのポリマー形態を含むために本明細書で使用される。この用語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、この用語には、三本鎖、二本鎖、および一本鎖ＤＮＡ、ならびに三本鎖、二本鎖、および一本鎖ＲＮＡが含まれる。また、この用語には、メチル化によるおよび／またはキャッピングによるなどの、修飾、ならびに未修飾形態のポリヌクレオチドも含まれる。より具体的には、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語には、ポリデオキシリボヌクレオチド（２－デオキシ－Ｄ－リボースを含む）、ポリリボヌクレオチド（Ｄ－リボースを含む）、プリンまたはピリミジン塩基のＮ－またはＣ－グリコシドである他の型のポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド骨格を含む他のポリマー、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ））およびポリモルホリノ（Ａｎｔｉ－Ｖｉｒａｌｓ，Ｉｎｃ．，Ｃｏｒｖａ

ｌｌｉｓ，ＯｒｅｇｏｎからＮｅｕｇｅｎｅとして市販されている）ポリマー、ならびにＤＮＡおよびＲＮＡに見出されるような、ポリマーが塩基対合および塩基の積み重ねが可能である立体配置中にヌクレオベース（ｎｕｃｌｅｏｂａｓｅ）を含む場合には他の合成配列特異的核酸ポリマーが含まれる。「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語の間には長さの区別を意図するものではなく、これらの用語は、交互に使用されるであろう。したがって、これらの用語には、例えば、３’－デオキシ－２’，５’－ＤＮＡ、オリゴデオキシリボヌクレオチドＮ３’Ｐ５’ホスホルアミデート、２’－Ｏ－アルキル置換ＲＮＡ、二本鎖および一本鎖ＤＮＡ、ならびに二本鎖および一本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッド、およびＰＮＡとＤＮＡまたはＲＮＡとの間のハイブリッドが含まれ、既知の型の修飾、例えば、当該技術分野で既知の標識、メチル化、１つ以上の天然に存在するヌクレオチドの類似体による「キャップ」置換、例えば、非荷電結合を有する（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カーバメートなど）、陰電荷結合を有する（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）、および陽電荷結合を有する（例えば、アミノアルキルホスホルアミデート、アミノアルキルホスホトリエステル）ものなどの、ヌクレオチド間（ｉｎｔｅｒｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）修飾物、例えば、タンパク質（ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リシンなど）などの、ペンダント部分を含むもの、インターカレーター（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｏｒ）を有するもの（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート化剤を含むもの（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）、アルキル化剤を含むもの、修飾結合を有するもの（例えば、アルファアノマー核酸など）、ならびに非修飾形態のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが含まれる。

【００６０】

核酸分子を説明するために本明細書で使用される「組換え」は、ゲノム、ｃＤＮＡ、ウイルス、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味し、その起源または操作により、それが天然で関連するポリヌクレオチドのすべてまたは一部と関連しない。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される「組換え」という用語は、組換えポリヌクレオチドの発現により産生されるポリペプチドを意味する。一般的に、目的の遺伝子は、以下にさらに説明するように、クローン化され、次いで、形質転換された生物において発現される。宿主生物は、外来遺伝子を発現し、発現条件下でタンパク質を産生する。

【００６１】

本明細書で使用する「固体支持体」とは、磁気ビーズ、ラテックスビーズ、マイクロタイタープレートウェル、ガラスプレート、ナイロン、アガロース、アクリルアミドなどの固体表面を指す。

【００６２】

「実質的に精製された」とは、一般に、物質が存在する試料の大部分を含むような物質（化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド組成物）の単離を指す。典型的には、試料において、実質的に精製された成分は、その試料の５０％、好ましくは８０％～８５％、より好ましくは９０～９５％を含む。目的のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを精製するための技術は、当該技術分野で周知であり、これには、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および密度に従った沈降が含まれる。

【００６３】

「単離された」とは、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに言及する場合、示された分子が、その分子が天然に見出される、生物全体から分離されており、別個である、または、同じ型の他の生物学的な高分子の実質的な不在下で存在することを意味する。核酸に関して「単離された」という用語は、天然では通常それに関連している配列の全体またはその部分を欠く核酸分子、または天然に存在するのと同様だが、それと結びついた異種配列を有する配列、または染色体から切り離された分子である。

【００６４】

本明細書で使用される、「標的核酸領域」または「標的核酸」という用語は、増幅される「標的配列」を有する核酸分子を示す。標的核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得、増幅され得ない標的配列以外の他の配列を含み得る。「標的配列」という用語は、増幅される標的核酸の特定のヌクレオチド配列を指す。標的配列は、所望の条件下でプローブが安定したハイブリッドを形成する、標的分子内に含まれるプローブがハイブリダイズする領域を含み得る。「標的配列」はまた、標的配列を鋳型として使用してオリゴヌクレオチドプライマーが複合体化し、伸長する複合体形成配列も含み得る。標的核酸が元々一本鎖である場合、「標的配列」という用語は、標的核酸に存在する「標的配列」に相補的な配列も指す。「標的核酸」が元々二本鎖である場合、「標的配列」という用語は、プラス（＋）鎖およびマイナス（－）鎖（またはセンス鎖およびアンチセンス鎖）の両方を指す。

【００６５】

本明細書で使用される、「プライマー」または「オリゴヌクレオチドプライマー」という用語は、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下に置かれたとき、すなわち、ヌクレオチド、およびＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼなどの重合誘導剤の存在下で、適切な温度、ｐＨ、金属濃度、および塩濃度で、核酸の鋳型鎖にハイブリダイズし、鋳型鎖に相補的である核酸鎖の合成を開始するオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、増幅の効率を最大にするために一本鎖であることが好ましいが、代替的に、二本鎖であってもよい。二本鎖の場合、伸長産物を調製するのに使用する前に、プライマーを、最初に処理して、その鎖を分離し得る。この変性ステップは、典型的には、熱によって達成されるが、代替的に、アルカリ、続いて中和を用いて行われてもよい。したがって、「プライマー」は、鋳型に相補的であり、鋳型と水素結合またはハイブリダイゼーションによって複合体を形成して、ポリメラーゼによる合成の開始のためのプライマー／鋳型複合体が得られ、それがＤＮＡまたはＲＮＡ合成の過程で鋳型に相補的な３’末端に共有結合した塩基の追加によって伸長される。典型的に、核酸は、増幅される核酸の部分に隣接する核酸の領域にハイブリダイズすることができる少なくとも１つの順方向プライマーおよび少なくとも１つの逆方向プライマーを含む少なくとも一組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅される。

【００６６】

「アンプリコン」という用語は、ＰＣＲ反応または他の核酸増幅プロセス（例えば、等温増幅、ローリングサークル増幅、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ））の増幅された核酸産物を指す。

【００６７】

本明細書で使用される、「プローブ」または「オリゴヌクレオチドプローブ」という用語は、標的核酸分析物に存在する核酸配列に相補的な核酸配列を含む、上記で定義されたポリヌクレオチドを指す。プローブのポリヌクレオチド領域は、ＤＮＡ、および／またはＲＮＡ、および／または合成ヌクレオチド類似体から構成され得る。標的配列を検出するために、プローブは、標識化され得る。そのような標識は、５’末端で、３’末端で、５’末端および３’末端の両方で、および／または内部に存在し得る。「オリゴヌクレオチドプローブ」は、少なくとも１つの蛍光剤および少なくとも１つの消光剤を含んでもよい。フルオロフォア蛍光の消光は、オリゴヌクレオチドからのフルオロフォアのエキソヌクレアーゼ切断（例えば、ＴａｑＭａｎアッセイ）により、またはオリゴヌクレオチドプローブの核酸標的配列へのハイブリダイゼーション（例えば、分子ビーコン）により除去され得る。加えて、オリゴヌクレオチドプローブは、典型的には、核酸増幅アッセイで使用される場合、センスプライマーとアンチセンスプライマーとの間にある配列に由来する。

【００６８】

「ハイブリダイズする」および「ハイブリダイゼーション」という用語は、ワトソン－クリック塩基対合を介して複合体を形成するのに十分に相補的なヌクレオチド配列間の複合体の形成を指す。プライマーが標的（鋳型）と「ハイブリダイズする」場合、そのような複合体（またはハイブリッド）は、例えば、ＤＮＡポリメラーゼがＤＮＡ合成を開始す

るのに必要なプライミング機能を果たすのに十分安定である。

【００６９】

ハイブリダイズする配列は、安定したハイブリッドを提供するために完全な相補性を有する必要はないことが理解されよう。多くの状況において、安定したハイブリッドは、塩基の約１０％未満がミスマッチであり、４つ以上のヌクレオチドのループを無視して形成される。したがって、本明細書で使用される、「相補的」という用語は、一般に約９０％以上の相同性があるアッセイ条件下で、その「相補体」と安定な二本鎖を形成するオリゴヌクレオチドを指す。

【００７０】

「選択的に検出する」または「選択的に検出している」という用語は、例えば、特定の抗原－ＤＮＡまたは抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート（例えば、二次抗体－ＤＮＡ、抗体模倣体－ＤＮＡ、またはアプタマー－ＤＮＡコンジュゲート）、またはその連結産物もしくは伸長産物のＤＮＡバーコードを増幅および／または結合することによるが、適切なハイブリダイゼーション条件下で他のＤＮＡ配列に増幅および／または結合しない、オリゴヌクレオチド、例えば、特定のＤＮＡバーコードを検出することができるプライマーおよび／またはプローブを用いて抗体アイソタイプの検出を指す。

【００７１】

「抗体」という用語は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製物、ならびにハイブリッド抗体、改変抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体を含む調製物、ならびにハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９および米国特許第４，８１６，５６７号を参照のこと）；Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦ（ａｂ）断片；$Ｆ_v$分子（非共有的ヘテロ二量体、例えば、Ｉｎｂａｒ ｅｔ ａｌ．（１９７２） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ６９：２６５９－２６６２；およびＥｈｒｌｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９８０） Ｂｉｏｃｈｅｍ １９：４０９１－４０９６）を参照のこと）；一本鎖Ｆｖ分子（ｓＦｖ）（例えば、Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３を参照のこと）；ナノボディまたは単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）（例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１６） Ｉｎｔ Ｊ Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ １１：３２８７－３３０３、Ｖｉｎｃｋｅ ｅｔ ａｌ．（２０１２） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ９１１：１５－２６を参照のこと；二量体および三量体抗体断片構築物；ミニボディ（例えば、Ｐａｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｂｉｏｃｈｅｍ ３１：１５７９－１５８４、Ｃｕｍｂｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １４９Ｂ：１２０－１２６を参照のこと）；ヒト化抗体分子（例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７、Ｖｅｒｈｏｅｙａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６、および１９９４年９月２１日に公開された英国特許公開第ＧＢ ２，２７６，１６９号を参照のこと）；ならびにそのような分子から得られた任意の機能的断片（そのような断片は親抗体分子の特異的結合特性を保持している）を包含する。

【００７２】

本明細書で使用する、「抗原」という用語は、任意の天然に存在するまたは合成の免疫原性物質を指す。免疫原性物質には、外来であるものおよび生体内で天然に存在するものが含まれる。そのようなものとして、外来免疫原性物質の導入は、外来免疫原性物質に対する一般的または特異的な免疫応答を生成するように生物を誘導し得る。他の例では、生体内での免疫原性物質の産生は、生物が天然の免疫原性物質に対する特異的または一般的な自己免疫応答を生成するように誘導し得る。本明細書で使用される、抗原は、化学物質、小分子、生体分子（例えば、核酸）、高分子、ペプチド、ポリペプチド、細胞断片、細胞、単細胞生物、多細胞生物、それらの断片、およびそれらの組み合わせを包含するが、これらに限定されない。場合によっては、抗原は、抗原に結合する薬剤が知られている抗原、例えば、ポリペプチドに結合する抗体が知られているポリペプチドであってもよい。

場合によっては、抗原は、抗原に結合する薬剤が未知の抗原、例えば、ポリペプチドに結合する抗体が未知のポリペプチドであってもよい。例えば、抗体が惹起され得る抗原としての天然に存在するおよび合成の両方のポリペプチドおよびペプチドの使用は、例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｅｄ．Ｂｕｒｎｓ，Ｒ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２００５（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００７３】

抗原またはアレルゲンに言及する場合、抗体に「特異的に（または選択的に）結合する」または「特異的に（または選択的に）～と免疫反応する」という語句は、タンパク質および他の生物製剤の不均一な集団において抗原またはアレルゲンの存在を決定する結合反応を指す。したがって、指定したイムノアッセイ条件下で、特定の抗体は、バックグラウンドの少なくとも２倍、特定の抗原に結合し、実質的に、有意な量で、試料中に存在する他の抗原に結合しない。このような条件下で抗体への特異的結合は、特定の抗原に対するその特異性に関して選択された抗体を必要とし得る。例えば、ラット、マウス、またはヒトなどの特定の種から抗原に対して生じたポリクローナル抗体を選択して、抗原と特異的に免疫反応するが、多型バリアントおよび対立遺伝子を除く他のタンパク質とは特異的に免疫反応しないポリクローナル抗体のみを得ることができる。この選択は、他の種からの分子と交差反応する抗体を引き抜くことによって達成され得る。様々なイムノアッセイ形式を用いて、特定の抗原と特異的に免疫反応する抗体を選択し得る。例えば、固相ＥＬＩＳＡイムノアッセイを通法により用いて、タンパク質に特異的に免疫反応性のある抗体を選択する（例えば、特定の免疫反応性を決定するのに用いられ得るイムノアッセイ形式および条件の説明については、Ｈａｒｌｏｗ ＆ Ｌａｎｅ．Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）を参照のこと）。典型的には、特異的または選択的反応は、バックグラウンド信号またはノイズの少なくとも２倍、より典型的にはバックグラウンドの１０～１００倍より大きくなる。

【００７４】

本明細書で使用される、「生物学的試料」とは、例えば、血液、血漿、血清、糞便、尿、骨髄、胆液、脊髄液、リンパ液、皮膚の試料、皮膚、呼吸器、腸管、および尿生殖路の外分泌液、涙、唾液、乳、細胞（例えば、上皮および内皮細胞、線維芽細胞、ならびにマクロファージ）、筋肉、関節、臓器（例えば、肝臓、肺、脾臓、胸腺、腎臓、脳、またはリンパ節）、炎症性の滲出液もしくは滲出液などの体液の異常な集積、膿、嚢胞の内容物もしくは組織壊死の領域、天然もしくは誘導喀痰、診断または治療目的で行われる洗浄、例えば、鼻、咽頭、もしくは気管支肺胞の洗浄によって得られる体液、または生検、ならびに培養液中の細胞および組織、例えば、組換え細胞、および細胞成分の成長から得られる馴化培地を含むが、これらに限定されない、対象から単離された細胞、組織、または体液の試料を指す。

【００７５】

本明細書で使用される、「標識」および「検出可能な標識」という用語は、放射性同位体、蛍光剤、化学発光剤、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、半導体ナノ粒子、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチン、ストレパビジン、またはハプテン）などを含むが、これらに限定されない、検出可能な分子を指す。「蛍光剤」という用語は、検出可能な範囲で蛍光を示すことができる物質またはその一部を指す。本発明の実施に使用することができる標識の特定の例には、ＳＹＢＲグリーン、ＳＹＢＲゴールド、ＣＡＬ Ｆｌｕｏｒ Ｇｏｌｄ ５４０、ＣＡＬ Ｆｌｕｏｒ Ｏｒａｎｇｅ ５６０、ＣＡＬ Ｆｌｕｏｒ Ｒｅｄ ５９０、ＣＡＬ Ｆｌｕｏｒ Ｒｅｄ ６１０、およびＣＡＬ Ｆｌｕｏｒ Ｒｅｄ ６３５などのＣＡＬ Ｆｌｕｏｒ色素、Ｑｕａｓａｒ ５７０、Ｑｕａｓａｒ ６７０、およびＱｕａｓａｒ ７０５などのＱｕａｓａｒ色素、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ３５０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５５５、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７、およびＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７８４など

のＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７などのシアニン色素、フルオレセイン、２’，４’，５’，７’－テトラクロロ－４－７－ジクロロフルオレセイン（ＴＥＴ）、カルボキシフルオレセイン（ＦＡＭ）、６－カルボキシ－４’，５’－ジクロロ－２’，７’－ジメトキシフルオレセイン（ＪＯＥ）、ヘキサクロロフルオレセイン（ＨＥＸ）、ローダミン、カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、テトラメチルローダミン（ＴＡＭＲＡ）、ＦＩＴＣ、ダンシル、ウンベリフェロン、ジメチルアクリジニウムエステル（ＤＭＡＥ）、テキサスレッド、ルミノール、ＮＡＤＰＨ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、およびα－β－ガラクトシダーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【００７６】

「対象」とは、脊索動物亜門の任意のメンバーを意味し、ヒト、および非ヒト霊長類、例えば、チンパンジーおよび他の類人猿およびサル種を含む他の霊長類；家畜動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマ；家畜哺乳動物、例えば、イヌおよびネコ；鳥類；齧歯類、例えば、マウス、ラット、およびモルモットを含む実験動物などが含まれるが、これらに限定されない。この用語は、特定の年齢を示さない。したがって、成体および新生の個体が包含されるものとする。

【００７７】

２．本発明を実施するモード

本発明を詳細に説明する前に、本発明が、特定の処方またはプロセスパラメータに限定されるものではなく、したがって、そのようなものは当然ながら変わり得ることが理解されたい。また、本明細書で使用される専門用語が、本発明の特定の実施形態のみを説明することを目的としており、限定的であることを意図していないこともまた理解されたい。

【００７８】

本明細書に記載されるものと同様または同等の多くの方法および材料は、本発明の実施においても使用することができるが、好ましい材料および方法は本明細書に記載されている。

【００７９】

本発明は、特定のアイソタイプの抗体の検出のための試薬および方法の発見に基づいている。特に、ＤＮＡバーコードを担持する、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、特定の抗体の存在を検出するために使用される。ＤＮＡバーコードの使用は、ＰＣＲ、等温増幅、マイクロアレイ分析などの核酸ベースの検出方法によって抗体を特定することができる。本発明の方法は、単一のアッセイで複数の抗体を検出および／または定量化するために使用することができる。さらに、本明細書に記載のアッセイは、抗体の検出のための任意の他のアッセイと容易に組み合わせることができる。多重アッセイは、例えば、疾患関連抗体の総レベルならびに複数の疾患関連抗体アイソタイプの個々のレベルを検出するために使用することができる。本発明の方法は、アレルギー、自己免疫疾患、感染症、または炎症などの免疫障害に関連する疾患関連抗体のモニタリングおよびより良好な疾患管理を可能にする。

【００８０】

本発明のさらなる理解のために、抗体を検出するためのアッセイ方法および疾患関連抗体の診断およびモニタリングにおけるそれらの使用に関して、より詳細な議論を以下に提供する。

【００８１】

Ａ．抗体を検出するための多重アッセイ

本方法は、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、ならびにオリゴヌクレオチド試薬（例えば、オリゴヌクレオチドプライマーおよび／またはプローブ）または単一のアッセイで１つ以上の抗体アイソタイプを検出可能な試薬の組み合わせを使用する。本明細書に記載されるアッセイ方法は、アレルゲン、自己免疫疾患抗原、がん抗原、または病原体抗原を含むが、これらに限定されない、あらゆる型の抗原に特異的な抗体アイソタイプを検出するために使用することができる。抗体アイソタイプを

検出するために使用することができる多くのアッセイ設計があり、それらは単独で、または互いに組み合わせて使用することができる。

【００８２】

一実施形態では、本発明は、本発明は、試料中の標的抗体アイソタイプを検出する方法であって、ａ）試料を、バーコードの第１の部分を含む第１のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗体結合剤およびバーコードの第２の部分を含む第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗原と接触させることであって、抗原は、試料中の標的抗体アイソタイプに、存在する場合、結合し、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合して、複合体の形成をもたらす、接触させることと、ｂ）複合体中で第１のＤＮＡ分子を第２のＤＮＡ分子に接続することであって、バーコードの第１の部分およびバーコードの第２の部分を接合して、完全なバーコードを形成する、接続することと、ｃ）試料中の標的抗体アイソタイプの存在の指標として完全なバーコードを検出することと、を含む、方法を含む。

【００８３】

第１のＤＮＡ分子を第２のＤＮＡ分子と接続することは、様々な方法において達成され得る。一実施形態では、第１のＤＮＡ分子および第２のＤＮＡ分子を、リガーゼを用いて一緒に連結して、完全なバーコードを含む連結産物を産生する。架橋オリゴヌクレオチドは、連結を促進するために使用してもよく、架橋オリゴヌクレオチドは、第１のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、第２のＤＮＡ分子に対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含む。第１のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗体結合剤および第２のＤＮＡ分子にコンジュゲートした抗原を含む複合体中で、両方のコンジュゲートは、標的抗体アイソタイプに結合し、第１のＤＮＡ分子および第２のＤＮＡ分子は、架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接しており、連結をする。連結産物は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、等温増幅、またはマイクロアレイ分析を用いて、検出および／または定量化することができる。

【００８４】

別の実施形態では、第１のＤＮＡ分子および第２のＤＮＡ分子は、相補的ヌクレオチド配列を含み、第１のＤＮＡ分子のヌクレオチド配列の第２のＤＮＡ分子の相補的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションは、ポリメラーゼが、ハイブリダイズした第１および第２のＤＮＡ分子を伸長させて、完全なバーコードを含む核酸を生成することを可能にする。ポリメラーゼ反応は、例えば、等温条件下で実施することができる。

【００８５】

「抗体結合剤」は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する任意の薬剤であり得る。いくつかの実施形態では、抗体結合剤は、高い親和性で標的抗体アイソタイプに結合する。抗体結合剤の例には、抗体、抗体断片、抗体模倣物、およびアプタマーが含まれるが、これらに限定されない。

【００８６】

ある特定の実施形態では、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する抗体を含む。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ハイブリッド抗体、改変抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体、ならびにハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９および米国特許第４，８１６，５６７号を参照のこと）；Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦ（ａｂ）断片；Ｆ$_v$分子（非共有的ヘテロ二量体、例えば、Ｉｎｂａｒ ｅｔ ａｌ．（１９７２） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ６９：２６５９－２６６２；およびＥｈｒｌｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９８０） Ｂｉｏｃｈｅｍ １９：４０９１－４０９６）を参照のこと）；一本鎖Ｆｖ分子（ｓＦｖ）（例えば、Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３を参照のこと）；ナノボディまたは単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）（例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１６） Ｉｎｔ Ｊ Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ １１：３２８７－３３０３、Ｖｉｎｃｋｅ ｅｔ ａｌ．（２０１２） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏ

ｌ　９１１：１５－２６を参照のこと；二量体および三量体抗体断片構築物；ミニボディ（例えば、Ｐａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｂｉｏｃｈｅｍ　３１：１５７９－１５８４、Ｃｕｍｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１４９Ｂ：１２０－１２６を参照のこと）；ヒト化抗体分子（例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７、Ｖｅｒｈｏｅｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４－１５３６、および１９９４年９月２１日に公開された英国特許公開第ＧＢ　２，２７６，１６９号を参照のこと）　；ならびにそのような分子から得られた任意の機能的断片を含む、任意の型の抗体を使用してもよく、このような断片は親抗体分子の特異的結合特性を保持している（すなわち、標的抗体アイソタイプに特異的に結合する）。

【００８７】

他の実施形態では、抗体結合剤は、標的抗体アイソタイプに特異的に結合するアプタマーを含む。標的抗体アイソタイプに特異的に結合する、ＤＮＡ、ＲＮＡ、異種核酸（ＸＮＡ）、またはペプチドアプタマーを含む、任意の型のアプタマーを使用してもよい。そのようなアプタマーは、例えば、コンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって同定することができる。標的抗体アイソタイプに選択的に結合する核酸アプタマー（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡアプタマー）は、インビトロでの選択または指数富化によるリガンドの系統的進化（ＳＥＬＥＸ）を繰り返し行うことにより生成することができる。標的抗体アイソタイプに結合するペプチドアプタマーは、コンビナトリアルライブラリから単離され、定方向変異または突然変異誘発および選択の繰り返しによって改善され得る。アプタマーを生成する方法の説明については、例えば、Ａｐｔａｍｅｒｓ：Ｔｏｏｌｓ　ｆｏｒ　Ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍａｇｉｎｇ（Ｒ．Ｎ．Ｖｅｅｄｕ　ｅｄ．，Ｐａｎ　Ｓｔａｎｆｏｒｄ，２０１６）、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　ａｎｄ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ａｐｔａｍｅｒｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇ．Ｍａｙｅｒ　ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，２００９）、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ａｐｔａｍｅｒｓ：Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇ．Ｍａｙｅｒ　ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，２０１６）、Ａｐｔａｍｅｒｓ　Ｓｅｌｅｃｔｅｄ　ｂｙ　Ｃｅｌｌ－ＳＥＬＥＸ　ｆｏｒ　Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ（Ｗ．Ｔａｎ，Ｘ．Ｆａｎｇ　ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，２０１５）、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）　Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．９（１０）：２５２５－２５３１、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３０（２０）：ｅ１０８、Ｋｅｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．１１８：２１７－２３１、Ｐｌａｔｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）　Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　Ｎｏｖ　１６　ｐｉｉ：Ｓ０３０４－４１６５（１６）３０４４７－０、およびＬｙｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）　Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ　６（９）：１４４０－１４５２を参照されたく、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００８８】

さらに他の実施形態では、抗体結合剤は、抗体模倣物を含む。アフィボディ分子（Ｎｙｇｒｅｎ（２００８）　ＦＥＢＳＪ．２７５（１１）：２６６８－２６７６）、アフィリン（Ｅｂｅｒｓｂａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３７２（１）：１７２－１８５）、アフィマー（Ｊｏｈｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）　Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．８４（１５）：６５５３－６５６０）、アフィチン（Ｋｒｅｈｅｎｂｒｉｎｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３８３（５）：１０５８－１０６８）、アルファボディ（Ｄｅｓｍｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）　Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　５：５２３７）、アンチカリン（Ｓｋｅｒｒａ（２００８）　ＦＥＢＳＪ．２７５（１１）：２６７７－２６８３）、アビマー（Ｓｉｌｖｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）　Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（１２）：１５

５６－１５６１）、ダーピン（Ｓｔｕｍｐｐ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ １３（１５－１６）：６９５－７０１）、フィノマー（Ｇｒａｂｕｌｏｖｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２（５）：３１９６－３２０４）、およびモノボディ（Ｋｏｉｄｅ ｅｔ ａｌ．（２００７） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３５２：９５－１０９）が含まれるが、これらに限定されない、任意の型の抗体模倣物を使用してもよい。

【００８９】

本方法の抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、それぞれ抗原または抗体結合剤に結合した少なくとも１つのＤＮＡ分子を含み、ＤＮＡ分子は、標的抗原特異的抗体アイソタイプを同定する独自のバーコード配列（すなわち、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡ配列を接合することによって生成される完全なバーコード）を含む。抗原または抗体結合剤に結合したＤＮＡ分子は、部分的には、採用した検出方法、結合方法、検出する特定の抗体などに応じて異なり得る。一般に、結合したＤＮＡ分子の長さは、少なくとも１５ヌクレオチドであるが、例えば、２０以上のヌクレオチド、２５以上のヌクレオチド、３０以上のヌクレオチド、３５以上のヌクレオチド、４０以上のヌクレオチド、４５以上のヌクレオチド、５０以上のヌクレオチド、５５以上のヌクレオチド、６０以上のヌクレオチド、６５以上のヌクレオチド、７０以上のヌクレオチド、７５以上のヌクレオチド、８０以上のヌクレオチド、９０以上のヌクレオチド、９５以上のヌクレオチド、１００以上ヌクレオチド、１５～２００ヌクレオチド、２０～２００ヌクレオチド、２５～２００ヌクレオチド、３０～２００ヌクレオチド、３５～２００ヌクレオチド、４０～２００ヌクレオチド、４５～２００ヌクレオチド、５０～２００ヌクレオチド、１５～１００ヌクレオチド、２０～１００ヌクレオチド、２５～１００ヌクレオチド、３０～１００ヌクレオチド、３５～１００ヌクレオチド、４０～１００ヌクレオチド、４５～１００ヌクレオチド、５０～１００ヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに限定されない、１５ヌクレオチド～２００ヌクレオチド以上の範囲であり得る。

【００９０】

以下により詳細に記載されるように、ＤＮＡは、任意の便利な方法によって抗原または抗体結合剤に結合し得る。ＤＮＡは、３’または５’末端を含むＤＮＡの長さに沿った任意の便利な地点で、抗原または抗体結合剤に結合し得る。場合によっては、ＤＮＡは、その３’末端または５’末端で抗原または抗体に結合する。場合によっては、抗原および抗体結合剤の両方は、それらの３’末端に結合したＤＮＡ分子を有する。場合によっては、抗原および抗体結合剤の両方は、それらの５’末端に結合したＤＮＡ分子を有する。

【００９１】

本明細書で使用される、「架橋オリゴヌクレオチド（ｂｒｉｄｇｉｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」または「架橋オリゴヌクレオチド（ｂｒｉｄｇｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」という用語は、各ＤＮＡ分子の相補的領域またはＤＮＡ末端の相補的領域と同時にハイブリダイズすることによって、２つ以上の別個のＤＮＡ分子または単一のＤＮＡ分子の２つの末端に接合する任意のオリゴヌクレオチドを指す。ある特定の例において、架橋オリゴヌクレオチドは、抗原－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡ中の第１の相補的領域および抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡ中の第２の相補的領域と同時にハイブリダイズすることによって、抗原－ＤＮＡコンジュゲートを抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートに接合する。架橋オリゴヌクレオチドは、部分的一本鎖および部分的二本鎖を含む、部分的または完全な一本鎖であり得る。本開示の架橋オリゴヌクレオチドの長さは、変化し、例えば、１０～１００ヌクレオチド、１２～１００ヌクレオチド、１４～１００ヌクレオチド、１６～１００ヌクレオチド、１８～１００ヌクレオチド、２０～１００ヌクレオチド、２２～１００ヌクレオチド、２４～１００ヌクレオチド、２６～１００ヌクレオチド、２８～１００ヌクレオチド、３０～１００ヌクレオチド、１０～５０ヌクレオチド、１２～５０ヌクレオチド、１４～５０ヌクレオチド、１６～５０ヌクレオチド、１８～５０ヌクレオチド、２０～５０ヌクレオチド、２２～５０ヌクレオチド、

２４～５０ヌクレオチド、２６～５０ヌクレオチド、２８～５０ヌクレオチド、３０～５０ヌクレオチド、１０～４０ヌクレオチド、１２～４０ヌクレオチド、１４～４０ヌクレオチド、１６～４０ヌクレオチド、１８～４０ヌクレオチド、２０～４０ヌクレオチド、２２～４０ヌクレオチド、２４～４０ヌクレオチド、２６～４０ヌクレオチド、２８～４０ヌクレオチド、３０～４０ヌクレオチド、１０～３０ヌクレオチド、１２～３０ヌクレオチド、１４～３０ヌクレオチド、１６～３０ヌクレオチド、１８～３０ヌクレオチド、２０～３０ヌクレオチド、１２以上のヌクレオチド、１３以上のヌクレオチド、１４以上のヌクレオチド、１５以上のヌクレオチド、１６以上のヌクレオチド、１７以上のヌクレオチド、１８以上のヌクレオチド、１９以上のヌクレオチド、２０以上のヌクレオチド、１２ヌクレオチド、１３ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１９ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２１ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２３ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２７ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、２９ヌクレオチド、３０ヌクレオチドなどを含む、１０以上のヌクレオチドであり得、１０～１００以上のヌクレオチドの範囲であり得る。

【００９２】

架橋オリゴヌクレオチドは、２つ以上のＤＮＡ分子を「架橋」して、複合体を形成し得る。場合によっては、架橋ポリヌクレオチドは、同じまたは異なる核酸の末端を含む、２つのＤＮＡ末端とハイブリダイズしてもよく、そのため、末端が複合体内で隣接し、例えば、隣接する末端の連結を可能にする。場合によっては、架橋ポリヌクレオチドは、同じまたは異なる核酸の末端を含む、２つのＤＮＡ末端とハイブリダイズしてもよく、そのため、末端は、得られたポリヌクレオチド複合体中で隣接されず、例えば、一緒に直接連結することができないように隣接されない。場合によっては、例えば、複合体中の２つのＤＮＡ末端が隣接していない場合、スプリントポリヌクレオチドの末端が末端の１つ以上に隣接して位置するように、スプリントポリヌクレオチドは、２つの末端間の空間にハイブリダイズしてもよい。本明細書で使用される「スプリントポリヌクレオチド」という用語は、一般に、複合体、例えば、架橋ポリヌクレオチドの使用によって形成された複合体中の２つのＤＮＡ末端間の１つ以上のギャップを埋めるために使用され得る、一本鎖または部分的一本鎖および部分的二本鎖であり得るポリヌクレオチドを指す。場合によっては、スプリントポリヌクレオチドは、架橋オリゴヌクレオチドの１つ以上の部分に対して相補性を有し得る。場合によっては、スプリントポリヌクレオチドに隣接するＤＮＡ末端は、スプリントポリヌクレオチドに連結され得る。

【００９３】

場合によっては、本開示の架橋オリゴヌクレオチドは、１つ以上のヌクレオシド類似体を含み得る。例えば、場合によっては、本開示の架橋オリゴヌクレオチドは、１つ以上のデオキシリボウラシル（すなわち、デオキシリボースウラシル、デオキシウリジンなど）ヌクレオシド／ヌクレオチドを含み得る。ある特定の例において、架橋ポリヌクレオチドは、例えば、３つ以上、４つ以上、５つ以上、６つ以上などを含むが、これらに限定されない、２つ以上のヌクレオシド類似体を含み得る。場合によっては、架橋ポリヌクレオチドの全塩基の割合は、例えば、２％以上、３％以上、４％以上、５％以上、６％以上、７％以上、８％以上、９％以上、１０％以上、１１％以上、１２％以上、１３％以上、１４％以上、１５％以上、１６％以上、１７％以上、１８％以上、１９％以上、２０％以上、２１％以上、２２％以上、２３％以上、２４％以上、２５％以上、２６％以上、２７％以上、２８％以上、２９％以上、３０％以上などが含まれるが、これらに限定されない、１％以上である。

【００９４】

抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートからのＤＮＡ分子の接合は、検出することができる増幅産物（すなわち、アンプリコン）を産生するために増幅され得る、標的抗体アイソタイプを同定する完全なバーコード配列を生成する。以下により詳細に説明するように、任意の便利な増幅方法は、増幅産物を産生するのに利用

することができ、これらは、形成された特定の複合体および／または全体の検出アッセイの特定の必要条件に応じて異なり得る。アンプリコンの形成は、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび同じ標的抗体に結合する抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートに結合する試料中の標的抗体に応じて異なるため、増幅産物の存在は、抗原に特異的であり、抗体結合剤によっても認識される試料中の標的抗体（例えば、特定の標的抗体アイソタイプに特異的な二次抗体、抗体模倣物、またはアプタマー）の存在を示す。

【００９５】

場合によっては、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって実施され得る。代表的なＰＣＲ増幅反応では、反応混合物は、一般に、プライマー伸長反応で使用される１つ以上のプライマー、例えば、ＰＣＲプライマー（幾何学的（または指数関数的）増幅で使用される順方向および逆方向プライマーまたは線形増幅で使用される単一のプライマー）と組み合わされる鋳型核酸を含む。したがって、場合によっては、上記の核酸複合体のハイブリダイズした部分は、増幅反応の「プライマー」として機能し得る。例えば、線形増幅が使用される場合、上記の核酸複合体のハイブリダイズした核酸の単一の遊離３’末端は、増幅のためのプライマーとして機能し得る。場合によっては、１つ以上のさらなる核酸は、形成された核酸複合体中のプライマーとして機能するように添加され得る。例えば、場合によっては、２つの抗原結合ポリヌクレオチドは、連結反応で接合してもよく、２つのさらなるプライマーは、新たに連結された核酸セグメントまたは鋳型の増幅を促進するために添加され得る。場合によっては、上記の核酸複合体のハイブリダイズした核酸の単一の遊離３’末端は、第１のプライマーとして機能し得、第２のプライマーは、増幅を促進するために添加され得る。

【００９６】

鋳型核酸（以下、便宜上、鋳型ＤＮＡと称される）が接触する任意のオリゴヌクレオチドプライマーは、アニーリング条件下で相補的な鋳型ＤＮＡへのハイブリダイゼーションを提供するのに十分な長さであろう。プライマーは、一般に、少なくとも６ｂｐ長であり、例えば、少なくとも１０ｂｐ長、少なくとも１５ｂｐ長、少なくとも１６ｂｐ長、少なくとも１７ｂｐ長、少なくとも１８ｂｐ長、少なくとも１９ｂｐ長、少なくとも２０ｂｐ長、少なくとも２１ｂｐ長、少なくとも２２ｂｐ長、少なくとも２３ｂｐ長、少なくとも２４ｂｐ長、少なくとも２５ｂｐ長、少なくとも２６ｂｐ長、少なくとも２７ｂｐ長、少なくとも２８ｂｐ長、少なくとも２９ｂｐ長、少なくとも３０ｂｐ長が挙げられるが、これらに限定されず、また、これらは、６０ｂｐ長以上もの長さであってもよく、プライマーの長さは、一般に、１８～５０ｂｐの範囲であり、例えば、約２０～３５ｂｐ長が挙げられるが、これに限定されない。場合によっては、鋳型ＤＮＡのプライマー伸長、線形増幅または指数関数的な増幅が望ましいかどうかに応じて、鋳型ＤＮＡは、単一のプライマーまたは２つのプライマーセット（順方向および逆方向プライマー）と接触させてよい。本方法で使用され得るＰＣＲの方法には、米国特許第４，６８３，２０２号、同第４，６８３，１９５号、同第４，８００，１５９号、同第４，９６５，１８８号、および同第５，５１２，４６２号に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されず、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００９７】

上記成分に加えて、本方法で生成されるＰＣＲ反応混合物は、ポリメラーゼおよびデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）を含んでよい。所望のポリメラーゼ活性は、１つ以上の異なるポリメラーゼ酵素によって提供され得る。多くの実施形態では、反応混合物は、少なくともファミリーＡポリメラーゼを含み、対象の代表的なファミリーＡポリメラーゼとしては、天然に存在するポリメラーゼ（Ｔａｑ）およびその誘導体および同族体、例えば、Ｋｌｅｎｔａｑ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ（１９９４）９１：２２１６－２２２０に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を含むＴｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓポリメラーゼ、天然に存在するポリメラーゼ（Ｔｔｈ）およびその誘導体および同族体などを含むＴｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｉｃｓポリメラーゼなどが挙げられるが、これらに限定され

ない。実行する増幅反応が、忠実度の高い反応である特定の実施形態では、その反応混合物は、例えば、ファミリーＢポリメラーゼによって提供され得るような３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素をさらに含んでよく、対象のファミリーＢポリメラーゼとしては、Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ　ｌｉｔｏｒａｌｉｓ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｖｅｎｔ）（例えば、Ｐｅｒｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９２）　８９：５５７７に記載される、この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ種ＧＢ－Ｄ（Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔ）、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｕｒｉｏｓｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｆｕ）（例えば、Ｌｕｎｄｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ（１９９１）　１０８：１－６に記載される、この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｗｏｅｓｅｉ（Ｐｗｏ）などが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、反応混合物は、４つの天然に存在する塩基に対応する４つの異なる型のｄＮＴＰ、すなわち、ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ、およびｄＧＴＰを含み、場合によっては、１つ以上の修飾ヌクレオチドｄＮＴＰを含んでよい。

【００９８】

ＰＣＲ反応は、一般に、反応混合物を、アニーリング、伸長／延長、および変性用の適切な温度間に、特定の回数サイクリングさせることによって実行する。そのような温度および時間は、変動し、例えば、ポリメラーゼおよびプライマー、ならびに得られるＰＣＲ産物の予想される長さを含む反応の特定の成分に応じて異なるだろう。場合によっては、例えば、ネステッドＰＣＲまたは２段階のＰＣＲが使用される場合、サイクリング反応は、段階的に行ってよく、例えば、特定のサイクリングプログラムを有するか、または特定の温度（複数可）を用いる第１の段階に従ってサイクリングを行った後に、特定のサイクリングプログラムを有するか、または特定の温度（複数可）を用いる第２の段階に従ってサイクリングする。

【００９９】

多段階のＰＣＲプロセスは、増幅の開始後に、１つ以上の試薬を添加することを含んでも、含まなくてもよい。例えば、場合によっては、ポリメラーゼの使用による伸長させることによって、増幅を開始してよく、反応の初期段階の後、さらなる試薬（複数可）（例えば、１つ以上のさらなるプライマー、さらなる酵素など）を反応系に添加して、第２の反応段階を促してよい。場合によっては、第１のプライマーまたは第１のプライマーセットによって、増幅を開始してよく、反応の初期段階の後、さらなる試薬（複数可）（例えば、１つ以上のさらなるプライマー、さらなる酵素など）を反応系に添加して、第２の反応段階を促してよい。ある特定の実施形態では、増幅の初期段階は、「プレ増幅」と称され得る。

【０１００】

場合によっては、等温条件下で、例えば、等温増幅によって増幅を行ってよい。等温増幅の方法は、一般に、ＤＮＡ鎖を分離する酵素的手段、例えば、鎖置換ポリメラーゼまたはヘリカーゼなどを用いて、一定温度で増幅を促すので、ＤＮＡを変性させるための熱サイクリングが不要になる。本方法においては、任意の利便的かつ適切な等温増幅手段を用いてよく、ループ介在等温増幅（ＬＡＭＰ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）などが挙げられるが、これらに限定されない。ＬＡＭＰは、概して、標的ＤＮＡの複数の異なる領域、例えば、６～８個の異なる領域を認識することができる複数のプライマー、例えば、４～６個のプライマーを使用する。合成は、概して、２つのプライマーとともに、鎖置換ＤＮＡポリメラーゼによって開始して、ループ構造を形成させて、その後の増幅ラウンドを促す。ＬＡＭＰは、迅速かつ感度が高い。さらに、ＬＡＭＰ増幅反応中に生成されるピロリン酸マグネシウムは、場合によっては、特殊な器具を使用せずに、例えば、肉眼によって可視化することができる。ＳＤＡは、概して、鎖限定型制限エンドヌクレアーゼまたはニッキング酵素によって、プライマーに含まれる部位に作られたニックから開始させるために、鎖置換ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、ラージ（クレノウ）断片ポリメラー

ゼ、クレノウ断片（３’－５’エキソ－）など）の使用が伴う。ＳＤＡでは、ニッキング部位は、概して、各ポリメラーゼ置換ステップで再生成され、その結果、指数関数的な増幅が行われる。ＨＤＡは、概して、二本鎖ＤＮＡをほどいて、鎖を分離するヘリカーゼと、ほどいたＤＮＡにアニーリングすることができるプライマー、例えば、２つのプライマーと、延長のための鎖置換ＤＮＡポリメラーゼと、を使用する。ＮＥＡＲは、概して、例えば、ニッキング酵素によって作られたニックから伸長を開始させる鎖置換ＤＮＡポリメラーゼを伴う。ＮＥＡＲは、迅速かつ感度が高く、標的配列から多くの短い核酸を素早く生成する。

【０１０１】

場合によっては、ハイブリッドな増幅方法をもたらすために、増幅方法全体を組み合わせても、様々な増幅方法の態様を再度組み合わせてもよい。例えば、場合によっては、初期鋳型もしくはアンプリコン、または１回目の増幅ラウンドもしくは複数回の増幅ラウンドをもたらすために、ＰＣＲの態様を用いてよく、その後、さらなる増幅のために、等温増幅方法を用いてもよい。場合によっては、等温増幅法または等温増幅法の態様を用いた後に、等温増幅反応の産物をさらに増幅するために、ＰＣＲを用いてもよい。場合によっては、試料は、第１の増幅方法を用いてプレ増幅してもよく、第２の増幅方法を用いて、例えば、さらなる増幅または分析を含む、さらなる処理を行ってもよい。非限定的な例として、試料は、ＰＣＲによってプレ増幅し、ｑＰＣＲによってさらに分析してもよい。

【０１０２】

場合によっては、以下で説明する増幅ステップと検出ステップは、プレ増幅ステップの使用の有無にかかわらず組み合わせることができる。場合によっては、用いられる特定の増幅方法は、例えば、検出試薬を伴うまたは伴わない増幅反応の目視検査によって、増幅産物の定性的検出を可能にする。一実施形態では、連結産物は、等温増幅、例えば、ＬＡＭＰによって増幅され、増幅は、効率的な増幅、したがって、試料中の抗体アイソタイプの存在を示す増幅反応の視覚的変化を引き起こす。場合によっては、増幅および検出ステップは、例えば、リアルタイムＰＣＲ（本明細書では、定量ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）とも称される）で行われるような増幅中の増幅反応をモニタリングすることによって組み合わされる。

【０１０３】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）および近接伸長アッセイ（ＰＥＡ）で用いられる方法、例えば、増幅方法と、その成分を用いてもよく、これには、例えば、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、結合誘導ＤＮＡアセンブリー（ＢＩＮＤＡ）、ニッキング酵素による蛍光シグナル増幅（ＮＥＦＳＡ）、および例えば、Ｊａｎｓｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）　Ｓｅｎｓｏｒｓ，１３，１３５３－１３８４（この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが含まれるが、これらに限定されない。

【０１０４】

本発明の方法は、多重化に適合させることができる。例えば、複数の抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することができ、各抗体結合剤は、異なるバーコード配列を含むＤＮＡ分子にコンジュゲートされ、各抗体結合剤は、異なる標的抗体アイソタイプに結合することができ、試料中の複数の標的抗体アイソタイプの多重検出を可能にする。ある特定の実施形態では、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、ＩｇＥの検出用の抗ＩｇＥ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＭの検出用の抗ＩｇＭ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＧの検出用の抗ＩｇＧ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＡの検出用の抗ＩｇＡ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、およびＩｇＤの検出用の抗ＩｇＤ二次抗体ＤＮＡコンジュゲートからなる群から選択され、コンジュゲート中のＤＮＡ分子は、多重型アッセイ形式でプライマーおよび／またはプローブの適切な組み合わせを使用することによって、同時に増幅および検出することができるアイソタイプ特異的なＤＮＡバーコードを含む。

【０１０５】

ＤＮＡ連結産物の検出のための、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、架橋オリゴヌクレオチド、およびＰＣＲプライマーに対する例示的なＤＮＡ配列は、実施例１および配列表の配列番号１～２１に示されている。ある特定の実施形態では、抗原－ＤＮＡコンジュゲートは、配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列、または配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するＤＮＡ配列を含む。他の実施形態では、二次抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列、または配列番号１、２、５、６、９、１０、１３、１４、１７、および１８からなる群から選択されるＤＮＡ配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するＤＮＡ配列を含む。ある特定の実施形態では、架橋オリゴヌクレオチドは、配列番号２１のヌクレオチド配列または配列番号２１の配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、架橋オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡにハイブリダイズすることができる

【０１０６】

別の実施形態では、本方法は、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗原－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレ

オチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【０１０７】

ＩＳＡＰは、他の抗体検出方法、特に、ＤＮＡバーコードを用いて多重ＰＣＲによって複数の抗体アイソタイプの検出を可能にする他の方法と組み合わせることができる。ある多重アッセイ形式では、ＩＳＡＰは、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）および／または凝集ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＤＡＰ）と組み合わされる。例えば、ＰＬＡの説明については、Ｇｕｌｌｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０１（２２）：８４２０－９４２４、Ｇｕｓｔａｆｓｄｏｔｔｉｒ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３４５（１）：２－９、およびＡＤＡＰの説明については、Ｔｓａｉ ｅｔ ａｌ．（２０１６） ＡＣＳ Ｃｅｎｔｒａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ．２（３）：１３９－１４７、国際特許出願公開ＷＯ２０１６１６８７１１ Ａ１を参照されたく、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１０８】

例えば、ＩＳＡＰは、試料中のアレルゲン抗体を検出するために、ＰＬＡおよび／またはＡＤＡＰと組み合わせることができる。一実施形態では、本方法は、ａ）試料中の総ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、ＰＬＡを実施することと、ｂ）試料中の総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために、少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを用いて、ＡＤＡＰを実施することと、ｃ）試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲンＤＮＡコンジュゲートを用いて、ＩＳＡＰを実施することと、を含む。本方法は、アレルゲン特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗免疫グロブリンＧ４（ＩｇＧ４）抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートでＩＳＡＰを実施することをさらに含み得る。ある特定の実施形態では、ＡＤＡＰは、ＩｇＧ、ＩｇＭ、およびＩｇＥの総抗アレルゲン抗体レベルを検出するために使用される。

【０１０９】

ＰＬＡの実施において、本方法は、ａ）少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、少なくとも一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、第１の部位で試料中のＩｇＥに結合する第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、第２の部位で同じＩｇＥに結合する第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、を含む、添加することと、ｂ）試料をＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接している、接触させることと、ｃ）ＰＬＡ架橋オリゴヌクレオチドを第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートに連結して、ＰＬＡ連結産物を産生することと、ｄ）試料中のＩｇＥの存在の指標としてＰＬＡ連結産物を検出することと、を含む。

【０１１０】

ＡＤＡＰの実施において、本方法は、ａ）前記少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、少なくとも一対のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、第１の部位で試料中の抗アレルゲン抗体に結合する第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと、第２の部位で同じ抗アレルゲン抗体に結合する第２の抗アレルゲン抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、を含む、添加することと、ｂ）試料をＡＤＡＰ架橋オ

リゴヌクレオチドと接触させることであって、ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよび第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、互いに近接している、接触させることと、ｃ）ＡＤＡＰ架橋オリゴヌクレオチドを第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートと第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートに連結して、ＡＤＡＰ連結産物を産生することと、ｄ）試料中の抗アレルゲン抗体の存在の指標としてＡＤＡＰ連結産物を検出することと、を含む。

【０１１１】

ＩＳＡＰの実施において、本方法は、ａ）少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥに結合し、抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、同じアレルゲン特異的ＩｇＥに結合して、第１の複合体の形成をもたらす、添加することと、ｂ）第１の複合体をＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡおよびアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、第１の複合体中で互いに近接している、接触させることと、ｃ）第１の複合体中でＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドを抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡとアレルゲン－ＤＮＡに連結して、第１のＩＳＡＰ連結産物を産生することと、ｄ）試料中のアレルゲン特異的ＩｇＥの存在の指標として第１のＩＳＡＰ連結産物を検出することと、ｅ）少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせて少なくとも１つのアレルゲン抗体－ＤＮＡコンジュゲートを試料に添加することであって、アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、試料中のアレルゲン特異的ＩｇＧ４に結合し、抗ＩｇＧ４抗体に－ＤＮＡコンジュゲートは、同じアレルゲン特異的ＩｇＧ４に結合して、第２の複合体の形成をもたらす、添加することと、ｆ）第２の複合体をＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドと接触させることであって、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドは、（ｉ）抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第１の部分と、（ｉｉ）アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡに対して十分に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な第２の部分と、を含み、抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートＤＮＡおよびアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡは、ＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズするのに十分、複合体中で互いに近接している、接触させることと、ｇ）第２の複合体中でＩＳＡＰ架橋オリゴヌクレオチドを抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡとアレルゲン－ＤＮＡに連結して、第２のＩＳＡＰ連結産物を産生することと、ｈ）試料中のアレルゲン特異的ＩｇＧ４の存在の指標として第２のＩＳＡＰ連結を検出することと、を含む。

【０１１２】

ある特定の実施形態では、ＰＬＡ連結産物、ＡＤＡＰ連結産物、第１のＩＳＡＰ連結産物、および第２のＩＳＡＰ連結産物を検出することは、多重ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、等温増幅、またはマイクロアレイ分析を用いることを含む。本方法は、例えば、ｑＰＣＲを実施することにより、ＰＬＡ連結産物、ＡＤＡＰ連結産物、第１のＩＳＡＰ連結産物、および第２のＩＳＡＰ連結産物の量を定量化することをさらに含み得る。

【０１１３】

別の実施形態では、ＰＬＡは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコ

ンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【０１１４】

別の実施形態では、ＡＤＡＰは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマ

ー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む第２のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む第１のアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【０１１５】

別の実施形態では、ＩＳＡＰは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含むアレルゲン

－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【０１１６】

別の実施形態では、ＩＳＡＰは、ａ）配列番号１のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｂ）配列番号５のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｃ）配列番号９のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｄ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｅ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、ｆ）配列番号１のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマー、ｇ）配列番号５のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｈ）配列番号９のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉ）配列番号１３のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含

むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ならびにｊ）配列番号１７のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含むアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号２０の配列を含む順方向プライマー、からなる群から選択される少なくとも一組の試薬を用いて実施される。

【０１１７】

別の実施形態では、本発明は、試料中のピーナッツアレルゲン抗体を検出するための方法であって、ａ）ＰＬＡは、試料中の総ＩｇＥレベルを検出するために、一対の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを用いて実施され、ｂ）ＡＤＡＰは、試料中の総抗－Ａｒａｈ１抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中の総抗－Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中の総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、一対のＡｒａｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いて実施され、ｃ）ＩＳＡＰは、試料中のＡｒａｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いて実施される、方法を含む。別の実施形態では、ＩＳＡＰの実施は、試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと、試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、少なくとも１つの抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲートと組み合わせたＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲートと、を用いることをさらに含む。

【０１１８】

別の実施形態では、本方法は、ａ）試料中の総ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１のＤＮＡ配列を含む第１の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む第２の抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号４の配列を含む順方向プライマーを用いてＰＬＡを実施することと、ｂ）ｉ）試料中の総抗Ａｒａ　ｈ１抗体レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号６のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号７のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）試料中の総抗Ａｒａ　ｈ２抗体レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１０のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１１のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｉｉｉ）試料中の総抗Ａｒａ　ｈ３抗体レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含む第１のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１４のＤＮＡ配列を含む第２のＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１５のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを用いてＡＤＡＰを実施することと、ｃ）ｉ）試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号

５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｉｉ）試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ｉｉｉ）試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＥレベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号３のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマー、ｉｖ）試料中のＡｒａ　ｈ１特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号５のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ１－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号８の配列を含む順方向プライマー、ｖ）試料中のＡｒａ　ｈ２特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号９のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ２－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１２の配列を含む順方向プライマー、ならびにｖｉ）試料中のＡｒａ　ｈ３特異的ＩｇＧ４レベルを検出するために、配列番号１３のＤＮＡ配列を含むＡｒａ　ｈ３－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号１８のＤＮＡ配列を含む抗ＩｇＧ４抗体－ＤＮＡコンジュゲート、配列番号２１のヌクレオチド配列を含む架橋オリゴヌクレオチド、配列番号１９のヌクレオチド配列を含む逆方向プライマー、および配列番号１６の配列を含む順方向プライマーを用いてＩＳＡＰを実施することと、を含む。

【０１１９】

Ｂ．検出

増幅産物の存在は、定性的に決定または定量的に決定されたものを含む、任意の便利な方法によって決定され得る。場合によっては、増幅産物の存在は、例えば、増幅反応における物理的変化であって、連結産物の効率的な増幅を示す変化を通じて定性的に決定され得る。

【０１２０】

場合によっては、増幅核酸の非特異的検出のための検出プロトコルまたは増幅核酸の特異的検出のためのプロトコルによって、増幅産物が検出され、および／または増幅産物の量が測定される。

【０１２１】

対象となる代表的な非特異的検出プロトコルには、例えば、インターカレーションを介して二本鎖核酸産物を選択的に検出するシグナル発生系を用いるプロトコルが含まれる。そのような実施形態での用途を見出す代表的な検出可能な分子には、核酸と複合体を形成するときに増強された蛍光を提供するモノマーまたはそのホモダイマーもしくはヘテロダイマーを含むフェナントリジニウム色素などの蛍光核酸染色が含まれる。フェナントリジニウム色素の例には、エチジウムホモダイマー、エチジウムブロミド、ヨウ化プロピジウム、および他のアルキル置換フェナントリジニウム色素が含まれる。別の実施形態では、核酸染色剤には、アクリジン色素、またはそのホモダイマーもしくはヘテロダイマー、例えば、アクリジンオレンジ、アクリジンホモダイマー、エチジウム－アクリジンヘテロダイマー、または９－アミノ－６－クロロ－２－メトキシアクリジンが含まれる。さらに別の実施形態では、核酸染色剤は、インドールまたはイミダゾール染料、例えば、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３２５８、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３４５８０、ＤＡ

ＰＩ（４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）、またはＤＩＰＩ（４’，６－（ジイミダゾリン）－２－イル）－２－フェニルインドール）である。その他の許容される核酸染色には、７－アミノアクチノマイシンＤ、ヒドロキシスチルバミジン、ＬＤＳ７５１、選択されたソラレン（フロクマリン）、スチリル色素、ルテニウム錯体などの金属錯体、および遷移金属錯体（例えば、Ｔｂ３＋およびＥｕ３＋が組み込まれたもの）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、核酸染色は、核酸と会合すると蛍光を増大させるシアニン色素、またはシアニン色素のホモダイマーもしくはヘテロダイマーである。場合によっては、米国特許第４，８８３，８６７号、米国特許第５，５８２，９７７号、米国特許第５，３２１，１３０号、および米国特許第５，４１０，０３０号に記載されている色素（これらは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を使用してもよく、これには、ＴＯＴＯ、ＢＯＢＯ、ＰＯＰＯ、ＹＯＹＯ、ＴＯ－ＰＲＯ、ＢＯ－ＰＲＯ、ＰＯ－ＰＲＯ、およびＹＯ－ＰＲＯ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）の商標下で市販されている核酸染色が含まれる。場合によっては、米国特許第５，４３６，１３４号、米国特許第５，６５８，７５１号、および米国特許第５，８６３，７５３号に記載されている色素（これらはそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を使用してもよく、これには、ＳＹＢＲ、ＳＹＴＯ、ＳＹＴＯＸ、ＰＩＣＯＧＲＥＥＮ、ＯＬＩＧＲＥＥＮ、およびＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）の商標下で市販されている核酸染色が含まれる。さらに他の実施形態では、核酸染色は、アザベンズアゾリウムもしくはポリアザベンズアゾリウム複素環（アザベンゾオキサゾール、アザベンズイミダゾール、またはアザベンゾチアゾールなど）を組み込み、核酸と会合すると蛍光を増大させる、単量体、ホモ二量体、またはヘテロ二量体シアニン色素であり、これには、ＳＹＴＯ、ＳＹＴＯＸ、ＪＯＪＯ、ＪＯ－ＰＲＯ、ＬＯＬＯ、ＬＯ－ＰＲＯ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｃ．Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）の商標下で市販されている核酸染色が含まれる。

【０１２２】

さらに他の実施形態では、増幅産物に特異的であるシグナル発生系は、二本鎖分子とは対照的に、概して、増幅を検出するために使用してもよい。これらの実施形態では、シグナル発生系は、増幅産物に見られる配列に特異的に結合するプローブ核酸を含んでもよく、プローブ核酸は、直接または間接的に検出可能な標識で標識されてもよい。直接的に検出可能な標識は、追加の試薬を用いずに、直接的に検出することができる標識であり、一方、間接的に検出可能な標識は、１つ以上の追加の試薬を用いることによって検出可能な標識であり、例えば、標識は、２つ以上の構成成分で構成されているシグナル発生系の一員である。いくつかの実施形態では、標識は、直接的に検出可能な標識であり、対象となる直接的に検出可能な標識には、蛍光標識、放射性同位体標識、化学発光標識などが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、標識は、蛍光標識であり、そのような実施形態で使用される標識試薬は、蛍光タグ化ヌクレオチド（複数可）、例えば、蛍光タグ化ＣＴＰ（Ｃｙ３－ＣＴＰ、Ｃｙ５－ＣＴＰなど）などである。標識プローブ核酸を生成するためにヌクレオチドをタグ化するのに用いてもよい蛍光部分には、フルオレセイン、シアニン色素（Ｃｙ３、Ｃｙ５など）、Ａｌｅｘａ５５５、Ｂｏｄｉｐｙ６３０／６５０などが含まれるが、これらに限定されない。上記のような他の標識もまた、使用してもよい。

【０１２３】

シグナル発生系が、蛍光シグナル発生系である実施形態では、シグナル検出は、典型的には、反応混合物からの蛍光シグナルの変化を検出してアッセイ結果を得ることを含む。換言すると、反応混合物によって生成される蛍光シグナルのいずれかの変調が評価される。この変化は、用いられる標識の性質に応じて、蛍光の増大または減少であり得、ある特定の実施形態では、蛍光の増大である。試料は、任意の便利な手段、例えば、熱安定性キュベットまたはプレートリーダー蛍光計などの好適な蛍光計を用いて、蛍光の増大についてスクリーニングされてもよい。蛍光は、好適には、既知の蛍光計を用いてモニタリング

される。これらのデバイスからの、例えば、光電子増倍管の電圧の形態のシグナルは、データプロセッサーボードに送られ、各試料管に関連したスペクトルに変換される。多数の反応容器、例えば、多数のチューブ、マルチウェルプレートなどを同時に評価することができる。

【０１２４】

場合によっては、（例えば、抗原－ＤＮＡコンジュゲート、抗体－ＤＮＡコンジュゲート、および架橋オリゴヌクレオチドからの）特定のＤＮＡ配列の伸長および／または増幅は、１つ以上の特定の核酸配列の複製をもたらし、その１つ以上の特定の核酸配列の反復を含む１つ以上の鎖が得られる。そのような反復配列は、例えば、反復された特定の配列に特異的なプローブ核酸のハイブリダイゼーションを通じて検出され得る。ある特定の例において、特定の反復配列に特異的なタグ化プローブ核酸、例えば、蛍光タグ化プローブ核酸、酵素タグ化プローブ核酸、放射標識タグ化プローブ核酸などは、特定の反復配列を含む、伸長ポリヌクレオチドまたは増幅産物を検出するために、使用することができる。場合によっては、タグ化プローブ核酸の伸長ポリヌクレオチドまたは増幅産物の反復配列へのハイブリダイゼーションにより、伸長ポリヌクレオチドまたは増幅産物にハイブリダイズしたタグ化プローブ核酸の数が多い（検出可能なタグの局所濃度が高くなる）ため、伸長ポリヌクレオチドまたは増幅産物の検出が可能になる。

【０１２５】

例えば、場合によっては、抗原－ＤＮＡコンジュゲートまたは抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートからのＤＮＡの１つ以上の配列の反復は、本明細書に記載の方法に従って産生される増幅産物または伸長産物に含まれ、その反復は、反復配列ユニットに特異的なタグ化プローブ核酸の使用を通じて検出される。場合によっては、架橋ポリヌクレオチドの１つ以上の配列の反復は、本明細書に記載の方法に従って産生される増幅産物または伸長産物に含まれ、その反復は、反復配列ユニットに特異的なタグ化プローブ核酸の使用を通じて検出される。場合によっては、環状化オリゴヌクレオチドの１つ以上の配列の反復は、本明細書に記載の方法に従って産生される増幅産物または伸長産物に含まれ、その反復は、反復配列ユニットに特異的なタグ化プローブ核酸の使用を通じて検出される。

【０１２６】

ある特定の実施形態では、反復核酸配列は、本明細書に記載の伸長および／または増幅方法、例えば、ＰＣＲ増幅、等温増幅（例えばＲＣＡ）などのうちの１つ以上によって生成され得、伸長および／または増幅産物は、１つ以上の蛍光標識プローブ核酸の伸長および／または増幅産物へのハイブリダイゼーションを通じて検出可能になり得る。そのような検出可能な伸長および／または増幅産物は、例えば、蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、イメージングフローサイトメトリーなどを含むが、これらに限定されない、蛍光を検出するための任意の便利な手段によって同定され得る。場合によっては、検出可能な伸長および／または増幅産物の同定は、伸長および／または増幅産物が由来する複合体の抗体に関連する分子、粒子、細胞、組織、生物などの検出または同定を可能にし得る。例えば、場合によっては、蛍光プローブ結合伸長および／または増幅産物は、例えば、蛍光顕微鏡によるその細胞の同定、および／または例えば、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によるその細胞の単離を可能にし得る。

【０１２７】

上記のように、場合によっては、増幅をリアルタイムでモニタリングして、検出および／または定量化を行ってよい。検出プロトコルが、例えば、ｑＰＣＲ反応プロトコルで使用されるようなリアルタイムプロトコルである場合、データは、頻繁な間隔で、例えば、反応全体を通して１０ミリ秒毎に１回、または１０ミリ秒毎に１回よりも高い頻度もしくは低い頻度で収集され得る。各サイクル中に試料からの反応性分子の蛍光をモニタリングすることによって、増幅反応の進行を様々な方法でモニタリングすることができる。例えば、融解ピークによって提供されるデータは、例えば、融解ピーク下面積を計算して、これらのデータをサイクル数に対してプロットすることによって分析することができる。

【０１２８】

この方法で生成されたスペクトルは、例えば、色素などの事前に選択した蛍光部分の「適合性」を用いて分解し、各シグナル部分（すなわち、フルオロフォア）を表すピークを形成することができる。各シグナルの強度値を表すピーク下面積を決定することができ、ピーク下面積は、必要に応じて、互いの比率として表すことができる。シグナルの強度および／または比の微分は、標識プローブにおける変化を反応を通してまたは温度などの異なる反応条件で記録することを可能にする。これらの変化は、オリゴヌクレオチドプローブと標的配列との間の結合現象、または標的配列に結合したオリゴヌクレオチドプローブの分解に関連している。微分ピーク下面積の積分は、標識作用に関する強度値を計算することを可能にする。

【０１２９】

混合物を蛍光変化についてスクリーニングすると、試料を増幅反応の最後に１回スクリーニングするか、または反応中に複数回、（例えば、リアルタイムＰＣＲモニタリングで行うように）例えば各サイクル後にスクリーニングするかに応じて、１つ以上のアッセイ結果が得られる。

【０１３０】

本明細書に記載の方法によれば、抗体アイソタイプの存在は、例えば、特定の検出閾値を上回っているかまたは下回っているかで検出しても、または測定してもよく、例えば、特定の検出閾値を上回って存在するときに、試料中の抗体アイソタイプの実際の量または濃度を測定してもよい。対象の抗体アイソタイプ検出反応の実際の検出閾値は変化し、例えば、検出される抗体アイソタイプ、使用される特定の増幅方法、使用される検出方法などに応じて異なるであろう。場合によっては、対象の検出方法の検出閾値は、１５ｎｇ／ｍｌ～１ｐｇ／ｍｌの範囲であり得、１５ｎｇ／ｍｌ未満、１４ｎｇ／ｍｌ未満、１３ｎｇ／ｍｌ未満、１２ｎｇ／ｍｌ、１１ｎｇ／ｍｌ未満、１０ｎｇ／ｍｌ未満、９ｎｇ／ｍｌ未満、８ｎｇ／ｍｌ未満、７ｎｇ／ｍｌ未満、６ｎｇ／ｍｌ未満、５ｎｇ／ｍｌ未満、４ｎｇ／ｍｌ未満、３ｎｇ／ｍｌ未満、２ｎｇ／ｍｌ未満、１ｎｇ／ｍｌ未満、５００ｐｇ／ｍｌ未満、４００ｐｇ／ｍｌ未満、３００ｐｇ／ｍｌ未満、２００ｐｇ／ｍｌ未満、１００ｐｇ／ｍｌ未満、９０ｐｇ／ｍｌ未満、８０ｐｇ／ｍｌ未満、７０ｐｇ／ｍｌ未満、６０ｐｇ／ｍｌ未満、５０ｐｇ／ｍｌ未満、４０ｐｇ／ｍｌ未満、３５ｐｇ／ｍｌ未満、３０ｐｇ／ｍｌ未満、２５ｐｇ／ｍｌ未満、２０ｐｇ／ｍｌ未満、１９ｐｇ／ｍｌ未満、１８ｐｇ／ｍｌ未満、１７ｐｇ／ｍｌ未満、１６ｐｇ／ｍｌ未満、１５ｐｇ／ｍｌ未満、１４ｐｇ／ｍｌ未満、１３ｐｇ／ｍｌ未満、１２ｐｇ／ｍｌ未満、１０ｐｇ／ｍｌ未満などを含み得る。場合によっては、本明細書に記載の特定の検出方法の検出閾値は、試料中で検出され得る抗体アイソタイプの最小モル数で表してもよく、このような検出閾値は、２００アトモル～１００ゼプトモルの範囲であり得、例えば、２００アトモル、１９０アトモル、１８０アトモル、１７０アトモル、１６０アトモル、１５０アトモル、１４０アトモル、１３０アトモル、１２０アトモル、１１０アトモル、１００アトモル、９０アトモル、８０アトモル、７０アトモル、６０アトモル、５０アトモル、４０アトモル、３０アトモル、２０アトモル、１０アトモル、１アトモル、９００ゼプトモル、８００ゼプトモル、７００ゼプトモル、６００ゼプトモル、５００ゼプトモル、４００ゼプトモル、３５０ゼプトモル、３００ゼプトモル、２５０ゼプトモル、２００ゼプトモル、１９０ゼプトモル、１８０ゼプトモル、１７０ゼプトモル、１６０ゼプトモル、１５０ゼプトモル、１４０ゼプトモル、１３０ゼプトモル、１２０ゼプトモル、１１０ゼプトモル、１００ゼプトモルなどを含むが、これらに限定されない。

【０１３１】

検出（増幅産物の定性的または定量的な測定を含んでも含まなくてもよい）の後、検出結果を評価して、抗体アイソタイプが試料に存在する可能性を判断することができる。このような評価を行う際には、場合によっては、対象の反応物を１つ以上の対照反応物または参照値と比較してもよい。本方法の対照反応物には、陽性対照、例えば、対象となる抗体を含むことが知られているおよび／または対象となる抗原の既知の量を含むことが知られている反応物が含まれる。対照反応物には、陰性対照、重要な試薬、例えば、抗原、ポ

リメラーゼ、重要なポリヌクレオチドなどを含まないことが知られている反応物が含まれる。検出反応の結果と比較され得る参照値には、事前に行った任意の対照反応物からの参照測定値、対照反応物から収集した標準曲線、陽性または陰性対照からの一連の蛍光測定値、ユーザーが定めた参照値、製造業者から供給された参照値などが含まれるが、これらに限定されない。場合によっては、対象の反応物の評価は、尺度、例えば、参照値の尺度との比較を含んでもよく、これは、試料に存在する抗体の量を推定するために使用することができる。

【０１３２】

Ｃ．多重化

本明細書に記載の方法によれば、試料は、標的抗体アイソタイプの存在について容易にスクリーニングされる。この方法は、単一の標的抗体アイソタイプの検出および多重分析の検出に適しており、２つ以上の異なる標的抗体アイソタイプは、試料でアッセイされる。これらの後者の多重状況では、使用され得る抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの異なるセットの数は、典型的には、約２～約２０以上、例えば、最大１００以上、１０００以上などの範囲であり、例えば、２～５０、２～１００、１０～１００、５０～１００、５０～２００、５０～３００、５０～４００、５０～５００などを含むが、これらに限定されない。一実施形態では、多重化アッセイは、特定の特異的にタグ化されたＤＮＡ分子の増幅が、特定の抗原に対して特異的な抗体の存在を示すように、特異的にタグ化されたＤＮＡ分子にコンジュゲートした様々な異なる抗原を用いてもよい。別の実施形態では、多重化アッセイは、特定の特異的にタグ化されたＤＮＡ分子の増幅が、抗体アイソタイプの存在を示すように、特異的にタグ化されたＤＮＡ分子にコンジュゲートした異なる標的抗体アイソタイプに特異的な様々な異なる抗体結合剤を用いてもよい。したがって、対象のアッセイでは、核酸のタグ付けおよび／または「バーコード」戦略を用いて、試料中の特定の抗原に特異的な複数の抗体アイソタイプの検出および／または定量化を可能にし得る。本明細書に記載の多重化アッセイに含めることができる、核酸バーコードで特異的にタグ付けされた異なる抗原および抗体結合剤の数は、変化してもよく、例えば、試料中に存在し得る抗原または抗体濃度のバーコードおよび物理的限界おける抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート中のＤＮＡの利用可能な長さによってのみ制限され得る。

【０１３３】

したがって、場合によっては、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのパネルを単一の反応物でスクリーニングされ得、パネルの各標的抗体アイソタイプの存在または量が評価され得る。上記の検出方法は、二重化アッセイにおける増幅産物の検出および測定に並行して利用することができる。場合によっては、多重化アッセイおよび非多重化アッセイの両方で、増幅産物の検出および／または測定のために、核酸シーケンシング方法を用いてもよい。例えば、場合によっては、例えば、複数の増幅産物が産生された多重アッセイにおいて、定量的なシーケンシングを用いて、各増幅産物の相対的な量または存在を決定して、高感度かつ高度に多重化された形で、単一の試料中の多くの異なる抗体アイソタイプを評価可能にしてもよい。

【０１３４】

ある特定の実施形態では、本開示の多重化アッセイをプール反応物において実施して、複数のアンプリコンを形成させてもよく、その後、形成されたアンプリコンを定量して、多重化アッセイの個々の抗体アイソタイプの量を得てもよい。例えば、一実施形態では、複数の異なる抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを、１つ以上の標的抗体アイソタイプを含むかまたは含むと思われる試料に添加してもよい。したがって、抗原－ＤＮＡおよび／または抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートからのＤＮＡ分子の複合体形成および接合時（任意に、架橋オリゴヌクレオチドまたはポリメラーゼの存在下での連結の使用は、相補的領域の伸長を触媒した）、試料に存在する標的抗体アイソタイプに対応する完全なバーコードを含むアンプリコンが形成される。したがって、形成される各アンプリコンの相対量は、試料中の各標的抗体アイソタイプの相対量に対応するであろう。

したがって、各抗体アイソタイプは、形成されたアンプリコンの定量化を通じて定量化することができる。

【０１３５】

形成されたアンプリコンの定量は、任意の利便的な方法によって行ってよく、用いられる特定の方法は、部分的には、検出される異なる抗体アイソタイプの数、所望の検出感度、所望の定量感度、所望の定量ダイナミックレンジなどに応じて異なり得る。定量は、プール反応物で行ってよく、またはアンプリコンを形成する反応物を定量のために小分けにしてよい。例えば、場合によっては、例えば、アンプリコンの定量的なシーケンシングを通じて、アンプリコンが形成され得、プールされた試料に対して定量化が行われ得る。他の例では、例えば、アンプリコンにハイブリダイズするプライマーを用いたｑＰＣＲによって、試料をアリコートし、各アンプリコンを個別に定量化することによって、アンプリコンが形成され得、定量化が行われ得る。

【０１３６】

多重化アッセイの一実施形態では、各抗原および／または抗体結合剤は、コンジュゲートした抗原および／または抗体結合剤に特有の配列およびポリヌクレオチドを架橋するための普遍的配列を含むＤＮＡ分子にコンジュゲートされる。その特有の配列は、プライマー結合部位であっても、プライマー結合部位を含んでもよい。ユニバーサルな配列は、例えば、架橋ポリヌクレオチドの半分を含むその一部分に対して相補的であり得、そのため、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートと抗原－ＤＮＡコンジュゲートとの間の複合体形成時に、結合したＤＮＡ分子は、架橋オリゴヌクレオチドが抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡ分子のユニバーサルな配列に同時に結合し、２つのコンジュゲートしたＤＮＡ分子の連結を可能にするような近接にもたらされる。次いで、連結反応物によって形成された複数のアンプリコンを含む試料を、個々の反応物に分注することができ、それぞれ、特定の抗原または抗体のプライマー結合部位に特異的なプライマーセットを含み、特定の抗体アイソタイプに対応する特定のアンプリコンに対してｑＰＣＲを実施可能にする。したがって、プールの特定の各アンプリコンの増幅を通じて、試料に元々存在する各抗体アイソタイプの量を決定することができる。

【０１３７】

本開示の多重化アッセイは、抗原－ＤＮＡおよび／または抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのライブラリを用いて実施され得る。そのようなライブラリは、スクリーニングされる抗原および／または抗体の数および／またはタイプに応じて異なる。したがって、場合によっては、本開示のライブラリは、例えば、アレルゲンに対する宿主アレルギー反応によって産生される抗体の検出のためのまたはさもなければ、アレルギーのタイプのためのバイオマーカーとして機能するアレルゲンライブラリ、病原体によって感染症に対する宿主反応によって産生される抗体の検出のためのまたはさもなければ、感染症のバイオマーカーとして機能する様々な病原体抗原を含む病原体ライブラリ、自己免疫疾患の一部として対象によって産生される抗体の検出のためのまたはさもなければ、自己免疫疾患のためのバイオマーカーとして機能する様々な自己抗原を含む自己免疫ライブラリ、がんもしくは腫瘍の存在に応じて対象によって産生される抗体の検出のためのまたはさもなければ、がんのバイオマーカーとして機能する様々な抗原を含むがんライブラリ、加齢またはその他の神経障害の結果として対象によって産生される抗体の検出のための様々なサイトカイン抗原を含むサイトカインライブラリなどを含む、ライブラリに含まれる抗原のタイプによって分類され得る。ライブラリ内の異なる抗原－ＤＮＡコンジュゲートの数は、変化し、１０個以下～１０００個以上の範囲であり得、例えば、１０～１０００個、２０～１０００個、３０～１０００個、４０～１０００個、５０～１０００個、６０～１０００個、７０～１０００個、８０～１０００個、９０～１０００個、１００～１０００個、１００～９００個、１００～８００個、１００～７００個、１００～６００個、１００～５００個、１００～４００個、１００～３００個、１００～２００個、１０～９００個、１０～８００個、１０～７００個、１０～６００個、１０～５００個、１０～４００個、１０～３００個、１０～２００個、１０～１００個、２０～１００個、３０～１００個、４０

～１００個、５０～１００個、６０～１００個、７０～１００個、８０～１００個、９０～１００個、１２個、２４個、３６個、４８個、９６個、３８４個などを含むが、これらに限定されない。ライブラリの異なるポリヌクレオチド抗原は、物理的に、例えば、別の容器もしくはマルチウェルプレートの別のウェルに分けてもよく、または物理的に分けなくてもよく、すなわち、単一の溶液、単一の容器などにプールしてもよい。

【０１３８】

さらに、ライブラリは、様々なアイソタイプの抗体に結合可能な１つ以上の抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート（例えば、二次抗体、抗体模倣物、またはアプタマーＤＮＡコンジュゲート）を含んでもよい。例えば、そのようなライブラリは、ＩｇＥの検出用の抗ＩｇＥ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＭの検出用の抗ＩｇＭ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＧの検出用の抗ＩｇＧ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＡの検出用の抗ＩｇＡ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、およびＩｇＤの検出用の抗ＩｇＤ二次抗体ＤＮＡコンジュゲートを含んでもよい。

【０１３９】

場合によっては、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのライブラリは、例えば、抗原特異的抗体アイソタイプの定量化のために、プライマー、例えばプライマー対の対応するライブラリを含んでもよい。一実施形態では、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのプールされたライブラリは、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートからのＤＮＡ分子の接合によって産生される完全なバーコード配列の増幅に由来する独自のアンプリコンを特異的に増幅および定量化するためのプライマー対の対応するライブラリを有するであろう（すなわち、抗原に特異的な標的抗体を用いた抗原－ＤＮＡコンジュゲートの複合体化によって生成されたバーコードは、同様に、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートによって結合し、複合体中で抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡ分子が、連結産物の形成またはハイブリダイゼーションおよびポリメラーゼ触媒伸長の形成による接合を可能にするのに十分、近接しており、バーコードは、抗原特異的抗体アイソタイプに対応する）。場合によっては、プライマーのそのようなライブラリは、各ウェルが、各ウェルに連結反応物のアリコートを添加する際に、特定の抗原特異的抗体アイソタイプに特異的な特定のアンプリコンの増幅および定量化のために構成されるように、マルチウェルプレートの個々のウェルにそれぞれプライマー対を含み得る。したがって、ライブラリの各アンプリコン／抗原特異的抗体アイソタイプの定量化により、初期試料に存在するライブラリが検出するように構成された各抗原特異的抗体アイソタイプの量を決定することができる。例えば、場合によっては、抗原－ＤＮＡと抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの１２個の異なる対を有するライブラリは、対応する１２ウェルのプライマーライブラリを有し、各ウェルが、抗原特異的抗体アイソタイプの検出のために、１２個の対の抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのうちの一対に特異的なアンプリコンを増幅するように構成されたプライマー対を含む。他の例では、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの２４個の異なる対を有するライブラリは、対応する２４ウェルのプライマーライブラリを有し、各ウェルが、抗原特異的抗体アイソタイプの検出のために、２４個の対の抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのうちの一対に特異的なアンプリコンを増幅するように構成されたプライマー対を含む。さらに他の例では、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの４８個の異なる対を有するライブラリは、対応する４８ウェルのプライマーライブラリを有し、各ウェルが、抗原特異的抗体アイソタイプの検出のために、４８個の対の抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのうちの一対に特異的なアンプリコンを増幅するように構成されたプライマー対を含む。さらに他の例では、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの９６個の異なる対を有するライブラリは、対応する９６ウェルのプライマーライブラリを有し、各ウェルが、抗原特異的抗体アイソタイプの検出のために、９６個の対の抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのうちの一対に特異的なアンプリコンを増幅するように構成されたプライマー対を含む。他の例では、抗原－ＤＮＡおよび抗

体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの３８４個の異なる対を有するライブラリは、対応する３８４ウェルのプライマーライブラリを有し、各ウェルが、抗原特異的抗体アイソタイプの検出のために、３８４個の対の抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのうちの一対に特異的なアンプリコンを増幅するように構成されたプライマー対を含む。場合によっては、ライブラリは、マルチウェルのプライマー対プレートに供給される対応するプライマー対よりも多くの抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび／または抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを有し、これは、例えば、プライマーライブラリが、ライブラリのアンプリコンのすべての増幅を可能にするために、プライマー対のマルチウェルを含む場合を含む。

【０１４０】

本開示のライブラリはまた、例えば、連結、増幅、検出などのための追加の試薬を含む、本明細書に記載の方法のすべてまたは一部を実施するために１つ以上の追加の試薬を含んでいてもよく、これは、例えば、連結、増幅、検出などのための追加の試薬を含む。場合によっては、追加の試薬は、プールされたライブラリに含まれていてもよい。例えば、場合によっては、連結のための試薬、例えば、リガーゼは、抗原－ＤＮＡおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートのプールされたライブラリ内に含まれていてもよい。場合によっては、追加の試薬は、マルチウェルプレートの個々のウェルに含まれていてもよい。例えば、場合によっては、増幅のための試薬、例えば、ポリメラーゼ、ｄＮＴＰなどは、マルチウェルプレートプライマーライブラリのウェル内に含まれていてもよい。記載されているように、適切な緩衝液、塩などは、ライブラリに含まれていても、含まれていなくてもよい。場合によっては、ライブラリおよび／またはその成分、例えば、プライマーライブラリは、凍結乾燥形態で供給してもよく、使用時に再水和してもよい。

【０１４１】

Ｄ．用途

本明細書に記載の方法および組成物は、試料中に存在する抗体アイソタイプの検出および／または定量化において特に有用性がある。このような検出は、様々な技術分野において様々な用途を見出すことができ、例えば、基礎科学的研究（例えば、生物医学的研究、生化学的研究、免疫学的研究、分子生物学的研究、微生物学的研究、細胞生物学的研究、遺伝学など）、医学的および／または薬物学的研究（例えば、創薬的研究、薬剤設計研究、薬剤開発研究、薬理学、毒物学、医薬品化学、前臨床研究、臨床研究、オーダーメイドまたは「精密」医療など）、医療、疫学、公衆衛生、バイオテクノロジー、畜産学、獣医学、農学、材料科学、分子検出、分子診断学などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１４２】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、対象からの生体試料中の抗体の検出の際の用途を見出す。本明細書で使用される「対象」という用語は、ヒト、家畜、ペット、実験動物、生物生産動物（例えば、バイオ製品、例えば抗体を生成するために使用される動物）などを含む動物を指す。場合によっては、試料は、哺乳動物組織、哺乳動物細胞、哺乳動物体液、哺乳動物排泄体液、哺乳動物半固形分泌物などを含む哺乳動物対象に由来する。

【０１４３】

このような試料からの対象となる哺乳動物は、例えば、ヒト、有蹄動物（例えば、ブタ（ｐｏｒｃｉｎｅ）（ブタ）、ウシ（ｂｏｖｉｎｅ）（ウシ）、ヒツジ（ｏｖｉｎｅ）（ヒツジ）、ヤギ（ｃａｐｒｉｎｅ）（ヤギ）、ウマ（ｅｑｕｉｎｅ）（ウマ）、ラクダ科の動物（ラクダ）、または概して、蹄を持つ家畜もしくは農場の動物などのあらゆる種もしくは亜種）、齧歯動物（例えば、マウス、ラット、アレチネズミ、ハムスター、モルモットなど）、ウサギ、ネコ、イヌ、霊長類などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１４４】

場合によっては、試料は、非ヒト哺乳動物を含むが、これに限定されない、非ヒト動物に由来してもよい。試料が由来し得る非ヒト哺乳動物には、上記のものが含まれるが、これらに限定されない。試料が由来し得る非ヒト動物には、上に列挙されているものと、加

えて、例えば、鳥類（すなわち、例えば、ニワトリ、カモなどのトリ）、両生動物（例えば、カエル）、魚類などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１４５】

場合によっては、対象が特定の状態にあるかどうかを評価するために、本明細書に記載の方法は、ヒトに由来する試料中の抗体アイソタイプの存在を検出および／または量を測定するために使用される。そのような場合、対象に由来する抗体アイソタイプは、概して、単一特異性抗体アイソタイプ、例えば、単一特異性ポリクローナル抗体を含む、例えば、単一特異性抗体であろう。ヒトまたは非ヒト対象で測定される単一特異性抗体は、疾患抗原に対する単一特異性である抗体であってよく、その疾患抗原は、宿主にとって内因性（すなわち、宿主由来の抗原または自己抗原）であってよく、宿主にとって外因性（すなわち、非宿主由来抗原または感染病原体由来抗原）であってよい。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、例えば、対象の状態の存在の判断または評価、および場合によっては診断の形で評価し、ある状態を有する対象に対する療法を決定し、ある状態を有する対象をモニタリングするなどのために使用される。場合によっては、本明細書に記載の方法を用いて対象の状態の評価は、技術者による対象の現在の健康状態の評価、すなわち、対象の予後の「診断評価」、すなわち、考え得る治療レジメンの「予後評価」、すなわち、「治療評価」および／または療法への応答性、すなわち、「予後評価」を含む報告書を作成することを含む。したがって、本方法は、診断評価、予後評価、治療評価、またはモニタリング評価、およびそれらの組み合わせの結果を提供する報告書を作成または出力するステップをさらに含んでいてもよく、これらの報告書は、電子媒体の形態（例えば、コンピューターモニター上の電子表示）、または有形媒体の形態（例えば、紙または他の有形媒体に印刷された報告書）で提供することができる。

【０１４７】

場合によっては、本明細書に記載の評価は、例えば、治療の有効性を評価するか、最良の治療のタイミングを決定するため、または治療の調節が必要かどうかを決定するために、治療レジメンの一部として実施される。例えば、場合によっては、本明細書に記載の方法に従って治療前試料を採取して評価してもよく、その評価から治療プロトコルを選択する。他の例では、治療有効性を評価するために、治療後試料を採取して、本明細書に記載の評価に従って、治療前試料と比較する。他の例では、さらなる治療法のタイミングを最もよく決定するために、１つ以上の治療後評価が実施される。

【０１４８】

本明細書に記載の検出方法のためのヒトおよび非ヒト動物の状態を含む状態には、対象の免疫系および／または免疫応答に関与する状態を含むが、これらに限定されない。場合によっては、対象の状態は、病原体由来（例えば、感染症）であってよく、他の例では、対象の状態は、対象由来（例えば、自己免疫疾患またはアレルギー）であってよく、場合によっては、状態の由来元は不明であってよい。

【０１４９】

場合によっては、本方法は、対象に由来する試料中のアレルゲンに対する１つ以上の抗体の存在を検出することによって、対象中のアレルゲン特異的抗体を検出する場合での用途を見出すことができる。アレルゲンには、アレルギーを有する対象において異常に強い免疫応答（すなわち、アレルギー反応）を引き起こす任意のタイプの抗原が含まれ、抗原は通常、アレルギーを有しない対象において強い免疫応答を引き起こさない（すなわち、抗原誘発臨床徴候および症状に関連する）。アレルゲンは、ＩｇＥ反応を介して部分的に媒介される過敏症を引き起こしてもよい。一部の対象では、過敏症は、同時に起こるｓＩｇＧ４の反応の影響によって減少するであろう。アレルギー反応のある対象の免疫反応は、様々な免疫グロブリンアイソタイプ（ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤなど）の他の抗アレルゲン抗体も含まれ得る。アレルギー反応またはアレルゲン誘発性炎症は、有害なＩｇＥ媒介免疫反応を誘発するまたは「引き起こす」ことができる、任意の摂取または吸入したアレルゲンによってもたらされ得る。アレルギー源物質は、花粉、動物の鱗屑、真菌

胞子、ハウスダストダニ糞粒子、節足動物または爬虫類の毒、食品、ラテックス、ならびに薬物、麻酔薬、および治療用抗体または他のタンパク質などの治療薬を含んでもよい。特に、食物誘発性のアレルギー反応は、通常、ピーナッツ、木の実、卵、牛乳、貝、魚、小麦、大豆、ゴマ、マスタード、およびセロリによって引き起こされる。

【０１５０】

アレルゲンは、ＩｇＥ媒介障害またはアレルギー性疾患、アレルゲン誘発性炎症、および喘息を引き起こすおよび／または悪化することと関連し得、これには、アレルギー性およびアトピー性喘息、アトピー性皮膚炎およびアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、および鼻結膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、アレルギー性血管炎、アナフィラキシーショック、アレルギー（例えば、動物性アレルギー（例えばネコ）、ゴキブリアレルギー、ダニアレルギー、チリダニアレルギー、昆虫刺傷アレルギー（例えば（ハチ、スズメバチなど）、食物アレルギー（例えば、イチゴおよび他の果物および野菜、ピーナッツ、大豆、および他の豆類、クルミおよび他の木の実、貝および他の魚介類、牛乳および他の乳製品、小麦および他の穀物、ならびに卵）、ラテックスアレルギー、薬物アレルギー（例えば、ペニシリン、カルボプラチン）、カビおよび真菌アレルギー（例えば、Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓなど）、花粉アレルギー（例えば、ブタクサ、Ｂｅｒｍｕｄａ ｇｒａｓｓ、Ｒｕｓｓｉａｎ ｔｈｉｓｔｌｅ、オーク、ライ麦など）、および金属アレルギーなどであるが、これらに限定されない）などであるが、これらに限定されない状態が含まれる。

【０１５１】

本明細書で使用される感染病態は、変化し得、一般的な感染症、新興感染症、症候性感染症、無症候性感染症などを含むが、これらに限定されない、外来抗原が宿主生物に存在する任意の状態を含んでもよい。感染病態の非限定的な例には、例えば、アシネトバクター感染症（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｕｍａｎｎｉｉ）、放線菌症（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｉｓｒａｅｌｉｉ、Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｇｅｒｅｎｃｓｅｒｉａｅ、およびＰｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｓ）、アフリカ睡眠病（アフリカトリパノソーマ症）（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）、ＡＩＤＳ（後天性免疫不全症候群）（ＨＩＶ（ヒト免疫不全ウイルス））、アメーバ赤痢（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）、アナプラズマ病（Ａｎａｐｌａｓｍａ属）、炭疽（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、Ａｒｃａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｍ感染症（Ａｒｃａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｍ）、アルゼンチン出血熱（Ｊｕｎｉｎウイルス）、回虫症（Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ）、アスペルギルス症（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ属）、アストロウイルス感染症（Ａｓｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ科）、バベシア症（Ｂａｂｅｓｉａ属）、セレウス菌感染症（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）、細菌性肺炎（多数の細菌）、細菌性膣炎（ＢＶ）（多数の細菌）、バクテロイデス感染症（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属）、バランチジウム症（Ｂａｌａｎｔｉｄｉｕｍ ｃｏｌｉ）、バイリサスカリス感染症（Ｂａｙｌｉｓａｓｃａｒｉｓ属）、ＢＫウイルス感染症（ＢＫウイルス）、黒色砂毛症（Ｐｉｅｄｒａｉａ ｈｏｒｔａｅ）、Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｓ ｈｏｍｉｎｉｓ感染症（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｓ ｈｏｍｉｎｉｓ）、ブラストミセス症（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、ボリビア出血熱（Ｍａｃｈｕｐｏウイルス）、ボレリア感染症（Ｂｏｒｒｅｌｉａ属）、ボツリヌス症（および乳児ボツリヌス症）（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、ブラジル出血熱（Ｓａｂｉａ）、ブルセラ症（Ｂｒｕｃｅｌｌａ属）、腺ペスト（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ科細菌）、バークホルデリア感染症（通常、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｐａｃｉａおよび他のＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ属）、ブルーリ潰瘍（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ）、カリシウイルス感染症（ノロウイルスおよびサポウイルス）（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ科）、カンピロバクター感染症（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ属）、カンジダ症（モニリア症、鵞口瘡）（通常、Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓおよび他のカンジダ属）、猫引っかき病（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｈｅｎｓｅｌａｅ）、蜂巣炎（通常

、Ａ群ＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓおよびＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、シャーガス病（アメリカトリパノソーマ症）（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、軟性下疳（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｄｕｃｒｅｙｉ）、水痘（Ｖａｒｉｃｅｌｌａ ｚｏｓｔｅｒウイルス（ＶＺＶ））、チクングンヤ熱（アルファウイルス）、クラミジア感染症（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ感染症（台湾急性呼吸器因子またはＴＷＡＲ）（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、コレラ（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、クロモブラストミコーシス（通常、Ｆｏｎｓｅｃａｅａ ｐｅｄｒｏｓｏｉ）、肝吸虫症（Ｃｌｏｎｏｒｃｈｉｓ ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染症（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）、コクシジオイデス症（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓおよびＣｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｐｏｓａｄａｓｉｉ）、コロラドダニ熱（ＣＴＦ）（コロラドダニ熱ウイルス（ＣＴＦＶ））、感冒（急性ウイルス性鼻咽頭炎、急性コリザ）（通常、ライノウイルスおよびコロナウイルス）、クロイツフェルトヤコブ病（ＣＪＤ）（ＰＲＮＰ）、クリミアコンゴ出血熱（ＣＣＨＦ）（クリミアコンゴ出血熱ウイルス）、クリプトコックス症（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、クリプトスポリジウム症（Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ属）、皮膚幼虫移行症（ＣＬＭ）（通常、Ａｎｃｙｌｏｓｔｏｍａ ｂｒａｚｉｌｉｅｎｓｅ、多数の他の寄生虫）、シクロスポラ症（Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒａ ｃａｙｅｔａｎｅｎｓｉｓ）、嚢虫症（Ｔａｅｎｉａ ｓｏｌｉｕｍ）、サイトメガロウイルス感染症（サイトメガロウイルス）、デング熱（デングウイルス（ＤＥＮ－１、ＤＥＮ－２、ＤＥＮ－３、およびＤＥＮ－４）－フラビウイルス）、Ｄｅｓｍｏｄｅｓｍｕｓ感染症（Ｇｒｅｅｎ ａｌｇａｅ Ｄｅｓｍｏｄｅｓｍｕｓ ａｒｍａｔｕｓ）、Ｄｉｅｎｔａｍｏｅｂｉａｓｉｓ（Ｄｉｅｎｔａｍｏｅｂａ ｆｒａｇｉｌｉｓ）、ジフテリア（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、裂頭条虫症（Ｄｉｐｈｙｌｌｏｂｏｔｈｒｉｕｍ）、メジナ虫症（Ｄｒａｃｕｎｃｕｌｕｓ ｍｅｄｉｎｅｎｓｉｓ）、エボラ出血熱（エボラウイルス（ＥＢＯＶ））、エキノコックス症（Ｅｃｈｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属）、エーリキア症（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ属）、蟯虫症（Ｐｉｎｗｏｒｍ感染症）（Ｅｎｔｅｒｏｂｉｕｓ ｖｅｒｍｉｃｕｌａｒｉｓ）、エンテロコッカス感染症（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ属）、エンテロウイルス感染症（Ｅｎｔｅｒｏｖｉｒｕｓ属）、発疹チフス（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ）、伝染性紅斑（第５病）（パルボウイルスＢ１９）、突発性発疹（第６病）（ヒトヘルペスウイルス６（ＨＨＶ－６）およびヒトヘルペスウイルス７（ＨＨＶ－７））、肥大吸虫症（Ｆａｓｃｉｏｌｏｐｓｉｓ ｂｕｓｋｉ）、肝蛭症（Ｆａｓｃｉｏｌａ ｈｅｐａｔｉｃａおよびＦａｓｃｉｏｌａ ｇｉｇａｎｔｉｃａ）、致死性家族性不眠症（ＦＦＩ）（ＰＲＮＰ）、フィラリア症（Ｆｉｌａｒｉｏｉｄｅａ上科）、ウェルシュ菌による食中毒（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、自由生活アメーバ感染症（多数の病原体）、Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ感染症（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属）、ガス壊疽（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｌ ｍｙｏｎｅｃｒｏｓｉｓ）（通常、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ、他のＣｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属種）、ジオトリクム症（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｕｍ ｃａｎｄｉｄｕｍ）、ゲルストマンストロイスラーシャインカー症候群（ＧＳＳ）（ＰＲＮＰ）、ジアルジア症（Ｇｉａｒｄｉａ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌｉｓ）、鼻疽（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｍａｌｌｅｉ）、顎口虫症（Ｇｎａｔｈｏｓｔｏｍａ ｓｐｉｎｉｇｅｒｕｍおよびＧｎａｔｈｏｓｔｏｍａ ｈｉｓｐｉｄｕｍ）、淋病（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、鼠径部肉芽腫（ドノヴァン症）（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｇｒａｎｕｌｏｍａｔｉｓ）、Ａ群連鎖球菌感染症（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、Ｂ群連鎖球菌感染症（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、インフルエンザ菌感染症（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、手足口病（ＨＦＭＤ）（エンテロウイルス、主にコクサッキーＡウイルスおよびエンテロウイルス７１（ＥＶ７１））、ハンタウイルス肺症候群（ＨＰＳ）（Ｓｉｎ Ｎｏｍｂｒｅウイルス）、Ｈｅａｒｔｌａｎｄウイルス疾患（Ｈｅａｒｔｌａｎｄウイルス）、ヘリコバクターピ

ロリ感染症（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）、溶血性尿毒症症候群（ＨＵＳ）（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ０１５７：Ｈ７、０１１１、およびＯ１０４：Ｈ４）、腎症候性出血熱（ＨＦＲＳ）（Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ科）、Ａ型肝炎（Ａ型肝炎ウイルス）、Ｂ型肝炎（Ｂ型肝炎ウイルス）、Ｃ型肝炎（Ｃ型肝炎ウイルス）、Ｄ型肝炎（Ｄ型肝炎ウイルス）、Ｅ型肝炎（Ｅ型肝炎ウイルス）、単純ヘルペス（単純ヘルペスウイルス１および２（ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２））、ヒストプラスマ症（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、鉤虫感染症（Ａｎｃｙｌｏｓｔｏｍａ ｄｕｏｄｅｎａｌｅおよびＮｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ）、ヒトボカウイルス感染症（ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ））、ヒトエウィンギイエールリヒア症（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｅｗｉｎｇｉｉ）、ヒト顆粒球性アナプラズマ病（ＨＧＡ）（Ａｎａｐｌａｓｍａ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｐｈｉｌｕｍ）、ヒトメタニューモウイルス感染症（ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ））、ヒト単球性エールリヒア症（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症（ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ））、ヒトパラインフルエンザウイルス感染症（ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ））、膜様条虫症（Ｈｙｍｅｎｏｌｅｐｉｓ ｎａｎａおよびＨｙｍｅｎｏｌｅｐｉｓ ｄｉｍｉｎｕｔａ）、エプスタインバーウイルス感染性単核球症（Ｍｏｎｏ）（エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ））、インフルエンザ（流感）（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ科）、イソスポーラ症（Ｉｓｏｓｐｏｒａ ｂｅｌｌｉ）、川崎病（未知の病原体）、角膜炎（多数の病原体）、Ｋｉｎｇｅｌｌａ ｋｉｎｇａｅ感染症（Ｋｉｎｇｅｌｌａ ｋｉｎｇａｅ）、Ｋｕｒｕ（ＰＲＮＰ）、ラッサ熱（Ｌａｓｓａウイルス）、レジオネラ症（レジオネラ病（Ｌｅｇｉｏｎｎａｉｒｅｓ’ ｄｉｓｅａｓｅ））（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、レジオネラ症（ポンティアック熱）（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、リーシュマニア症（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ属）、ハンセン病（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅおよびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ）、レプトスピラ症（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ属）、リステリア症（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、ライム病（ライムボレリア症）（通常、Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉおよび他のＢｏｒｒｅｌｉａ種）、リンパ性フィラリア症（象皮病）（Ｗｕｃｈｅｒｅｒｉａ ｂａｎｃｒｏｆｔｉおよびＢｒｕｇｉａ ｍａｌａｙｉ）、リンパ球性脈絡髄膜炎（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ））、マラリア（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ属）、マールブルグ出血熱（ＭＨＦ）（Ｍａｒｂｕｒｇウイルス）、麻疹（麻疹ウイルス）、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）（中東呼吸器症候群コロナウイルス）、類鼻疽（Ｗｈｉｔｍｏｒｅ病）（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ）、髄膜炎（多数の病原体）、髄膜炎菌性疾患（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、横川吸虫症（通常、Ｍｅｔａｇｏｎｉｍｕｓ ｙｏｋａｇａｗａｉ）、微胞子虫症（Ｍｉｃｒｏ ｓｐｏｒｉｄｉａ ｐｈｙｌｕｍ）、伝染性軟属腫（ＭＣ）（伝染性軟属腫ウイルス（ＭＣＶ））、サル痘（サル痘ウイルス）、ムンプス（ムンプスウイルス）、発疹熱（地方性発疹チフス）（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｙｐｈｉ）、マイコプラズマ肺炎（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、菌腫（多くの種の細菌（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｏｍａ）および真菌（Ｅｕｍｙｃｅｔｏｍａ））、ハエ蛆症（寄生性双翅目ハエ幼虫）、新生児結膜炎（新生児眼炎）（最も一般的には、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓおよびＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ノカルジア症（通常、Ｎｏｃａｒｄｉａ ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓおよび他のノカルジア種）、オンコセルカ症（河川盲目症）（Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ ｖｏｌｖｕｌｕｓ）、パラコクシジオイド症（南アメリカブラストミセス症）（Ｐａｒａｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）、肺吸虫症（通常、Ｐａｒａｇｏｎｉｍｕｓ ｗｅｓｔｅｒｍａｎｉおよび他のＰａｒａｇｏｎｉｍｕｓ種）、パスツレラ症（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ属）、病原性腸疾患（例えば、腸内細菌の病原性株（例えば、病原性Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌ

e、病原性Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ、病原性Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ、病原性Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒなど）を原因とするものを含む）、Ｐｅｄｉｃｕｌｏｓｉｓ ｃａｐｉｔｉｓ（頭シラミ）（Ｐｅｄｉｃｕｌｕｓ ｈｕｍａｎｕｓ ｃａｐｉｔｉｓ）、Ｐｅｄｉｃｕｌｏｓｉｓ ｃｏｒｐｏｒｉｓ（カラダシラミ）（Ｐｅｄｉｃｕｌｕｓ ｈｕｍａｎｕｓ ｃｏｒｐｏｒｉｓ）、Ｐｅｄｉｃｕｌｏｓｉｓ ｐｕｂｉｓ（毛ジラミ（Ｐｕｂｉｃ ｌｉｃｅ）、カニシラミ）（Ｐｈｔｈｉｒｕｓ ｐｕｂｉｓ）、骨盤内炎症性疾患（ＰＩＤ）（多発性病原体）、百日咳（百日咳（Ｗｈｏｏｐｉｎｇ ｃｏｕｇｈ））（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、ペスト（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ）、肺炎球菌感染症（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ニューモシスチス肺炎（ＰＣＰ）（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｊｉｒｏｖｅｃｉｉ）、肺炎（複数の病原体）、ポリオ（ポリオウイルス）、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ感染症（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ属）、原発性アメーバ性髄膜脳炎（ＰＡＭ）（通常、Ｎａｅｇｌｅｒｉａ ｆｏｗｌｅｒｉ）、進行性多巣性白質脳症（ＪＣウイルス）、Ｐｓｉｔｔａｃｏｓｉｓ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｓｉｔｔａｃｉ）、Ｑ熱（Ｃｏｘｉｅｌｌａ ｂｕｒｎｅｔｉｉ）、狂犬病（狂犬病ウイルス）、ネズミ咬熱（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉｓもしくはＳｐｉｒｉｌｌｕｍ ｍｉｎｕｓ）、呼吸器合胞体ウイルス感染症（Ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｓｙｎｃｙｔｉａｌウイルス（ＲＳＶ））、リノスポリジウム症（Ｒｈｉｎｏ ｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｓｅｅｂｅｒｉ）、ライノウイルス感染症（ライノウイルス）、リケッチア感染症（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ属）、リケッチア痘瘡（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ａｋａｒｉ）、リフトバレー熱（ＲＶＦ）（リフトバレー熱ウイルス）、ロッキー山発疹熱（ＲＭＳＦ）（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、ロタウイルス感染症（ロタウイルス）、風疹（風疹ウイルス）、サルモネラ症（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属）、ＳＡＲＳ（重症急性呼吸器症候群）（ＳＡＲＳコロナウイルス）、疥癬（Ｓａｒｃｏｐｔｅｓ ｓｃａｂｉｅｉ）、住血吸虫症（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ属）、敗血症（例えば、Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａを含む複数の病原体）、細菌性赤痢（細菌性赤痢（Ｂａｃｉｌｌａｒｙ ｄｙｓｅｎｔｅｒｙ））（Ｓｈｉｇｅｌｌａ属）、帯状疱疹（帯状疱疹（Ｈｅｒｐｅｓ ｚｏｓｔｅｒ））（水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ））、天然痘（バリオラ（Ｖａｒｉｏｌａ））（Ｖａｒｉｏｌａ ｍａｊｏｒまたはＶａｒｉｏｌａ ｍｉｎｏｒ）、スポロトリクム症（Ｓｐｏｒｏｔｈｒｉｘ ｓｃｈｅｎｃｋｉｉ）、ブドウ球菌食中毒（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ属）、ブドウ球菌感染症（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ属）、糞線虫症（Ｓｔｒｏｎｇｙｌｏｉｄｅｓ ｓｔｅｒｃｏｒａｌｉｓ）、亜急性硬化性全脳炎（麻疹ウイルス）、梅毒（梅毒トレポネーマ）、条虫症（Ｔａｅｎｉａ属）、破傷風（破傷風（Ｌｏｃｋ ｊａｗ））（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、白癬性毛瘡（白癬性毛瘡（Ｂａｒｂｅｒ’ｓ ｉｔｃｈ））（通常、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ属）、頭部白癬（頭皮白癬（Ｒｉｎｇｗｏｒｍ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｃａｌｐ））（通常、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｔｏｎｓｕｒａｎｓ）、体部白癬（体部白癬（Ｒｉｎｇｗｏｒｍ ｏｆ ｔｈｅ Ｂｏｄｙ））（通常Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ属）、頑癬（Ｊｏｃｋ ｉｔｃｈ）（通常、Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ ｆｌｏｃｃｏｓｕｍ、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ、およびＴｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）、手白癬（手白癬（Ｒｉｎｇｗｏｒｍ ｏｆ ｔｈｅ Ｈａｎｄ））（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）、黒癬（通常、Ｈｏｒｔａｅａ ｗｅｒｎｅｃｋｉｉ）、足白癬（水虫（Ａｔｈｌｅｔｅ’ｓ ｆｏｏｔ））（通常Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ属）、爪白癬（爪甲真菌症）（通常、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ属）、癜風（Ｐｉｔｙｒｉａｓｉｓ ｖｅｒｓｉｃｏｌｏｒ）（Ｍａｌａｓｓｅｚｉａ属）、トキソカラ症（眼幼虫移行症（ＯＬＭ））（Ｔｏｘｏｃａｒａ ｃａｎｉｓまたはＴｏｘｏｃａｒａ ｃａｔｉ）、トキソカラ症（Ｖｉｓｃｅｒａｌ Ｌａｒｖａ Ｍｉｇｒａｎｓ（ＶＬＭ））（Ｔｏｘｏｃａｒａ ｃａｎｉｓまたはＴｏｘｏｃａｒａ ｃａｔｉ）、トラコーマ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、Ｔｒｉｎｏｃｈｃｃｌｉａｓｉｓ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）、旋毛虫症（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ ｓｐｉｒａｌｉｓ）、トリコモナス

症（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ ｖａｇｉｎａｌｉｓ）、鞭虫症（鞭虫感染症）（Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ）、結核（通常、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、野兎病（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）、腸チフス（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｕｂｓｐ．ｅｎｔｅｒｉｃａ、ｓｅｒｏｖａｒ ｔｙｐｈｉ）、ウレアプラズマウレアリチカム感染症（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ）、バレー熱（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓまたは Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｐｏｓａｄａｓｉｉ）、ベネズエラウマ脳炎（ベネズエラウマ脳炎ウイルス）、ベネズエラ出血熱（Ｇｕａｎａｒｉｔｏウイルス）、ウイルス性肺炎（複数のウイルス）、西ナイル熱（西ナイルウイルス）、白色砂毛（Ｔｉｎｅａ ｂｌａｎｃａ）（Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ ｂｅｉｇｅｌｉｉ）、エルシニア偽結核感染症（エルシニア偽結核）、エルシニア症（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）、黄熱病（黄熱ウイルス）、ジカウイルス病（ジカウイルス）、接合菌症（ケカビ目（Ｍｕｃｏｒａｌｅｓ ｏｒｄｅｒ）（ムコール菌症）およびハエカビ目（Ｅｎｔｏｍｏｐｈｔｈｏｒａｌｅｓ ｏｒｄｅｒ）（エントモフトラ症））などが含まれるが、これらに限定されない。概して、本明細書では、記載の方法に従って感染病態の検出は、１つ以上の抗原特異的抗体アイソタイプ、例えば、宿主に由来する試料に存在する、病原体由来抗原に対する宿主由来抗体を検出することによって、感染症に対する宿主免疫応答を検出することを含む。

【０１５２】

したがって、場合によっては、本方法は、試料中の病原体またはその成分に対する１つ以上の抗体の存在を検出することによって、対象由来または他のタイプの試料中の病原体の存在を検出する場合での用途を見出すことができる。本方法に従って検出され得る病原体には、例えば、ウイルス性病原体、細菌性病原体、真菌性病原体、原生動物性病原体などが含まれるが、これらに限定されない。容易に理解されるように、試料内の新たに発見された病原体の存在は、本開示の１つ以上の実施形態に従って、ポリヌクレオチドコンジュゲート抗原として使用するために病原体から抗原成分を単離することによってアッセイされ得る。

【０１５３】

場合によっては、本明細書に記載の方法には、例えば、ＨＩＶ－１抗原、ＨＩＶ－２抗原、ＨＩＶ－１／２抗原、ｐ１６、ｐ１４、ｐ２４、ｐ５５、ｇｐｌ２０、ｇｐｌ６０、ｇｐ４１、ｇｐ３６などが含まれるが、これらに限定されない、ＨＩＶ抗原に対する抗体の存在を検出および／または測定するであろう。

【０１５４】

本明細書で使用される自己免疫状態は、変化し、対象自体の免疫細胞が、健常な組織を攻撃したり、および／または対象が、対象由来の抗原に対して免疫応答を起こしたりするあらゆる状態を含み得、これには、症候性自己免疫疾患、無症候性自己免疫疾患、急性自己免疫疾患、慢性自己免疫疾患、移植誘発性自己免疫疾患などが含まれるが、これらに限定されない。理論に拘束されるものではないが、場合によっては、自己免疫疾患は、外来物質の存在によって誘発され得るが、活性化した免疫応答は、その外来物質に対して特異的に向けられるとは限らない。概して、自己免疫状態の影響を受ける、体の区域としては、例えば、血管、結合組織、内分泌組織（例えば、甲状腺組織、膵臓組織など）、関節組織、筋肉組織、造血組織（例えば、赤血球などを含む）、上皮組織（例えば、皮膚および消化管を含む）が含まれるが、これらに限定されない。自己免疫状態および自己免疫関連状態の非限定的な例には、例えば、急性散在性脳脊髄炎（ＡＤＥＭ）、急性壊死性出血性白質脳炎、アジソン病、副腎炎、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイド症、強直性脊椎炎、抗ＧＢＭ／抗ＴＢＭ腎炎、抗リン脂質症候群（ＡＰＳ）、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性肝炎、自己免疫性高脂質血症、自己免疫性免疫不全、自己免疫性内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性膵炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＡＴＰ）、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性蕁麻疹、軸索ニューロパチー、神経

ニューロパチー、バロー病、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（ＣＩＤＰ）、慢性再発性多発性骨髄炎（ＣＲＭＯ）、チャーグストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキーウイルス感染症、ＣＲＥＳＴ病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性ニューロパチー、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性食道炎、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エバンス症候群、線維筋痛症、線維化性肺胞炎、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、巨細胞性心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症（ＧＰＡ）（以前は「ウェゲナー」肉芽腫症と呼ばれていた）、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホシェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ腎症、ＩｇＧ４関連硬化性疾患、免疫調節性リポタンパク、封入体筋炎、間質性膀胱炎、若年性関節炎、若年性糖尿病（１型糖尿病）、若年性筋炎、川崎症候群、ランバートイートン症候群、白血球破砕性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状ＩｇＡ疾患（ＬＡＤ）、ループス（ＳＬＥ）、ライム病、慢性メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織疾患（ＭＣＴＤ）、モーレン潰瘍、ムッハハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎（デビック病）、好中球減少症、眼瘢痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ、ＰＡＮＤＡＳ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓに関連する小児自己免疫性精神神経障害）、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間血色素尿症（ＰＮＨ）、Ｐａｒｒｙ　Ｒｏｍｂｅｒｇ症候群、Ｐａｒｓｏｎｎａｇｅ－Ｔｕｒｎｅｒ症候群、扁平部炎（周辺性ブドウ膜炎）、天疱瘡、末梢ニューロパチー、静脈周囲性脳脊髄炎、悪性貧血、ＰＯＥＭＳ症候群、結節性多発性動脈炎、Ｉ型、ＩＩ型およびＩＩＩ型多腺性自己免疫症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発性軟骨炎、不穏下肢症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精子および精巣の自己免疫、スティッフパーソン症候群、亜急性細菌性心内膜炎（ＳＢＥ）、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、トロサハント症候群、横断性脊髄炎、１型糖尿病、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患（ＵＣＴＤ）、ブドウ膜炎、脈管炎、小水疱水疱性皮膚病、白斑、ウェゲナー肉芽腫症（現在は、多発血管炎性肉芽腫症（ＧＰＡ）と称される）などが含まれるが、これらに限定されない。概して、本明細書では、記載の方法に従って自己免疫状態の検出は、１つ以上の抗原特異的抗体アイソタイプ、例えば、対象に由来する試料に存在する、対象由来抗原に対する対象由来自己免疫抗体を検出することによって、対象の自己免疫応答を検出することを含む。場合によっては、特定の自己免疫疾患は、様々なアイソタイプの多数の異なる自己抗体の存在によって特徴付けられ得、したがって、本明細書に記載の検出のための多重化方法を用いて、自己免疫関連自己抗体のパネルのレベルを検出または測定してもよい。

【０１５５】

本開示の方法は、例えば、１つ以上の臨床的に関連する自己抗体（例えば、新生物に応答して対象によって生じる１つ以上の自己抗体が含まれるが、これに限定されない）を検出する場合での用途を見出すことができ、例えば、その新生物が、前立腺がん、乳がん、肺がん、大腸がん、胃がん、肝臓がん、および甲状腺がんのうちの１つ以上である場合が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の例では、検出は、疾患の症状の存在前に行ってよい。他の例では、検出は、例えば、１つ以上の疾患の症状の出現後であるが、治療前、治療中、治療後、またはこれらの組み合わせを含む、疾患の症状の存在後に行ってもよい。

【０１５６】
有用な自己抗体は、がん自己抗体（すなわち、がんの存在を示す抗体）を含んでもよい。がんの存在を特定または予測することができるがん自己抗体は、例えば、前立腺がん自己抗体（例えば、アルファ－メチルアシル－ＣｏＡラセマーゼ（ＡＭＡＣＲ）、ブロモドメイン含有２（ＢＲＤ２）、カルデスモン１（ＣＡＬＤ１）、真核生物翻訳開始因子４ガンマ、１（ＥＩＦ４Ｇ１）、カリクレイン－３（ＫＬＫ３）、ニューヨーク食道扁平上皮がん１（ＮＹ－ＥＳＯ－１）、パーキンソンタンパク質７（ＰＡＲＫ７）、ＰＣ４およびＳＦＲＳ　１相互作用タンパク質１（ＰＳＩＰ１）、リボソームタンパク質Ｌ１３ａ（ＲＰＬ１３Ａ）、リボソームタンパク質Ｌ２２（ＲＰＬ２２）、滑膜肉腫、Ｘブレイクポイント２（ＳＳＸ２）、（ＴＡＲ　ＤＮＡ結合タンパク質（ＴＡＲＤＢＰ）、トランスフェリン受容体（ＴＦＲＣ）、タリン１（ＴＬＮ１）、Ｘ抗原ファミリーメンバーＩＢ（ＸＡＧＥ１Ｂ）など）、乳がん自己抗体（アルファ２－ＨＳ糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、ＡＳＢ９アンキリンリピートおよびＳＯＣＳボックス含有９（ＡＳＢ９）、早期発症型乳がん１（ＢＲＣＡ１）、早期発症型乳がん２（ＢＲＣＡ２）、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（ＣＥＡＣＡＭ）遺伝子、真核生物伸長因子－２キナーゼ（ＥＥＦ２Ｋ）、ｅｒｂ－ｂ２受容体チロシンキナーゼ２（ＥＲＢＢ２）、熱ショックタンパク質６０（ＨＳＰ６０）、ムチン１（ＭＵＣ１）、Ｍｙｃ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤２Ａ（ｐ１６）、ＰＡＲＫ７、ＲＥＬＴ腫瘍壊死因子受容体、セリン活性部位含有１（ＳＥＲＡＣ１）、腫瘍タンパク質ｐ５３（ＴＰ５３）などの遺伝子産物に特異的に結合するバイオマーカー自己抗体が含まれるが、これらに限定されない）、肺がん自己抗体（例えば、アネキシンＡ１（ＡＮＸＡ１）、がん抗原１（ＣＡＧＥ１）、ＣＥＡＣＡＭ遺伝子、エノラーゼ１（ＥＮＯ１）、ＥＲＢＢ２、ＧＢＵ４－５、ガストリン放出ペプチド（ＧＲＰ）、ＭＵＣ１、Ｍｙｃ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ホスホグリコレートホスファターゼ（ＰＧＰ）、リボソームタンパク質ＳＡ（ＲＰＳＡ）、スーパーオキシドジスムターゼ２（ＳＯＤ２）、ＴＰ５３、トリオースホスフェートイソメラーゼ（ＴＰＩ）、チロシン３－モノオキシゲナーゼ／トリプトファン５－モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質シータ（ＹＷＨＡＱ）などの遺伝子産物に特異的に結合するバイオマーカー自己抗体が含まれるが、これらに限定されない）、大腸がん自己抗体（例えば、サイクリンＢ１（ＣＣＮＢ１）、サイクリンＤ１（ＣＣＮＤ１）、ＣＥＡＣＡＭ遺伝子、ＧＲＰ、ＨＳＰ６０、ＩＭＰ（イノシン５’－モノホスフェート）デヒドロゲナーゼ１（ＩＭＰＤＨ１）、インスリン様成長因子２ｍＲＮＡ結合タンパク質３（ＫＯＣ）、ムチン５ＡＣ（ＭＵＣ５ＡＣ）、Ｍｙｃ、ヌクレオビンディン１（ＮＵＣＢ１）、ヌクレオポリン６２ｋＤａ（ＮＵＰ６２）、ｐ１６、Ｆａｓ（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６）（ＴＮＦＲＳＦ６）、ＴＰ５３などの遺伝子産物に特異的に結合するバイオマーカー自己抗体が含まれるが、これらに限定されない）、胃がん自己抗体（例えば、ＣＥＡＣＡＭ遺伝子、ＧＲＰ、ＭＵＣ１、ＴＰ５３などの遺伝子産物に特異的に結合するバイオマーカー自己抗体が含まれるが、これらに限定されない）、肝臓がん自己抗体（例えば、アルファフェトプロテイン（ＡＦＰ）、アポトーシス誘導因子（ＡＩＦ）、アンジオテンシンＩ変換酵素（ＤＣＰ）、ＤＥＡＤ－ボックスヘリカーゼ３、Ｘ連鎖（ＤＤＸ３Ｘ）、ＥＥＦ２Ｋ、グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、甲状腺癌、ヒュルトレ細胞（ＨＣＣ）、不均一核内リボ核酸タンパク質Ａ２（ＨＮＲＮＰＡ２）、ＨＳＰ７０、ＮＵＰ６２、ポリシスチン１、一過性受容体電位チャネル相互作用（ＰＢＰ）、ペルオキシレドキシン（ＰＲＤＸ）、ＳＯＤ２、ＴＰ５３、ＴＰＩなどの遺伝子産物に特異的に結合するバイオマーカー自己抗体が含まれるが、これらに限定されない）などを含み得るが、これらに限定されない。

【０１５７】
したがって、場合によっては、本開示の対象は、がんを有する対象、がんを有すると疑われる対象、および／または例えば、前立腺がん、乳がん、肺がん、結腸がん、胃がん、肝臓がんなどを含むが、これらに限定されない、がんの治療を受けているもしくは治療されている対象を含み得る。

【０１５８】
場合によっては、本開示の対象は、１つ以上の腫瘍随伴症候群、すなわち、体内のがんによって生じた結果であるが、がん細胞の局所的存在によるものではない症候群を有するか、またはそれを有すると疑われ得る。腫瘍随伴症候群には、例えば、内分泌腫瘍随伴症候群（例えば、クッシング症候群、抗利尿ホルモン（ＡＤＨ）不適合分泌症候群（ＳＩＡＤＨ）、高カルシウム血症、低血糖症、カルチノイド症候群、多血症、高アルドステロン症などを含む）、神経学的腫瘍随伴症候群（例えば、ランバートイートン無筋力症症候群（ＬＥＭＳ）、傍腫瘍性小脳変性症、脳脊髄炎、辺縁系脳炎、脳幹脳炎、眼球クローヌスミオクローヌス運動失調症候群、抗ＮＭＤＡ受容体脳炎、多発性筋炎などを含む）、皮膚粘膜腫瘍随伴症候群（例えば、黒色表皮症、皮膚筋炎、レーザートレラー徴候、壊死融解性移動性紅斑、スイート症候群、葉状皮膚乳頭腫症、壊疽性膿皮症、後天性汎発性多毛症などを含む）、血液学的腫瘍随伴症候群（例えば、顆粒球増加症、多血症、トルソー徴候、非細菌性血栓性心内膜炎、貧血などを含む）、膜性糸球体腎炎、腫瘍性骨軟化症、シュタウファー症候群、腫瘍性熱などが含まれるが、これらに限定されない。したがって、本方法は、例えば、対象における自己抗体の検出によって、対象における１つ以上の腫瘍随伴症候群または腫瘍随伴症候群に関連する新生物の存在を特定し得るか、またはその存在を予測し得る。

【０１５９】
場合によっては、本開示の方法は、例えば、ＭＯＲＣファミリーＣＷ型ジンクフィンガー３（ＮＸＰ２）、３連モチーフ含有３３（ＴＩＦｌｙ）、低分子ユビキチン様修飾因子活性化酵素（ＳＡＥ）などの１つ以上の遺伝子産物に対する自己抗体が含まれるが、これらに限定されない、皮膚筋炎に関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含む。

【０１６０】
場合によっては、本開示の方法は、例えば、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩに対する自己抗体を含むが、これに限定されない、全身性硬化症に関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含む。

【０１６１】
場合によっては、本開示の方法は、電位依存性カルシウムチャネル遺伝子の１つ以上の遺伝子産物に対する自己抗体を含むが、これに限定されない、ランバートイートン筋無力症候群に関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含む。

【０１６２】
場合によっては、本開示の方法は、タイチン（Ｔｉｔｉｎ）、リアノジン受容体などの１つ以上の遺伝子産物に対する自己抗体を含むが、これらに限定されない、重症筋無力症に関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含む。

【０１６３】
場合によっては、本開示の方法は、デスモプラキンＩ、エスモプラキンＩＩ、エンボプラキン、プレクチン、ペリプラキンなどの１つ以上の遺伝子産物に対する自己抗体を含むが、これらに限定されない、腫瘍随伴性天疱瘡と関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含む。

【０１６４】
場合によっては、本開示の方法は、Ｈｕ（抗神経自己抗体１（ＡＮＮＡ１）、Ｙｏ（プルキンエ細胞細胞質抗体タイプ１（ＰＣＡ－１））、Ｒｉ（抗神経自己抗体２（ＡＮＮＡ２）、Ｍａｌ／２（腫瘍性抗原Ｍａｌ／２　ＰＮＭＡ１／２）、ＣＶ２（ＣＶ２／ＣＲＭＰ５－Ａｂ）、アンフィファイシン、ＳＲＹ（性決定領域Ｙ）－ボックス１（ＳＯＸ１）、Ｚｉｃファミリーメンバー４（Ｚｉｃ４）、Ｔｒ（デルタ／ノッチ様上皮成長因子関連受容体（ＤＮＥＲ））、タンパク質キナーゼＣ、ガンマ（ＰＫＣｙ）、ＣＡＲＰＶＩＩ、Ｃａ／ＡＲＨＧＡＰ２６などの１つ以上の遺伝子産物／抗原に対する自己抗体を含むが、これらに限定されない、腫瘍随伴性神経疾患と関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含む。

【０１６５】
場合によっては、本開示の対象は、例えば、自己免疫成分による神経障害（例えば、神経炎症疾患、炎症性神経筋疾患など）を含み、例えば、重症筋無力症、多発性硬化症などが含まれるが、これらに限定されない、神経障害を有するか、それを有する疑いがあるか、またはその治療を受けている対象を含み得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、電位依存性カリウムチャネル複合体（例えば、ＶＧＫＣ、ＬＧ１１、ＣＡＳＰＲ２など）の成分に結合する自己抗体、ＮＭＤＡ受容体（例えば、ＮＲ２）に結合する自己抗体、ＡＭＰＡ受容体に結合する自己抗体、ＧＡＢＡＡ／Ｂ受容体に結合する自己抗体、ジペプチジルペプチダーゼ様タンパク質－６（ＤＰＰＸ）に結合する自己抗体、ＩｇＬＯＮ５に結合する抗体、重症筋無力症の病原性成分に結合する自己抗体、または概して重症筋無力症と関連する自己抗体（例えば、抗アセチルコリン受容体（ＡＣｈＲ）抗体、抗筋性特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）抗体、抗リポタンパク関連タンパク質（ＬＲＰ）４、アグリンに対する抗体、コルタクチンに対する抗体などが含まれるが、これらに限定されない）、多発性硬化症の病原性成分に結合する自己抗体または概して多発性硬化症と関連する自己抗体（例えば、抗アクアポリン４抗体、抗ミエリン抗体（抗ＭＯＧ、抗ＭＢＰなど）、抗ＫＩＲ４．１抗体、抗ＳＰＡＧ１６抗体などを含む）が含まれるが、これらに限定されない、神経障害と関連する自己抗体の存在を特定または予測することを含み得る。

【０１６６】
場合によっては、本開示の対象は、胆汁性肝硬変を有するか、それを有する疑いがあるか、またはその治療を受けている対象であり得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、抗Ｍ２ミトコンドリア抗体を含むが、これに限定されない、１つ以上の胆汁性肝硬変関連抗体の検出または測定を通じて、胆汁性肝硬変の存在を特定または予測することを含み得る。

【０１６７】
場合によっては、本開示の対象は、自己免疫リウマチ性疾患を有するか、それを有する疑いがあるか、またはその治療を受けている対象であり得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、抗核抗体、抗ＳＳＡ自己抗体（抗シェーグレン症候群関連抗原Ａ）、抗シェーグレン症候群タイプＢ（ＳＳＢ）抗体、抗スミス抗体、抗Ｕ１ＲＮＰ抗体、抗二本鎖ＤＮＡ抗体、抗リン脂質抗体、抗シトルリン化タンパク質抗体などを含むが、これらに限定されない、１つ以上の自己免疫性リウマチ性疾患関連抗体の検出または測定を通じて、自己免疫性リウマチ性疾患の存在を特定または予測することを含み得る。

【０１６８】
場合によっては、本開示の対象は、特発性炎症性筋障害（ＩＩＭ）（または別個に、多発性筋炎（ＰＭ）および皮膚筋炎（ＤＭ）とも称される）を有するか、それを有する疑いがあるか、またはその治療を受けている対象であり得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、抗Ｊｏ－１抗体、アミノアシル－ｔＲＮＡシンテターゼ自己抗体（例えば、Ｊｏ－１（ヒスチジル）抗体、ＰＬ－７（スレオニル）抗体、ＰＬ－１２（アラニル）抗体、ＯＪ（イソロイシル）抗体、ＥＪ（グリシル）抗体、ＫＳ（アスパラギニル）抗体、Ｚｏ（フェニルアラニル）抗体、およびＨａ（チロシル）抗体など）、抗Ｍｉ－２抗体、抗ＭＤＡ５抗体、抗ＮＸＰ２抗体、抗ＳＡＥ抗体、ならびに抗ＴＩＦ１γ（ｐ１５５／１４０）抗体などを含むが、これらに限定されない、１つ以上のＩＩＭ関連抗体の検出または測定を通じて、ＩＩＭの存在を特定または予測することを含み得る。

【０１６９】
場合によっては、本開示の対象は、非炎症性筋肉壊死を有するか、それを有する疑いがあるか、またはその治療を受けている対象であり得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、抗３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－コエンザイムＡレダクターゼ（ＨＭＧＣＲ）抗体を含むが、これに限定されない、１つ以上の非炎症性筋肉壊死関連抗体の検出または測定を通じて、非炎症性筋肉壊死の存在を特定または予測することを含み得る。

【０１７０】
場合によっては、本開示の対象は、全身性硬化症および混合性結合組織疾患を有するか、それらを有する疑いがあるか、またはそれらの治療を受けている対象であり得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、抗ＰＭ－Ｓｃｌ抗体、抗Ｋｕ抗体、および抗Ｕ１ＲＮＰ抗体などを含むが、これに限定されない、１つ以上の全身性硬化症または混合性結合組織疾患関連抗体の検出または測定を通じて、全身性硬化症および／または混合性結合組織疾患の存在を特定または予測することを含み得る。
【０１７１】
場合によっては、本開示の対象は、代謝性疾患（例えば、１型糖尿病を含む糖尿病）を有するか、それを有する疑いがあるが、またはその治療を受けている対象であり得る。したがって、場合によっては、本開示の方法は、例えば、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）抗体、抗チロシンホスファターゼ様分子抗体、抗ＩＡ－２抗体、および抗インスリン抗体（例えば１型糖尿病を検出および／またはモニタリングするのに有用であるようなもの）を含むが、これに限定されない、１つ以上の代謝性疾患関連抗体の検出または測定を通じて、代謝性疾患の存在を特定または予測することを含み得る。
【０１７２】
場合によっては、本開示の障害、および対象における状態の特定のために、または対象における状態の予後診断の一部として本明細書に記載の方法を用いて検出され得る自己抗体には、例えば、Ｚａｅｎｋｅｒ　＆　Ｚｉｍａｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ　Ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ　Ｐｒｅｖ．（２０１３）　２２（１２）：２１６１－８１、Ｌｅｓｌｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ（２００１）　１０８（１０）：１４１７－２２、Ｄａｍｏｉｓｅａｕｘ　ｅｔ　ａｌ．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ（２０１５）　１４：５５５－５６３（これらの開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが含まれるが、これらに限定されない。
【０１７３】
場合によっては、本明細書に記載の方法は、治療後、例えば、組織移植を含む手術後、がん治療後、感染状態の治療後、自己免疫状態の治療後などの患者をモニタリングする場合での用途を見出すことができる。場合によっては、本明細書に記載の方法は、がんの外科的治療後の対象をモニタリングする、例えば、外科的がん除去後のがんの有無と関連する自己抗体レベルをモニタリングするために使用することができる。例えば、一実施形態では、本明細書に記載の方法は、甲状腺摘出後の１つ以上のサイログロブリン自己抗体をモニタリングするために使用することができる。場合によっては、本開示の方法は、１つ以上の抗スレオグロブリン抗体、１つ以上の抗Ｃｌｑ抗体、１つ以上の抗ＭＰＯ抗体、１つ以上の抗トランスグルタミナーゼ抗体、１つ以上の抗－Ｓｍ／ＲＮＰ抗体、１つ以上の抗ＧＡＤ６５抗体、１つ以上の抗Ｒｏ／ＳＳＡ抗体、１つ以上の抗ＪＯ－１抗体、１つ以上の抗ＩＡ－２抗体、１つ以上の抗Ｌａ／ＳＳＢ抗体、１つ以上の抗ＰＲ３抗体、１つ以上の抗Ｓｍ　Ｂ／Ｂ’抗体、１つ以上の抗ＣＥＮＰ－Ａ抗体、１つ以上の抗Ｕｌ－ｓｎＲＮＰ－Ｃ抗体、１つ以上の抗グリアジン抗体、１つ以上の抗ヒストンＨ３抗体、１つ以上の抗Ｈ２Ｂ抗体、１つ以上の抗ＳｍＤ抗体、１つ以上の抗ヒストンＨ４抗体、または１つ以上の抗インスリンＨ抗体を検出する場合での用途を見出す。したがって、場合によっては、本方法の抗原は、１つ以上のスレオグロブリン抗原、１つ以上のＣｌｑ抗原、１つ以上のＭＰＯ抗原、１つ以上のトランスグルタミナーゼ抗原、１つ以上のＳｍ／ＲＮＰ抗原、１つ以上のＧＡＤ６５抗原、１つ以上のＲｏ／ＳＳＡ抗原、１つ以上のＪＯ－１抗原、１つ以上のＩＡ－２抗原、１つ以上のＬａ／ＳＳＢ抗原、１つ以上のＰＲ３抗原、１つ以上のＳｍ　Ｂ／Ｂ’抗原、１つ以上のＣＥＮＰ－Ａ抗原、１つ以上のＵｌ－ｓｎＲＮＰ－Ｃ抗原、１つ以上のグリアジン抗原、１つ以上のヒストンＨ３抗原、１つ以上のＨ２Ｂ抗原、１つ以上のＳｍＤ抗原、１つ以上のヒストンＨ４抗原、または１つ以上のインスリンＨ抗原であり得る。ある特定の多重アッセイでは、特定のアッセイは、本明細書に記載のポリヌクレオチドに個別にコンジュゲートされた複数の抗原の組み合わせを含み得、それ

らの抗原は、それぞれ、スレオグロブリン抗原、Ｃｌｑ抗原、ＭＰＯ抗原、トランスグルタミナーゼ抗原、Ｓｍ／ＲＮＰ抗原、ＧＡＤ６５抗原、Ｒｏ／ＳＳＡ抗原、ＪＯ－１抗原、ＩＡ－２抗原、Ｌａ／ＳＳＢ抗原、ＰＲ３抗原、Ｓｍ　Ｂ／Ｂ’抗原、ＣＥＮＰ－Ａ抗原、Ｕｌ－ｓｎＲＮＰ－Ｃ抗原、グリアジン抗原、ヒストンＨ３抗原、Ｈ２Ｂ抗原、ＳｍＤ抗原、ヒストンＨ４抗原、および／またはインスリンＨ抗原であり得るか、それらから選択され得る。

【０１７４】

場合によっては、本方法は、試料に存在する１つ以上の抗体アイソタイプの測定値を正規化する場合での用途を見出す。例えば、場合によっては、特定の抗体アイソタイプのレベルは、試料に存在する第２の抗体のレベルに従って正規化されてもよい。場合によっては、抗体のレベルは、試料に存在する１つ以上の免疫グロブリンのレベルに従って正規化されてもよい。場合によっては、試料中の免疫グロブリンのレベルは、免疫グロブリンの欠乏を示し得る。

【０１７５】

本明細書に記載の方法の実施において、任意の便利な試料を使用してもよい。場合によっては、対象から得た試料、例えば、患者試料には、例えば、組織試料（例えば生検試料）が含まれるが、これに限定されない。本明細書で使用する、組織試料とは、概して、細胞とおよび他の成分を含む試料を指し、様々であり得るが、概して、皮膚組織試料、筋肉組織試料、腫瘍組織試料、血液試料、骨試料、骨髄試料、脳組織試料、結合組織試料などを含む。場合によっては、例えば、組織試料が固体または半固体である場合、本明細書に記載の方法で使用する前に、組織試料を液化してもよく、または細胞試料を解離および／または均質化してもよい。場合によっては、例えば、組織が液体組織試料、例えば血液である場合、このような前処理は不必要である。場合によっては、本明細書に記載の方法は、前処理なしに、固体または半固体の組織試料、例えば、組織切片、または固体もしくは半固体組織から得た細胞の細胞学的試料で、例えば、組織学的または細胞学的方法で実施するようにして実施してもよい。したがって、場合によっては、本方法は、例えば、抗体、組織学的または細胞学的試料の特定のために、染色における用途を見出すことができる。

【０１７６】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体検出方法の特異性は、試料中の抗ポリヌクレオチド抗体の存在とは無関係である。したがって、記載されているアッセイは、抗ポリヌクレオチド抗体が試料に存在するかどうかに関わらず実施され得る。場合によっては、本開示の試料は、抗ポリヌクレオチド抗体を含むことが知られている試料であってもよい。場合によっては、本開示の試料は、抗ポリヌクレオチド抗体を含んでいる疑いがある試料であってもよい。本明細書で使用される、「抗ポリヌクレオチド抗体」という用語は、例えば、抗ＤＮＡ自己抗体、抗二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）抗体、抗一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）抗体などを含むが、これらに限定されない、１つ以上のポリヌクレオチドに特異的に結合する対象の免疫系によって産生される抗体を含む。

【０１７７】

抗ＤＮＡ抗体は、一般集団で多少見られ、ある特定の対象（自己免疫疾患になる素因を有する対象を含む）は、血液中に抗ＤＮＡ抗体を示す可能性が高くなる。加えて、ある特定の条件は、抗ＤＮＡ抗体の存在および／またはレベルの増加と相関しているか、または相関し得る。このような状態には、例えば、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、

【０１７８】

リウマチ性疾患（例えば、抗リン脂質抗体症候群、関節リウマチ、ＣＲＥＳＴ（石灰沈着症、レイノー病、食道運動障害、手指硬化症、および毛細血管拡張症）、強皮症、脈管炎、若年性関節リウマチ、混合性結合組織疾患など）、悪性疾患（例えば、リンパ腫およびその他のがん）、感染性疾患（例えば、結核およびその他の感染）、内分泌障害、肝炎（例えば、自己免疫性肝炎、慢性Ｂ型肝炎など）、サルコイドーシス、家族性地中海熱、特発性血小板減少性紫斑病、リウマチ性心疾患、重症筋無力症、末期腎不全、潰瘍性大腸

炎、てんかん、線維筋痛症、骨軟骨炎、変形性関節症、エバンス症候群、皮膚乾癬、発疹、多発性硬化症などが含まれるが、これらに限定されない。抗ＤＮＡ抗体の存在またはレベルの増加と関連する対象および状態には、例えば、Ｉｓｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ（Ｏｘｆｏｒｄ）．（２００７）　４６（７）：１０５２－６、Ａｔｔａｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｓａｕｄｉ　ＭｅｄＪ．（２０１０）　３１（７）：７８１－７、およびＷｉｌｌｉａｍｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．（２００１）　９８（４）：１７９３－８（これらの開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが含まれるが、これらに限定されない。

【０１７９】

場合によっては、患者試料（血液、血清など）には、抗ポリヌクレオチド抗体（例えば、上記の状態および一般的なヒト患者集団と関連付けられる抗ＤＮＡ抗体を含む）を含んでもよく、またはそれを含む可能性が高くてもよく、またはそれを含む疑いがあってもよい。本開示の発明者らは、ある特定の場合では、抗ポリヌクレオチド抗体が、理論に拘束されるものではないが、標的抗体による所望の抗原の凝集を妨げたり、および／またはポリヌクレオチド結合抗原と抗ポリヌクレオチド抗体との偽陽性凝集を引き起こしたりすることによって、凝集アッセイを妨げ得ることを発見した。場合によっては、本明細書に記載の凝集アッセイに対する抗ポリヌクレオチド抗体の悪影響は、凝集反応への非結合（すなわち、遊離）ポリヌクレオチドの添加によって軽減され得る。

【０１８０】

ある特定の場合では、本開示の方法は、遊離ＤＮＡ、例えば、遊離ｓｓＤＮＡ）を凝集反応物に添加することを含み、これは、このような遊離ＤＮＡを、抗ＤＮＡ抗体を含むことが知られているか、または予測される試料に添加する場合と、遊離ＤＮＡを、抗ＤＮＡ抗体の存在が知られていないかまたは予測されない試料に予防的に添加する場合と、を含む。凝集反応における遊離ＤＮＡの有用な量は、変化し、有用な濃度は、０．１μＭ以下～１ｍＭ以上の範囲であり得、例えば、０．１μＭ～１ｍＭ、１μＭ～１ｍＭ、２μＭ～１ｍＭ、３μＭ～１ｍＭ、４μＭ～１ｍＭ、５μＭ～１ｍＭ、６μＭ～１ｍＭ、７μＭ～１ｍＭ、８μＭ～１ｍＭ、９μＭ～１ｍＭ、１０μＭ～１ｍＭ、０．１μＭ～１００μＭ、１μＭ～１００μＭ、２μＭ～１００μＭ、３μＭ～１００μＭ、４μＭ～１００μＭ、５μＭ～１００μＭ、６μＭ～１００μＭ、７μＭ～１００μＭ、８μＭ～１００μＭ、９μＭ～１００μＭ、１０μＭ～１００μＭなどを含むが、これらに限定されない。凝集反応における有用な遊離ＤＮＡ（すなわち、競合ＤＮＡまたはブロッキングＤＮＡ）は概して、抗原結合ポリヌクレオチドまたは他のポリヌクレオチド（例えば、架橋ポリヌクレオチド、スプリントポリヌクレオチドなど）に対して、有意な相同性を有さず、この場合、「有意な相同性」は、通常の反応条件下でハイブリダイズするのに十分、相同性があると見なされる。したがって、このような遊離ＤＮＡの構造（例えば、長さ、ヌクレオチド含有量、配列など）は、大きく変動するであろう。場合によっては、遊離ＤＮＡは、５０個以下～１００個以上のヌクレオチドの範囲であり得、例えば、５０～１００個のヌクレオチド、５０～９５個のヌクレオチド、５０～９０個のヌクレオチド、５０～８５個のヌクレオチド、５０～８０個のヌクレオチド、５５～１００個のヌクレオチド、６０～１００個のヌクレオチド、６０～９０個のヌクレオチド、６０～８０個のヌクレオチド、６０個のヌクレオチド、６５個のヌクレオチド、７０個のヌクレオチド、７５個のヌクレオチド、８０個のヌクレオチド、８５個のヌクレオチドなどを含むが、これらに限定されない。場合によっては、遊離ＤＮＡのＧ／Ｃ含有量は、５０％以下であり、例えば、３０％～５０％、３５％～５０％、４０％～５０％、４５％～５０％などを含むが、これらに限定されない。

【０１８１】

場合によっては、試料は、血液試料である。血液試料は、全血試料として分析してもよく、部分的または全体的に分画してもよい。場合によっては、分画した血液試料は、本明細書に記載の検出方法が実施され得る血清試料、または本明細書に記載の検出方法が実施

され得る血漿試料を生成し得る。

【０１８２】

場合によっては、非侵襲的におよび／または対象にいずれの損傷もなしに試料の採取が実施されるように、試料は、排出体液または半固体であってよい。

【０１８３】

対象となる排出体液および／または半固体としては、例えば、尿、唾液、涙、汗、膿、および糞便が含まれるが、これらに限定されない。場合によっては、本方法の高感度により、従来の凝集方法および／またはＥＬＩＳＡでは不可能である排出体液または半固体中の抗体アイソタイプの検出が可能になる。

【０１８４】

場合によっては、例えば、バイオテクノロジーおよび／または薬学的用途において、特定の抗体アイソタイプを生成し、および／または特定の抗体アイソタイプを標的とする薬剤の活性をスクリーニングするプロセスにおけるステップとして、試料は、特定の抗体アイソタイプの存在についてアッセイされ得る、および／または特定の抗体アイソタイプの量について測定（例えば、滴定）され得る。場合によっては、本明細書に記載の方法の用途が見出される試料は、研究室で生成される細胞試料である。このような細胞研究用試料は、インビトロまたはインビボで生成され得る。場合によっては、細胞試料は、インビトロ由来のハイブリドーマであり、対象の抗体は、ハイブリドーマによって産生される抗体である。場合によっては、細胞試料は、インビボ由来のハイブリドーマであり、対象の抗体は、ハイブリドーマによって産生される抗体である。したがって、場合によっては、本明細書に記載の本方法、および本明細書に記載の多重化方法は、ハイブリドーマをスクリーニングする場合での用途を見出す。ハイブリドーマのスクリーニングは、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）などを含むが、これらに限定されない、所望の天然または合成により産生された抗体の検出のために実施され得る。

【０１８５】

記載の方法の用途が見出されるハイブリドーマ産生および分析の方法は、当業者には容易に明らかであり、例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｅｄ．Ｂｕｒｎｓ，Ｒ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２００５（この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたものが含まれる。

【０１８６】

場合によっては、本明細書に記載の方法に従って生成された関連する伸長されたポリヌクレオチドまたは増幅産物の検出を通じて、抗体を発現する細胞、例えば、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ハイブリドーマ細胞などは、抗体、例えば、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体などを発現するものと特定され得る。場合によっては、ポリヌクレオチド結合抗原および抗体の凝集に基づいて生成された伸長および／または増幅産物は、検出可能なプローブ核酸、例えば、蛍光タグ化プローブ核酸を用いて検出され、伸長および／または増幅産物と関連する細胞の特定を可能にし得る。例えば、場合によっては、ポリヌクレオチド結合抗原および抗体の凝集に基づいて生成された伸長および／または増幅産物は、検出可能なプローブ核酸、例えば、蛍光タグ化プローブ核酸を用いて検出され、抗体を産生した細胞の特定を可能にし得る。場合によっては、このような特定は、特定された細胞の抗体の抗原への相対的な結合の定量化を可能にする（例えば、抗原抗体結合または優れた抗原抗体結合を有する抗体を産生する細胞の特定を可能にする）。場合によっては、例えば、多数の異なる細胞を並列に、または多重形式でアッセイする場合、このような特定は、抗体の産生に基づいて、および／または比較的優れた抗体の産生に基づいて、（例えば、ＦＡＣＳによって）細胞の選別を可能にする。

【０１８７】

場合によっては、本明細書に記載の方法は、抗体を生成するために免疫化した宿主動物のスクリーニングする場合での用途を見出す。任意の利便的な宿主動物抗体産生系は、本

明細書に記載の方法と組み合わせる場合での用途を見出すことができ、例えば、上記の対象動物を含み得るが、これらに限定されない。

【０１８８】

バイオテクノロジーおよび／または薬学的用途は、単一特異性および多重特異性（例えば、二重特異性）抗原結合メンバーの使用および／または産生を包含するので、本明細書に記載の本方法は、概して、単一特異性または多重特異性抗体、例えば、単一特異性または多重特異性抗体（二重特異性抗体など）の検出用に構成され得る。

【０１８９】

本明細書に記載の方法および組成物は、本明細書に記載されていない追加の有用性を有し得るため、上記の使用は、決して限定するものと見なされるべきではない。

【０１９０】

Ｅ．組成物およびキット

本開示は、本明細書に記載の方法を実施するのに有用な組成物、例えば試薬、キット、およびデバイスを含む。本明細書に記載の試薬のいずれかは、抗体を検出するための方法またはキットにおいて個々に用途を見出すことができる。例えば、本開示は、記載のアッセイに有用な抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートを提供する。

【０１９１】

上記のように、抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートは、任意の利便的な方法によって生成され得る。場合によっては、ポリヌクレオチドおよび抗原または抗体結合剤は、例えば、単結合を介して直接連結してもよく、あるいは、例えば、好適なリンカー、例えば、ポリマーリンカー、化学リンカー、または１つ以上の連結分子もしくは部分の使用を通じて間接的に連結してもよい。場合によっては、抗原または抗体結合剤へのポリヌクレオチドの結合は、１つ以上の共有相互作用によるものであり得る。場合によっては、抗原は、例えば、ポリヌクレオチドへの結合のために、反応性官能基の追加または作製によって官能化され得る。場合によっては、ポリヌクレオチドは、例えば、抗原への結合のために、反応性官能基の追加または作製によって官能化され得る。官能化抗原、抗体結合剤、および／またはポリヌクレオチドは、コンジュゲートのために、任意の利便的な反応性官能基を含むように改変してもよい。場合によっては、ポリヌクレオチドは、アミン官能基、例えば、末端アミン官能基、カルボキシル官能基、例えば、末端カルボキシル官能基またはスルフヒドリル基、チオール官能基、例えば、チオール化またはチオール修飾オリゴヌクレオチドなどの場合などを含む、１つ以上の官能基を含むように官能化される。

【０１９２】

ポリヌクレオチドがアミン官能基および／またはカルボキシル官能基および／またはスルフヒドリル基およびポリペプチド抗原または抗体で官能化されている場合では、官能化ポリヌクレオチドおよびポリペプチド抗原または抗体は、任意の利便的なタンパク質コンジュゲート方法によってコンジュゲートしてよく、その方法には、例えば、グルタルアルデヒド架橋、カルボジイミド架橋、スクシンイミドエステル架橋、イミドエステル、架橋、マレイミド架橋、ヨードアセトアミド架橋、ベンジジン架橋、過ヨウ素酸架橋、イソチオシアネート架橋などが含まれるが、これらに限定されない、タンパク質架橋が含まれるが、これらに限定されない。このようなコンジュゲーション方法は、任意に、ポリペプチド抗原のアミノ酸残基の反応性側鎖基（例えば、タンパク質のＬｙｓ、Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｈｉｓ、またはＡｒｇアミノ酸残基の反応性側鎖基、すなわち、ポリペプチド連結基は、アミノ反応性、チオール反応性、ヒドロキシル反応性、イミダゾリル反応性、またはグアニジニル反応性であってもよい）を用いてもよい。場合によっては、ポリヌクレオチドの適合性官能基にコンジュゲートする、化学選択的反応性官能基を利用してもよい。対象のポリペプチド抗原に含めるための化学選択的な反応性官能基には、アジド基、アルキニル基、ホスフィン基、システイン残基、Ｃ末端チオエステル、アリールアジド、マレイミド、カルボジイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）－エステ

ル、ヒドラジド、ＰＦＰ－エステル、ヒドロキシメチルホスフィン、ソラレン、イミドエステル、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、アミノオキシ－、アルデヒド、ケト、クロロアセチル、ブロモアセチル、およびビニルスルホンが含まれるが、これらに限定されない。さらなる例示的な官能基および架橋方法およびそのような官能基を用いたコンジュゲーション方法は、例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，“Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ” ２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００８（この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１９３】

天然か合成かにかかわらず、コンジュゲートする抗原または抗体結合剤およびポリヌクレオチドに存在する特定の官能基に応じて、場合によっては、有用なコンジュゲーション試薬には、例えば、ホモ二官能性コンジュゲーション試薬（例えば、（ビス（２－［スクシンイミドオキシカルボニルオキシ］エチル）スルホン、１，４－ジ－（３’－［２’ピリジルジチオ］－プロピオンアミド）ブタン、ジスクシンイミジルスベレート、ジスクシンイミジルタルトレート、スルホジスクシンイミジルタルトレート、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）、３，３’－ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）など）、ヘテロ二官能性共役試薬（例えば、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、Ｎ－γ－マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、Ｎ－γ－マレイミドブチリルオキシスルホスクシンイミドエステル、Ｎ－（８－マレイミドカプロン酸）ヒドラジド、Ｎ－（ε－マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミドエステル、Ｎ－（８－マレイミドカプロイルオキシ）スルホスクシンイミドエステル、Ｎ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアネート、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート、スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノ安息香酸塩、スルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート、スルホスクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩、マレイミドＰＥＧ Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルなど）、光反応性コンジュゲーション試薬（例えば、ｐ－アジドベンゾイルヒドラジド、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンジルオキシスクシンイミド、ｐ－アジドフェニルグリオキサール一水和物、Ｎ－（４－［ｐ－アジドサリチルアミド］ブチル）－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド、ビス（Ｐ－［４－アジドサリチルアミド］－エチル）ジスルフィド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジド安息香酸、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３－ジチオプロピオネート、スルホスクシンイミジル２－（ｍ－アジドオンイトロベンズアミド）－エチル－１，３’－プロピオネート、スルホスクシンイミジル６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート、スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニルジチオ）プロピオネート、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３－ジチオプロピオン酸など）が含まれ得るが、これらに限定されない。

【０１９４】

ポリヌクレオチドがチオール官能基で官能化されている場合（例えば、チオール化オリゴヌクレオチド）では、対象となる抗原または抗体結合剤へのコンジュゲーションは、本明細書に記載のスルホ－スルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）コンジュゲーションの使用を通じて達成され得る。

【０１９５】

ポリヌクレオチドが小分子にコンジュゲートされる場合では、コンジュゲーションの任

意の利便的な方法は、例えば、小分子における利用可能な反応基、およびポリヌクレオチドにおける特定の修飾の有無を含む様々な因子に応じて、ポリヌクレオチドを小分子に共有結合させる場合での用途を見出すことができる。場合によっては、アミン官能化ポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されるものを含むＮＨＳエステルを含むが、これに限定されない、アミン反応性架橋剤を介して所望の小分子にコンジュゲートされ得る。

【０１９６】

場合によっては、抗原または抗体結合剤へのポリヌクレオチドの結合は、ポリヌクレオチドにすでに存在する既存の官能部分を利用する。場合によっては、ポリヌクレオチドを抗原または抗体にコンジュゲートする際に利用される官能部分を、ポリヌクレオチドに付加して、官能化ポリヌクレオチドを生成する。官能化ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドを修飾することによって、または修飾ヌクレオチドをポリヌクレオチドに付加することによって生成され得る。このような修飾ヌクレオチドは、場合によっては、官能化ヌクレオチドと称され得る。

【０１９７】

修飾ヌクレオチドは、例えば、合成／化学合成（例えば、固相オリゴヌクレオチド合成、ホスホルアミダイト合成など）、組換え合成、酵素取り込みなどを含むが、これらに限定されない、任意の利便的な方法によってポリヌクレオチドに導入され得る。対象となる抗原への結合を形成するのに有用な修飾ヌクレオチドおよびヌクレオチド修飾には、例えば、クリック化学による官能化（例えば、アジド官能化、アルキン官能化、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）官能化など）に有用なもの、核酸標識に有用なもの、光架橋に有用なもの、アクリルリン酸アミダイト結合に有用なもの、ピロリン酸結合／連結に有用なものなど、例えば、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシアデノシン－５’－三リン酸、５－（３－アジドプロピル）－ウリジン－５’－三リン酸、５－エチニル－２’－ウリジン５’－三リン酸、８－アジド－アデノシン－５’－三リン酸、Ｎ^{6}－（６－アジド）ヘキシル－３’－デオキシアデノシン－５’－三リン酸、シチジン－５’－リン酸－３’－（１５－アジド－４，７，１０，１３－テトラオキサ－ペンタデカノイル－６－アミノヘキシル）リン酸、γ－（２－アジドエチル）－アデノシン－５’－三リン酸、γ－（６－アジドヘキシル）－アデノシン－５’－三リン酸、γ－［（６－アジドヘキシル）－イミド］－アデノシン－５’－三リン酸、Ｎ^{6}－（６－アジド）ヘキシル－アデノシン－５’－三リン酸、Ｎ^{6}－（６－アジド）ヘキシル－２’デオキシ－アデノシン－５’－三リン酸、Ｎ^{6}－（６－アジド）ヘキシル－３’－デオキシアデノシン－５’－三リン酸、３’－アジド－２’，３’－ジデオキシチミジン－５’－三リン酸、５－（１５－アジド－４，７，１０，１３－テトラオキサ－ペンタデカノイル－アミノアリル）－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸、Ｎ^{6}－プロパルギル－アデノシン－５’－三リン酸、アデノシン－５’－［γ－（プロパルギル）］三リン酸、アデノシン－５’－［γ－（プロパルギル）－イミド］三リン酸、２－エチニル－アデノシン－５’－三リン酸、５－（オクター１，７－ジイニル）－２’－デオキシシチジン５’－三リン酸、５－（オクター１，７－ジイニル）－２’－デオキシウリジン５’－三リン酸、５－エチニル－２’－デオキシウリジン５’－三リン酸、５－ジベンジルシクロオクチン－２’－デオキシウリジン５’－三リン酸、２－アミノプリン－２’－デオキシリボシド－三リン酸、５－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－アミノアリル－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、５－プロパルギルアミノ－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸、５－ヨードウリジン－５’－三リン酸、４－チウリジン－５’－三リン酸、５－ブロモウリジン－５’－三リン酸、５’－アクリダイト修飾、５’－アデニル化修飾などが含まれるが、これらに限定されない。

【０１９８】

場合によっては、対象となる抗原または抗体結合剤へのポリヌクレオチドの結合は、１つ以上の官能性リンカーによって媒介される。本明細書で使用される官能性リンカーは、ある分子を別の分子に結合させるための１つ以上の官能基を有する任意の好適なリンカー

を指す。例えば、場合によっては、本開示のポリヌクレオチドのヌクレオチドは、官能基（例えば、アミノ官能基、チオール官能基、ヒドロキシル官能基、イミダゾリル官能基、グアニジニル官能基、アルキン官能基、アジド官能基、歪みアルキン官能基など）を含む生体分子リンカーに結合してもよい。非限定的な例として、本開示のポリヌクレオチドのヌクレオチドは、官能基を含む官能性ビオチンでビオチン化してもよい。

【０１９９】

場合によっては、ポリヌクレオチドの所望の抗原または抗体結合剤への結合に有用な修飾ヌクレオチドは、例えば、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，ＩＡ）、ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、Ｊｅｎａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＧｍｂＨ（Ｊｅｎａ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，（Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ）、Ｅｎｚｏ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｆａｒｍｉｎｇｄａｌｅ，ＮＹ）などを含むが、これらに限定されない、市販業者から入手可能なものを含み得る。

【０２００】

本開示の抗原－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートの生成は、コンジュゲート後、抗原対ポリヌクレオチドのモル比、例えば、抗原：ＤＮＡのモル比、または抗体結合剤対ポリヌクレオチドのモル比、例えば、抗体、抗体模倣物、またはアプタマー：ＤＮＡのモル比に影響を与えるコンジュゲート反応の効率を考慮し得る。本開示の発明者らは、抗原対ポリヌクレオチドのモル比が、記載されたアッセイにおける凝集に影響を及ぼすことを発見した。理論に拘束されるものではないが、抗原の比率が低く、ポリヌクレオチドの比率が高いと、場合によっては、（例えば、抗原および抗体の結合表面のアクセスを阻害することによって、）凝集が阻害されると見られる。多くの場合、コンジュゲート後の抗原対ポリヌクレオチドまたは抗体対ポリヌクレオチドのモル比は、１：５を上回り、例えば、１：４を上回る、１：３を上回る、１：２を上回るなどのモル比を含むが、これらに限定されない。ある特定の例では、コンジュゲート後の抗原対ポリヌクレオチドのモル比は、１：１～１：５の範囲であり、例えば、１：１～１：４、１：１～１：３、１：１～１：２などを含むが、これらに限定されない。別の例では、記載されているようなアッセイで用いるためには、コンジュゲート後の抗原対ポリヌクレオチドまたは抗体対ポリヌクレオチドのモル比は、本質的に１：１、本質的に１：２、本質的に１：３などである。

【０２０１】

本開示は、本アッセイおよび記載されている抗体の検出に関連するデバイスも提供する。このようなデバイスは、研究設備、例えば、電気、化学試薬、温度制御、冷蔵などが最小限でも、または研究設備がなくても、本明細書に記載の凝集アッセイの実施を可能にし得る「実施使用」デバイス、例えば、ディップスティックアッセイデバイス、ラテラルフローアッセイデバイス、スライドベースデバイスなどを含み得るが、これらに限定されない。研究室の環境で使用するためのデバイスも含まれ、例えば、生成される増幅産物の正確な定量を用いるデバイス（例えば、ＰＣＲデバイス、ｑＰＣＲデバイス、蛍光光度計、シンチレーションカウンター、顕微鏡、プレートリーダー、核酸シーケンシングデバイスなどを含む。場合によっては、Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１２） Ｓｅｎｓｏｒｓ １２，８３１９－８３３７（この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの等温増幅デバイスは、本明細書に記載の方法を実施するためのデバイスとして使用するために改良してもよい。

【０２０２】

さらに別の態様では、本開示は、例えば、上記のような本方法を実施するためのキットを提供する。本キットは、上記のような方法を実施するのに有用な、本明細書に記載の試薬、デバイス、または組成物の任意の組み合わせを含んでもよく、例えば、記載されてい

る抗原－ＤＮＡコンジュゲート、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲート、架橋ポリヌクレオチド、スプリントポリヌクレオチド、酵素試薬（例えばリガーゼ）、プライマーなどのうちの１つ以上を含むが、これらに限定されない。本キットは、例えば、抗原または抗体結合剤を官能化するための試薬（例えば、ポリヌクレオチドを対象となる抗原または抗体結合剤に容易にコンジュゲートするための官能化ポリヌクレオチドを含む）、ポリヌクレオチドを官能化するための試薬（例えば、官能化ヌクレオチド（すなわち、１つ以上の反応性基を含むヌクレオチド）、ポリヌクレオチドおよび／または抗原および／または抗体結合剤のコンジュゲーションのための試薬（例えば、本明細書に記載の１つ以上のコンジュゲーションおよび／または架橋試薬もしくはリンカーを含む）を含むが、これらに限定されない、１つ以上の試薬調製試薬をさらに含んでもよい。

【０２０３】

加えて、本キットはさらに、例えば、対象からの試料に、１つ以上の抗体アイソタイプが存在するかどうかの評価を可能にするために、アッセイ試薬、または、例えば、患者試料のアッセイを実施するのに有用な試薬を含み得る。このようなアッセイ試薬は、例えば、検出試薬、試料調製試薬、増幅試薬（例えば、ＰＣＲ試薬および／または等温増幅試薬および／またはｑＰＣＲ試薬など）および凝集試薬（例えば、抗原－ＤＮＡコンジュゲート、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートなど）、緩衝液、希釈液などを含み得るが、これらに限定されない。このようなアッセイキットは、さらに、試料収集要素、例えば、試料収集容器および／または試料収集デバイスなどを含み得る。上記の要素は、別々の容器に存在し得るか、または１つ以上の要素は、単一の容器、例えば、ガラスまたはプラスチックのバイアルもしくはチューブの中で組み合わされ得る。

【０２０４】

キットは、さらに、対照試薬（例えば、陽性対照試料、陰性対照試料など）、較正試薬（例えば、蛍光較正試薬など）を含み得るが、これらに限定されない。

【０２０５】

上記の構成要素に加えて、本キットは、さらに、本方法を実施するための取扱説明書を含み得る。これらの取扱説明書は、対象キットに様々な形態で存在し得、そのうちの１つ以上がキットに存在し得る。これらの取扱説明書が存在し得る１つの形態は、好適な媒体または基材上に印刷された情報として、例えば、キットの包装内、添付文書中などの情報が印刷された単数または複数の紙片としてである。さらに別の手段は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えば、ディスケット、ＣＤ、ＤＶＤ、ブルーレイ、リムーバブルディスク（例えば、フラッシュメモリーデバイス）などであり得る。存在し得るさらに別の手段は、インターネットを介して除去されたサイトの情報にアクセスするために使用されるウェブサイトアドレスである。任意の好都合な手段がキット内に存在し得る。

【０２０６】

３．実施例

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の例である。実施例は、例示目的のみのために提供されており、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【０２０７】

使用した数値（例えば、量、温度など）に関しては、精度を確保する努力を行ったが、ある程度の実験誤差および偏差は許容されるべきである。

【０２０８】

実施例１

凝集ＰＣＲによるアイソタイプ特異的抗体検出（ＩＳＡＰ）

ＩＳＡＰ法の概要

図１は、標的抗体の検出のためのＩＳＡＰ法を示す。抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗原－ＤＮＡコンジュゲートは、標的抗体検体を含む試料とともにインキュベートされる。二次抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、標的抗体に結合し、次に標的抗体は、抗原－ＤＮＡコンジュゲートに結合して、二次抗体－ＤＮＡおよび抗原－ＤＮＡが互いに近接する複合体を形成する。二次抗体－ＤＮＡと抗原－ＤＮＡは近接しているため、架橋オ

リゴヌクレオチドの存在下で連結することができる。連結産物は、ｑＰＣＲまたは任意のその他のＤＮＡ検出方法（例えば、ＤＮＡマイクロアレイ）によって検出および定量化され得る。

【０２０９】

ＩＳＡＰ法は、原則として、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＤを含む任意のアイソタイプの抗体を検出するために使用することができる。さらに、ＩＳＡＰ法を使用して、システムに対応する二次抗体－ＤＮＡコンジュゲートを添加することによって単一のアッセイにおいて２つ以上の異なるアイソタイプを検出するために使用することができる。例えば、以下の二次抗体－ＤＮＡコンジュゲートのうちの１つ以上は、ＩｇＥの検出用の抗ＩｇＥ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＭの検出用の抗ＩｇＭ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＧの検出用の抗ＩｇＧ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、ＩｇＡの検出用の抗ＩｇＡ二次抗体－ＤＮＡコンジュゲート、およびＩｇＤの検出用の抗ＩｇＤ二次抗体ＤＮＡコンジュゲートを使用してもよい。

【０２１０】

方法

血漿試料の分析

ピーナッツアレルギーを有する患者からの血漿試料は、ピーナッツアレルギーを有する小児および成人における経口免疫療法（ＯＩＴ）の施設内審査委員会承認臨床試験への登録の一環として得た（ＰＯＩＳＥＤ；ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｒ：ＮＣＴ０２１０３２７０）。ピーナッツアレルギーは、ピーナッツに対する二重盲検プラセボ対照食品チャレンジに対する反応（５００ｍｇ以下のピーナッツタンパク質で誘発される反応を伴う）およびピーナッツに対する陽性の皮膚プリックテスト反応（５ｍｍ以上）として定義された。

【０２１１】

ＯＶＡ感作

マウスの感作は、卵白アルブミン（ＯＶＡ）と水酸化アルミニウム（ミョウバン）の投与、続いて、ＯＶＡの鼻腔内投与によって達成された。プロトコルは、記載されているように（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（２００８） Ａｎｎ Ａｌｌｅｒｇｙ Ａｓｔｈｍａ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１００：Ｓ１－１４８（参照により本明細書に組み込まれる））、軽微な変更を加えて実施した。簡単に言えば、マウス（ｎ＝５／群）に、総量１００μＬのミョウバン２．２５ｍｇ（ＡｌｕｍＩｍｕｊｅｃｔ；Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ）で乳化した２０μｇのＯＶＡ（グレードＶ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ）を、０日目および１４日目に腹腔内に免疫した。対照マウス（ｎ＝５）にも同様に接種したが、ＯＶＡは接種しなかった。次いで、マウスに、２１日目に、ＰＢＳ中の２００μｇのＯＶＡを含む２０μＬの溶液またはＰＢＳのみで鼻腔内に接種した。体温変化は、接種後２時間連続して測定された。感作の成功は、ＯＶＡ接種後の体温の著しい低下（３℃超）の検出によって定義される。血清試料は、０、７、および１４日目に眼窩後部出血を介して収集された。２１日目に、CO_2の吸入によりマウスを殺処分し、心臓から血清試料を収集した。すべての血清試料は、使用するまで－８０℃で保存した。全血試料は、血清試料と一緒に収集した。凝固を防ぐために、全血試料を、採取直後に１０ｍＭ ＥＤＴＡおよび１×ＰＢＳで１：１に希釈した。全血試料は、使用するまで－８０℃で保存した。

【０２１２】

ピーナッツ油による感作

ＢＡＬＢ／ｃ野生型マウス（ｎ＝１０）、Ｃ５７ＢＬ／６野生型マウス（ｎ＝１０）、ＢＡＬＢ／ｃ－Ｊｈノックアウトマウス（ｎ＝５）、およびＢＡＬＢ／ｃ－ＲＡＧノックアウトマウス（ｎ＝５）に、ピーナッツ油（２００μＬ、Ｇｏｌｄｅｎ Ｐｅａｎｕｔ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｄａｗｓｏｎ，Ｇｅｏｒｇｉａ）を６週間、皮膚感作した。次いで、ＢＡＬＢ／ｃおよびＣ５７ＢＬ／６マウスに、５ｍｇのピーナッツタンパク質（以前に記載されたように脱脂ピーナッツ粉から抽出された（Ｂｙｒｄ Ｍｉｌｌ，Ａｓｈｌａｎｄ，

Ｖｉｒｇｉｎｉａ）を腹腔内に接種した。体温を上記のように測定して、感作を確認した。CO_2の吸入によりマウスを殺処分した後、０日目に眼窩後出血により、４５日目に心臓出血により血清試料を採取した。血清試料は、使用するまで－８０℃で保存した。

【０２１３】

ＥＬＩＳＡ分析

特異的ＩｇＥ（ｓＩｇＥ）ＥＬＩＳＡを記載のように行った（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎら、上記参照）簡単に言えば、ＯＶＡをＥＬＩＳＡプレートに沈着させて、精製ＩｇＥ試料およびＯＶＡ感作マウスからの血清試料から抗ＯＶＡ　ＩｇＥを捕捉および検出した。表面に結合したＩｇＥの量は、二次抗マウスＩｇＥおよびＳＡ－ＨＲＰで処理した後の吸光度を検出することによって定量化された。ピーナッツ特異的ＩｇＥの検出のために、ピーナッツ抽出物をＥＬＩＳＡプレートにコーティングし、抗ピーナッツＩｇＥを上記のように検出した。

【０２１４】

ＩｍｍｕｎｏＣＡＰ分析

ＩｍｍｕｎｏＣＡＰ分析は、Ｔｈｅｒｍｏ　ＦｉｓｃｈｅｒのＰｈａｄｉａによって実施した。

【０２１５】

ＤＮＡ配列設計

ＤＮＡ配列およびプライマーは、Ｅｎａｂｌｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから提供された。配列は、増幅効率を最大化しながら、二次構造およびプライマーダイマーの形成を最小化するように最適化された。

【０２１６】

ＩＳＡＰで使用される配列には、抗体－ＤＮＡまたは抗原－ＤＮＡコンジュゲートのＤＮＡ分子、架橋オリゴヌクレオチド、およびＰＣＲプライマーが含まれる。

１Ａ：５’－ＣＡＧＧＴＡＧＴＡＧＴＡＣＧＴＣＴＧＴＴＴＣＡＣＧＡＴＧＡＧＡＣＴＧＧＡＴＧＡＡ－３’（配列番号１）

１Ｂ：５’－ＴＣＡＣＧＧＴＡＧＣＡＴＡＡＧＧＴＧＣＡＡＧＡＴＡＡＴＡＣＴＣＴＣＧＣＡＧＣＡＣ－３’

（配列番号２）

逆方向プライマー１：ＧＴＧＣＴＧＣＧＡＧＡＧＴＡＴＴＡＴＣＴ（配列番号３）

順方向プライマー１：ＣＡＧＧＴＡＧＴＡＧＴＡＣＧＴＣＴＧＴＴ（配列番号４）

２Ａ：５’－ＧＧＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＴＴＡＡＡＧＡＡＴＣＡＣＧＡＴＧＡＧＡＣＴＧＧＡＴＧＡＡ－３’

（配列番号５）

２Ｂ：５’－ＴＣＡＣＧＧＴＡＧＣＡＴＡＡＧＧＴＧＣＡＧＴＡＣＣＣＡＡＡＴＡＡＣＧＧＴＴＣＡＣ－３’

（配列番号６）

逆方向プライマー２：ＧＴＧＡＡＣＣＧＴＴＡＴＴＴＧＧＧＴＡＣ（配列番号７）

順方向プライマー２：ＧＧＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＴＴＡＡＡＧＡＡ（配列番号８）

３Ａ：ＧＧＡＴＣＡＣＴＣＣＡＡＣＴＡＧＡＣＴＡＴＣＡＣＧＡＴＧＡＧＡＣＴＧＧＡＴＧＡＡ

（配列番号９）

３Ｂ：ＴＣＡＣＧＧＴＡＧＣＡＴＡＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＡＴＡＴＣＴＧＣＣＡＣＴＧＴＣＡＣ

（配列番号１０）

逆方向プライマー３：ＧＴＧＡＣＡＧＴＧＧＣＡＧＡＴＡＴＡＡＣ（配列番号１１）

順方向プライマー３：ＧＧＡＴＣＡＣＴＣＣＡＡＣＴＡＧＡＣＴＡ（配列番号１２）

４Ａ：ＡＧＡＧＴＣＣＡＣＴＴＣＣＣＡＴＡＡＴＧＴＣＡＣＧＡＴＧＡＧＡＣＴＧＧＡＴＧＡＡ

（配列番号１３）

４Ｂ：ＴＣＡＣＧＧＴＡＧＣＡＴＡＡＧＧＴＧＣＡＣＧＧＴＡＣＴＧＴＣＡＧＣＡＴＡＧＴＴＣ
（配列番号１４）
逆方向プライマー４：ＧＡＡＣＴＡＴＧＣＴＧＡＣＡＧＴＡＣＣＧ（配列番号１５）
順方向プライマー４：ＡＧＡＧＴＣＣＡＣＴＴＣＣＣＡＴＡＡＴＧ（配列番号１６）
５Ａ：ＣＴＡＣＧＡＣＴＡＧＧＡＧＡＴＡＧＡＴＧＴＣＡＣＧＡＴＧＡＧＡＣＴＧＧＡＴＧＡＡ
（配列番号１７）
５Ｂ：ＴＣＡＣＧＧＴＡＧＣＡＴＡＡＧＧＴＧＣＡＧＴＴＡＴＧＴＡＴＡＧＴＡＣＧＣＴＣＧＣ
（配列番号１８）
逆方向プライマー５：ＧＣＧＡＧＣＧＴＡＣＴＡＴＡＣＡＴＡＡＣ（配列番号１９）
順方向プライマー５：ＣＴＡＣＧＡＣＴＡＧＧＡＧＡＴＡＧＡＴＧ（配列番号２０）
架橋オリゴ：ＣＴＡＣＣＧＴＧＡＴＴＣＡＴＣＣＡＧ（配列番号２１）

【０２１７】

図２は、ＩＳＡＰを使用する単一のアッセイにおいて、これらの配列がどのように使用されて、Ａｒａ－ｈ１、Ａｒａ－ｈ２、およびＡｒａ－ｈ３抗原に対するＩｇＧ４およびＩｇＥ抗ピーナッツ抗体を検出するかを示す。

【０２１８】

アレルゲン－ＤＮＡおよび抗体－ＤＮＡコンジュゲートの合成

ＯＶＡは、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（＃７７１２０）から入手した。Ａｒａ－ｈ１（＃ＬＴＮ－ＡＨ１－１）、Ａｒａ－ｈ２（＃ＲＰ－ＡＨ２－１）、およびＡｒａ－ｈ３（＃ＮＡ－ＡＨ３－１）は、Ｉｎｄｏｏｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入した。アレルゲン（ＯＶＡ、Ａｒａ－ｈ１、Ａｒａ－ｈ２、およびＡｒａ－ｈ３）－ＤＮＡコンジュゲートは、組換えタンパク質反応緩衝液（５５ｍＭのリン酸ナトリウム、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、２０ｍＭのＥＤＴＡ中の１ｍｇ／ｍＬタンパク質、ｐＨ７．２）を再懸濁させることによって合成した。ＳＭＣＣ（スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート）を、無水ＤＭＳＯに溶解し、４ｍＭの溶液の５μＬを、５０μＬのタンパク質溶液に添加し、室温で２時間インキュベートした。チオール化ＤＮＡ（ＩＤＴ）を、反応緩衝液で１００μＭに再懸濁し、３μＬを５０μＬの反応緩衝液に添加した。この溶液に、ＤＴＴ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の１００ｍＭの溶液の４μＬを添加し、酸化チオールＤＮＡを還元した。次いで、溶液を、３７℃で１時間インキュベートした。７ｋ　ＭＷＣＯ（分子量カットオフ）ゲルマイクロスピンカラム（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、反応緩衝液に平衡化した。還元されたオリゴヌクレオチドを、平衡化されたマイクロスピンカラムによって２回脱塩した。反応緩衝液で５００μＬの体積に希釈することによって、未反応のＳＭＣＣをアレルゲンタンパク質溶液から除去した。次いで、チオール－ＤＮＡおよびアレルゲン－ＳＭＣＣ溶液を混合し、４℃で一晩反応させ、次いで、３０ｋ　ＭＷＣＯフィルターカラム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）によって精製した。コンジュゲートの濃度は、ＢＣＡアッセイ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって決定された。コンジュゲーション効率は、前述のようにＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび銀染色によって決定された。代表的な銀染色が提供される（図４）。コンジュゲートのＤＮＡ対アレルゲン比は、ＵＶ－ＶＩＳ吸収によって推定された。アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、短期間使用する場合、４°Ｃで保管するか、または長期間保管する場合、－８０℃で分注した。

【０２１９】

抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、同様のプロトコルに従って合成されたが、軽微な変更を加えた。簡単に言えば、抗ＩｇＥおよび抗ＩｇＧ４ポリクローナル抗体は、ＳｉｇｍａおよびＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒから購入した。３０Ｋ　ＭＷＣＯフィルターの代わりに、１００Ｋ　ＭＷＣＯフィルターカラムを使用して、未反応のＤＮＡからコンジュゲートを精製した。

【０２２０】
アイソタイプ特異的凝集ＰＣＲ（ＩＳＡＰ）
アレルゲン特異的ＩｇＥを検出するために、１ｆｍｏｌのアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートおよび抗ＩｇＥコンジュゲートを、２μＬのインキュベーション緩衝液Ｃ（ＰＢＳ中の、２％ＢＳＡ、０．２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、８ｍＭのＥＤＴＡ）に再懸濁した。この溶液に、１μＬの検体を添加し、次いで、３７℃で３０分間インキュベートした。インキュベーション後、連結混合物の１１７μＬ（２０ｍＭのＴｒｉｓ、５０ｍＭのＫＣｌ、２０ｍＭの$MgCl_2$、２０ｍＭのＤＴＴ、２５μＭのＮＡＤ、０．０２５Ｕ／μｌのリガーゼ、架橋オリゴ１００ｎＭ、０．００１％のＢＳＡ、ｐＨ＝７．５）を添加し、次いで、３０℃で１５分間インキュベートした。このインキュベーションステップ後、２５μＬの溶液を、１０ｎＭのプライマーを含む２５μＬの２×ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｑｉａｇｅｎ）に添加し、ＰＣＲ（９５℃で１０分間、６０℃で３０秒間、９５℃で１５秒間）で１３サイクル増幅した。次いで、ＰＣＲ反応物を、ddH_2Oで１：２０に希釈し、８．５μＬの希釈したＰＣＲ試料を、１．５μＬのプライマー（最終濃度６９０ｎＭ）を含む１０μＬの２×ｑＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に添加した。ｑＰＣＲによる分析は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣＦＸ９６リアルタイムＰＣＲ検出システムで実施された。
【０２２１】
アレルゲン特異的ＩｇＧ４の検出については、抗ＩｇＥ－ＤＮＡコンジュゲートの代わりに抗ＩｇＧ４－ＤＮＡコンジュゲートを使用したことを除き、手順は同様であった。
【０２２２】
データ分析
すべてのＰＣＲアッセイは、緩衝液Ｃのみのブランク（ＰＢＳ中の２％ＢＳＡ、０．２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、８ｍＭのＥＤＴＡ）とともに実行して、実行ごとの変動を修正した。各試料のＣｔ値は、Ｂｉｏ－Ｒａｄソフトウェアによって自動的に選択された単一閾値の蛍光値によって決定された。各試料について、閾値に対応する蛍光値を持つＰＣＲサイクル数を、サイクル閾値（Ｃｔ）値として定義した。ΔＣｔは、ブランクのＣｔ値から試料のＣｔ値を引いた値として定義される。ΔＣｔの値は、ＰＣＲプレートウェルの初期アンプリコン濃度に比例する。次いで、このアンプリコン濃度はまた、標的抗体の量に比例する。
【０２２３】
検出限界を決定するために、抗体希釈シリーズの非線形４パラメーターロジスティックフィットは、カスタムソフトウェアを使用して決定される。ＰＣＲベースのアッセイの検出限界は、緩衝液Ｃのみのブランクの平均ΔＣｔ値とブランクの３つの標準偏差として定義される。検出限界の値は、ブランクを基準にして計算される。同様のプロセスが、対応する検出限界を得るために、ＥＬＩＳＡによって測定された抗体の希釈系列に対して実行された。
【０２２４】
ＯＶＡまたはピーナッツの感作を受けたマウスからの標本の試験では、０日目に観察されたシグナルによってＰＣＲベースのシグナルを正規化した。このような正規化は、マウス間の不均一性を修正するのに役立つことを実験的に観察した。
【０２２５】
統計学的分析のために、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ　Ｕ検定が実行された。Ｐ値が０．０５より小さいと統計学的に有意であると考えた。
【０２２６】
実施例２
ＰＣＲによるアレルギー反応の超高感度多重検出
ここでは、統合されたＰＣＲベースのアプローチを用いた、高感度かつ多重化可能な要素分解アレルギー診断を示す。最初に、アレルゲン特異的ＩｇＥを検出するために、新しいＰＣＲベースの方法であるアイソタイプ特異的凝集ＰＣＲ（ＩＳＡＰ）の開発を報する

。次いで、ＩＳＡＰを、単一のプラットフォームに、凝集ＰＣＲ（ＡＤＡＰ）（Ｔｓａｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）　ＡＣＳ　Ｃｅｎｔ　Ｓｃｉ　２：１３９－１４７）および近接連結アッセイ（ＰＬＡ）（Ｆｒｅｄｒｉｋｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）　Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　４：３２７－３２９）による抗体検出と組み合わせる。この多重化アッセイは、独自のＤＮＡ配列にタンパク質レベルをエンコードし、次いで、ｑＰＣＲで検出することによって、総ＩｇＥ、特異的ＩｇＥ、特異的ＩｇＧ４、および総抗アレルゲン免疫グロブリン（ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥなど）の４つの免疫学的特徴を同時に検出する。

【０２２７】

ピーナッツアレルギーのマウスモデルでは、ＰＣＲベースのアプローチがＥＬＩＳＡよりもはるかに感度が高く、ＥＬＩＳＡによって検出することができないレベルで疾患関連アレルギーマーカーを検出することを示す。また、ＰＣＲベースのアプローチは、費用対効果が高く（１機能当たり１試料当たり０．５ドル）、わずか１μＬの血漿を消費するだけでなく、ピーナッツアレルギー患者コホートを分析する際に、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰとよく相関していることも示す。

【０２２８】

結果

ＰＣＲベースのアッセイによるアレルギー性免疫グロブリン応答の検出。

３つの抗体検出方法を統合して、包括的なアレルギーアッセイを作成した。

【０２２９】

最初に、総ＩｇＥレベルを検出するために、近接連結アッセイ（ＰＬＡ）を作成した（Ｆｒｅｄｒｉｋｓｓｏｎら、上記参照）。ＰＬＡは、標的抗原を検出するために、一対の抗体－ＤＮＡコンジュゲートを採用する。この場合、ＩｇＥを検出するために、一対のポリクローナル抗ＩｇＥ抗体－ＤＮＡコンジュゲートを使用した。抗体－ＤＮＡコンジュゲートは、同じＩｇＥ分子の複数の部位に結合し、コンジュゲート上の一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を近接させる。短い架橋オリゴヌクレオチドおよびＤＮＡリガーゼの追加により、２つの近くの鎖が完全長アンプリコンに連結される。ｑＰＣＲを用いた分析は、再構成されたアンプリコンの量を決定し、これは、試料中のＩｇＥ分子の存在量を反映する。

【０２３０】

第２に、これまでに開発されたアッセイ（凝集ＰＣＲによる抗体検出；ＡＤＡＰ）を用いて、総抗アレルゲン抗体のレベルを検出した。１３個のアレルゲン結合抗体は、合成アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを大きな免疫複合体に凝集し、結合したＤＮＡ鎖を近接させて、ｑＰＣＲによる連結および定量化を可能にする。

【０２３１】

抗アレルゲン抗体の検出は、アレルギー反応の完全な見解を確立するのに役立ち、この場合、他の試験を単独で行うと、誤解を招くまたは不完全な全体像が得られ得る。例えば、一部の患者は、ｓＩｇＥおよびｓＩｇＧ４に対して陰性であり得るが、他の抗体アイソタイプの存在のために、依然として高レベルの総抗アレルゲン抗体を有する。これらのサブグループは、すべてのアイソタイプに対して陰性であるサブグループとは異なる臨床的挙動を示し得る。したがって、総抗アレルゲン抗体を含めると、特に免疫療法を受けている患者に対してアレルギー反応の分類に役立つ。

【０２３２】

第３に、アレルゲン特異的ＩｇＥおよびＩｇＧ４の検出のために、アイソタイプ特異的凝集ＰＣＲ（ＩＳＡＰ）と称される、新しいＰＣＲベースのアッセイの開発を報告する。ＩＳＡＰは、特定のアレルゲンに対する抗体のアイソタイプを検出するために、抗体結合剤－ＤＮＡコンジュゲートをアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートとともに使用する。抗アレルゲン抗体がＩｇＥアイソタイプではない場合、抗ＩｇＥ－ＤＮＡコンジュゲートは、免疫複合体に存在せず、連結およびシグナル生成を妨げる。同様に、抗体がＩｇＥであるが、アレルゲンに結合しない場合、アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートは、免疫複合体から除外され、シグナルは発生しない。抗体がＩｇＥであり、標的アレルゲンに結合する場

合にのみ、完全長アンプリコンへの効率的な連結のために、２つのＤＮＡコンジュゲートが同じ分子上で結合する。また、この技術を拡張して、抗ＩｇＧ４－ＤＮＡおよびアレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートを使用することによってｓＩｇＧ４を検出する。

【０２３３】

次いで、各アレルギー機能は、統合されたＰＣＲベースのアッセイで適切なプライマー対を使用することによって調べることができる。例えば、１Ｆ１Ｒは、総ＩｇＥを報告し、２Ｆ２Ｒは、総抗アレルゲン抗体のレベルを示すが、２Ｆ１Ｒは、ｓＩｇＥレベルを定量化する。このバーコードアプローチにより、１つのアレルゲンに対する免疫グロブリン応答の詳細な調査が可能になるだけでなく、複数のアレルゲン成分を一度に監視することもできる。

【０２３４】

アレルゲン－ＤＮＡおよび抗体－ＤＮＡコンジュゲートの合成。

ＰＣＲベースのアッセイのコア試薬は、高品質のアレルゲン－ＤＮＡおよび抗体－ＤＮＡコンジュゲートである（Ｔｓａｉら、上記参照）。

【０２３５】

アレルゲン－ＤＮＡコンジュゲートの場合、組換え発現または精製されたアレルゲン分子を使用する。アレルゲンは、チオール官能化ｓｓＤＮＡをアレルゲンの表面上のリジン残基に結合する、ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣと呼ばれる低分子架橋剤を使用してｓｓＤＮＡと架橋する。これらのコンジュゲートは、典型的には、ゲル分析およびＵＶ－ＶＩＳ分光法によって決定されるように、１アレルゲン分子当たり２．５本のｓｓＤＮＡ鎖を持っている。このｓｓＤＮＡの負荷量は、アレルゲン上の抗原性エピトープを遮断せずに、強力なアッセイシグナルを生成するのに十分である（Ｔｓａｉら、上記参照）。

【０２３６】

抗体－ＤＮＡは、同じ戦略を用いて合成される。具体的には、この研究では、精製ポリクローナル抗ＩｇＥおよび抗ＩｇＧ４抗体を使用する。得られたコンジュゲートは、ゲルおよびＵＶ－ＶＩＳ分析によっても検証される。

【０２３７】

ＰＣＲベースのアレルギー反応検出のワークフロー。

統合されたＰＣＲベースのアプローチによるアレルギー関連抗体の検出は、３つのステップからなる。（１）第１に、１μＬの試料を、２μＬのＤＮＡコンジュゲートプローブと混合し、３７℃で３０分間インキュベートする。このインキュベーションステップ中に、プローブは、試料中の検体に結合させ、プローブ上のｓｓＤＮＡを近接させる。（２）次に、ＤＮＡリガーゼおよび短い架橋ＤＮＡを含む連結マスターミックスを添加する。プローブが標的検体によって適切にクラスター化されている場合、架橋ＤＮＡは、２つの近くのｓｓＤＮＡにハイブリダイズし、ＤＮＡリガーゼによる連結を引き起こす。特に、プローブ上の各ｓｓＤＮＡが１つのプライマー結合部位のみを有するため、プローブ自体はＰＣＲで増幅することはできない。したがって、連結されたＤＮＡのみが、ＰＣＲ増幅に適した２つのプライマー部位を有する。（３）連結されたＤＮＡは、ＰＣＲによってプレ増幅され、次いで、リアルタイムｑＰＣＲによって分析される。プレ増幅ステップは、ｑＰＣＲステップの前にＤＮＡのコピー数を増やすことによって、アッセイの再現性を向上させることが示されている（Ｔｓａｉら、上記参照）。

【０２３８】

さらに、緩衝液のみの陰性対照は、常に一緒に実行される。ΔＣｔ値は、検体を含む試料と緩衝液のみの試料のＣｔ値の差を示す。したがって、緩衝液のみの試料は、アッセイ間の変動を補正するための評価基準として機能する（Ｔｓａｉら、上記参照）。ΔＣｔ値は、試料中の標的検体の量に比例する。

【０２３９】

要約すると、アッセイのワークフローは、主要な試薬の連続添加のみを必要とする。アッセイは、すぐに利用可能なリアルタイムｑＰＣＲサーモサイクラーで実行される。これらの簡単な要件は、研究および臨床検査室での技術の採用を促進するのに役立つと予測す

る。
【０２４０】
ＩＳＡＰによるアレルゲン特異的ＩｇＥ検出の検証
アイソタイプ特異的凝集ＰＣＲ（ＩＳＡＰ）が特定のアイソタイプの抗体を忠実に検出するかどうかを検証するために、卵白アルブミン（ＯＶＡ）タンパク質に対する高度に精製されたＩｇＥおよびＩｇＧ抗体を得た。緩衝液で両方の抗体の連続希釈液を調製し、プローブとして抗ＩｇＥ－１ＢおよびＯＶＡ－２Ａを用いてＩＳＡＰアッセイを行った。
【０２４１】
予想どおりに、連続希釈したＩｇＥ抗ＯＶＡの濃度依存性シグナルが観察され、ＩｇＧ抗ＯＶＡのシグナルは観察されなかった。ＩｇＥ抗ＯＶＡの検出限界は、１２アトモルである。したがって、ＩＳＡＰは、実際に、アイソタイプ特異的な方法で抗体抗原結合を高感度かつ特異的に検出する。
【０２４２】
ＩＳＡＰの特異性にさらに挑むために、ＯＶＡへの親和性を欠いている希釈系列の非特異的ＩｇＥを調製した。予想どおりに、ＩＳＡＰアッセイからシグナルは観察されなかった。これは、ＩＳＡＰが実際に指定されたアレルゲンに対するＩｇＥ抗体にのみ反応し、ランダムで非特異的なＩｇＥ分子には反応しないことを示す。
【０２４３】
重要なことは、同じ希釈系列のＩｇＥ抗ＯＶＡ抗体を試験することによって、ＩＳＡＰとＥＬＩＳＡの分析感度を比較する。感度が向上すると、試料の消費量が減り、疾患関連のＩｇＥ抗体のレベルが低くても観察される可能性が高くなる。尾／眼の出血が非常に少量の血清／血漿を産生するため、これらの共同の特徴は、アレルギー反応を研究するために、マウスモデルを用いる研究者にとって特に興味深いものである。ＩＳＡＰアッセイでは、試験毎に１μＬのみの試料を消費するだけで、より頻繁に試料を収集し、より多くの種類のアッセイを実行するのを可能にする。
【０２４４】
統合ＰＣＲアッセイによるアレルギー反応の多重検出
ＰＬＡ、ＡＤＡＰ、およびＩＳＡＰを統合すると、単一のアッセイで、総ＩｇＥ、総抗アレルゲン抗体、アレルゲン特異的ＩｇＥおよびＩｇＧ４を同時にモニタリングすることができる。概念実証実験として、希釈系列のＩｇＥ抗ＯＶＡ、ＩｇＧ抗ＯＶＡ、および非特異的ＩｇＥ抗体を再調製した。
【０２４５】
シングルプレックスアッセイとは対照的に、マルチプレックスプローブパネルは、抗ＩｇＥ－１Ａ、抗ＩｇＥ－１Ｂ、ＯＶＡ－２ＡおよびＯＶＡ－２Ｂを含んだ。任意のＩｇＥ分子の存在は、１Ａ－１Ｂ　ＤＮＡの生成を引き起こし、任意の抗ＯＶＡ抗体は、２Ａ－２Ｂ　ＤＮＡをもたらし、ＩｇＥ抗ＯＶＡのみが１Ａ－２Ｂまたは２Ａ－１Ｂ　ＤＮＡを形成し得る。したがって、プライマー対を適切に選択することによって、単一のアッセイで３つすべてを同時に定量化することができる。
【０２４６】
予想どおりに、１Ａ－１Ｂのみが、ＩｇＥ抗ＯＶＡまたは非特異的ＩｇＥのいずれかをアッセイする場合、濃度依存シグナルを示す。２Ａ－２Ｂのみが、ＩｇＥ抗ＯＶＡまたはＩｇＧ抗ＯＶＡのいずれかをアッセイする場合、濃度依存シグナルを示す。２Ａ－１Ｂのみが、ＩｇＥ抗ＯＶＡを試験する場合、シグナルを示す。
【０２４７】
２Ａ－１Ｂおよび１Ａ－２Ｂの両方がＩｇＥ抗ＯＶＡに特異的であると予想され得るが、１Ａ－２Ｂは２Ａ－１Ｂほど特異的ではないことが観察された。言い換えれば、１Ａ－２Ｂは、高濃度でＩｇＧ抗ＯＶＡをアッセイしたときにクロストークを示した。したがって、２Ａ－１Ｂを用いてアレルゲン特異的ＩｇＥ抗体をアッセイすることが好ましい。これらの実験は、プライマー対を適切に選択することによって、多様なアレルギー情報の多重検出を実現できることを示す。

【０２４８】
ＰＣＲベースのアッセイによる１μＬ試料を用いた卵白アルブミン感作マウスにおけるアレルギー反応の検出
次に、ＯＶＡ感作マウスアレルギーモデルを用いたＰＣＲベースのアッセイ性能を基準に従って評価を試みた（Ｎａｋａｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１９：６８０－６８６）。ＯＶＡ感作マウス群は、０および１４日目に２回のＯＶＡ投与で感作させた。試料は、７日毎に尾出血を介して採取した。対照群のマウスにＰＢＳビヒクルを注射し、従来どおりに試料を採取した。重要なことは、ＰＣＲベースのアプローチに対する試料タイプの互換性をさらに調査するために、各マウスからすべての時点で全血および血清の試料を採取する。
【０２４９】
多重ＰＣＲベースの分析を実施するために、抗ＩｇＥ－１Ａ、抗ＩｇＥ－１Ｂ、ＯＶＡ－２Ａ、ＯＶＡ－２Ｂをプローブとして使用した。このパネルにより、ＯＶＡのｔＩｇＥ、ｓＩｇＥ、およびＯＶＡに対する総免疫グロブリンの検出を可能にした。簡単に言えば、１μＬの試料をプローブでインキュベートし、連結混合物を添加し、ＰＣＲによってプレ増幅し、ｑＰＣＲによって分析した。
【０２５０】
血清試料については、７日目から開始する総ＩｇＥシグナルの有意な上昇が観察された。また、１４日目に抗ＯＶＡ　ｓＩｇＥを観察した。ＯＶＡに対する総免疫グロブリンが７日目に観察された。ＰＣＲベースのアプローチによって観察されたアレルギー反応をさらに検証するために、ＯＶＡに対するｓＩｇＥのＥＬＩＳＡで同じ試料セットを分析した。予想どおりに、ｓＩｇＥは、１４日目にＥＬＩＳＡによって観察され、これはＰＣＲベースのアプローチと一致した。重要なことは、ＥＬＩＳＡベースのアッセイは、２０μＬの血清を消費しましたが、ＰＣＲベースのアプローチでは毎回１μＬの血清しか使用しなかった。
【０２５１】
また、ＰＣＲベースのアプローチと全血試料の適合性についても調査した。全血は、労働集約的で時間のかかる分離プロセスを必要としないため、血清と比較して有利であり得る（Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊ．Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．２：２４２－２４３）。さらに、全血試料は、乾燥した血液スポットとして室温で研究室から研究室に移すことができ、送料を大幅に削減する（Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａｎら、上記参照）。
【０２５２】
全血試料では、血清試料と同様のアレルギープロファイルが観察された。総ＩｇＥは、７日目に現れ、ＯＶＡに対する特異的ＩｇＥは、１４日目に現れ、ＯＶＡに対する総免疫グロブリンは、７日目に観察された。重要なことは、血清および全血試料を用いて測定されたシグナルは、高度な相関を示すことである（Ｒ＝０．９）。
【０２５３】
これらの実験は、ＰＣＲベースの分析が血清および全血試料の両方に適合することを示す。ＰＣＲベースのアプローチは、ＥＬＩＳＡよりもはるかに少ない試料量を消費するが、アレルギー情報を忠実に明らかにすることができる。
【０２５４】
複数のピーナッツ成分ＩｇＥのＰＣＲベースの検出は、マウスモデルにおいてＥＬＩＳＡよりも感度が高い。
次に、ＰＣＲベースのアプローチが、単一のアッセイで複数のピーナッツ成分（Ａｒａｈ１、ｈ２、およびｈ３）におけるアレルギー情報を示し得ることを実証しようとした。Ｂ６およびＢＡＬＢマウスの両方を、６週間連続してピーナッツ油で皮膚感作させた。血清試料を０日目および４５日目に採取した。ピーナッツアレルギーの誘導の成功は、ピーナッツエキスの静脈内大量投与後のアナフィラキシーによって検証された。
【０２５５】

この高度に多重化されたＰＣＲベースの分析では、プローブとして抗ＩｇＥ－１Ａ、抗ＩｇＥ－１Ｂ、Ａｒａ－ｈ１－２Ａ、Ａｒａ－ｈ１－２Ｂ、Ａｒａ－ｈ２－３Ａ、Ａｒａ－ｈ２－３Ｂ、Ａｒａ－ｈ３－４Ａ、およびＡｒａ－ｈ３－４Ｂを使用した。１μＬのマウス血清試料を分析し、感作後のＡｒａ－ｈ１に対する総ＩｇＥおよびｓＩｇＥのシグナルが強く上昇したことを観察した。Ａｒａ－ｈ２に対して上昇したシグナルが観察されるが、統計的有意性には達していない。この結果は、ピーナッツの全皮膚感作がマウスモデルにおいてＡｒａ－ｈ１特異的ＩｇＥの強力な産生につながるというこれまでの結果を概括する（Ｓｍｉｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）　Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ．Ａｌｌｅｒｇｙ　５：１３）。重要なことは、ピーナッツ特異的ＩｇＥについてＥＬＩＳＡによって同じセットのマウス血清をアッセイする場合、感作後に反応は観察されなかった。この結果は、非常に低レベルのＩｇＥ検体を検出するために、標準的なＥＬＩＳＡを超えるＰＣＲベースのアッセイの能力を強調する。

【０２５６】

興味深いことに、ＢＡＬＢマウスおよびＢ６マウスの両方が皮膚感作にさらされる場合に、Ｂ６マウスよりもＢＡＬＢマウスに対して定性的に強い反応が観察される。この結果はまた、ＢＡＬＢマウスがより強いＴｈ２反応を生じさせ、それ故に、ＩｇＥ誘導の影響をより受けやすいという現時点での理解とも一致している（Ｓａｈｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）　ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　５：ｅ１１３４８）。

【０２５７】

ＰＣＲベースの分析によって観察された結果がピーナッツ感作による特異的ＩｇＥの誘導によるものであることをさらに検証するために、同じプロトコルを用いてＪｈおよびＲａｇノックアウトマウスの両方に皮膚感作した。これらの２系統のマウスは免疫グロブリンを産生できず、それ故にピーナッツ成分に対するｓＩｇＥを生成すべきではない（Ｌａｎｓｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）　Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：３２５－３３２、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５：６４７－６５６）。予想どおりに、ＪｈおよびＲＡＧマウスからの血清試料を分析した場合、感作後に統計学的に有意な差は認められなかった。

【０２５８】

ここでは、ＰＣＲベースのアプローチが、単一のアッセイで複数のピーナッツ成分におけるアレルギー情報を分析することができることを実証した。ＰＣＲベースのアプローチの感度の向上により、従来のＥＬＩＳＡによって検出することができない関連シグナルを観察する。また、免疫不全マウス系統ではシグナルが観察されないため、観察されたシグナルは実際には特異的である。

【０２５９】

１μＬの患者血漿を用いたピーナッツアレルギー反応の多重分析およびＩｍｍｕｎｏＣＡＰとの相関。

最後に、ＰＣＲベースのアッセイが、臨床患者試料を用いたピーナッツアレルギーに対する免疫反応を忠実に獲得し、その結果をＩｍｍｕｎｏＣＡＰと相関させることができることを実証しようとした。

【０２６０】

アレルギー反応を減衰させるためのピーナッツ経口免疫療法の有効性を調査するために設計されたＰＯＩＳＥＤ臨床試験から２０個のベースライン患者試料を得た（Ｍｕｋａｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｓ００９１－６７４９：３０６１３－３）。ここでは、前述の多重パネルの抗ＩｇＥ－ＤＮＡ、Ａｒａ　ｈ１－ＤＮＡ、Ａｒａ－ｈ２－ＤＮＡ、およびＡｒａ－ｈ３－ＤＮＡプローブ対を使用した。さらに、ピーナッツ成分に対するｓＩｇＧ４を検出するために、抗ＩｇＧ４－ＤＮＡコンジュゲートを含めた。

【０２６１】

満足のいくことに、当社のＰＣＲベースのアプローチは、わずか１μＬの患者血漿から１０個のアレルギーパラメーターを追跡することに成功した。重要なことは、Ａｒａ　ｈ

１、ｈ２、およびｈ３に対して特異的なＩｇＥシグナルは、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰと非常によく相関する（Ａｒａ　ｈ１に対してはＲ＝０．８２、Ａｒａ　ｈ２に対しては０．９２、およびＡｒａ　ｈ３に対して０．８４）。

【０２６２】

これらの結果は、ＰＣＲベースのアプローチが究極の判断基準のＩｍｍｕｎｏＣＡＰプラットフォームと少なくとも同じくらい効果的であるが、費用対効果および試料消費量の削減を含む重要な利点があることを示す。例えば、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰを用いて収集した同じ情報は、４００μＬの患者血漿が必要となり得る。統合されたＰＣＲベースのアプローチは、１μＬのみを必要とし、単一のアッセイでこれらすべてのパラメーターを検出する。さらに、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰアッセイで必要とされる高額な抗原は、この形式の費用を約５００ドルまで増加させるが、ＰＣＲベースのアプローチの材料費は、約５ドルである。追加のアレルゲンおよび患者試料を用いたＰＣＲベースのアプローチの正確な臨床感度および特異性を調べるために、今後の研究が進行中である。

【０２６３】

考察

特定のアイソタイプの抗原結合抗体を検出するために新しく開発されたＰＣＲベースの方法であるＩＳＡＰを報告する。さらに、ＩＳＡＰを他のＰＣＲベースの方法と単一のアッセイに結合する。この統合されたＰＣＲベースのアプローチは、１つの多重化アッセイにおいて、総ＩｇＥ、特異的ＩｇＥ、特異的ＩｇＧ４、および総抗アレルゲン抗体を検出する。

【０２６４】

アレルギー検出のためのＰＣＲベースのアプローチは、いくつかの長所がある。第１に、個々のアレルゲンタンパク質－ＤＮＡコンジュゲートをプローブとして使用することによって、成分分解アレルギー診断の高い特異性を活用する。第２に、ＤＮＡバーコードを介して高度に多重化することができ、複数のアレルゲン成分に対する反応を同時に検出することができる。第３に、ＰＣＲの指数関数的増幅により、分析感度が大幅に向上したことを示す。第４に、ＰＣＲベースのアプローチは、微量の試料（１μＬ）を消費するため、小児患者の検査に役立つ。第５に、ＰＣＲベースのアッセイにおける材料費は、究極の判断基準のアレルゲンアッセイと比較して非常に低い（１機能当たり１試料あたり０．５ドル）。最後に、ＰＣＲベースのアプローチのワークフローは操作が簡単で、特別な機器を必要としない。

【０２６５】

ＩｍｍｕｎｏＣＡＰアッセイは、ｓＩｇＥ測定における究極の判断基準として認められている。ここでは、ＰＣＲベースの抗体検査が、臨床患者試料の分析においてＩｍｍｕｎｏＣＡＰとよく相関することを実証した。重要なことは、ＰＣＲベースのアプローチは、１検査当たり５ドル未満の安価であることである。比較され得るＩｍｍｕｎｏＣＡＰアッセイは、５００ドル以上の費用を要する。さらに、ＰＣＲベースのアプローチは、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰが必要とする４００μＬと比較して、１μＬの血漿しか使用しない。大幅な費用削減は、成分分解アレルギー診断の広範な採用が促進され得る。

【０２６６】

ＩｍｍｕｎｏＣＡＰプラットフォームの姉妹技術は、ＩＳＡＣ技術である（Ｃｈａｐｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）　Ｃｕｒｒ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ａｓｔｈｍａ　Ｒｅｐ．１５：３６）。従来のＩｍｍｕｎｏＣＡＰアッセイで使用されるポリマーベースのアッセイと対照的に、ＩＳＡＣは、多数のアレルゲン成分に対してｓＩｇＥを捕捉し、検出するために、アレルゲン印刷アレイを使用する。しかしながら、ＩｇＥ捕捉には抗原が少ないため、ＩＳＡＣは、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰよりも感度が低くなる。さらに、ＩＳＡＣは、１１２個のアレルゲンを一度に検出するように固定されている。このような固定された多重形式は、混乱を招く／誤解を招く情報をもたらし得ることが報告されている（Ｉｎｃｏｒｖａｉａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｐｒａｃｔ．３：８７９－８８２）。ＤＮＡバーコードの性質により、統合されたＰＣＲ

ベースのアプローチは、必要に応じて１～９６個のアレルゲン成分の検出を理想的に可能にする柔軟な多重化パワーを享受する。

【０２６７】

しかしながら、ＰＣＲベースのアプローチは、限定されないわけではない。血清試料は、アレルゲン（ｓＩｇＧ）に対する高レベルのＩｇＧ抗体を含み、プローブ結合についてｓＩｇＥと競合し得る。ＰＣＲベースのアプローチが、最大１０００～１００００Ｘの過剰ｓＩｇＧに対応することができることを実験的に検証した。ｓＩｇＧ干渉に対するこの回復力は、臨床的に使用されているＩＳＡＣ形式と比較して有利である（Ｌｕｐｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）　Ｍｅｔｈｏｄｓ　６６：１０６－１１９）。

【０２６８】

さらに、ピーナッツアレルギー患者から分析された試料の多くには、検出可能なレベルのｓＩｇＧ４が含まれていた。幸いなことに、ＰＣＲベースのアプローチは、これらの試料中のピーナッツ成分に対するｓＩｇＥが依然として正確に検出された。ｓＩｇＥレベルもまた、ＩｍｍｕｎｏＣＡＰとよく相関した。このデータは、ＰＣＲベースのアプローチが、ｓＩｇＧの存在下でもｓＩｇＥを忠実に検出することを示唆している。

【０２６９】

最悪の筋書きでは、偽陰性ＩｇＥ検査が特定され得、総抗アレルゲンまたはＩｇＧ４が非常に強いシグナルを示す場合、ＰＣＲベースのアプローチが本質的に総抗アレルゲン抗体を検出する。

【０２７０】

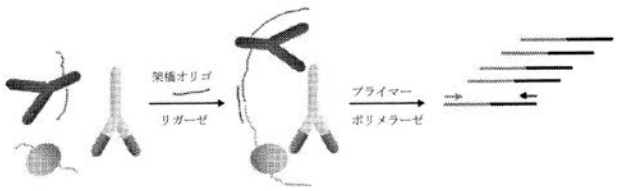
結論として、ＰＣＲベースのアレルギーアッセイは、感度、特異性の向上、試料消費およびアッセイ費用の低減、ならびに標準のｑＰＣＲ機器への依存の低下を特徴とする。より良好な疾患管理のために、小児患者を臨床試験およびその他の新しい治療法に結び付けるために必要とされる試料の低減により、当社のアッセイは小児患者に特に有益であることを示す。それ故に、ＩＳＡＰおよびその関連するＰＣＲベースのアプローチは、研究所や臨床施設でのより良好なアレルギー検査の基盤を形成することを構想している。

【０２７１】

本発明の好ましい実施形態がいくらか詳細に説明されているが、本明細書で定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく明らかな変更がなされ得ることが理解される。

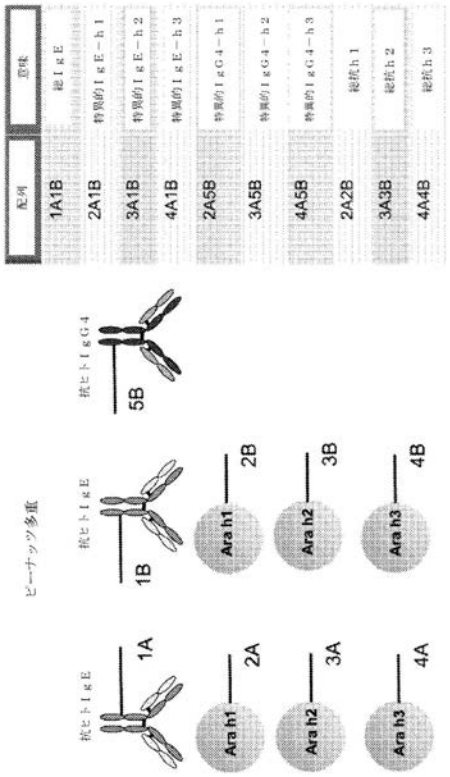
【図１】

【図１】



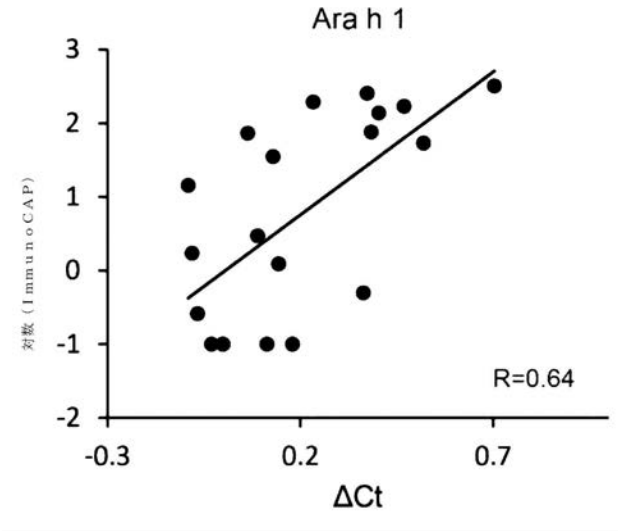
【図２】

【図２】



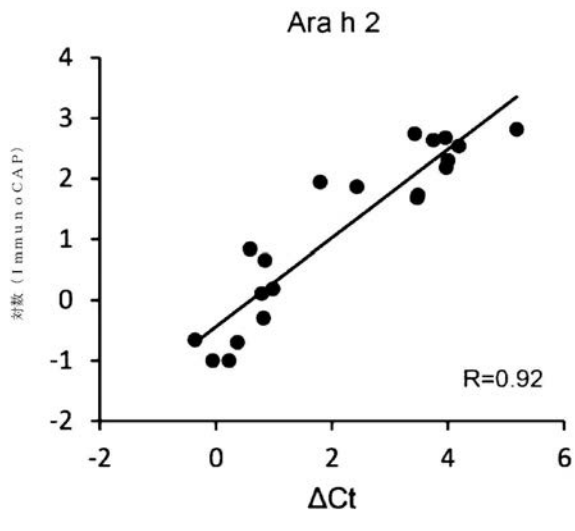
【図３Ａ】

【図３Ａ】



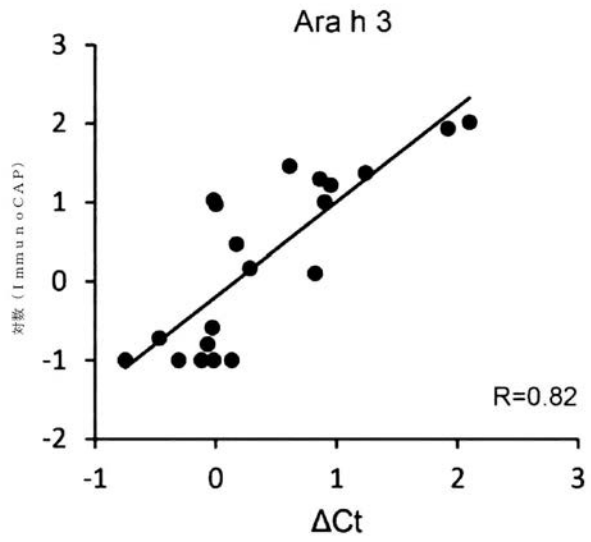
【図３Ｂ】

【図３Ｂ】



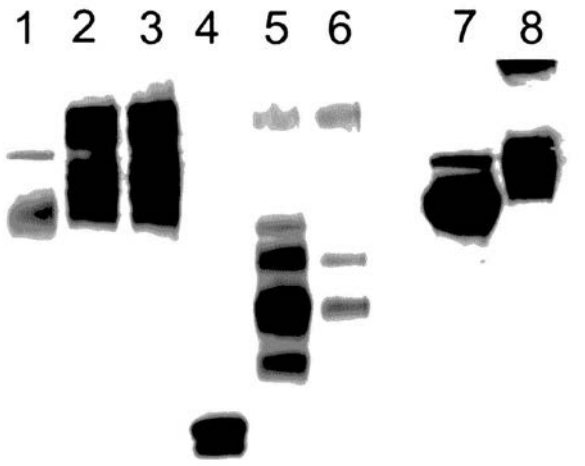
【図３Ｃ】

【図３Ｃ】



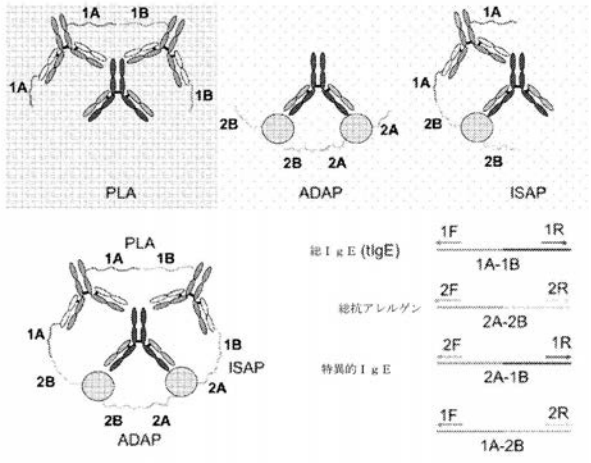
【図４】

【図４】



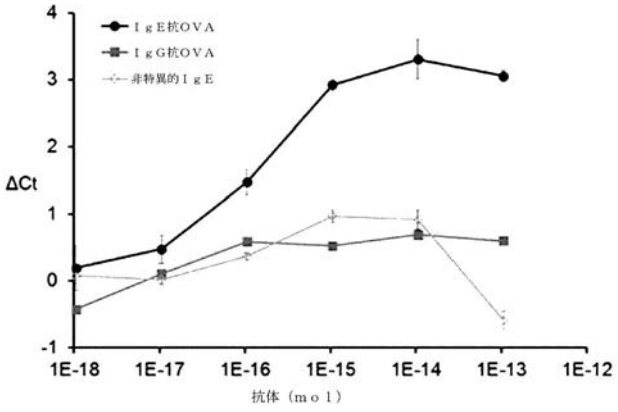
【図５】

【図５】



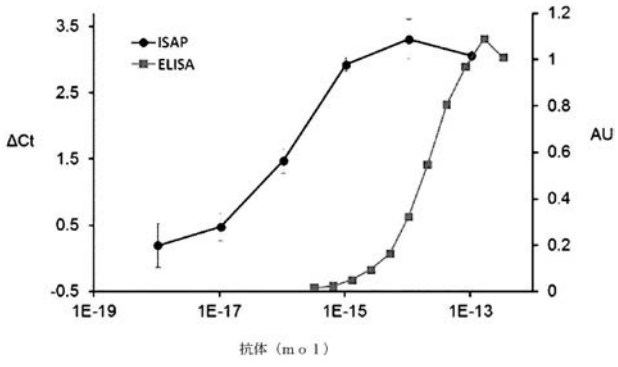
【図６Ａ】

【図６Ａ】



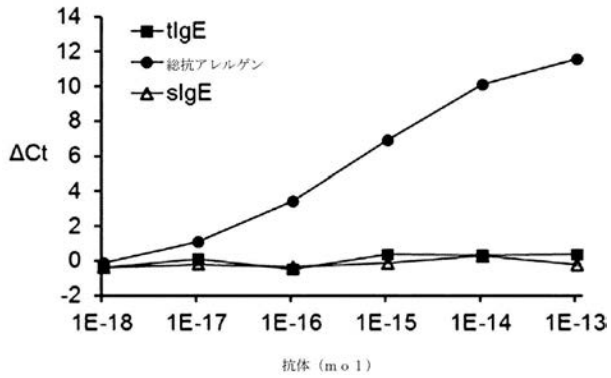
【図６Ｂ】

【図６Ｂ】



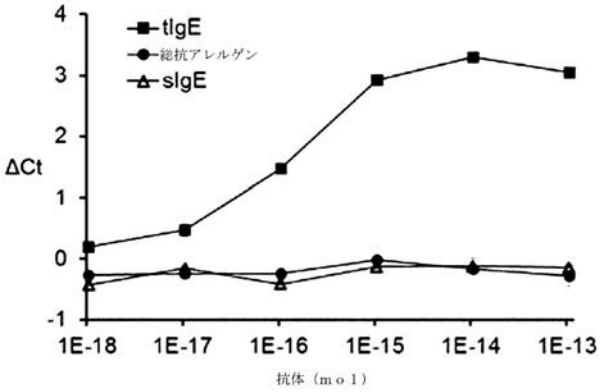
【図７Ａ】

【図７Ａ】



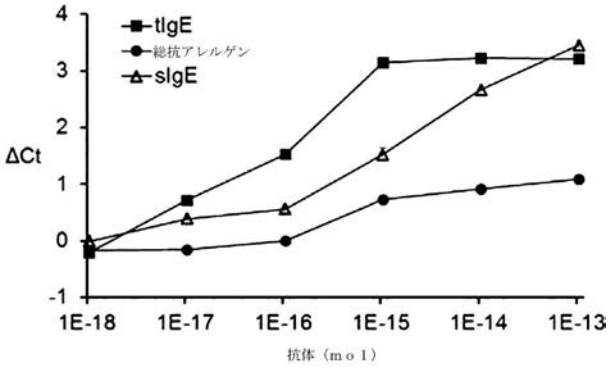
【図７Ｂ】

【図７Ｂ】



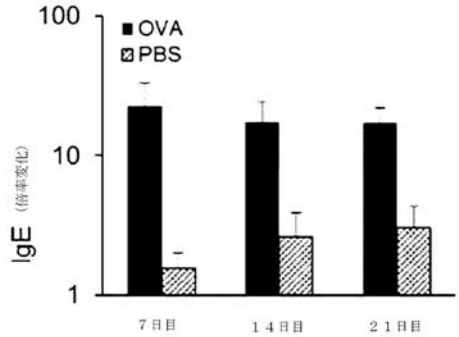
【図７Ｃ】

【図７Ｃ】



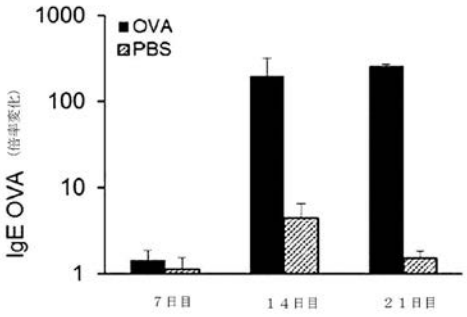
【図８Ａ】

【図８Ａ】



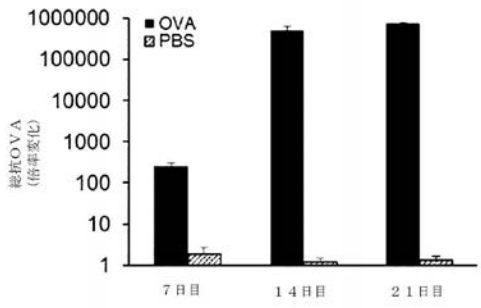
【図８Ｂ】

【図８Ｂ】



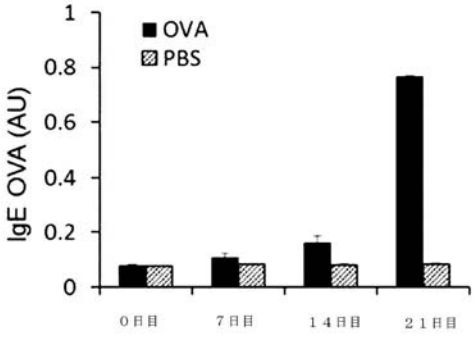
【図８Ｃ】

【図８Ｃ】



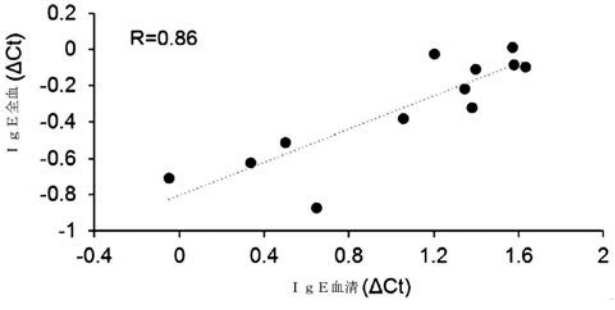
【図８Ｄ】

【図８Ｄ】

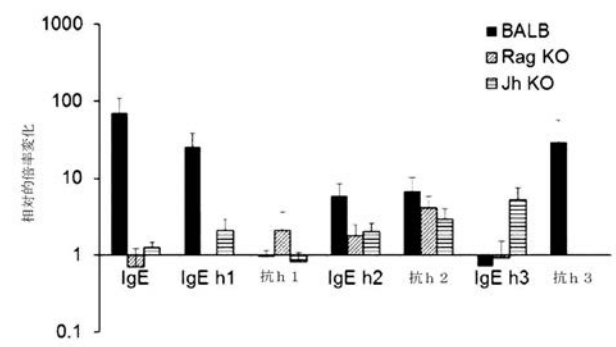


【図８Ｅ】

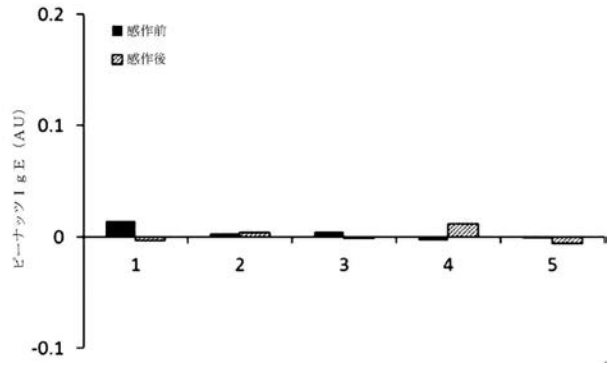
【図８Ｅ】



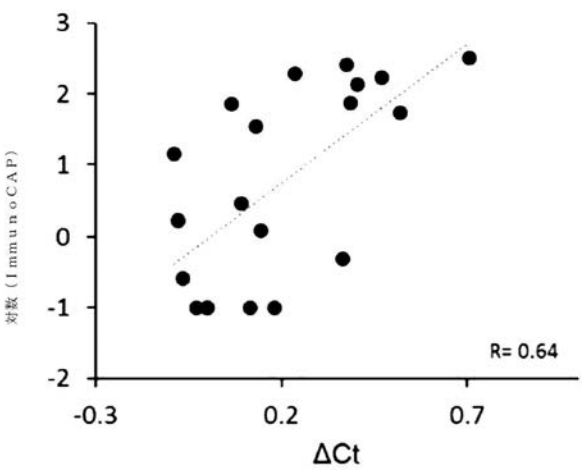
【図９Ａ】



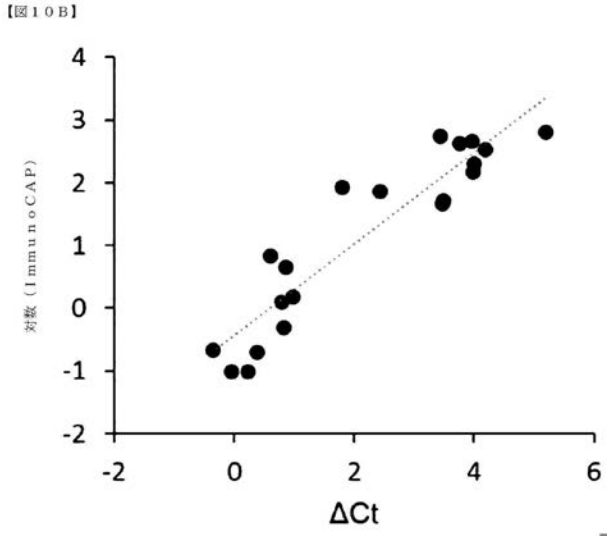
【図９Ｂ】



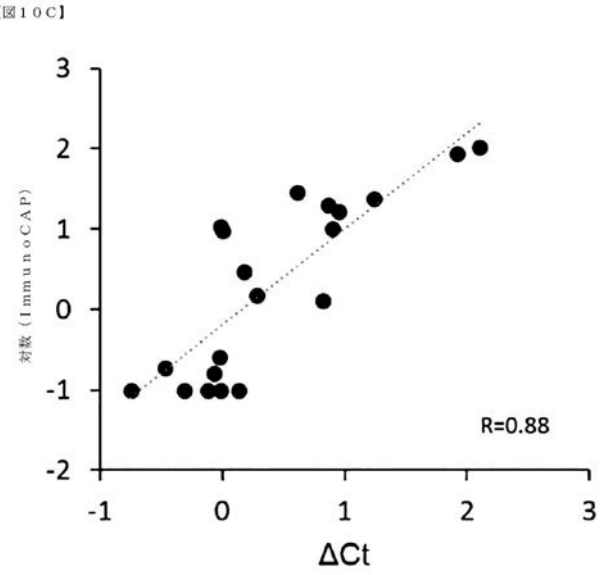
【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】

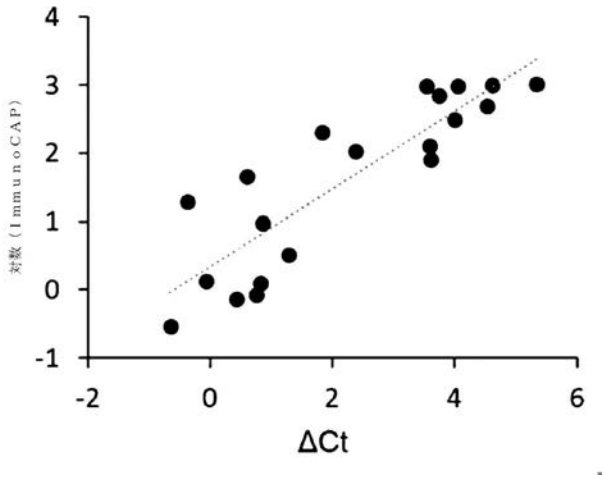


【図１０Ｃ】



【図１０Ｄ】

【図１０Ｄ】



【図１０Ｅ】

【図１０Ｅ】

	ＰＣＲベースのアッセイ	ImmunoCAP
試料の量	1 µl	200 µl
費用	$5	$500
応答時間	＜４時間	＜６時間
機器	ｑＰＣＲ機構	免疫アッセイ分析器

【配列表】

2020515267000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/25299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C12Q 1/68, 1/6804, 1/686, 1/6806; G01N 33/48, 33/52, 33/53, 33/532, 33/543 (2018.01)
CPC - C12Q 1/68, 1/6804, 1/6806, 1/686; G01N 33/48, 33/52, 33/53, 33/532, 33/543, 33/54306; C12P 19/34; C12M 1/34; C07K 16/4283

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	WO 2016/168711 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 20 October 2016; paragraphs [0006]-[0008], [0024], [0041], [0069], [0084], [0093], [00101], [00115], [00117], [00119], [00179]-[00180], [00182], [00189], [00192]-[00193], [00195], [00199], [00205]-[00206], [00212], [00240], [00243], [00249]; Table 2	1-7, 9-33 --------- 8, 34-58
Y	EP 2 022 507 A1 (UNIVERSITAT HAMBURG) 11 February 2009; paragraph [0014]	8, 35, 39, 43-46, 50
Y	US 2011/0020373 A1 (SAXON, A et al.) 27 January 2011; paragraph [0078], [0205], [0223], [0249]; Figure 5	51-54
A	WO 95/05399 A1 (THE REGENTS OF 1HE UNNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 February 1995; entire document	1-58
A	WO 2014/207245 A1 (INSERM et al.) 31 December 2014; entire document	1-58
P, X	WO 2017/068116 A1 (OLINK PROTEOMICS AB) 27 April 2017; entire document	1-58
P, X	US 2018/0100181 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 April 2018; entire document	1-58

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 July 2018 (18.07.2018)	26 JUL 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/25299

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-58; SEQ ID NO: 1 (antigen-conjugate DNA sequence), SEQ ID NO: 2 (antibody-conjugate DNA sequence); SEQ ID NO: 3 (reverse primer), and SEQ ID NO: 4 (forward primer)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US18/25299

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-58 and SEQ ID NOs: 1, 2, 3, and 4 are directed toward methods, kits, conjugates and compositions for detecting a target antibody isotype and allergen antibodies.

The methods, kits, conjugates and compositions will be searched to the extent they encompass conjugates comprising DNA sequences encompassing SEQ ID NO: 1 (first exemplary antigen-conjugate DNA sequence) and SEQ ID NO: 2 (first exemplary antibody-conjugate DNA sequence); and a pair of primers encompassing SEQ ID NO: 3 (first exemplary reverse primer) and SEQ ID NO: 4 (first exemplary forward primer). Applicant is invited to elect additional pair(s) of DNA sequence(s) associated with each antigen and its cognate antibody, and, where applicable, an associated pair of primers for amplification of the DNA sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional pair(s) of conjugated DNA sequence(s) and associated pair(s) of primers will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-23, 24 (in-part), 25-27, 28-33 (each in-part), 34-46, 47-50 (each in-part), 51-53, and 54-58 (each in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (antigen-conjugate DNA sequence), SEQ ID NO: 2 (antibody-conjugate DNA sequence); SEQ ID NO: 3 (reverse primer), and SEQ ID NO: 4 (forward primer). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 5 (antigen-conjugate DNA sequence), SEQ ID NO: 6 (antibody-conjugate DNA sequence); SEQ ID NO: 7 (reverse primer), and SEQ ID NO: 8 (forward primer). (It should be noted that, since bridge oligonucleotide sequence SEQ ID NO: 21 is the only bridge sequence claimed by the applicants, it will be searched as a part of the first embodiment of Groups I+).

No technical features are shared between the conjugate DNA sequences and primers of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method of detecting a target antibody isotype in a sample, the method comprising: a) contacting the sample with i) an antibody-binding agent conjugated to a first DNA molecule comprising a first portion of a barcode and ii) an antigen conjugated to a second DNA molecule comprising a second portion of a barcode, wherein the antigen binds to the target antibody isotype in the sample, if present, and the antibody-binding agent specifically binds to the target antibody isotype resulting in formation of a complex; b) connecting the first DNA molecule to the second DNA molecule in the complex, wherein the first portion of the barcode and the second portion of the barcode are joined to form a complete barcode; and c) detecting the complete barcode as an indication of the presence of the target antibody isotype in the sample; a kit for performing isotype-specific agglutination-polymerase chain reaction (ISAP) comprising at least one antigen-DNA conjugate, at least one antibody-binding agent-DNA conjugate, at least one bridge oligonucleotide, and at least one pair of PCR primers for detecting an antibody isotype; an antigen-DNA conjugate comprising a DNA sequence; an antibody-binding agent-DNA conjugate comprising a DNA sequence ; a composition for detecting antibodies in a biological sample comprising at least one set of reagents: a) an antigen-DNA conjugate, an antibody-binding agent-DNA conjugate, a bridge oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 21, a reverse primer; and a forward primer; a kit comprising the composition and instructions for detecting antibodies; a method for detecting allergen antibodies in a sample, the method comprising performing isotype-specific agglutination-polymerase chain reaction (ISAP) using at least one allergen-DNA conjugate in combination with at least one anti-IgE antibody-DNA conjugate to detect allergen-specific IgE levels in the sample; a method for detecting peanut allergen antibodies in a sample according to the method, wherein said performing ADAP comprises using a pair of DNA conjugates to antibody levels in the sample; a composition comprising: reagents comprising: a first antibody-DNA conjugate, a second antibody-DNA conjugate, a bridge oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 21, a reverse primer, and a forward primer; a kit comprising the composition and instructions for detecting allergen antibodies; these shared technical features are previously disclosed by WO 2016/166711 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter 'California') in view of the article 'Ultrasensitive Antibody Detection by Agglutination-PCR (ADAP)' by Tsai et al. (hereinafter 'Tsai').

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/25299

-***-Continued from Previous Supplemental Page-***-

California discloses a method of detecting a target antibody isotype in a sample (a method of detecting mouse IgG (a target antibody isotype) in a sample; paragraphs [0004], [0006], [0021]), the method comprising: a) contacting the sample with i) an antibody-binding agent conjugated to a first DNA molecule (the method comprising: a) contacting the sample with i) an anti-IgG antibody (antibody-binding agent) conjugated to a first DNA molecule; paragraphs [0006], [0021] wherein the antigen is a mouse IgG antibody or epitope thereof) comprising a first portion of a barcode (comprising a first portion of a barcode; paragraphs [0006], [00115]) and ii) an antigen conjugated to a second DNA molecule (an antigen conjugated to a second DNA molecule; paragraphs [0006], [00115]) comprising a second portion of a barcode (comprising a second portion of a barcode; paragraphs [0006], [00115]), wherein the antigen binds to the target antibody isotype in the sample, if present (wherein the second antigen binds to the target antibody isotype in the sample, if present; paragraph [0006]), and the antibody-binding agent specifically binds to the target antibody isotype (and the anti-mouse IgG (antibody-binding agent) specifically binds to the target antibody isotype; paragraphs [0006], [0021]) resulting in formation of a complex (resulting in formation of a complex; paragraph [0006]); b) connecting the first DNA molecule to the second DNA molecule in the complex (ligating (connecting) the first DNA molecule to the second DNA molecule in the complex; paragraph [0006]), wherein the first portion of the barcode and the second portion of the barcode are joined to form a complete barcode (wherein the first portion of the barcode and the second portion of the barcode are joined to form a complete barcode; paragraphs [0006], [00115]); and c) detecting the complete barcode as an indication of the presence of the target antibody isotype in the sample (detecting the complete barcode as an indication of the presence of the target antibody isotype in the sample; paragraphs [0006], [0021], [00115]); a kit for performing isotype-specific agglutination-polymerase chain reaction (ISAP) (a kit for performing amplification-based detection of an agglutination detection product (isotype-specific agglutination-polymerase chain reaction (ISAP); paragraphs [0007], [00180]) comprising at least one antigen-DNA conjugate (comprising at least one second antigen-DNA conjugate; paragraphs [0006], [0007], [00180]), at least one antibody-binding agent-DNA conjugate (at least one mouse IgG-DNA conjugate, (antibody-binding agent-DNA conjugate); paragraphs [0006], [0007], [0021], [00180]), at least one bridge oligonucleotide (at least one bridge oligonucleotide; paragraphs [0007], [00180]), and at least one pair of PCR primers for detecting an antibody isotype (and at least one pair of PCR primers for detecting an antibody isotype; paragraphs [0006], [0007], [0021], [00180], as PCR reagents); an antigen-DNA conjugate comprising a DNA sequence (an antigen-DNA conjugate comprising a DNA sequence; paragraph [0006]); an antibody-binding agent-DNA conjugate comprising a DNA sequence (a mouse IgG-DNA conjugate (an antibody-binding agent-DNA conjugate comprising a DNA sequence); paragraphs [0006], [0021]); a composition for detecting antibodies in a biological sample comprising at least one set of reagents (a composition for detecting antibodies in a biological sample comprising at least one set of reagents; paragraphs [0006], [00167]): a) an antigen-DNA conjugate (comprising a second antigen-DNA conjugate; paragraphs [0006], [0007], [00180]), an antibody-binding agent-DNA conjugate (a mouse IgG-DNA conjugate, (antibody-binding agent-DNA conjugate); paragraphs [0006], [0007], [0021], [00180]), a bridge oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 21 (a bridge oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 21; paragraphs [0006], Table 2, SEQ ID NO: 4, wherein SEQ ID NO: 4 is the RNA equivalent (i.e. U replacing T) of Applicants' SEQ ID NO: 21), a reverse primer (a reverse primer; paragraphs [0008], [0093], [00180]); and a forward primer (a forward primer; paragraphs [0008], [0093], [00180]); a kit comprising the composition and instructions for detecting antibodies (a kit comprising the composition and instructions for detecting antibodies; paragraphs [0007], [00180], [00182]).

California does not disclose a method for detecting allergen antibodies in a sample, the method comprising performing isotype-specific agglutination-polymerase chain reaction (ISAP) using at least one allergen-DNA conjugate in combination with at least one anti-IgE antibody-DNA conjugate to detect allergen-specific IgE levels in the sample; a method for detecting peanut allergen antibodies in a sample according to the method, wherein said performing ADAP comprises using a pair of DNA conjugates to antibody levels in the sample; a composition comprising: reagents comprising: a first antibody-DNA conjugate, a second antibody-DNA conjugate, a bridge oligonucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 21, a reverse primer, and a forward primer; a kit comprising the composition and instructions for detecting allergen antibodies.

Tsai discloses wherein ADAP can be used to monitor allergic responses (wherein ADAP can be used to monitor allergic responses; page 141, second column, first paragraph [immediately under the legend for Figure 4]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of California to have provided antigens comprising anti-allergen antibodies, such as antibodies which bind to a common antigen involved in peanut allergies, in accordance with the formation of an IgG-DNA conjugate as disclosed by California, and using a second, anti-idotypic antibody-DNA conjugate, as disclosed by California, and the additional reagents and processes disclosed by California to monitor or detect the presence of allergy-related antibodies in a subject to monitor and/or predict allergic responses, as disclosed by Tsai.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the California and Tsai references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/11	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11 Ｚ	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者 ベルトッツィ， キャロライン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０２５， メンロー パーク， イェール ロード ２２０
(72)発明者 ガッリ， スティーブン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０２８， ポートラ バレー， エイコーン ストリート ２
(72)発明者 向井 香織
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， ソデン ストリート １０， アパートメント ４６
(72)発明者 ロビンソン， ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１１２， サンフランシスコ， オーシャン アベニュー ２４８ ナンバー３０１
(72)発明者 ツァイ， チェン－ティン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０６， パロ アルト， バイロン ストリート ２７３７
(72)発明者 ツァイ， ミンディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０３， パロ アルト， ウォルター ヘイズ ドライブ ２６８

Ｆターム(参考) 2G045 CA25 CA26 DA37 FB01 FB02 FB03
4B063 QA01 QA07 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ79 QQ96 QR08
QR20 QR32 QR58 QR62 QS10 QS12 QS25 QS33 QS34 QS39
QX02

专利名称(译)	检测多种同种型特异性抗体		
公开(公告)号	JP2020515267A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019553563	申请日	2018-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	向井香織		
发明人	ベルトッツィ, キャロライン ガッリ, スティーブン ジェイ. 向井 香織 ロビンソン, ピーター ツァイ, チェン-ティン ツァイ, ミンディ		
IPC分类号	C12Q1/686 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/50 C12Q1/6851 C12N15/11		
CPC分类号	C12Q1/6804 G01N33/686 G01N2458/10 C12Q2521/101 C12Q2521/501 C12Q2525/205 C12Q2537/143 C12Q2563/179		
FI分类号	C12Q1/686.Z G01N33/53.ZNA.N G01N33/542.Z G01N33/50.P C12Q1/6851.Z C12N15/11.Z		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	62/479278 2017-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于抗体的多重检测的方法和试剂。 特别地，本发明涉及携带DNA条形码的抗原-DNA和携带DNA的抗原，用于识别和定量疾病相关抗体同种型，例如涉及变态反应，自身免疫疾病，传染病和炎症的疾病相关抗体同种型。 它涉及使用抗体结合剂-DNA缀合物的抗体的多重检测。 本发明基于用于检测特定同种型抗体的灵敏且可靠的诊断测定法的发展。 带有DNA条码的抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物可用于检测特定抗体的存在。 [选择图]图5

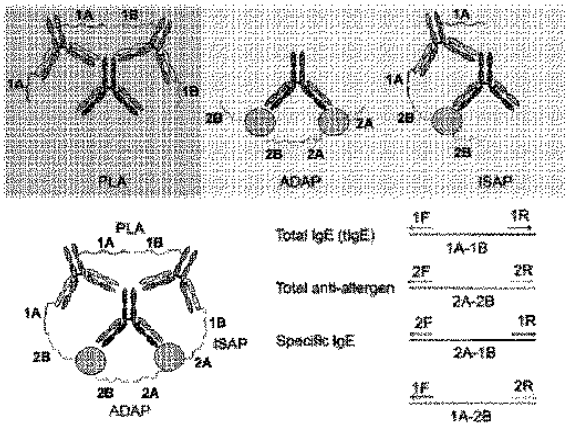


FIG. 5