

(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2021-524589

(P2021-524589A)

(43) 公表日 令和3年9月13日 (2021.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	4 B O 2 9
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 A	4 B O 5 0
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	G O 1 N 33/53 U	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B O 6 4
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	C 1 2 N 15/53	4 B O 6 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-573295 (P2020-573295)
 (86) (22) 出願日 令和1年7月1日 (2019.7.1)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月8日 (2021.2.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/040161
 (87) 国際公開番号 W02020/010007
 (87) 国際公開日 令和2年1月9日 (2020.1.9)
 (31) 優先権主張番号 62/693, 434
 (32) 優先日 平成30年7月2日 (2018.7.2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 508147326
 シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
 イックス・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10591
 -5098, タリータウン, ベネディクト
 アベニュー511
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 カイラ・コーティーゼ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州074
 30, マファ, メイセングー・ロード60

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規甲状腺ペルオキシダーゼ自己抗体イムノアッセイ

(57) 【要約】

本明細書で開示するのは、対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する、および/または対象の甲状腺疾患を診断するイムノアッセイである。開示されたイムノアッセイは、組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O) を使用し、抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体が誘導する固体支持体および r T P O を含む複合体の形成または崩壊のレベルを評価する。

【選択図】 図 1

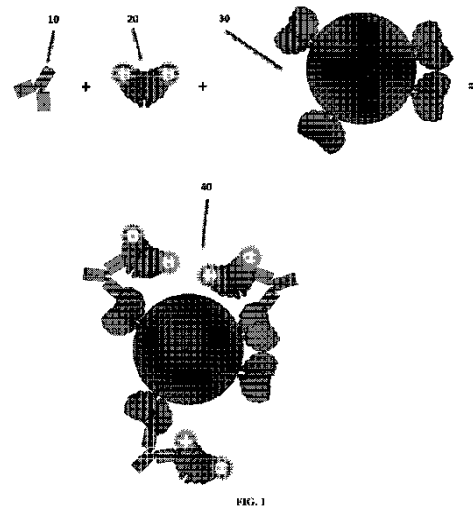


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O)、および

標識カニクイザル r T P O

とインキュベートする工程であって、

該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該標識カニクイザル r T P O、該非標識
カニクイザル r T P O および該固体支持体を含む複合体が形成される、工程；および

10

b) 該複合体を検出する工程であって、該複合体の存在は、生物学的サンプル中の該抗
甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す、工程
を含む前記方法。

【請求項 2】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物
発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

標識は、アクリジニウムエステル (「 A E 」) またはその類似体を含む、請求項 2 に記
載の方法。

【請求項 4】

20

非標識カニクイザル r T P O は、固体支持体に間接的に連結されている、請求項 1 ~ 3
のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

非標識カニクイザル r T P O は、ビオチン化されており、固体支持体は、ストレプトア
ビジンを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

非標識カニクイザル r T P O および固体支持体は、リン酸緩衝液、N a C l、E D T A
、プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾
ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中に存在する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方
法。

30

【請求項 7】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

標識カニクイザル r T P O、および

抗ヒト二次抗体

とインキュベートする工程であって、

該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該固体支持体、該カニクイザル r T P O
および該抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される、工程；および

40

b) 該複合体を検出する工程であって、該複合体の存在は、生物学的サンプル中の該抗
甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す、工程
を含む前記方法。

【請求項 8】

抗ヒト二次抗体は、固体支持体に直接的または間接的に連結されている、請求項 7 に記
載の方法。

【請求項 9】

カニクイザル r T P O は、標識を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物
発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 11】

標識は、アクリジニウムエステル（「AE」）またはその類似体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

アクリジニウムエステル（AE）類似体は、DMAE、NSP-DMAE、HQYAE、ZAE、Iso-Di-ZAE、TSP-AEまたはHEG-GLU-AEである、請求項 3 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

標識を含むカニクイザル rTPO は、rTPO-NSP-DMAE である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

rTPO-NSP-DMAE は、約 50 ng/ml から約 2 μg/ml で存在する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

カニクイザル rTPO および標識は、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニック F-127、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中に存在する、請求項 3 または 11 に記載の方法。

【請求項 16】

カニクイザル rTPO は、固体支持体に直接的または間接的に連結されている、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 17】

抗ヒト二次抗体は、標識を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

標識は、アクリジニウムエステル（「AE」）またはその類似体である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

アクリジニウムエステル類似体は、DMAE、NSP-DMAE、HQYAE、ZAE、Iso-Di-ZAE、TSP-AE または HEG-GLU-AE である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

抗ヒト二次抗体は、固体支持体に間接的に連結している、請求項 7 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

抗ヒト二次抗体は、ビオチン化されており、固体支持体は、ストレプトアビジンを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

カニクイザル rTPO は、固体支持体に間接的に連結している、請求項 7、16、17、18 または 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

カニクイザル rTPO は、ビオチン化されており、固体支持体は、ストレプトアビジンを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

カニクイザル rTPO および固体支持体は、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニック F-127、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中に存在する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

抗ヒト二次抗体は、抗ヒト IgG を含む、請求項 7 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 27】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 TPO 抗体、カニクイザル r TPO および標識抗 TPO 抗体とインキュベートする工程；および

b) 生物学的サンプル中の該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する工程であって、該検出は、該固体支持体、該非標識抗 TPO 抗体、該カニクイザル r TPO および該標識抗 TPO 抗体を含む複合体の形成の減少を分析することを含む、工程を含む前記方法。

【請求項 28】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

標識は、アクリジニウムエステル（「AE」）またはその類似体を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

アクリジニウムエステル類似体は、DMAE、NSP-DMAE、HQYAE、ZAE、Iso-Di-ZAE、TSP-AE または HEG-GLU-AE である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

標識抗 TPO 抗体は、抗 r TPO IgG HEG-GLU-AE である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

抗 r TPO IgG HEG-GLU-AE は、約 50 ng/ml から約 2 µg/ml で存在する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

複合体は、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニック F-127、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中にある、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 34】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

固体支持体は、常磁性粒子（PMP）またはラテックス磁性粒子（LMP）を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

カニクイザル r TPO は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

カニクイザル r TPO は、グリコシル化されているか、脱グリコシル化されているか、またはそれらの混合物である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

カニクイザル r TPO は、エピトープタグを含む、請求項 1～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

エピトープタグは、6-ヒスチジンタグ、血球凝集素タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質またはキチン結合タンパク質である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体のレベルを決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体のレベルは、検出された複合体のレベルに正比例している、請求項 1 ~ 26 および 34 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体は、自己抗体である、請求項 1 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

10

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O)、および

標識カニクイザル r T P O

とインキュベートする工程であって、

生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該標識カニクイザル r T P O、該非標識カニクイザル r T P O および該固体支持体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 該複合体が形成された場合、対象を甲状腺疾患と診断する工程を含む前記方法。

20

【請求項 44】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

カニクイザル r T P O、および

抗ヒト二次抗体

とインキュベートする工程であって、

生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該固体支持体、該カニクイザル r T P O および該抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される、工程；および

30

b) 該複合体が形成された場合、対象を甲状腺疾患と診断する工程を含む前記方法。

【請求項 45】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体とインキュベートする工程；および

b) 該固体支持体、該非標識抗 T P O 抗体、該カニクイザル r T P O および該標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少している場合、対象を甲状腺疾患と診断する工程を含む前記方法。

40

【請求項 46】

甲状腺疾患は、自己免疫障害である、請求項 43 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

自己免疫障害は、橋本病またはグレーブス病である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む組換えによって生成された甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O)。

【請求項 49】

r T P O は、標識を含む、請求項 48 に記載の r T P O。

【請求項 50】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物

50

発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 49 に記載の r T P O。

【請求項 51】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体を含む、請求項 50 に記載の r T P O。

【請求項 52】

アクリジニウムエステル類似体は、D M A E、N S P - D M A E、H Q Y A E、Z A E、I s o - D i - Z A E、T S P - A E または H E G - G L U - A E である、請求項 51 に記載の r T P O。

【請求項 53】

抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体と複合体化した請求項 49 の r T P O。

10

【請求項 54】

請求項 49 の r T P O をコードする c D N A。

【請求項 55】

固体支持体、
非標識カニクイザル r T P O、および
標識カニクイザル r T P O
を含むキット。

【請求項 56】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 55 に記載のキット。

20

【請求項 57】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 55 に記載のキット。

【請求項 58】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 55 に記載のキット。

【請求項 59】

固体支持体、
カニクイザル r T P O、および
抗ヒト二次抗体
を含むキット。

30

【請求項 60】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 59 に記載のキット。

【請求項 61】

カニクイザル r T P O が標識を含むか、または抗ヒト二次抗体が標識を含む、請求項 59 に記載のキット。

【請求項 62】

標識が酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 61 に記載のキット。

40

【請求項 63】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 62 に記載のキット。

【請求項 64】

固体支持体、
カニクイザル r T P O、および
抗 T P O 抗体
を含むキット。

50

【請求項 6 5】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 6 4 に記載のキット。

【請求項 6 6】

抗 T P O 抗体の一部は標識されておらず、抗 T P O 抗体の一部は標識されている、請求項 6 4 に記載のキット。

【請求項 6 7】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 6 6 に記載のキット。

10

【請求項 6 8】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 6 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連出願の相互参照

本出願は、2018年7月2日出願の米国仮出願第62/693,434号の優先権を主張し、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。

【0002】

本明細書で開示するのは、対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法および対象の甲状腺疾患を診断する方法である。

20

【背景技術】**【0003】**

甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）は、甲状腺濾胞細胞の頂端膜に見いだされる膜結合型糖タンパク質である。TPOは、重要な甲状腺ホルモン T_3 および T_4 を産生するために、ヨウ素イオンを酸化してサイログロブリンチロシン残基に付加する。TPOは、例えば、橋本病、グレーブス病、萎縮性甲状腺炎、原発性粘液水腫および女性における出産後甲状腺炎を含む甲状腺疾患における自己抗原でもある。抗TPO自己抗体のレベル上昇は、甲状腺疾患の危険因子である。

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

患者の抗TPO自己抗体を検出するための現在のイムノアッセイは、ヒトの遺体甲状腺組織から得られるヒト由来TPOを利用する。しかし、ヒト由来TPOは、費用がかかり、精製が難しく収率が低く、ロット毎に著しく変動する可能性がある。現在のイムノアッセイは、複数の非ヒト二次抗体をさらに必要とする。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本明細書で開示するのは、対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法である。この方法は、対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ（rTPO）および標識カニクイザルrTPOとインキュベートすることを含んでいてもよい。抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、標識カニクイザルrTPO、非標識カニクイザルrTPOおよび固体支持体を含む複合体が形成される。この方法は、複合体を検出することをさらに含み、複合体の存在が生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す。一部の実施形態では、この方法は本明細書で記載したような「抗原架橋」アッセイであってもよい。

40

【0006】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって、対象の生物学的サンプルを固体支持体、カニクイザルrTPOおよび抗ヒト二次抗体とイ

50

ンキュベートすることを含む方法も提供する。抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、固体支持体、カニクイザル r T P O および抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される。この方法は、複合体を検出することをさらに含み、複合体の存在が生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す。一部の実施形態では、この方法は本明細書で記載したような「r T P O 捕捉」アッセイであってもよい。一部の実施形態では、この方法は本明細書で記載したような「I g G クラス捕捉」アッセイであってもよい。

【0007】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって、対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体とインキュベートする工程、および抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する工程であって、この検出が、固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成の減少を分析することを含む、工程を含む方法もさらに提供する。生物学的サンプル中に抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体が存在すると、固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少する。複合体の存在は、生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在に反比例する。一部の実施形態では、この方法は本明細書で記載したような「競合」アッセイまたは「阻害」アッセイであってもよい。

10

【0008】

本明細書でさらに開示するのは、対象の甲状腺疾患を診断する方法である。この方法は、対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O) および標識カニクイザル r T P O とインキュベートすることを含んでもよい。生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、標識カニクイザル r T P O 、非標識カニクイザル r T P O および固体支持体を含む複合体が形成される。この方法は、複合体が形成されている場合、対象を甲状腺疾患と診断することをさらに含む。

20

【0009】

対象の生物学的サンプルを固体支持体、カニクイザル r T P O および抗ヒト二次抗体とインキュベートすることを含む、対象の甲状腺疾患を診断する方法も提供する。生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、固体支持体、カニクイザル r T P O および抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される。この方法は、複合体が形成されている場合、対象を甲状腺疾患と診断することをさらに含む。

30

【0010】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって、対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体とインキュベートする工程、および固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少している場合、患者を甲状腺疾患と診断する工程を含む、方法もさらに提供する。生物学的サンプル中に抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体が存在すると、固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少する。

40

【0011】

組換えによって生成された甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O) をコードする c D N A 分子のように、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む組換えによって生成された r T P O も開示する。

【0012】

本明細書でさらに開示するのはキットである。一部の実施形態では、キットは、固体支持体、非標識カニクイザル r T P O および標識カニクイザル r T P O を含む。

【0013】

あるいは、キットは、固体支持体、カニクイザル r T P O および抗ヒト二次抗体を含んでもよい。

【0014】

50

一部の実施形態では、キットは、固体支持体、カニクイザル r T P O および抗 T P O 抗体を含む。

【 0 0 1 5 】

添付の図面と併せて読むと、要約ならびに以下の詳細な説明はさらに理解される。開示された方法およびキットを例示する目的で、方法およびキットの実施形態例が図面に示されているが；方法およびキットは、開示した特定の実施形態に限定はされない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 6 】

【図 1】本明細書では抗原架橋イムノアッセイと呼ばれる、開示された方法の一実施形態のための反応スキーム例を示した図である。

【図 2】本明細書では I g G クラス捕捉イムノアッセイと呼ばれる、開示された方法の一実施形態のための反応スキーム例を示した図である。

【図 3】本明細書では r T P O 捕捉イムノアッセイと呼ばれる、開示された方法の一実施形態のための反応スキーム例を示した図である。

【図 4】本明細書では競合 / 阻害イムノアッセイと呼ばれる、開示された方法の一実施形態のための反応スキーム例を示した図である。

【図 5】r T P O のロット毎の例示的な純度および免疫反応性の評価の結果を示した図である。パネル A は、G e l C o d e B l u e (T h e r m o F i s h e r 2 5 5 9 0) で染色されたゲルを示している；パネル B は、マウス抗 T P O モノクローナル抗体とそれに続くヤギ抗マウス I g G - H R P 二次抗体で探索したニトロセルロース膜を示している。プロットを発色させるために、4 - クロロ - 1 - ナフトール (S i g m a) を使用した。

【図 6】4 つの r T P O 抗原ロットの例示的 r T P O 等電点評価の結果を示した図である。

【図 7 A】脱グリコシル化された r T P O に対するイムノアッセイ感度の例示的評価の結果を示した図である。図 7 A は r T P O 抗原架橋アッセイを示し、図 7 B は様々な脱グリコシル化された成分を使用して構成されたヒト I g G クラス捕捉アッセイを示す。「フック比」とは、2 0 , 0 0 0 I U / m L サンプルの相対発光単位 (R L U) を 6 2 5 I U / m L の最高標準物の R L U で除したものである。「B K G D」は、a T P O 陰性血清患者プールのバックグラウンド R L U、すなわち最低標準値を示す。「S 0 8 / S 0 1」は、6 2 5 I U / m L の最高標準物の R L U を最低標準値の R L U で除したものを示す。「S P」は「固相」を意味し、「L R」は「L i t e 試薬」を意味し；「d e」は「脱グリコシル化」を指す。

【図 7 B】脱グリコシル化された r T P O に対するイムノアッセイ感度の例示的評価の結果を示した図である。図 7 A は r T P O 抗原架橋アッセイを示し、図 7 B は様々な脱グリコシル化された成分を使用して構成されたヒト I g G クラス捕捉アッセイを示す。「フック比」とは、2 0 , 0 0 0 I U / m L サンプルの相対発光単位 (R L U) を 6 2 5 I U / m L の最高標準物の R L U で除したものである。「B K G D」は、a T P O 陰性血清患者プールのバックグラウンド R L U、すなわち最低標準値を示す。「S 0 8 / S 0 1」は、6 2 5 I U / m L の最高標準物の R L U を最低標準値の R L U で除したものを示す。「S P」は「固相」を意味し、「L R」は「L i t e 試薬」を意味し；「d e」は「脱グリコシル化」を指す。

【図 8】抗 T P O 抗体陽性疾患の患者サンプルの自己抗体と複合体を形成した r T P O の例示的特徴付けの結果を示しており、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 画分のクロマトグラムにプロットした相対発光単位 (R L U) である。

【図 9】図 8 において長方形で示した画分からプールされた画分の S E C 分析例のクロマトグラムを示した図である。

【図 1 0 A】図 9 の単離画分 S 1、S 2、S 3 および S 4 の M A L D I - T O F スペクトル例を示した図である。

【図 1 0 B】図 9 の単離画分 S 1、S 2、S 3 および S 4 の M A L D I - T O F スペクト

10

20

30

40

50

ル例を示した図である。

【図 1 0 C】図 9 の単離画分 S 1、S 2、S 3 および S 4 の M A L D I - T O F スペクトル例を示した図である。

【図 1 0 D】図 9 の単離画分 S 1、S 2、S 3 および S 4 の M A L D I - T O F スペクトル例を示した図である。

【図 1 1】ネイティブ T P O および組換え T P O (「r T P O」) を使用したイムノアッセイ性能の分析結果を示した図である。

【図 1 2 A】開示されたイムノアッセイを使用して実行された例示の実験の結果を示した図である：図 1 2 A) 抗原架橋、図 1 2 B) I g G クラス捕捉、図 1 2 C) r T P O 捕捉および図 1 2 D) 競合 / 阻害形式。各アッセイは A D V I A C E N T A U R (登録商標) システムを使用して実行された。標準物質の値に関連した R L U 出力は、W H O 6 6 / 3 8 7 ヒト抗甲状腺ミクロソーム血清から指定した。

【図 1 2 B】開示されたイムノアッセイを使用して実行された例示の実験の結果を示した図である：図 1 2 A) 抗原架橋、図 1 2 B) I g G クラス捕捉、図 1 2 C) r T P O 捕捉および図 1 2 D) 競合 / 阻害形式。各アッセイは A D V I A C E N T A U R (登録商標) システムを使用して実行された。標準物質の値に関連した R L U 出力は、W H O 6 6 / 3 8 7 ヒト抗甲状腺ミクロソーム血清から指定した。

【図 1 2 C】開示されたイムノアッセイを使用して実行された例示の実験の結果を示した図である：図 1 2 A) 抗原架橋、図 1 2 B) I g G クラス捕捉、図 1 2 C) r T P O 捕捉および図 1 2 D) 競合 / 阻害形式。各アッセイは A D V I A C E N T A U R (登録商標) システムを使用して実行された。標準物質の値に関連した R L U 出力は、W H O 6 6 / 3 8 7 ヒト抗甲状腺ミクロソーム血清から指定した。

【図 1 2 D】開示されたイムノアッセイを使用して実行された例示の実験の結果を示した図である：図 1 2 A) 抗原架橋、図 1 2 B) I g G クラス捕捉、図 1 2 C) r T P O 捕捉および図 1 2 D) 競合 / 阻害形式。各アッセイは A D V I A C E N T A U R (登録商標) システムを使用して実行された。標準物質の値に関連した R L U 出力は、W H O 6 6 / 3 8 7 ヒト抗甲状腺ミクロソーム血清から指定した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 7】

開示された方法およびキットは、本開示の一部を形成する添付の図面に関連して記載された以下の詳細な説明を参照することにより、より容易に理解することができよう。開示された方法およびキットは、本明細書に記載および / または提示した特定の方法およびキットに限定されず、本明細書で使用した用語は、例として特定の実施形態を説明することを目的としているだけであり、主張した方法およびキットを限定することは意図していないことを理解されたい。

【0 0 1 8】

特に明記しない限り、可能性のある機構または作用機序または改善の理由に関する説明は例示のみを意味しており、開示された方法およびキットはそのような提案された機構または作用機序または改善の理由の正誤によって制約されるべきではない。

【0 0 1 9】

この文書全体を通して、説明は抗体を検出する方法および甲状腺疾患を診断する方法を意味している。本開示が抗体を検出する方法に関連する構成または実施形態を説明または主張する場合、このような構成または実施形態は甲状腺疾患を診断する方法に等しく適用可能である。同様に、本開示が甲状腺疾患を診断する方法に関連する構成または実施形態を説明または主張する場合、このような構成または実施形態は抗体を検出する方法に等しく適用可能である。

【0 0 2 0】

数値の範囲が本明細書に列挙または規定されている場合、その範囲はその終点ならびに範囲内の個々の整数および分数全てを含み、記載した範囲内の値の大きなグループの中の部分グループを同程度で形成するために、それらの終点ならびに内部の整数および分数の

10

20

30

40

50

様々な可能性のある全組み合わせによって形成されるより狭い範囲の各も、より狭い範囲の各が明示的に列挙されているかのように含む。数値の範囲が記載された値よりも大きいと本明細書に記載されている場合であっても、範囲は有限であり、本明細書に記載されているような本発明の文脈内で操作可能な値によってその上限が制限される。数値の範囲が記載された値よりも小さいと本明細書に記載されている場合であっても、その範囲はゼロ以外の値によってその下限が制限される。本発明の範囲は、範囲を定義するときに列挙された特定の値に限定されることを意図するものではない。範囲は全て、包括的で組み合わせ可能である。

【0021】

値を近似値として表している場合、先行詞「約」を使用することによって特定の値が別の実施形態を形成しているものと理解されたい。特定の数値については、文脈で明確に指示されていない限り、少なくともその特定の値を含む。

10

【0022】

明確にするために本明細書では別個の実施形態の文脈で記載されている開示された方法およびキットのある種の機能は、単一の実施形態で組み合わせて提供することもできることを理解されたい。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の文脈で説明されている開示された方法およびキットの様々な構成は、別々にまたは任意の部分的組み合わせで提供することもできる。

【0023】

本明細書で使用したように、単数形「a」、「an」および「the」には複数形が含まれる。

20

【0024】

記載の態様に関連した様々な用語が、明細書および特許請求の範囲全体で使用されている。このような用語には、特に明記しない限り、当技術分野におけるそれらの通常の意味を与えられるべきである。その他の詳細に定義された用語は、本明細書で提供されている定義と一致する方法で解釈されるべきである。

【0025】

「含む」という用語は、「本質的になる」および「からなる」という用語に包含される例を含むことを意図しており；同様に、「本質的になる」という用語は、「からなる」という用語に包含される例を含むことを意図している。

30

【0026】

本明細書で開示するのは、対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ（抗TPO）抗体を検出する、および/または対象の甲状腺疾患を診断するイムノアッセイおよび方法である。

【0027】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法は：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ（rTPO）、および

標識カニクイザルrTPO

40

とインキュベートする工程であって、

抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、標識カニクイザルrTPO、非標識カニクイザルrTPOおよび固体支持体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 複合体を検出する工程であって、複合体の存在は、生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す、工程を含んでいてもよい。

【0028】

一部の実施形態では、方法は「抗原架橋」イムノアッセイを含んでいてもよく、そのための反応スキーム例を図1に示す。抗TPO抗体10を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、標識rTPO20および非標識rTPOが

50

結合した固体支持体 30 とインキュベートする。抗 T P O 抗体 10 が存在していない場合、標識 r T P O 20 は固体支持体に結合したり、その他の方法で相互作用したりしない。したがって、抗 T P O 抗体が存在していない場合、標識 r T P O は溶液中に残存し、固体支持体を単離しても標識 r T P O の単離を引き起こさないであろう。抗 T P O 抗体 10 が生物学的サンプル中に存在している場合、抗 T P O 抗体 10 は固体支持体 30 に結合した非標識 r T P O および標識 r T P O 20 に同時に結合し、それによって標識 r T P O 20 および固体支持体 30 を連結し、固体支持体 / 標識 r T P O 複合体 40 の形成を引き起こす。インキュベーションが行われる順番は、図 1 に例示した順番とは異なってもよいことを理解されたい。例えば、抗 T P O 抗体 10 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、最初に非標識 r T P O が結合した固体支持体 30 とインキュベートし、続いて標識 r T P O 20 とインキュベートすることができる。あるいは、抗 T P O 抗体 10 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、非標識 r T P O が結合した固体支持体 30 および標識 r T P O 20 と同時にインキュベートすることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

抗 T P O 抗体 10 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルは、約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分または約 10 分未満のような、反応が平衡に達することなく部分的な反応を達成するのに十分な時間、反応混合物中でインキュベートすることができる。標識 r T P O 20 を添加して、生物学的サンプルと約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分または約 5 分未満インキュベートすることができる。非標識 r T P O が結合した固体支持体 30 を生物学的サンプルおよび標識 r T P O 20 の混合物に添加し、約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分、約 6 分、約 7 分または約 10 分未満のような、反応が平衡に達することなく部分的な反応を達成するのに十分な時間インキュベートすることができる。一部の実施形態では、インキュベーション工程は、合計で約 10 分から約 20 分で実行する。その後の検出は、約 5 分未満で実行することができる。アッセイに必要な時間の長さは、生物学的サンプル中の抗 T P O 抗体（複数可）のレベルおよび r T P O に対する抗 T P O 抗体（複数可）の親和性を含むいくつかの要因に基づいて変動し得ることを理解されたい。一部の実施形態では、生物学的サンプルと反応混合物とのインキュベーションは、1 時間またはそれ以上のオーダーのような反応が平衡に達するのに十分な時間実行することができる。したがって、開示した方法は、任意の適切な時間の長さで実行することができる。

【 0 0 3 0 】

非標識 r T P O は、固体支持体に直接的または間接的に連結していてもよい。非標識 r T P O を固体支持体に直接的に連結するために適切な技術には、例えば、共有結合、吸着、非共有結合性相互作用またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、非標識 r T P O は、N - ヒドロキシスクシンイミド（N H S）化学物質または 1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（E D C）N H S 化学物質によって、固体支持体に直接的に連結していてもよい。r T P O を固体支持体に間接的に連結するための適切な技術には、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、リンカーまたはそれらの組み合わせを介した連結が含まれる。一部の実施形態では、非標識 r T P O は、ストربتアビジンおよびビオチンを介して固体支持体に間接的に連結していてもよい。例えば、非標識 r T P O は、ビオチン化することができ、固体支持体はストربتアビジンを含んでいてもよい。

【 0 0 3 1 】

固体支持体例には、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズ / 粒子、熱殺菌ホルマリンで（もしくはその他の化学的方法で）固定された原核もしくは真核細胞、顕微鏡スライド、A C L A R（登録商標）フィルムもしくは任意のその他の光学的に透明なポリマーまたはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。固体支持体は、プラスチック、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、ガラス、ガラス繊維、ラテックスまたはそれらの組み合わせから

、完全にまたは部分的に構成される。一部の実施形態では、固体支持体には磁性ビーズ／粒子が含まれる。一部の実施形態では、磁性ビーズ／粒子は常磁性粒子（PMP）である。一部の実施形態では、磁性ビーズ／粒子はラテックス磁性粒子（LMP）である。

【0032】

標識は、検出可能なシグナルを生じるのに有用な、当業者に公知の任意の適切な標識であってもよい。適切な検出可能な標識には、酵素コンジュゲート（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびβ-ガラクトシダーゼ）、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。一部の実施形態では、標識はアクリジニウムエステル（「AE」）またはその類似体である。適切なAE類似体には：ジメチルアクリジニウムエステル（DMAE）、N-スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル（NSP-DMAE）、高量子収率アクリジニウムエステル（HQYAE）、アクリジニウム、9-[4-[6-(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-6-オキソヘキシル]アミノ]カルボニル]-2,6-ジメチルフェノキシ]カルボニル]-2,7-ビス(3,6,9,12,15,18-ヘキサオキサノナデカ-1-イルオキシ)-10-(3-スルホプロピル)-,内部塩)、双性イオンアクリジニウムエステル（ZAE、アクリジニウム、9-[4-[3-[3-[5-(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-1,5-ジオキソペンチル]アミノ]プロピル]メチル(3-スルホプロピル)アンモニオ]プロピル]アミノ]カルボニル]-2,6-ジメチルフェノキシ]カルボニル]-10-(3-スルホプロピル)-,ビス(内部塩))、N-スルホプロピル-2-イソプロポキシジメチルアクリジニウムエステル（Iso-Di-ZAE）、トリスルホプロピルアクリジニウムエステル（TSP-AE）またはヘキサ(エチレン)グリコールリンカーを有するN-スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル（HEG-GLU-AE）が含まれる。一部の実施形態では、標識カニクイザルrTPOにはrTPO-NSP-DMAEが含まれる。rTPO-NSP-DMAEは約50ng/mlから約2μg/mlで存在し得る。一部の実施形態では、rTPO-NSP-DMAEは約220ng/mlで存在し得る。

【0033】

非標識rTPOが結合した固体支持体および／または標識rTPOは、例えば、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニックF-127、アジ化ナトリウム、ソルビトール、スルフヒドリル修飾ウシ血清、またはそれらの任意の組み合わせ、変種もしくは同等物を含む緩衝液中に存在し得る。一実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液約100mM、NaCl約400mM、EDTA約1.9g/L、約0.2%(v/v)ブルロニックF-127、アジ化ナトリウム約0.9g/L、約10%ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン約10g/Lを含む。

【0034】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

標識カニクイザルrTPO、および

抗ヒト二次抗体

とインキュベートする工程であって、

抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、固体支持体、カニクイザルrTPOおよび抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 複合体を検出する工程であって、複合体の存在は、生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す、工程を含む方法も提供する。

【0035】

抗ヒト二次抗体は、固体支持体に直接的または間接的に連結していてもよく、カニクイザルrTPOは標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、抗ヒト二次抗体は、グル

タルアルデヒド固定によって固体支持体に直接的に連結していてもよい。

【0036】

一部の実施形態では、方法は「IgGクラス捕捉」イムノアッセイを含んでいてもよく、そのための反応スキーム例を図2に示す。抗TPO抗体10を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、標識rTPO20および非標識抗ヒト二次抗体が結合した固体支持体50とインキュベートする。抗TPO抗体10が存在していない場合、標識rTPO20は固体支持体に結合したり、その他の方法で相互作用したりしない。したがって、抗TPO抗体が存在していない場合、標識rTPOは溶液中に残存し、固体支持体を単離しても標識rTPOの単離を引き起こさないであろう。抗TPO抗体10が生物学的サンプル中に存在している場合、抗TPO抗体10は、固体支持体50に結合した非標識抗ヒト二次抗体および標識rTPO20と同時に結合し、それによって標識rTPO20および固体支持体50を連結し、固体支持体/標識rTPO複合体60の形成を引き起こす。インキュベーションが行われる順番は、図2に例示した順番とは異なってもよいことを理解されたい。例えば、抗TPO抗体10を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、最初に非標識抗ヒト二次抗体が結合した固体支持体50とインキュベートし、続いて標識rTPO20とインキュベートすることができる。あるいは、抗TPO抗体10を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、非標識抗ヒト二次抗体が結合した固体支持体50および標識rTPO20と同時にインキュベートすることができる。

10

【0037】

抗TPO抗体10を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルは、反応混合物中で約1分、約2分、約3分、約4分、約5分または約10分未満インキュベートすることができる。標識rTPO20を添加して、生物学的サンプルと約1分、約2分、約3分、約4分または約5分未満インキュベートすることができる。非標識抗ヒト二次抗体が結合した固体支持体50を生物学的サンプルおよび標識rTPO20の混合物に添加し、約1分、約2分、約3分、約4分、約5分、約6分、約7分または約10分未満インキュベートすることができる。一部の実施形態では、インキュベーション工程は、合計で約10分から約20分で実行する。その後の検出は、約5分未満で実行することができる。アッセイに必要な時間の長さは、生物学的サンプル中の抗TPO抗体（複数可）のレベルおよびrTPOに対する抗TPO抗体（複数可）の親和性を含むいくつかの要因に基づいて変動し得ることを理解されたい。したがって、開示された方法は、任意の適切な時間の長さで実行することができる。

20

30

【0038】

カニクイザルrTPOは、固体支持体に直接的または間接的に連結していてもよく、抗ヒト二次抗体は標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、rTPOは、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）化学物質または1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）NHS化学物質によって固体支持体に直接連結し得る。

【0039】

一部の実施形態では、方法は「rTPO捕捉」イムノアッセイを含んでいてもよく、そのための反応スキーム例を図3に示す。抗TPO抗体10を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、標識抗ヒト二次抗体70および非標識rTPOが結合した固体支持体30とインキュベートする。抗TPO抗体10が存在していない場合、標識抗ヒト二次抗体70は固体支持体に結合したり、その他の方法で相互作用したりしない。したがって、抗TPO抗体が存在していない場合、標識抗ヒト二次抗体は溶液中に残存し、固体支持体を単離しても標識抗ヒト二次抗体の単離を引き起こさないであろう。抗TPO抗体10が生物学的サンプル中に存在している場合、抗TPO抗体10は、固体支持体30に結合した非標識rTPOおよび標識抗ヒト二次抗体70と同時に結合し、それによって標識抗ヒト二次抗体70および固体支持体30を連結し、固体支持体/標識抗ヒト二次抗体複合体80の形成を引き起こす。インキュベーションが行われる

40

50

順番は、図 3 に例示した順番とは異なってもよいことを理解されたい。例えば、抗 T P O 抗体 1 0 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルは、最初に非標識 r T P O が結合した固体支持体 3 0 とインキュベートし、続いて標識抗ヒト二次抗体 7 0 とインキュベートすることができる。あるいは、抗 T P O 抗体 1 0 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを、非標識 r T P O が結合した固体支持体 3 0 および標識抗ヒト二次抗体 7 0 と同時にインキュベートすることができる。

【 0 0 4 0 】

抗 T P O 抗体 1 0 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルは、反応混合物中で約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分または約 1 0 分未満インキュベートすることができる。標識抗ヒト二次抗体 7 0 を添加して、生物学的サンプルと約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分または約 5 分未満インキュベートすることができる。非標識 r T P O が結合した固体支持体 3 0 を生物学的サンプルおよび標識抗ヒト二次抗体 7 0 の混合物に添加し、約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分、約 6 分、約 7 分または約 1 0 分未満インキュベートすることができる。一部の実施形態では、インキュベーション工程は、合計で約 1 0 分から約 2 0 分で実行する。その後の検出は、約 5 分未満で実行することができる。アッセイに必要な時間の長さは、生物学的サンプル中の抗 T P O 抗体（複数可）のレベルおよび r T P O に対する抗 T P O 抗体（複数可）の親和性を含むいくつかの要因に基づいて変動し得ることを理解されたい。したがって、開示された方法は、任意の適切な時間の長さで実行することができる。

【 0 0 4 1 】

抗ヒト二次抗体またはカニクイザル r T P O は、当業者に公知の任意の適切な手段によって固体支持体に直接的または間接的に連結していてもよい。直接的連結のために適切な技術には、例えば、共有結合、吸着、非共有結合性相互作用またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、抗ヒト二次抗体は、グルタルアルデヒド固定によって固体支持体に直接的に連結していてもよい。間接的連結のための適切な手段には、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、リンカーまたはそれらの組み合わせを介した連結が含まれる。一部の実施形態では、抗ヒト二次抗体またはカニクイザル r T P O は、ストレプトアビジンおよびビオチンを介して固体支持体に間接的に連結していてもよい。例えば、非標識抗ヒト二次抗体または非標識 r T P O はビオチン化することができ、固体支持体はストレプトアビジンを含んでいてもよい。

【 0 0 4 2 】

固体支持体例には、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズ／粒子、熱殺菌ホルマリンで（もしくはその他の化学的方法で）固定された原核もしくは真核細胞、顕微鏡スライド、A C L A R（登録商標）フィルムもしくは任意のその他の光学的に透明なポリマーまたはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。固体支持体は、プラスチック、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、ガラス、ガラス繊維、ラテックスまたはそれらの組み合わせから、完全にまたは部分的に構成することができる。一部の実施形態では、固体支持体には磁性ビーズ／粒子が含まれる。一部の実施形態では、磁性ビーズ／粒子は常磁性粒子（P M P）である。一部の実施形態では、磁性ビーズ／粒子はラテックス磁性粒子（L M P）である。

【 0 0 4 3 】

抗ヒト二次抗体は、I g A、I g D、I g G、I g E もしくは I g M アイソタイプ、またはラクダ科の単ドメイン抗体のような単ドメイン形式であってもよい。一部の実施形態では、抗ヒト二次抗体は抗ヒト I g G である。一部の実施形態では、抗ヒト二次抗体は、市販の抗ヒト二次抗体である。抗 T P O 抗体に特異的なアプタマーも使用することができる。

【 0 0 4 4 】

標識は、検出可能なシグナルを生じるのに有用であることが当業者に公知の任意の適切

10

20

30

40

50

な標識であってもよい。適切な検出可能な標識には、酵素コンジュゲート（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびβ-ガラクトシダーゼ）、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。一部の実施形態では、標識はAEまたはその類似体である。適切なAE類似体には、ジメチルアクリジニウムエステル（DMAE）、N-スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル（NSP-DMAE）、高量子収率アクリジニウムエステル（HQYAE）、双性イオンアクリジニウムエステル（ZAE）、N-スルホプロピル-2-イソプロポキシジメチルアクリジニウムエステル（Iso-Di-ZAE）、トリスルホプロピルアクリジニウムエステル（TSP-AE）またはヘキサ（エチレン）グリコールリンカーを含むN-スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル（HEG-GLU-AE）が含まれる。一部の実施形態では、標識カニクイザルrTPOにはrTPO-NSP-DMAEが含まれる。rTPO-NSP-DMAEは約50ng/mlから約2μg/mlで存在し得る。一部の実施形態では、rTPO-NSP-DMAEは約220ng/mlで存在し得る。

10

【0045】

非標識抗ヒト二次抗体または非標識rTPOが結合した固体支持体および/または標識rTPOまたは標識抗ヒト二次抗体は、例えば、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニックF-127、アジ化ナトリウム、ソルビトール、スルフヒドリル修飾ウシ血清、またはそれらの任意の組み合わせ、変種もしくは同等物を含む緩衝液中に存在し得る。一実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液約100mM、NaCl約400mM、EDTA約1.9g/L、約0.2%（v/v）ブルロニックF-127、アジ化ナトリウム約0.9g/L、約10%ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン約10g/Lを含む。

20

【0046】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって、

a) 対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗TPO抗体、カニクイザルrTPOおよび標識抗TPO抗体とインキュベートする工程；および

b) 生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する工程であって、この検出が、固体支持体、非標識抗TPO抗体、カニクイザルrTPOおよび標識抗TPO抗体を含む複合体の形成の減少を分析することを含む、工程を含む方法も提供する。

30

【0047】

複合体形成の減少の分析は、例えば、生物学的サンプルを含む反応混合物中の標識抗TPO抗体からのシグナルの読み出しを、生物学的サンプルを含まない反応混合物中の標識抗TPO抗体からのシグナルの読み出しと比較することによって実行することができる。生物学的サンプルを含む反応混合物からのシグナルの読み出しが、生物学的サンプルを含まない反応混合物からの読み出しよりも小さい場合、複合体の形成は減少している。形成される複合体の量は、生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在に反比例する。

40

【0048】

一部の実施形態では、方法は「競合」イムノアッセイまたは「阻害」イムノアッセイを含んでいてもよく、そのための反応スキーム例を図4に示す。本明細書で使用したように、「競合」イムノアッセイとは、2つまたはそれ以上の結合分子が標的分子への結合について競合するイムノアッセイを意味する。結合分子は抗体であってもよく、例えば、標的分子は抗原であってもよい。結合分子は、例えば、抗原の同じエピトープ（複数可）への結合について競合し得る。「阻害」イムノアッセイとは、1つまたはそれ以上の結合分子が標的分子への1つまたはそれ以上のその他の結合分子の結合を阻害するイムノアッセイを意味する。結合分子は抗体であってもよく、例えば、標的分子は抗原であってもよい。阻害は、立体障害またはその他の公知の結合阻害機構によって引き起こされる可能性がある。特許請求するアッセイが「競合」または「阻害」イムノアッセイとして分類されるか

50

どうかは、例えば、生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体および標識抗 T P O 抗体によって認識される r T P O エピトープに左右されるだろう。特許請求する方法は競争および阻害イムノアッセイの両方を包含し、したがって、「競争」および「阻害」という用語は特許請求する方法の範囲を限定するものではない。

【 0 0 4 9 】

競合 / 阻害イムノアッセイの一部の実施形態では、標識抗 T P O 抗体および r T P O は、反応混合物に添加する前に、予め形成された免疫複合体にすることができる。一部の実施形態では、非標識抗 T P O 抗体および固体支持体は、反応混合物に添加する前に、予め形成された複合体にすることができる。一部の実施形態では、標識抗 T P O 抗体、r T P O、非標識抗 T P O 抗体、および固体支持体は、反応混合物に添加する前に、予め形成された複合体にしない。さらに他の実施形態では、標識抗 T P O 抗体、r T P O、非標識抗 T P O 抗体および固体支持体は全て、反応混合物に添加する前に、予め形成された複合体中に存在する。様々な成分が反応混合物に添加する前に 1 つまたはそれ以上の予め形成された複合体中にあるかどうかは、標識および非標識抗体ならびに r T P O の解離定数 (K_D) に部分的に左右される。開示した方法は、反応混合物に添加された複合体形成の種類または程度に限定されない。生物学的サンプル、標識抗 T P O 抗体、r T P O、非標識抗 T P O 抗体および固体支持体は、任意の順番で反応混合物に添加することができることを理解されたい。

10

【 0 0 5 0 】

図 4 は、本明細書に記載された競合 / 阻害イムノアッセイの一実施形態例を開示しており、標識抗 T P O 抗体 1 1 0 および r T P O 1 2 0 を非標識抗 T P O 抗体が結合した固体支持体 1 3 0 とインキュベートする。生物学的サンプルの抗 T P O 抗体 1 0 が存在していない場合、標識抗 T P O 抗体 1 1 0 は r T P O 1 2 0 に結合し、次に、非標識抗 T P O 抗体が結合した固体支持体 1 3 0 に結合するかまたは相互作用し、それによって、標識抗 T P O 抗体 1 1 0、r T P O 1 2 0 および固体支持体を含む複合体 1 4 0 を形成する。したがって、生物学的サンプルの抗 T P O 抗体 1 0 が存在していない場合、標識抗 T P O 抗体 1 1 0 は固体支持体にカップリングされ、その単離は標識抗 T P O 抗体 1 1 0 の単離を引き起こす。抗 T P O 抗体 1 0 が生物学的サンプル中に存在している場合、抗 T P O 抗体 1 0 は r T P O 1 2 0 への結合について標識抗 T P O 抗体 1 1 0 と競合するか、そうでなければ阻害し、または r T P O 1 2 0 への結合について固体支持体 1 3 0 に結合した非標識抗 T P O 抗体と競合するか、そうでなければ阻害し、それによって、複合体が形成するのを妨害するか、または複合体 1 4 0 から標識抗 T P O 抗体を変位させる。したがって、生物学的サンプルの抗 T P O 抗体 1 0 の存在下では、標識抗 T P O 抗体 1 1 0、r T P O 1 2 0 および固体支持体を含む複合体 1 4 0 の存在が減少する。

20

30

【 0 0 5 1 】

標識抗 T P O 抗体 1 1 0、非標識 r T P O 1 2 0 および固体支持体 1 3 0 に結合した非標識抗 T P O 抗体は、反応混合物中で約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分または約 1 0 分未満インキュベートすることができる。抗 T P O 抗体 1 0 を有することが知られている、または有することが疑われる生物学的サンプルを添加して、反応混合物中で約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分または約 1 0 分未満インキュベートすることができる。一部の実施形態では、インキュベーション工程は、合計で約 1 0 分から約 2 0 分で実行する。その後の検出は、約 5 分未満で実行することができる。アッセイに必要な時間の長さは、生物学的サンプル中の抗 T P O 抗体 (複数可) のレベルおよび r T P O に対する抗 T P O 抗体 (複数可) の親和性を含むいくつかの要因に基づいて変動し得ることを理解されたい。したがって、開示された方法は、任意の適切な時間の長さで実行することができる。

40

【 0 0 5 2 】

非標識抗 T P O 抗体は、固体支持体に直接的または間接的にカップリングしていてもよい。非標識抗 T P O 抗体を固体支持体に直接的にカップリングするために適切な技術には、例えば、共有結合、吸着、非共有結合性相互作用またはそれらの組み合わせが含まれる

50

。非標識抗 T P O 抗体を固体支持体に間接的にカップリングするための適切な手段には、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、リンカーまたはそれらの組み合わせを介した連結が含まれる。一部の実施形態では、非標識抗 T P O 抗体は、ストレプトアビジンおよびビオチンを介して固体支持体に間接的にカップリングすることができる。例えば、非標識抗 T P O 抗体はビオチン化することができ、固体支持体はストレプトアビジンを含んでいてもよい。標識および / または非標識抗 T P O 抗体は、任意の公知の市販の抗 T P O 抗体であってもよい。

【 0 0 5 3 】

固体支持体例には、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズ / 粒子、熱殺菌ホルマリンで（もしくはその他の化学的方法で）固定された原核もしくは真核細胞、顕微鏡スライド、A C L A R（登録商標）フィルムもしくは任意のその他の光学的に透明なポリマーまたはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。固体支持体は、プラスチック、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、ガラス、ガラス繊維、ラテックスまたはそれらの組み合わせから、完全にまたは部分的に構成される。一部の実施形態では、固体支持体は磁性ビーズ / 粒子を含む。一部の実施形態では、磁性ビーズ / 粒子は常磁性粒子（P M P）である。一部の実施形態では、磁性ビーズ / 粒子はラテックス磁性粒子（L M P）である。

【 0 0 5 4 】

標識は、検出可能なシグナルを生じるのに有用な、当業者に公知の任意の適切な標識であってもよい。適切な検出可能な標識には、酵素コンジュゲート（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよびβ - ガラクトシダーゼ）、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。一部の実施形態では、標識は、A E またはその類似体である。適切な A E 類似体には、ジメチルアクリジニウムエステル（D M A E）、N - スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル（N S P - D M A E）、高量子収率アクリジニウムエステル（H Q Y A E）、双性イオンアクリジニウムエステル（Z A E）、N - スルホプロピル - 2 - イソプロポキシジメチルアクリジニウムエステル（I s o - D i - Z A E）、トリスルホプロピルアクリジニウムエステル（T S P - A E）またはヘキサ（エチレン）グリコールリンカーを含む N - スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル（H E G - G L U - A E）が含まれる。一部の実施形態では、標識抗 T P O 抗体は、抗 T P O I g G H E G - G L U - A E である。抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E は約 5 0 n g / m l から約 2 μ g / m l で存在し得る。一部の実施形態では、抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E は約 4 2 0 n g / m l で存在し得る。

【 0 0 5 5 】

非標識抗 T P O 抗体が結合した固体支持体および / または非標識 r T P O および / または標識抗 T P O 抗体は、例えば、リン酸緩衝液、N a C l、E D T A、プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム、ソルビトール、スルフヒドリル修飾ウシ血清、またはそれらの任意の組み合わせ、変種もしくは同等物を含む緩衝液中に存在し得る。一実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液約 1 0 0 m M、N a C l 約 4 0 0 m M、E D T A 約 1 . 9 g / L、約 0 . 2 %（v / v）プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム約 0 . 9 g / L、ソルビトール約 1 0 % およびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン約 1 0 g / L を含む。

【 0 0 5 6 】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって、対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ（r T P O）および標識カニクイザル r T P O とインキュベートすることを含む方法もさらに開示する。生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、標識カニクイザル r T P O、非標識カニクイザル r T P O および固体支持体を含む複合体が形成される。この方法は、複合体が形成されている場合、対象を甲状腺疾患と診断することをさらに含む。

【 0 0 5 7 】

対象の生物学的サンプルを固体支持体、カニクイザル r T P O および抗ヒト二次抗体とインキュベートすることを含む、対象の甲状腺疾患を診断する方法も提供する。生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、固体支持体、カニクイザル r T P O および抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される。この方法は、複合体が形成されている場合、対象を甲状腺疾患と診断することをさらに含む。

【 0 0 5 8 】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって、対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル T P O および標識抗 T P O 抗体とインキュベートする工程、および固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少している場合、甲状腺疾患と診断する工程を含む方法も開示する。生物学的サンプル中に抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体が存在すると、固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少する。標識および / または非標識抗 T P O 抗体は、任意の公知のまたは市販の抗 T P O 抗体であってもよい。

10

【 0 0 5 9 】

診断の方法は、複合体を検出する工程をさらに含んでもよい。例えば、複合体の検出は、標識からのシグナルの読み出しの取得を含んでもよく、ここで、標識からのシグナルの強度はアッセイ中に存在する標識の量を示す。

【 0 0 6 0 】

甲状腺疾患は自己免疫障害であってもよい。一部の実施形態では、自己免疫障害は橋本病またはグレーブス病であってもよい。

20

【 0 0 6 1 】

前述の検出方法と同様に、診断方法において、非標識 r T P O、非標識抗ヒト二次抗体または非標識抗 T P O 抗体は、固体支持体に直接的または間接的に連結 / カップリングすることができる。直接的に連結 / カップリングするために適切な技術には、例えば、共有結合、吸着、非共有結合性相互作用またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、直接的連結 / カップリングは、グルタルアルデヒド固定、N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 化学物質または 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (E D C) N H S 化学物質によって達成することができる。間接的連結 / カップリングのための適切な手段には、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、リンカーまたはそれらの組み合わせを介した連結 / カップリングが含まれる。一部の実施形態では、固体支持体への間接的連結 / カップリングは、ストレプトアビジンおよびビオチンを介する。例えば、非標識 r T P O、非標識抗ヒト二次抗体または非標識抗 T P O 抗体はビオチン化することができ、固体支持体はストレプトアビジンを含んでもよい。

30

【 0 0 6 2 】

固体支持体例には、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズ / 粒子、熱殺菌ホルマリンで (もしくはその他の化学的方法で) 固定された原核もしくは真核細胞、顕微鏡スライド、A C L A R (登録商標) フィルムもしくは任意のその他の光学的に透明なポリマーまたはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。固体支持体は、プラスチック、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、ガラス、ガラス繊維、ラテックスまたはそれらの組み合わせから、完全にまたは部分的に構成することができる。一部の実施形態では、固体支持体は磁性ビーズ / 粒子を含む。一部の実施形態では、磁性ビーズ / 粒子は常磁性粒子 (P M P) である。一部の実施形態では、磁性ビーズ / 粒子はラテックス磁性粒子 (L M P) である。

40

【 0 0 6 3 】

標識は、検出可能なシグナルを生じるのに有用な、当業者に公知の任意の適切な標識であってもよい。適切な検出可能な標識には、酵素コンジュゲート (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよび β - ガラクトシダーゼ)、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物

50

物またはそれらの組み合わせが含まれるが、限定はされない。一部の実施形態では、標識は A E またはその類似体である。適切な A E 類似体には、ジメチルアクリジニウムエステル (D M A E)、N - スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル (N S P - D M A E)、高量子収率アクリジニウムエステル (H Q Y A E)、双性イオンアクリジニウムエステル (Z A E)、N - スルホプロピル - 2 - イソプロボキシジメチルアクリジニウムエステル (I s o - D i - Z A E)、トリスルホプロピルアクリジニウムエステル (T S P - A E) またはヘキサ (エチレン) グリコールリンカーを含む N - スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル (H E G - G L U - A E) が含まれる。一部の実施形態では、標識カニクイザル r T P O は r T P O - N S P - D M A E を含む。r T P O - N S P - D M A E は約 5 0 n g / m l から約 2 μ g / m l で存在し得る。一部の実施形態では、r T P O - N S P - D M A E は約 2 2 0 n g / m l で存在し得る。一部の実施形態では、標識抗 T P O 抗体は抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E である。抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E は約 5 0 n g / m l から約 2 μ g / m l で存在し得る。一部の実施形態では、抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E は約 4 2 0 n g / m l で存在し得る。

10

【 0 0 6 4 】

自己免疫疾患を診断する方法を実行するのに適した時間には、抗体の様々な検出方法について上で挙げた時間が含まれる。

【 0 0 6 5 】

方法は、対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体のレベルを決定することをさらに含んでもよい。一部の実施形態では、対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体のレベルは、検出された複合体のレベルに正比例する。したがって、抗 T P O 抗体のレベルは、標識成分 (すなわち、標識 r T P O または抗体) とカップリングした、または複合体形成した固体支持体のレベルを決定することによって決定することができる。標識成分とカップリングした、または複合体形成した固体支持体のレベルの決定は、例えば、複合体からのシグナルを測定することによって実行することができる。同様に、対象の甲状腺疾患を診断するためにこの方法を使用する実施形態では、標識成分とカップリングした、または複合体形成した固体支持体は、固体支持体に連結した標識成分からのシグナルまたはシグナルがないことを測定することによって検出する。

20

【 0 0 6 6 】

開示した方法は手動で実行するか、または自動化することができる。例えば、開示された方法は、A D V I A C E N T A U R (登録商標) イムノアッセイシステムまたは A T E L L I C A (商標) システムを使用して実行することができる。

30

【 0 0 6 7 】

一部の実施形態では、抗 T P O 抗体は患者の抗 T P O 抗体である。一部の実施形態では、抗 T P O 抗体は自己抗体である。

【 0 0 6 8 】

抗 T P O 抗体を検出するために適切な生物学的サンプルには、血清、血漿、全血、唾液、尿、精液、汗、涙、および体組織を含むが、限定はされない、抗 T P O 抗体を含有する、または含有することが疑われる対象の任意の生物学的サンプルが含まれる。

40

【 0 0 6 9 】

本明細書で開示したイムノアッセイは、組換え甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O) を使用する。一部の実施形態では、r T P O はカニクイザル由来である。一部の実施形態では、r T P O は、配列番号 1 (表 1) に記載のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、r T P O はエピトープタグをさらに含む。エピトープタグは、r T P O の N 末端または C 末端にあってもよい。エピトープタグは、6 - ヒスチジントグ、血球凝集素タグ、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質またはキチン結合タンパク質を含むがそれらに限定はされない、当業者に公知の任意の適切なタグであってもよい。一部の実施形態では、r T P O は C 末端 6 - ヒスチジントグを含む。

【 0 0 7 0 】

50

【表 1】

表 1 : カニクイザル rTPO アミノ酸配列(配列番号1)

配列番号1	ADPGYLLECT EAFFPFISRG KELLWGKPEE SRVAGILEES KRLVDTAMY A TMQRNLKKRE ILSPHQLLSF SKLPEPTSGE IARAAEIMET SIQAMKRK VN LKIQSQHPT DALSEDLLSI IANMSGCLPY MLPPKCPNTC LANKYR PITG ACNNRDHPRW GASNTALARW LPPVYEDGFS QPRGWNPSIL HNG FPLPPVR EVTRHVIQVS NEVVTD DRY SDLLMAWGQY IDHDIAFTPQ S TSKAAFRGG ADCQVTCENQ NPCFPIQLPE EARPAAGTAC LPFYRSSAAC GTGDQGALFG NLSTANPRQQ MNGLTSFLDA STVYGSSPAL ERQLRN WTS A EGLLRVHARL RDSGRAYLPF APPRAPAACA PEPGIPGETR GPCF LAGDGR ASEVPSLTAL HTLWLREHNR LAAALKALNA HWSADAVYQE ARKVVGALHQ IITLRDYVPR ILGPEAFQY VGPYEGYDSA ANPTVSNV FS TAAFRFGHAT IHPLVRR LDA GFQEHPLPG LWLHETFFSP WTLHG GGLD PLIRGLLARP AKLQVQDQLM NEELTERLFV LSNSTDLA SINL QRGRDH GLPGYNEWRE FCGLPRLETP ADLSTAIASR SVADKILDLY K HPDNIDVWL GGLAENFLPR ARTGPLFACL IGKQMKALRD GDWFWWE NSH VFTDAQRHEL EKHSLSRVIC DNTGLTRVPV DAFRVGKFPE DFESC DSIPG MNLEAWRETF PQDDKCGFPE SVENGDFVHC EESGRRVLVY SC RHGYELQG HEQLTCTQEG WDFQPPLCKD VNECADGAHP PCHASARCR N TKGGFQCLCA DPYELGDDGR TCVD SGRLPR
-------	--

10

【0071】

20

本明細書ではキットをさらに開示する。一部の実施形態では、キットは、固体支持体、非標識カニクイザル rTPO および標識カニクイザル rTPO を含んでいてもよい。

【0072】

キットは、固体支持体、標識カニクイザル rTPO および抗ヒト二次抗体を含んでいてもよい。一部の実施形態では、カニクイザル rTPO が標識を含むか、または抗ヒト二次抗体が標識を含む。

【0073】

キットは、固体支持体、カニクイザル rTPO および抗 TPO 抗体を含んでいてもよい。一部の実施形態では、抗 TPO 抗体の一部は標識されておらず、抗 TPO 抗体の一部は標識されている。

30

【0074】

本明細書で開示したキットのいずれかに適した固体支持体および標識には、上記の方法について開示したそれらの固体支持体および標識が含まれる。

【実施例】

【0075】

以下の実施例は、本明細書で開示した実施形態のいくつかをさらに説明するために提供されている。実施例は、開示された実施形態を例示するものであって、限定するものではない。

【0076】

rTPO クローニング

40

サルの甲状腺組織はカニクイザルから入手し、mRNA はトリゾール/クロロホルム抽出 (Invitrogen、カタログ番号 15596026) を使用して単離し精製した。cDNA ライブラリーは、Invitrogen Thermo-Script RT-PCR キットを使用して調製した。

【0077】

PCR を使用して可溶性の TPO を cDNA ライブラリーから増幅し、PCR 産物は Qiagen PCR 精製キット (QIAquick PCR 精製キット、カタログ番号 28104) を使用して精製した。精製した PCR 産物は、XbaI (New England Biolabs カタログ番号 R0145S) および NotI (New England Biolabs カタログ番号 R0189S) 制限エンドヌクレアーゼで消化し、ゲ

50

ル抽出した。ゲル抽出したTPOは、バキュロウイルス発現ベクターにライゲーションした。ベクターでコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン選択プレートに播種した。

【0078】

得られたコロニーをPCRでスクリーニングし、プラスミドの生成および精製のために陽性クローンを増殖させた。いくつかのプラスミドクローンは、Beckman CEQ 8000配列決定装置を使用して配列決定し；TPOを含有するクローンを検証した。PCRおよび配列決定プライマーは全て、ABI Expedite 8909 DNA合成機を使用して合成した。このcDNAは、配列番号1のアミノ酸配列を有するカニクイザルrTPOをコードしている（表1）。

【0079】

rTPO バキュロウイルスを生じさせるための一過性トランスフェクション

rTPO配列を含むトランスファープラスミドとバキュロウイルスDNAを組み合わせ、グレース培地およびトランスフェクション試薬（Invitrogen、Bac-N-BLueトランスフェクションキット、カタログ番号K855-01）とインキュベートした。スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）（Sf）細胞のトランスフェクション後、引き続いて細胞培養上清を組換えウイルスについてスクリーニングし、選択した組換え体を精製し、増幅し、配列決定して、rTPOの同一性を確認した。

【0080】

rTPO精製

rTPOを含有する精製組換えバキュロウイルスを使用して、ESF921細胞培養培地中でトリコプルシア・ニPRO（*Trichoplusia ni* PRO）（TniPRO）の培養物に感染させた。形質導入されたrTPOは細胞培養上清中に分泌された。

【0081】

キレーティングセファロースファストフロー固定化金属（ニッケル）アフィニティークロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、上清からrTPOを単離した。簡単に説明すると、キレーティングセファロースゲル（GE Healthcareカタログ番号17-0575-01）にNiSO₄ 100mMを加えた。培養上清中のrTPOを1.5時間ゲルに結合させた。非特異的タンパク質は、ゲルを塩化ナトリウム0.5M、0.05MトリスpH8.0、イミダゾール10mMで洗浄することによって除去した。次に、rTPOを塩化ナトリウム0.5M、0.05MトリスpH8.0、イミダゾール0.1Mで溶出した。次に、溶出画分についてAKTA Prime Plus液体クロマトグラフィーシステムでS-200サイズ排除クロマトグラフィーを行い、rTPOを含有する画分をプールした。

【0082】

純粋なrTPOを含有する最終プールをSDS/PAGEによって分析し、続いてクーマシーブルー染色（図5、パネルA）またはウエスタンブロット（図5、パネルB）を行った。4~20%トリス-グリシンゲルで、非還元条件下で、200Vで約30~40分間、rTPOを電気泳動した。ウエスタンブロット分析では、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、マウス抗TPOモノクローナル抗体で1時間、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）をコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（Millipore、ロット17011271）で30分間で探索し；ブロットを基質（Surmodics BCIB）で約5分間発色させた。

【0083】

グリコシル化

rTPOグリコシル化の範囲は、イオン交換クロマトグラフィー、マトリックス支援LASER脱離飛行時間型（「MALDI-TOF」）質量分析および等電点電気泳動によって決定した。イオン交換クロマトグラフィー、MALDI-TOFおよび等電点電気泳動実験の各々において、2つのタンパク質種が同定され、グリコシル化の結果であるもの

10

20

30

40

50

と考えられた。図 6 に示したように、主要なバンドの平均 p I は 6 . 2 であり、小さいバンドの平均 p I は 5 . 2 であった。

【 0 0 8 4 】

r T P O の潜在的なロット間のグリカンの多様性をさらに特徴づけるために、r T P O の 3 つの異なるロットを以下の酵素の 1 つで各々消化した：タンパク質脱グリコシル化ミックス I I (P N G アーゼ F、O - グリコシダーゼ、 α 2 - 3 , 6 , 8 , 9 ノイラミニダーゼ A、 β 1 - 4 ガラクトシダーゼ S および β - N - アセチルヘキソサミニダーゼを含む)、E n d o H、 α 2 - 3、6、8、9 ノイラミニダーゼ、O - グリコシダーゼまたは P N G アーゼ F (N e w E n g l a n d B i o l a b s)。消化した r T P O は、続いて S h i m a d z u A X I M A C o n f i d e n c e M A L D I - T O F 質量分析機を使用して M A L D I - T O F 分析によって分析した。各反応の酵素消化条件を以下の表 2 にまとめて示す。37 で一晩インキュベートした後、サンプルを収集し、室温まで冷却し、脱塩した。10 k D a M W C O 遠心分離フィルター (M i l l i p o r e ; 参照番号 U F C 5 0 1 0 2 4) を d i H ₂ O 250 μ l で洗浄し、14,000 r p m で 10 分間回転させた。消化したサンプルを洗浄した遠心分離フィルターに添加し、14,000 r p m で 10 分間回転させ、通過画分を傾瀉することによってサンプルを脱塩した。各回転の後、d i H ₂ O 250 μ l を遠心分離フィルターに分注し、再度 14,000 r p m で 10 分間回転させ、全部で 3 回洗浄した。

10

【 0 0 8 5 】

【表 2】

表 2：酵素消化条件

脱グリコシル化 ミックス カタログ番号 P6044S	EndoH カタログ番号 P0702S	ノイラミニダーゼ カタログ番号 P0720S	O-グリコシダーゼ カタログ番号 P0733S	PNGアーゼF カタログ番号 P0704S
110μL rTPO	45μL rTPO	20μL rTPO	45μL rTPO	45μL rTPO
40μL H ₂ O	5μL 10Xグリコ シル化変性 緩衝液	160μL H ₂ O	5μL 10Xグリコ シル化変性緩衝液	5μL 10Xグリコ シル化変性 緩衝液
5μL脱グリコシ ル化ミックス 緩衝液2	完全に沸騰した H ₂ Oに混合物を 10分間入れる	20μL 10Xグリコ 緩衝液1	完全に沸騰した H ₂ Oに混合物を 10分間入れる	完全に沸騰した H ₂ Oに混合物を 10分間入れる
75℃で10分間 インキュベート し、RTまで 冷却	10μL グリコ 緩衝液3 10X	20μL ノイラミニ ダーゼ	10μL グリコ 緩衝液2 10X	10μL グリコ 緩衝液2 10X
25℃で30分間 インキュベート する	15μL EndoH		10μLノイラミニ ダーゼ	5μL PNGアーゼF
	25μL H ₂ O		15μL O-グリコ シダーゼ	35μL H ₂ O
			15μL H ₂ O	
全反応は37℃の温水浴中で一晩インキュベートした。				

【 0 0 8 6 】

37 で一晩インキュベートした後、サンプルを収集し、室温まで冷却し、脱塩した。10 kDa MWCO遠心分離フィルター (Millipore; 参照番号 UFC501024) を di H₂O 250 μl で洗浄し、14,000 rpm で10分間回転させた。消化したサンプルを洗浄した遠心分離フィルターに添加し、14,000 rpm で10分間回転させ、通過画分を傾瀉することによってサンプルを脱塩した。各回転の後、di H₂O 250 μl を遠心分離フィルターに分注し、再度14,000 rpm で10分間回転させ、全部で3回洗浄した。

【 0 0 8 7 】

サンプルは全て脱塩し、シナピン酸 (Sigma-Aldrich 49508) トリフルオロ酢酸 (Alfa-Aesar 44630) マトリックス溶液で直接再構成した。マトリックスに対するサンプルの比は、表3に挙げた最適比を用いて各サンプルについて最適化した。各サンプルの一定分量 2 μl をMALDI-TOFサンプルプレートに3連でプロットした。サンプルを徹底的に空気乾燥し、MALDI-TOFサンプルチャンバーに入れ、Shimadzu Axima Confidence MALDI-TOFでレーザー出力を65に設定して測定した。MALDI-TOF質量分析機は、ProteoMassアルブミン標準物 (Sigma; 部品番号 A8471) を使用して校正し

た。

【 0 0 8 8 】

【 表 3 】

表 3：酵素消化物の最適化されたサンプル対マトリックス比

サンプル	比(サンプル対マトリックス)
脱グリコシル化ミックス	1:2
EndoH	1:1
ノイラミニダーゼ	1:2
O-グリコシダーゼ	1:2
PNGアーゼF	1:1
未消化rTPO	1:2

10

【 0 0 8 9 】

r T P O の 3 つ の ロ ッ ト の M A L D I - T O F 分 析 で は 、 グ リ コ シ ル 化 に わ ず か な ロ ッ ト 毎 の 差 が 示 さ れ た (デ ー タ は 示 さ ず) 。 脱 グ リ コ シ ル 化 ミ ッ ク ス に よ る 消 化 は 、 最 も 顕 著 な 分 子 量 シ フ ト を 示 し た ; こ の 酵 素 は 、 A D V I A C E N T A U R (登 録 商 標) X P イ ム ノ ア ッ セ イ (S i e m e n s H e a l t h c a r e) で の 機 能 試 験 の た め の 脱 グ リ コ シ ル 化 お よ び そ の 後 の コ ン ジ ュ ゲ ー ト の た め に 選 択 さ れ た 。

【 0 0 9 0 】

20

r T P O イ ム ノ ア ッ セ イ の 特 徴 づ け

N - ヒ ド ロ キ シ ス ク シ ン イ ミ ド (N H S) 化 学 物 質 を 使 用 し て 、 N S P - D M A E で 標 識 し た 天 然 の ヒ ト T P O (F i t z g e r a l d 8 0 - 1 3 8 2) お よ び N S P - D M A E で 標 識 し た 組 換 え カ ニ ク イ ザ ル T P O を 調 製 し た 。 こ れ ら の 標 識 タ ン プ ク 質 は 、 リ ン 酸 緩 衝 液 1 0 0 m M 、 N a C l 4 0 0 m M 、 E D T A 1 . 9 g / L 、 0 . 2 % (v / v) プ ル ロ ニ ッ ク F - 1 2 7 、 ア ジ 化 ナ ト リ ウ ム 0 . 9 g / L 、 1 0 % ソ ル ビ ト ール お よ び ス ル フ ヒ ド リ ル 修 飾 ウ シ 血 清 ア ル ブ ミ ン 1 0 g / L 中 で 、 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ラ テ ッ ク ス ま た は 常 磁 性 粒 子 に カ ッ プ リ ン グ し た ビ オ チ ン 化 抗 ヒ ト I g G と 対 に な り 、 A D V I A C E N T A U R (登 録 商 標) シ ス テ ム (S i e m e n s H e a l t h c a r e) を 使 用 し て 、 7 . 5 分 の ワ ン パ ス (最 初 の 結 果 出 力 ま で の 時 間 (T T F R)) : 1 8 分) お よ び / ま た は 2 0 / 2 0 分 の ツ ー パ ス (T T F R : 6 0 分) 形 式 で 試 験 し た 。 7 . 5 分 の ワ ン パ ス イ ム ノ ア ッ セ イ で は 、 サ ン プ ル は ゼ ロ 時 点 で 添 加 し た 。 ヒ ト T P O - N S P - D M A E ま た は r T P O - N S P - D M A E は 4 . 7 5 分 で 添 加 し 、 続 い て ラ テ ッ ク ス 磁 性 ビ ーズ を 含 有 す る 試 薬 を 7 . 5 分 で 添 加 し た 。 ラ テ ッ ク ス 磁 性 粒 子 を 単 離 す る た め に 磁 気 分 離 を 1 3 . 0 分 で 開 始 し た 。 2 0 / 2 0 ツ ー パ ス イ ム ノ ア ッ セ イ で は 、 サ ン プ ル は ゼ ロ 時 点 で 添 加 し 、 フ ァ ース ト パ ス ヒ ト T P O - N S P - D M A E ま た は r T P O - N S P - D M A E は 6 分 で 添 加 し 、 続 い て フ ァ ース ト パ ス 磁 気 分 離 は 2 4 . 0 分 で 行 っ た 。 セ カ ン ド パ ス ヒ ト T P O - N S P - D M A E ま た は r T P O - N S P - D M A E は 3 5 . 0 分 で 添 加 し 、 セ カ ン ド パ ス 磁 気 分 離 は 5 2 . 7 5 分 で 開 始 し た 。 ワ ン パ ス お よ び ツ ー パ ス 形 式 の 両 方 で 、 磁 性 粒 子 は リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 で 3 回 洗 浄 し 、 リ ン 酸 緩 衝 液 1 0 0 m M 、 N a C l 4 0 0 m M 、 E D T A 1 . 9 g / L 、 0 . 2 % (v / v) プ ル ロ ニ ッ ク F - 1 2 7 、 ア ジ 化 ナ ト リ ウ ム 0 . 9 g / L 、 1 0 % ソ ル ビ ト ール お よ び ス ル フ ヒ ド リ ル 修 飾 ウ シ 血 清 ア ル ブ ミ ン 1 0 g / L に 再 懸 濁 す る こ と に よ っ て 調 製 し た 。 キ ュ ベ ッ ト 内 で 、 C e n t a u r プ ラ ッ ト フ ァ ーム サ イ ク ル パ ラ メ ー タ に 従 っ て 粒 子 は 磁 気 的 に 分 離 さ れ 、 水 ま た は t w e e n - 2 0 P B S の い ず れ か に 再 懸 濁 し た 。 S i e m e n s a T P O M a s t e r C u r v e M a t e r i a l (S i e m e n s 1 0 6 3 0 8 9 0) を サ ン プ ル と し て 、 実 施 し た 。 図 1 1 に 示 し た よ う に 、 A D V I A C E N T A U R (登 録 商 標) X P に お い て 7 . 5 分 ワ ン パ ス お よ び 2 0 / 2 0 分 ツ ー パ ス 形 式 の 両 方 を 使 用 し て 、 組 換 え T P O は 天 然 T P O と 比 較 し て 高 い シ グ ナ ル 対 ノ イ ズ 比 を も た ら し た 。

30

40

【 0 0 9 1 】

50

抗 T P O 抗体イムノアッセイ

抗原架橋形式

r T P O 抗原架橋イムノアッセイは、リン酸緩衝液 1 0 0 m M、Na C l 4 0 0 m M、E D T A 1 . 9 g / L、0 . 2 % (v / v) プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム 0 . 9 g / L、1 0 % ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン 1 0 g / L にストレプトアビジンコーティングラテックス磁性粒子に直接的にカップリングしたビオチン化 r T P O 0 . 6 m g / m L ならびに T S P - A E にカップリングした r T P O (リン酸緩衝液 1 0 0 m M、Na C l 4 0 0 m M、E D T A 1 . 9 g / L、0 . 2 % (v / v) プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム 0 . 9 g / L、1 0 % ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン 1 0 g / L に 3 0 n g / m L r T P O - T S P - A E) を使用した。r T P O 抗原架橋形式は、7 . 5 分ワンパス (T T F R : 1 8 分) アッセイとして実施し、1 : 6 のオンボードサンプル予備希釈を必要とした。A D V I A C E N T A U R (登録商標) X P では、希釈したサンプル 2 0 μ L を第 2 のキュベットに添加し、4 . 7 5 分間インキュベートした。r T P O - T S P - A E 1 0 0 μ L を添加し、2 . 7 5 分間インキュベートした。次に、r T P O / ラテックス磁性粒子 1 0 0 μ L を添加し、2 . 7 5 分間インキュベートした。磁気分離を 1 3 . 0 分で開始した。磁性粒子はリン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄し、リン酸緩衝液 1 0 0 m M、Na C l 4 0 0 m M、E D T A 1 . 9 g / L、0 . 2 % (v / v) プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム 0 . 9 g / L、1 0 % ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン 1 0 g / L で最終的に元の濃度に再懸濁した。キュベット内で、C e n t a u r プラットフォームサイクルパラメータに従って、粒子は磁氣的に分離され、水または t w e e n - 2 0 P B S のいずれかに再懸濁された。抗原架橋アッセイ形式の概略例を図 1 に示す。最適化した r T P O 抗原架橋イムノアッセイ (バックグラウンドを最小限に抑え、シグナル対ノイズを増強し、いかなるプロゾン現象も制限するために最適化した) の性能を図 1 2 A に挙げる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

I g G クラス捕捉形式

ヒト I g G クラス捕捉イムノアッセイは、グルタルアルデヒド固定によって常磁性粒子に直接的にカップリングした抗ヒト I g G モノクローナル抗体および N S P - D M A E にカップリングした r T P O (抗ヒト I g G / 常磁性粒子 0 . 3 4 m g / m l および r T P O - N P S - D M A E 2 2 0 n g / m l に、いずれもリン酸緩衝液 1 0 0 m M、Na C l 4 0 0 m M、E D T A 1 . 9 g / L、0 . 2 % (v / v) プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム 0 . 9 g / L、1 0 % ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン 1 0 g / L) を使用した。ヒト I g G クラス捕捉形式は、7 . 5 分ワンパス (T T F R : 1 8 分) アッセイとして実施し、1 : 1 0 オンボードサンプル予備希釈を必要とした。A D V I A C E N T A U R (登録商標) X P では、希釈したサンプル 2 0 μ L を第 2 のキュベットに添加し、4 . 7 5 分間インキュベートした。r T P O - N S P - D M A E 1 0 0 μ L を添加し、2 . 7 5 分間インキュベートした。抗ヒト I g G / 常磁性粒子 2 0 0 μ L を添加し、2 . 7 5 分間インキュベートした。磁性粒子は前述のように分離して洗浄した。I g G クラス捕捉アッセイ形式の概略例を図 2 に示す。最適化したヒト I g G クラス捕捉イムノアッセイ (バックグラウンドを最小限に抑え、シグナル対ノイズを増強し、いかなるプロゾン現象も制限するために最適化した) の性能を図 1 2 B に挙げる。

【 0 0 9 3 】

r T P O 捕捉形式

r T P O 捕捉イムノアッセイは、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (E D C) N H S 化学物質を使用してラテックス磁性粒子に直接的にカップリングした r T P O および N S P - D M A E にカップリングしたモノクローナル抗ヒト I g G 抗体 (r T P O / ラテックス磁性粒子 0 . 4 m g / m l および抗ヒト I g G 抗体 - N S P - D M A E 1 . 6 μ g / m l に、いずれもリン酸緩衝液 1 0 0 m M、Na C l 4 0 0 m M、E D T A 1 . 9 g / L、0 . 2 % (v / v) プルロニック F - 1 2 7、アジ化ナト

リウム 0.9 g/L、10%ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン 10 g/L)を使用した。rTPO捕捉形式は、7.5分ワンパス(TTFR:18分)アッセイとして実施し、1:10オンボードサンプル予備希釈を必要とした。ADVIA CENTAUR(登録商標)XPでは、希釈したサンプル20 µLを第2のキュベットに添加した。抗ヒトIgG抗体-NSP-DMAE 100 µLを添加し、2.75分間インキュベートした。rTPO/ラテックス磁性粒子100 µLを添加し、2.75分間インキュベートした。磁性粒子は前述のように分離して洗浄した。rTPO捕捉アッセイ形式の概略例を図3に示す。最適化したrTPO捕捉イムノアッセイ(バックグラウンドを最小限に抑え、シグナル対ノイズを増強し、いかなるプロゾーン現象も制限するために最適化した)の性能を図12Cに挙げる。

10

【0094】

競合/阻害形式

競合/阻害イムノアッセイは、ストレプトアビジンコーティングラテックス磁性粒子にカップリングしたビオチン化マウスモノクローナル抗rTPO IgG抗体および非標識rTPOとの免疫複合体中でHEG-GLU-AEにカップリングしたマウスモノクローナル抗rTPO IgG抗体(それぞれ、マウス抗rTPO/ラテックス磁性粒子0.3 mg/mlおよびrTPO:抗rTPO IgG HEG-GLU-AE 420 ng/mlに、いずれもリン酸緩衝液100 mM、NaCl 400 mM、EDTA 1.9 g/L、0.2%(v/v)ブルロニックF-127、アジ化ナトリウム0.9 g/L、10%ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン10 g/L)を使用した。競合/阻害形式は、7.5分ワンパス(TTFR:18分)アッセイとして実施した。ADVIA CENTAUR(登録商標)XPでは、未希釈サンプル20 µLをキュベットに添加し、4.75分間インキュベートした。rTPO:抗rTPO IgG HEG-GLU-AE 75 µLおよびマウス抗rTPO/ラテックス磁性粒子150 µLを添加し、各2.75分間インキュベートした。磁性粒子は前述のように分離して洗浄した。競合/阻害アッセイ形式の概略例を図4に示す。最適化した競合/阻害イムノアッセイ(バックグラウンドを最小限に抑え、シグナル対ノイズを増強し、いかなるプロゾーン現象も制限するために最適化した)の性能を図12Dに挙げる。

20

【0095】

イムノアッセイの性能に対するrTPOグリコシル化の影響

イムノアッセイの性能に対する組換えrTPOグリコシル化の影響を分析するために、抗原架橋およびIgGクラス捕捉(標識rTPO検出を含む)形式を使用して、イムノアッセイを実施した。表4は、各形式のためのイムノアッセイ調製物の概略を示す。イムノアッセイは、ADVIA CENTAUR(登録商標)XPで3連で実施した。サンプルはPBS緩衝液に混ぜた抗TPO抗体陽性血漿を使用して調製し、以下の用量:0、12.5、25、50、100、200、300、400、625、20,000 IU/mLを標的化した。

30

【0096】

抗原架橋アッセイ形式では、サンプル30 µL、続いて希釈液(リン酸緩衝液100 mM、NaCl 約400 mM、EDTA 約1.9 g/L、約0.2%(v/v)ブルロニックF-127、アジ化ナトリウム約0.9 g/L、ソルビトール約10%およびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン約10 g/L)180 µLをキュベットに添加し、希釈したサンプルを4.75分間インキュベートした。希釈したサンプル30 µLを、常磁性粒子を含有する希釈液100 µLに添加し、2.75分間インキュベートした。標識rTPOを含有する希釈液100 µLを反応物に添加し、6.5分間インキュベートした。イムノアッセイは、脱グリコシル化無し(「対照」)、脱グリコシル化された標識rTPO(「グリコシル化SP/脱グリコシル化LR」)、固体支持体に結合した脱グリコシル化非標識rTPO(「脱グリコシル化SP/グリコシル化LR」)ならびにいずれも脱グリコシル化された標識rTPOおよび固体支持体に結合した非標識rTPO(「脱グリコシル化SP&LR」)で試験した(結果は図7Aに示す)。

40

50

【 0 0 9 7 】

I g G クラス捕捉アッセイ形式では、サンプル 3 0 μ L、続いて希釈液（リン酸緩衝液 1 0 0 m M、N a C l 約 4 0 0 m M、E D T A 約 1 . 9 g / L、約 0 . 2 % (v / v) ブルコニック F - 1 2 7、アジ化ナトリウム約 0 . 9 g / L、ソルビトール約 1 0 % およびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミン約 1 0 g / L) 1 8 0 μ L をキュベットに添加し、希釈したサンプルを 4 . 7 5 分間インキュベートした。希釈したサンプル 3 0 μ L を、標識 r T P O を含有する希釈液 1 0 0 μ L に添加し、2 . 7 5 分間インキュベートした。常磁性粒子にカップリングした抗ヒト I g G F c モノクローナル抗体を含有する希釈液 1 0 0 μ L を反応物に添加し、6 . 5 分間インキュベートした。イムノアッセイは、脱グリコシル化されていない標識 r T P O (対照) および脱グリコシル化された標識 r T P O で試験した (図 7 B)。

10

【 0 0 9 8 】

【 表 4 】

表 4 : イムノアッセイ調製物

	固体支持体 (磁性粒子に結合)	[固体支持体] (mg/mL)	標識 rTPO	[標識rTPO] (ng/mL)
抗原架橋	rTPO: スルホ-NHS- LC-ビオチン 30X	0.6 mg/mL	rTPO: NSP- DMAE-Z-NHS 20X	120 ng/mL
IgG クラス捕捉 w/ rTPO 検出	抗ヒトIgG, 8D6	0.34 mg/mL	rTPO: NSP- DMAE-Z-NHS 20X	220 ng/mL

20

【 0 0 9 9 】

グリコシル化に基づいた r T P O の機能評価によって、r T P O グリコシル化の違いにより、抗 T P O 抗体陽性患者プールに対する免疫反応性 (A D V I A C E N T A U R (登録商標) X P によって測定) に微妙な変動が生じることが明らかになった (図 7 A および図 7 B)。

【 0 1 0 0 】

イムノアッセイは、効果的な a T P O の検出と定量化のための低いバックグラウンドおよび広いダイナミックレンジを示した。

30

【 0 1 0 1 】

r T P O 免疫複合体の特徴づけ

F P L C サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、組換え T P O - 抗 T P O 自己抗体複合体の i n v i t r o における形成を検証し、患者サンプル内の何らかのその他の成分ではなく抗 T P O 自己抗体が組換え T P O と相互作用していることを確認した。

【 0 1 0 2 】

r T P O A E ベースラインクロマトグラム: N - スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル (N S P - D M A E) で標識した r T P O (5 モル過剰) は、分画緩衝液; リン酸ナトリウム 5 0 m M、塩化ナトリウム 1 5 0 m M、0 . 5 % t w e e n 2 0 および 0 . 1 % アジ化ナトリウム、p H 7 . 4 を使用して約 5 0 0 万 R L U (1 : 6 0 0 希釈) になるように希釈した。このサンプルは、S u p e r d e x 2 0 0 H i L o a d 1 6 / 6 0 0 カラムを用いた A K T A ピュアシステムによって、分画緩衝液、注入 5 0 0 μ L および溶出 1 m l / 分を使用して分析し; 1 8 0 個の画分 (各 1 m l) を収集し、B e r t h o l d A u t o L u m a t システムを実施して、ベースライン R L U クロマトグラムを生成した。標識 r T P O は、図 8 の R L U クロマトグラムの M W 9 0 ~ 1 0 0 K D a (画分 6 6 ~ 7 6) の単一ピークによって表された (注: 「 r T P O A E 」 は、アクリジニウムエステル類似体または変種、例えば、本実施例では N S P - D M A E で標識された r T P O を意味する)。

40

【 0 1 0 3 】

50

*in vitro*免疫複合体クロマトグラム：高抗TPO抗体患者サンプルプール（濃度約60,000U/mL）を分画緩衝液で約1,500U/mLまで希釈した。希釈サンプルの一部を、ジメチルアクリジニウムエステル（NSP-DMAE）で標識した希釈（1:600）rTPOの19部と混合した。上記と同じカラムおよび条件を使用してサンプル混合物を分析した。図8のベースラインクロマトグラムに重ねた混合物のRLUクロマトグラム（「rTPOAE_speaker」）は、結合していない標識rTPOピーク（画分66~76）とともに高分子量の免疫複合体ピーク（画分45~55）を示している。

【0104】

MALDI-TOFを使用して、免疫複合体の成分を評価した。

10

【0105】

サンプル調製：高抗TPO抗体患者プール（濃度約20,000U/mL）を分画緩衝液で約2,700U/mLまで希釈した。希釈したサンプルをrTPOと1:1比で混合した。サンプル混合物は、Superdex200 HiLoad16/60カラムを用いたAKTAピュアシステムによって分析し、180個（各1mL）の画分を収集した。

【0106】

A280クロマトグラム（図9）は3つの別個のピーク；高分子量のピークA（保持容量52.05mL）、ピークB（保持容量66.87mL）およびピークC（保持容量75.43mL）を示している。ピーク領域画分の各は別々にプールし；高分子量ピーク領域は2つのサンプルにプールした。プールしたサンプル：S1（画分46~49）、S2（画分51~54）、S3（画分65~68）およびS4（画分74~77）は、Amicon Ultra-4遠心分離フィルター（Ultracel 30K 30,000 NMWL ref UFC803024）を使用して濃縮した。

20

【0107】

MALDI-TOF手順：洗浄済みのPall NanoSepフィルターに脱イオン水（「dH₂O」）（500μL）、続いて上記の様々な量のS1、S2、S3およびS4サンプルを添加した。次に、サンプルを12,000×gで7分間遠心分離し、もう一度水で洗浄し、シナピン酸（Sigma-Aldrich 49508）トリフルオロ酢酸（Alfa-Aesar 44630）マトリックス溶液で直接再構成して、タンパク質濃度2mg/mLを達成した。各サンプル2マイクロリットルをMALDI-TOFプレートに直接プロットし、乾燥させた。感度を高めるために第2のスポット形成を実行した。MALDI-TOFは、Shimadzu Axima Confidence MALDI-TOFで、MALDIグレードBSA標準物を使用して校正し、レーザー出力を65に設定した。MALDI-TOFの結果（図10）は、サンプルS1およびS2が主に約90kDaタンパク質種（rTPO）およびヒトTPO自己抗体を表す約150kDaタンパク質で構成されていることを示した。

30

【0108】

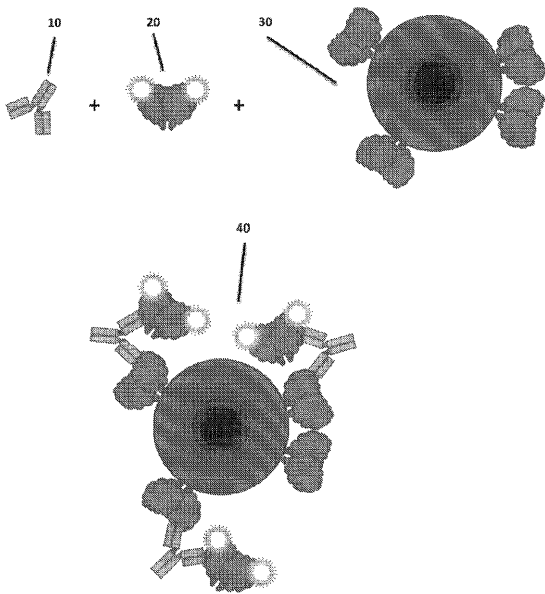
結果は、標識rTPOと患者サンプルとの相互作用が患者の抗TPO抗体に特異であることを示した。

【0109】

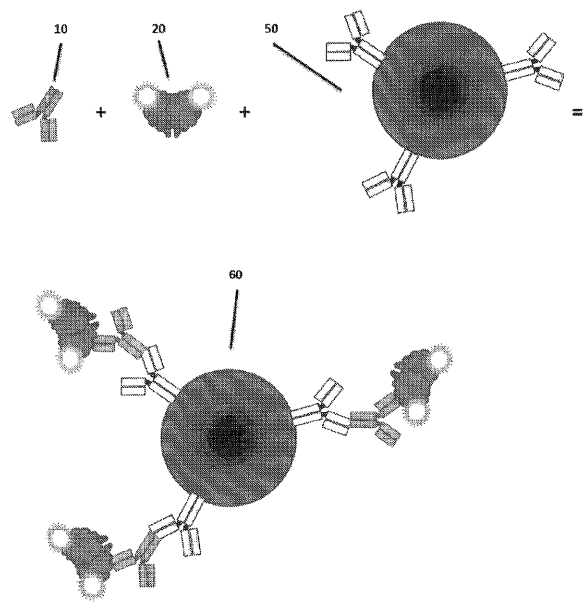
40

当業者であれば、本発明の好ましい実施形態に対して多数の改変および修正を行うことができ、そのような改変および修正は、本発明の趣旨から逸脱することなく行うことができることを理解するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨および範囲内にあるこのような同等の変更全てを包含することを意図している。

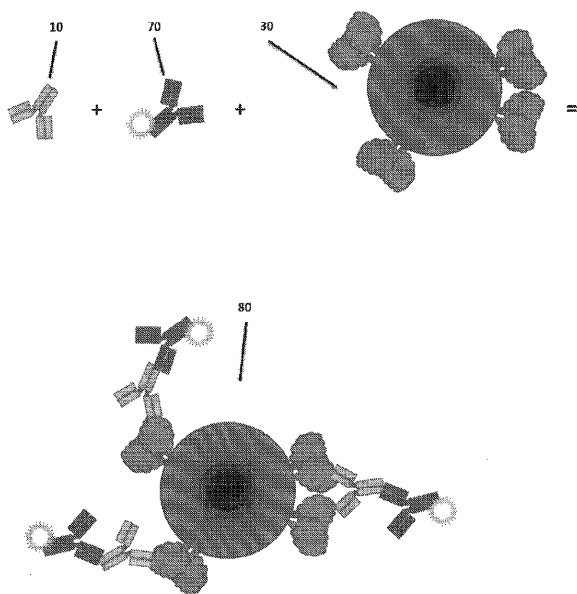
【図 1】



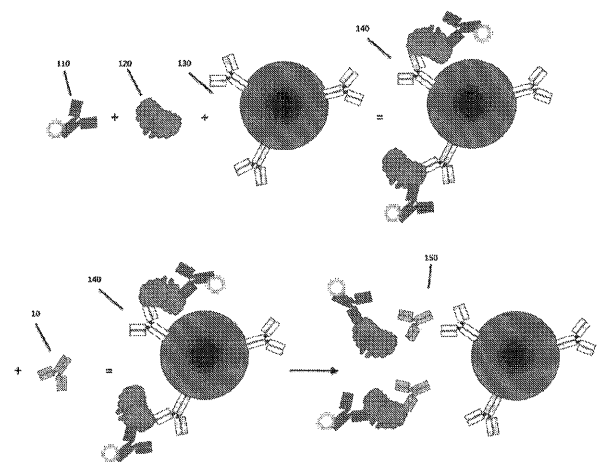
【図 2】



【図 3】



【図 4】

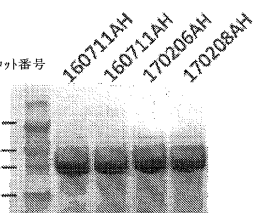


【図 5】

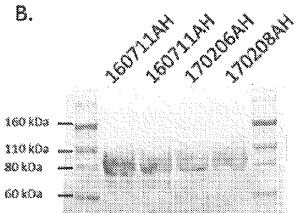
A.

rTPO ヌット番号

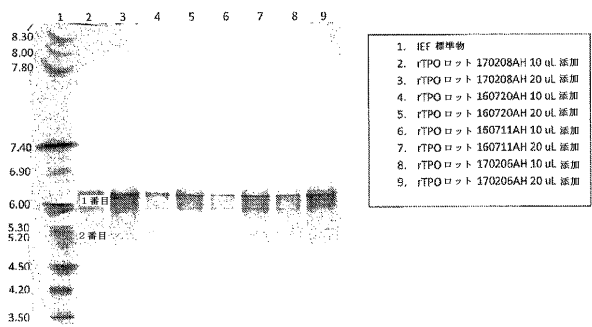
160 kDa
110 kDa
80 kDa
60 kDa



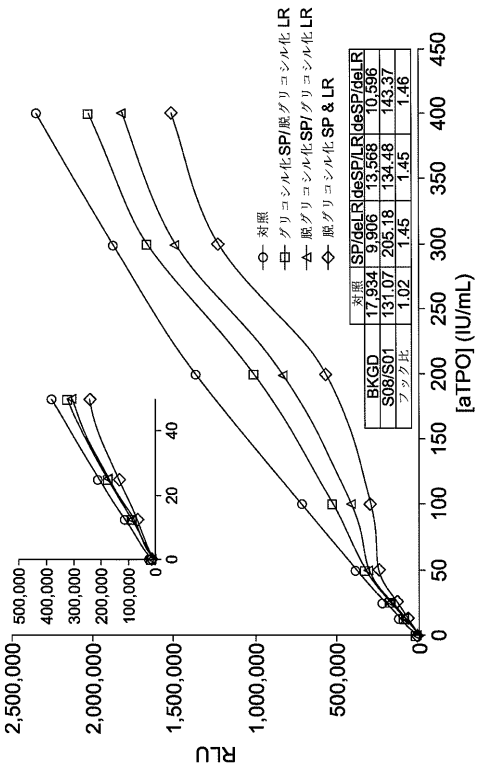
B.



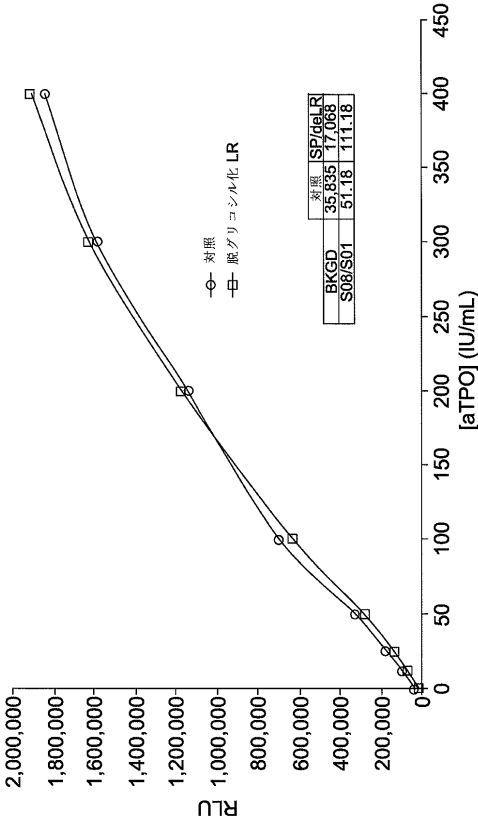
【図 6】



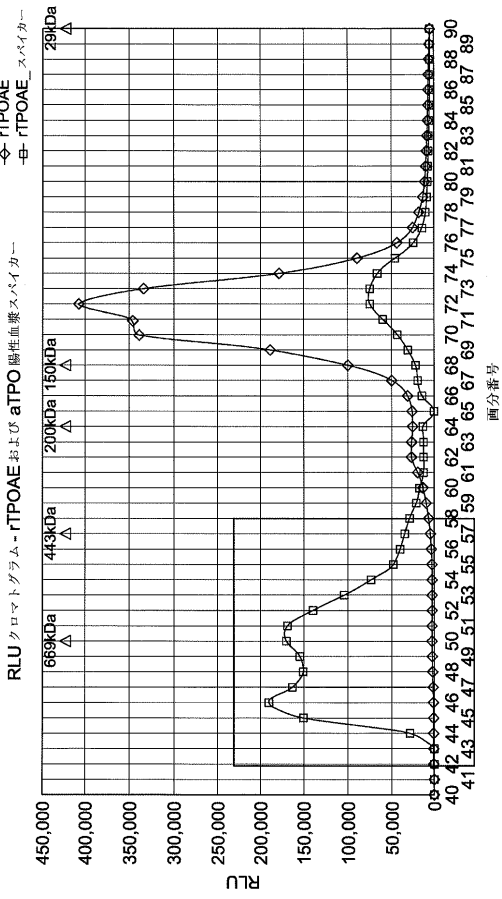
【図 7 A】



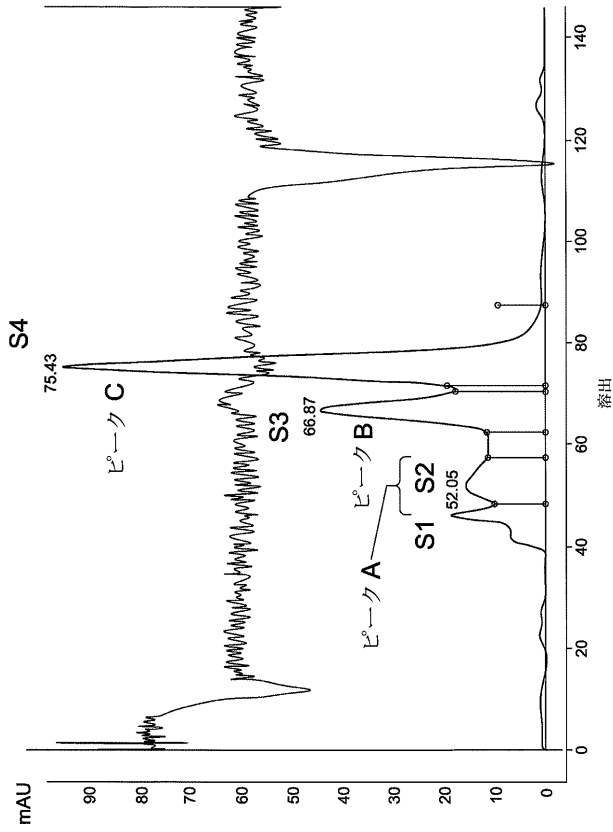
【図 7 B】



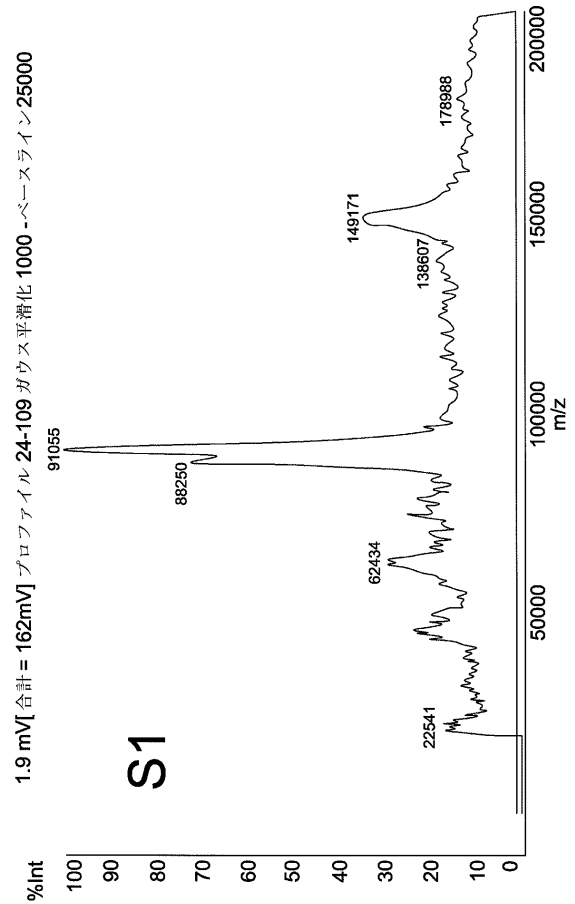
【図 8】



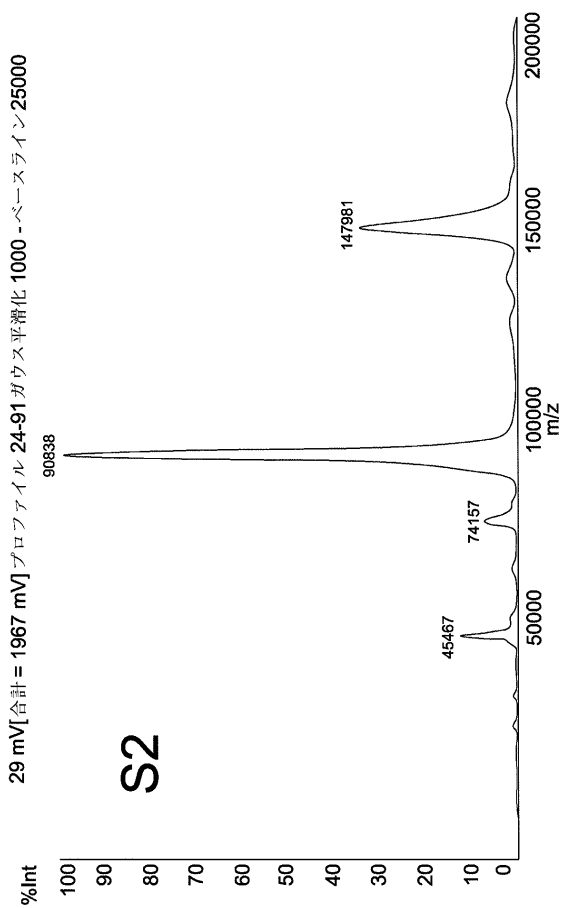
【図 9】



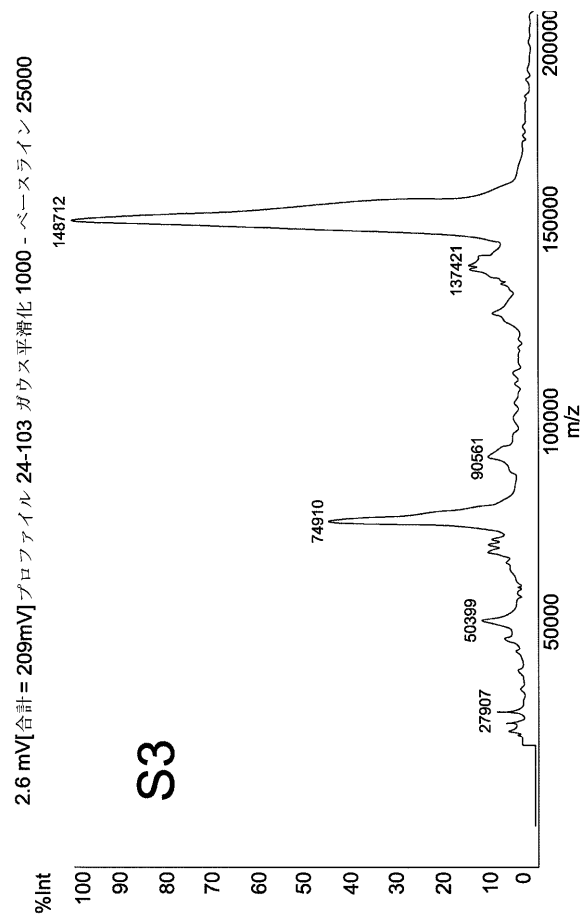
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】

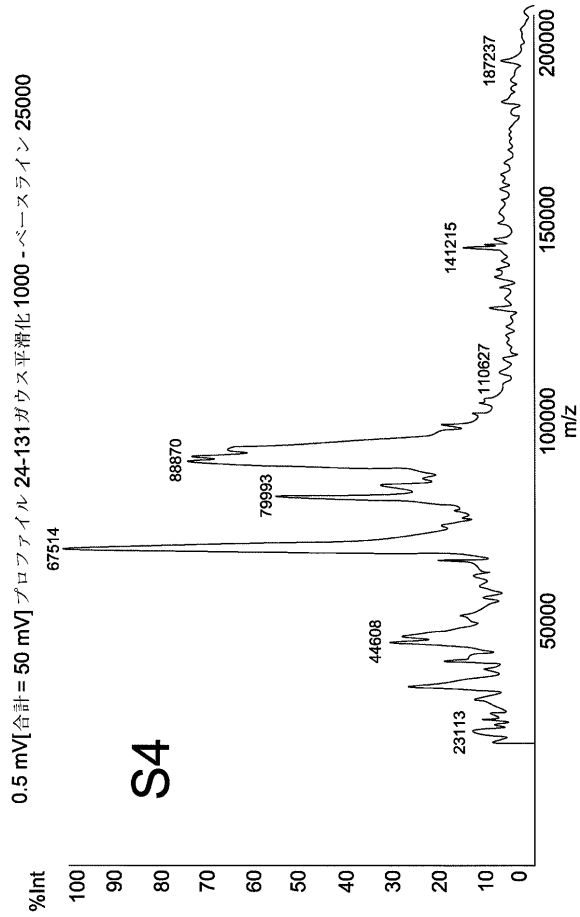


1.9 mV[合計 = 162mV] プロファイル 24-109 ガウス平滑化 1000 - ベースライン 25000

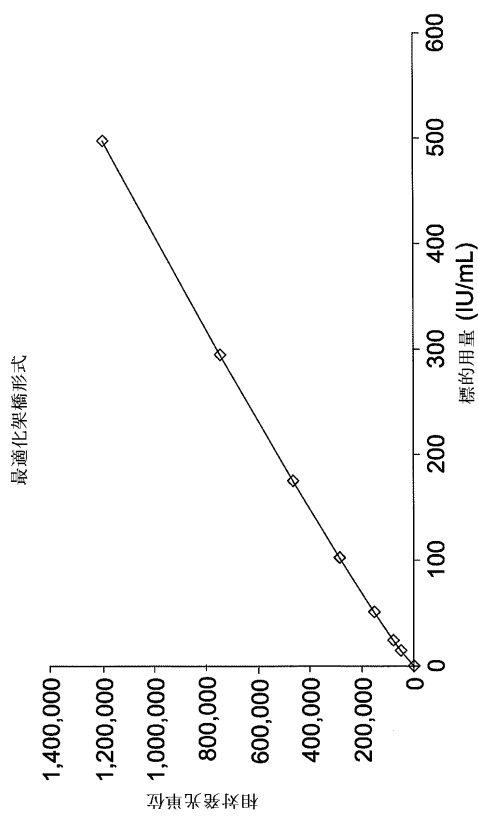
29 mV[合計 = 1967 mV] プロファイル 24-91 ガウス平滑化 1000 - ベースライン 25000

2.6 mV[合計 = 209mV] プロファイル 24-103 ガウス平滑化 1000 - ベースライン 25000

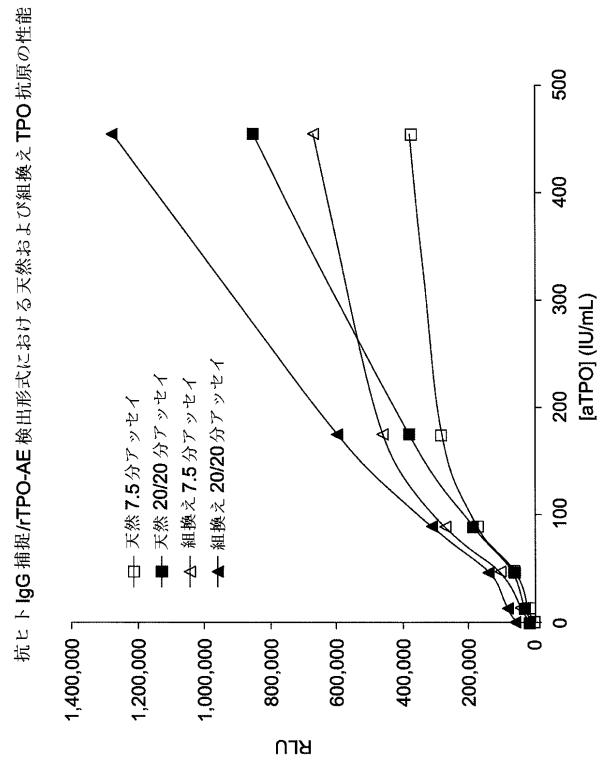
【図 1 0 D】



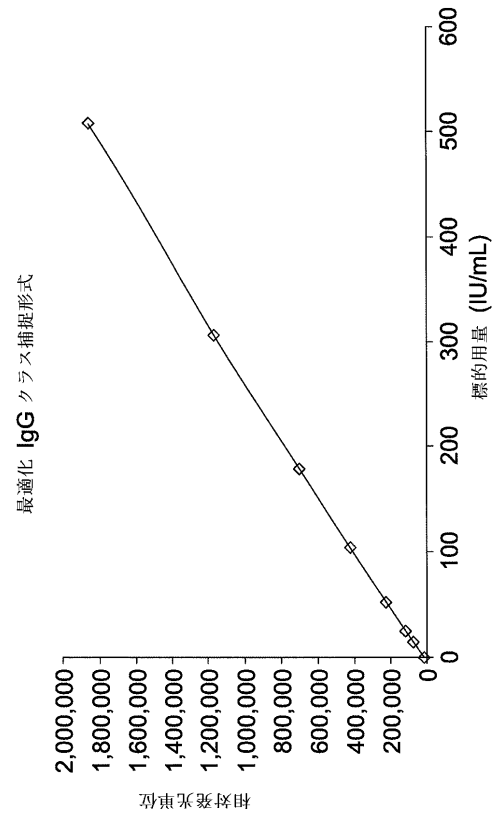
【図 1 2 A】



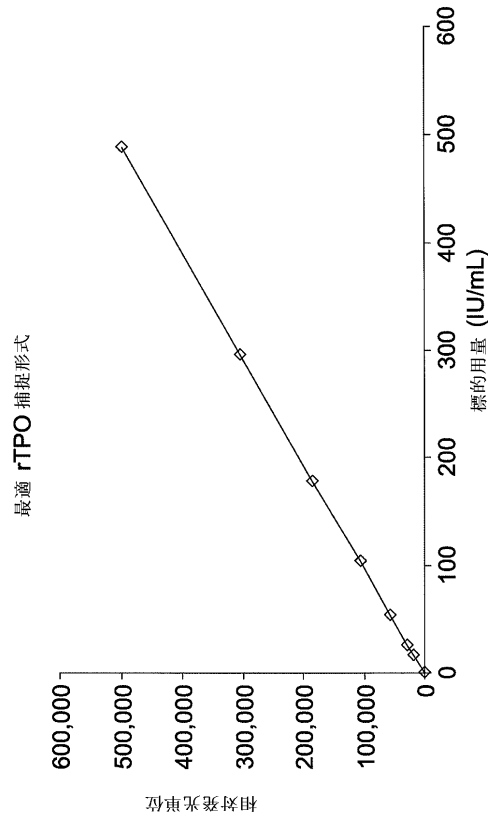
【図 1 1】



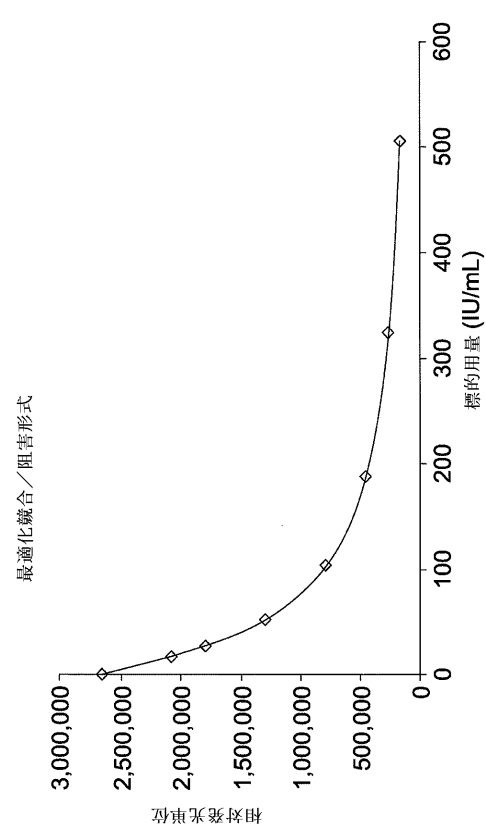
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



【配列表】

2021524589000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和3年2月16日 (2021.2.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O)、および

標識カニクイザル r T P O

とインキュベートする工程であって、

該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該標識カニクイザル r T P O、該非標識カニクイザル r T P O および該固体支持体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 該複合体を検出する工程であって、該複合体の存在は、生物学的サンプル中の該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す、工程

を含む前記方法。

【請求項 2】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

非標識カニクイザル r T P O は、固体支持体に間接的に連結されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

非標識カニクイザル r T P O は、ビオチン化されており、固体支持体は、ストレプトアビジンを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

標識カニクイザル r T P O、および

抗ヒト二次抗体

とインキュベートする工程であって、

該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該固体支持体、該カニクイザル r T P O および該抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 該複合体を検出する工程であって、該複合体の存在は、生物学的サンプル中の該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在を示す、工程を含む前記方法。

【請求項 7】

抗ヒト二次抗体は、固体支持体に直接的または間接的に連結されている、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

カニクイザル r T P O は、標識を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

アクリジニウムエステル（A E）類似体は、DMAE、NSP - DMAE、HQYAE、ZAE、Iso - Di - ZAE、TSP - AE または HEG - GLU - AE である、請求項 3 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

標識を含むカニクイザル r T P O は、r T P O - NSP - DMAE である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

r T P O - NSP - DMAE は、約 50 ng / ml から約 2 μg / ml で存在する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

カニクイザル r T P O および標識は、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニック F - 127、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中に存在する、請求項 3 または 10 に記載の方法。

【請求項 15】

カニクイザル r T P O は、固体支持体に直接的または間接的に連結されている、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 16】

抗ヒト二次抗体は、標識を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

標識は、アクリジニウムエステル（「AE」）またはその類似体である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

アクリジニウムエステル類似体は、DMAE、NSP-DMAE、HQYAE、ZAE、Iso-Di-ZAE、TSP-AEまたはHEG-GLU-AEである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

カニクイザル r T P O は、固体支持体に間接的に連結している、請求項 6、15、16、17 または 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

カニクイザル r T P O は、ビオチン化されており、固体支持体は、ストレプトアビジンを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

カニクイザル r T P O および固体支持体は、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニック F-127、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中に存在する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

対象の生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体とインキュベートする工程；および

b) 生物学的サンプル中の該抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を検出する工程であって、該検出は、該固体支持体、該非標識抗 T P O 抗体、該カニクイザル r T P O および該標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成の減少を分析することを含む、工程を含む前記方法。

【請求項 24】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

標識は、アクリジニウムエステル（「AE」）またはその類似体を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

アクリジニウムエステル類似体は、DMAE、NSP-DMAE、HQYAE、ZAE、Iso-Di-ZAE、TSP-AEまたはHEG-GLU-AEである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

標識抗 T P O 抗体は、抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

抗 r T P O I g G H E G - G L U - A E は、約 50 ng / ml から約 2 μ g / ml で存在する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

複合体は、リン酸緩衝液、NaCl、EDTA、ブルロニック F-127、アジ化ナトリウム、ソルビトールおよびスルフヒドリル修飾ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中にある、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

非標識組換えカニクイザル甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O)、および

標識カニクイザル r T P O

とインキュベートする工程であって、

生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該標識カニクイザル r T P O、該非標識カニクイザル r T P O および該固体支持体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 該複合体が形成された場合、対象を甲状腺疾患と診断する工程を含む前記方法。

【請求項 3 1】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを：

固体支持体、

カニクイザル r T P O、および

抗ヒト二次抗体

とインキュベートする工程であって、

生物学的サンプル中の抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の存在下で、該固体支持体、該カニクイザル r T P O および該抗ヒト二次抗体を含む複合体が形成される、工程；および

b) 該複合体が形成された場合、対象を甲状腺疾患と診断する工程を含む前記方法。

【請求項 3 2】

対象の甲状腺疾患を診断する方法であって：

a) 対象の生物学的サンプルを固体支持体、非標識抗 T P O 抗体、カニクイザル r T P O および標識抗 T P O 抗体とインキュベートする工程；および

b) 該固体支持体、該非標識抗 T P O 抗体、該カニクイザル r T P O および該標識抗 T P O 抗体を含む複合体の形成が減少している場合、対象を甲状腺疾患と診断する工程を含む前記方法。

【請求項 3 3】

甲状腺疾患は、自己免疫障害である、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

自己免疫障害は、橋本病またはグレーブス病である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む組換えによって生成された甲状腺ペルオキシダーゼ (r T P O)。

【請求項 3 6】

r T P O は、標識を含む、請求項 3 5 に記載の r T P O。

【請求項 3 7】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 3 6 に記載の r T P O。

【請求項 3 8】

標識は、アクリジニウムエステル (「A E」) またはその類似体を含む、請求項 3 7 に記載の r T P O。

【請求項 3 9】

アクリジニウムエステル類似体は、DMAE、NSP - DMAE、HQYAE、ZAE、Iso - Di - ZAE、TSP - AE または HEG - GLU - AE である、請求項 3 8 に記載の r T P O。

【請求項 4 0】

抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体と複合体化した請求項 3 6 の r T P O。

【請求項 4 1】

請求項 3 6 の r T P O をコードする c D N A。

【請求項 4 2】

固体支持体、
非標識カニクイザル r T P O、および
標識カニクイザル r T P O

を含むキット。

【請求項 4 3】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 4】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 5】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 6】

固体支持体、
カニクイザル r T P O、および
抗ヒト二次抗体

を含むキット。

【請求項 4 7】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 4 6 に記載のキット。

【請求項 4 8】

カニクイザル r T P O が標識を含むか、または抗ヒト二次抗体が標識を含む、請求項 4 6 に記載のキット。

【請求項 4 9】

標識が酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 4 8 に記載のキット。

【請求項 5 0】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 4 9 に記載のキット。

【請求項 5 1】

固体支持体、
カニクイザル r T P O、および
抗 T P O 抗体

を含むキット。

【請求項 5 2】

固体支持体は、カラムマトリックス材料、培養プレート、試験管、皿、フラスコ、マイクロタイタープレート、ビーズまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 5 1 に記載のキット。

【請求項 5 3】

抗 T P O 抗体の一部は標識されておらず、抗 T P O 抗体の一部は標識されている、請求項 5 1 に記載のキット。

【請求項 5 4】

標識は、酵素コンジュゲート、蛍光プローブ、放射性同位元素、化学発光化合物、生物発光化合物またはそれらの組み合わせを含む、請求項 5 3 に記載のキット。

【請求項 55】

標識は、アクリジニウムエステル（「A E」）またはその類似体である、請求項 54 に記載のキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/040161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 37/50; A61K 38/10; A61K 38/43; C07K 3/02; C07K 3/04; C07K 13/00 (2019.01)

CPC - A61K 38/00; A61K 39/00; C12N 9/0065; C12Y 111/01008; G01N 33/564; G01N 33/573 (2019.08)

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

USPC - 424/568; 424/185.1; 424/192.1; 424/277.1; 435/28; 435/192; 435/7.21; 435/7.4; 435/7.92 (keyword delimited)

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.
A	US 6,528,059 B1 (BAKER, JR. et al) 04 March 2003 (04.03.2003) entire document	1-5, 7-20, 23-25, 27-33, 43-68
A	US 2017/0307629 A1 (GENZYME CORPORATION) 26 October 2017 (26.10.2017) entire document	1-5, 7-20, 23-25, 27-33, 43-68
A	GODLEWSKA et al. "Biochemical properties of thyroid peroxidase (TPO) expressed in human breast and mammary-derived cell lines," PLoS One, 07 March 2018 (07.03.2018), Vol. 13, Iss. 3, Pgs. 1-14. entire document	1-5, 7-20, 23-25, 27-33, 43-68
A	GB 2265713 A (R S R LIMITED) 06 October 1993 (06.10.1993) entire document	1-5, 7-20, 23-25, 27-33, 43-68
A	US 7,186,181 B1 (RAPOPORT) 27 March 2007 (27.03.2007) entire document	1-5, 7-20, 23-25, 27-33, 43-68
A	US 2007/0178604 A1 (WATKINS et al) 02 August 2007 (02.08.2007) entire document	1-5, 7-20, 23-25, 27-33, 43-68

☐ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2019

Date of mailing of the international search report

12 NOV 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/040161

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

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

3. Additional comments:

SEQ ID NO:1 was searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/040161

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.: 6, 21, 22, 26, 34-42
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 9/08 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
C 1 2 N 15/866 (2006.01)	C 1 2 N 9/08	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/866	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 N 5/10	

(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. ブルロニック
2. T W E E N

- (72) 発明者 サジ・チェリアン
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 9 5 6 . ニュー・シティ・ヘンブター・ロード 2 7
- (72) 発明者 ポール・ダゴスティーノ
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 9 4 1 . ミドルタウン・カントリーサイド・コート 6 0
- (72) 発明者 ガブリエル・ハマーキスト
アメリカ合衆国バーモント州 0 5 3 5 8 . ハリファックス・ジャクソンビル・ステージ・ロード 7 9 6 8
- (72) 発明者 アイリ・ハン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 0 6 3 0 . サイプレス・シッピング・ウェイ 1 1 4 6 2
- (72) 発明者 カルディーブ・ジャッキ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 6 9 2 . ミッションビエホ・ボレロ 1 9
- (72) 発明者 マラル・ポラディアン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 3 1 6 . エンシノ・グリーン・メドー・コート 4 1 6 8
- (72) 発明者 ニバー・サハキアン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 3 1 6 . エンシノ・グリーン・メドー・コート 4 1 7 1
- (72) 発明者 シーマ・シンハ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 6 8 8 . ランチョ・サンタ・マルガリータ・エル・コース 2 0
- (72) 発明者 プラカッシュ・テワリ
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 1 2 . カメル・ストーンリー・アヴェニュー 9 1 1
- (72) 発明者 ヘギョン・リー
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 1 2 8 . サード・アヴェニュー 1 6 4 1 . アpartment・ナンバー 2 5 ディー

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA08 BB17 FA12 GA08 GB10
4B050 CC04 DD07 DD11 FF14E LL03 LL10
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR02 QR48 QR82 QS28
QS33 QS39 QX02

4B064	AG01	CA10	CA19	CC24	CE12	DA13	DA20
4B065	AA90X	AA90Y	AB01	AC14	BA02	CA28	CA46