

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B1)

(11)特許番号  
特許第7216948号  
(P7216948)

(45)発行日 令和5年2月2日(2023.2.2)

(24)登録日 令和5年1月25日(2023.1.25)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	L
C 0 7 K	14/08 (2006.01)	C 0 7 K	14/08	
C 0 7 K	16/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/10	
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	B
C 1 2 Q	1/37 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	F

請求項の数 19 (全32頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-100117(P2021-100117)  
 (22)出願日 令和3年6月16日(2021.6.16)  
 審査請求日 令和3年6月16日(2021.6.16)  
 審判番号 不服2022-3272(P2022-3272/J1)  
 審判請求日 令和4年3月3日(2022.3.3)  
 早期審査対象出願

(73)特許権者 390037327  
 積水メディカル株式会社  
 東京都中央区日本橋二丁目1番3号  
 (74)代理人 100161207  
 弁理士 西澤 和純  
 (74)代理人 100152272  
 弁理士 川越 雄一郎  
 (74)代理人 100147267  
 弁理士 大槻 真紀子  
 (74)代理人 100188592  
 弁理士 山口 洋  
 (72)発明者 廣田 次郎  
 東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内  
 (72)発明者 宇野 智

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 S A R S - C o V - 2 の免疫測定方法及び免疫測定キット、並びにモノクローナル抗体又はその抗体断片

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

S A R S - C o V - 2 の免疫測定方法であって、  
 生体試料と、S A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質と結合する第一モノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させ、複合体を形成させる工程と、  
 前記複合体とS A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質と結合する第二モノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させる工程と  
 を含み、

前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片の両方が、トリプシン、T M P R S S 2、T M P R S S 4、又はT M P R S S 1 1 D で処理したS A R S - C o V - 2 から生成する一のペプチド断片と結合する特徴を有し、  
 前記一のペプチド断片がS A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質のC末端側の領域の一部である、  
 免疫測定方法。

【請求項2】

前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片の一方が、K Q Q T V T L L P A A D L D D F S K (配列番号1)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識し、そして、  
 前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片のもう一方が、A A D L D D F S K Q L Q (配列番号2)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する、請求項1に

記載の免疫測定方法。

【請求項 3】

前記生体試料が、トリプシン、TMPRSS2、TMPRSS4、又はTMPRSS1Dにより処理されている、請求項1又は2に記載の免疫測定方法。

【請求項 4】

前記生体試料が、呼吸器分泌液である、請求項1～3のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 5】

第一モノクローナル抗体又はその抗体断片は、標識物質と間接的又は直接的に結合しており、第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、固相と間接的又は直接的に結合しており、

第一モノクローナル抗体又はその抗体断片と第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、認識するエピトープが異なる、請求項1～4のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 6】

(1) 生体試料と、標識物質に結合している第一モノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させ、第一複合体を形成する工程であり、そして、

(2) 前記第一複合体と、第二モノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させ、第二複合体を形成する工程と、

(3) 標識物質に由来するシグナルを測定する工程とをさらに含む、請求項5に記載の免疫測定方法。

【請求項 7】

前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片が、KQQTVTL LPAADLDDFSK(配列番号1)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片であり、前記第二モノクローナル抗体又はその抗体断片が、AADLDDFSKQLQ(配列番号2)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片である、請求項5又は6に記載の免疫測定方法。

【請求項 8】

イムノクロマトグラフィー、又はELISAである、請求項1～7のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 9】

前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片の一方が、LLPAA(配列番号25)で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識する、請求項1～8のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 10】

前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、以下の(1)～(3)からなる群から選択される1種又は2種である、請求項1～9のいずれかに記載の免疫測定方法

(1) 配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(2) 配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(3) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 1】

生体試料中の S A R S - C o V - 2 の免疫測定キットであって、  
 S A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片  
 を 2 種類含み、  
 前記 2 種類のモノクローナル抗体又はその抗体断片が、それぞれ、第一モノクローナル抗体  
 又はその抗体断片及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片であり、  
 前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片及び第二モノクローナル抗体又はその抗体  
 断片の両方が、トリプシン、T M P R S S 2、T M P R S S 4、又は T M P R S S 1 1 D  
 で処理した S A R S - C o V - 2 から生成する一のペプチド断片と結合する特徴を有し、  
前記一のペプチド断片が S A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質の C 末端側の領域の一部である、  
 免疫測定キット。

10

## 【請求項 1 2】

前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片の一方が、K Q Q T V T L L P  
 A A D L D D F S K (配列番号 1) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識し、そ  
 して  
 前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片のもう一方が、A A D L D D F S  
 K Q L Q (配列番号 2) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する、請求項 1 1  
 に記載の免疫測定キット。

20

## 【請求項 1 3】

前記生体試料が、トリプシン、T M P R S S 2、T M P R S S 4、または T M P R S S  
 1 1 D により処理されている、請求項 1 1 又は 1 2 のいずれかに記載の免疫測定キット。

## 【請求項 1 4】

前記生体試料が、呼吸器分泌液である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の免疫測定  
 キット。

## 【請求項 1 5】

第一モノクローナル抗体又はその抗体断片は、標識物質と間接的又は直接的に結合して  
 おり、第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、固相と間接的又は直接的に結合して  
 おり、

30

第一モノクローナル抗体又はその抗体断片と第二モノクローナル抗体又はその抗体断片  
 は、認識するエピトープが異なる、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の免疫測定キット。

## 【請求項 1 6】

前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片が、K Q Q T V T L L P A A D L D D F  
 S K (配列番号 1) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗  
 体又はその抗体断片であり、前記第二モノクローナル抗体又はその抗体断片が、A A D L  
 D D F S K Q L Q (配列番号 2) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノ  
 クローナル抗体又はその抗体断片である、請求項 1 5 に記載の免疫測定キット。

## 【請求項 1 7】

イムノクロマトグラフィー、又は E L I S A 用のキットである、請求項 1 1 ~ 1 6 のい  
 ずれかに記載の免疫測定キット。

40

## 【請求項 1 8】

前記第一及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片の一方が、L L P A A (配列番  
 号 2 5) で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識する、請求項 1 1 ~ 1 7 のい  
 ずれかに記載の免疫測定キット。

## 【請求項 1 9】

前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、以下の ( 1 ) ~ ( 3 ) からなる群から選  
 択される 1 種又は 2 種である、請求項 1 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の免疫測定キット  
 ( 1 ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1 と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有す  
 る C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む重鎖可変領域と配列番

50

号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(2) 配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(3) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、SARS-CoV-2の免疫測定方法及び免疫測定キットに関する。また、本発明は、モノクローナル抗体又はその抗体断片に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

SARS-CoV-2は、coronavirus disease 2019 (COVID-19)を引き起こすウイルスである。SARS-CoV-2は、ゲノムとして一本鎖プラス鎖RNAを持つ、コロナウイルス科に属している。現在、coronavirus disease 2019が世界中で流行し、多くの感染者が発生している。

#### 【0003】

SARS-CoV-2の検出のために、PCR検査や抗原検査が用いられている。抗原検査は、検体採取から数十分程度で結果の確認が可能であるので、PCR検査より簡便に検査を行うことができる。その反面、SARS-CoV-2の迅速検出のためには高感度で特異的な検査が求められる。しかし、抗原検査は一般的にPCR検査よりも低感度である。したがって、より高感度の抗原検査が求められている。

#### 【0004】

人体から採取されるSARS-CoV-2サンプルの解析も行われている（非特許文献1）。しかしながら、SARS-CoV-2のどのような配列又はどのようなサンプルをターゲットにして分析を行うと高感度の抗原検査が可能となるかは未だ不明であった。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0005】

【文献】Journal of proteome research 2020, 19, 4389-4392 Mass Spectrometric Identification of SARS-CoV-2 Proteins from Gargle Solution Samples of COVID-19 Patients

「エスプライン（登録商標）SARS-CoV-2」（富士レビオ社）体外診断用医薬品の添付文書

「クイックナビ（登録商標）- COVID19 Ag」（デンカ社）体外診断用医薬品の添付文書

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明の課題は、高感度で迅速な免疫測定が可能なSARS-CoV-2免疫測定キット及びSARS-CoV-2の免疫測定方法を提供することである。また、本発明の別の

10

20

30

40

50

課題は、前記免疫測定キット及び免疫測定方法に用いることができる、モノクローナル抗体又はその抗体断片を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記課題を解決するために、鋭意検討した。そして、セリンプロテアーゼで処理したSARS-CoV-2と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を用いることにより、前記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明者らは、実施例において、本発明の免疫測定方法の一実施形態と市販のSARS-CoV-2抗原検出用試薬である、エスプライン（登録商標）SARS-CoV-2（富士レピオ社）（非特許文献2）及びクイックナビ（登録商標）-COVID19 Ag（デンカ社）（非特許文献3）との感度を比較している。本発明の免疫測定方法の一実施形態は、これらの2種の試薬に対して、より短い測定時間で、同等以上の感度を示している。

具体的に、本発明は以下のとおりである。

<1> SARS-CoV-2の免疫測定方法であって、  
生体試料と、SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させる工程  
を含み、

前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、セリンプロテアーゼで処理したSARS-CoV-2と結合する、免疫測定方法。

<2> 前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、KQQTVTL LPAADLDD FSK（配列番号1）で表されるアミノ酸配列中のエピトープ、又はAADLDDFSKQLQ（配列番号2）で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する、<1>に記載の免疫測定方法。

<3> 前記生体試料が、セリンプロテアーゼ処理されている、<1>又は<2>に記載の免疫測定方法。

<4> 前記生体試料が、呼吸器分泌液である、<1>～<3>のいずれかに記載の免疫測定方法。

<5> SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質のペプチド断片と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を2種類用い、

前記2種類のモノクローナル抗体又はその抗体断片が、それぞれ、第一モノクローナル抗体又はその抗体断片及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片であり、  
第一モノクローナル抗体又はその抗体断片は、標識物質と間接的又は直接的に結合しており、第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、固相と間接的又は直接的に結合しており、

第一モノクローナル抗体又はその抗体断片と第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、認識するエピトープが異なる、<1>～<3>のいずれかに記載の免疫測定方法。

<6> 前記接触させる工程が、

（1）生体試料と、標識物質に結合している第一モノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させ、第一複合体を形成する工程であり、そして、

（2）前記第一複合体と、第二モノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させ、第二複合体を形成する工程と、

（3）標識物質に由来するシグナルを測定する工程と

をさらに含む、<5>に記載の免疫測定方法。

<7> 前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片が、KQQTVTL LPAADLDDFSK（配列番号1）で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片であり、前記第二モノクローナル抗体又はその抗体断片が、AADLDDFSKQLQ（配列番号2）で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片である、<5>又は<6>に記載の免疫測定方法。

<8> イムノクロマトグラフィー、又はELISAである、<1>～<7>のいずれか

10

20

30

40

50

に記載の免疫測定方法。

< 9 > 前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、以下の(1)~(4)からなる群から選択される1種又は2種である、< 1 > ~ < 8 > のいずれかに記載の免疫測定方法(1)配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(2)配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(3)配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、又は

(4)前記(1)~(3)のいずれかの抗体若しくはその抗体断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と、それぞれ、80%以上のアミノ酸配列の同一性を有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体若しくはその抗体断片。

< 10 > 生体試料中のSARS-CoV-2の免疫測定キットであって、SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を含み、

前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、セリンプロテアーゼで処理したSARS-CoV-2と結合する、免疫測定キット。

< 11 > 前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、KQQTVTL LPAADLDDFSK(配列番号1)で表されるアミノ酸配列中のエピトープ、又はAADLDDFSKQLQ(配列番号2)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する、< 10 > に記載の免疫測定キット。

< 12 > 前記生体試料が、セリンプロテアーゼ処理されている、< 10 > 又は< 11 > のいずれかに記載の免疫測定キット。

< 13 > 前記生体試料が、呼吸器分泌液である< 10 > ~ < 12 > のいずれかに記載の免疫測定キット。

< 14 > SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質のペプチド断片と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を2種類含み、

前記2種類のモノクローナル抗体又はその抗体断片が、それぞれ、第一モノクローナル抗体又はその抗体断片及び第二モノクローナル抗体又はその抗体断片であり、第一モノクローナル抗体又はその抗体断片は、標識物質と間接的又は直接的に結合しており、第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、固相と間接的又は直接的に結合しており、

第一モノクローナル抗体又はその抗体断片と第二モノクローナル抗体又はその抗体断片は、認識するエピトープが異なる、< 10 > ~ < 13 > のいずれかに記載の免疫測定キット。

< 15 > 前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片が、KQQTVTL LPAADLDDFSK(配列番号1)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片であり、前記第二モノクローナル抗体又はその抗体断片が、AADLDDFSKQLQ(配列番号2)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片である、< 14 > に記載の免疫測定キット。

10

20

30

40

50

< 16 > イムノクロマトグラフィー、又はE L I S A用のキットである、< 10 > ~ < 15 >のいずれかに記載の免疫測定キット。

< 17 > 前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、以下の(1) ~ (4)からなる群から選択される1種又は2種である、< 10 > ~ < 16 >のいずれかに記載の免疫測定キット

(1) 配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

10

(2) 配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(3) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、又は

20

(4) 前記(1) ~ (3)のいずれかの抗体若しくはその抗体断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と、それぞれ、80%以上のアミノ酸配列の同一性を有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体若しくはその抗体断片。

< 18 > S A R S - C o V - 2のヌクレオカプシドタンパク質と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片であって、

前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、セリンプロテアーゼ処理したS A R S - C o V - 2と結合する、モノクローナル抗体又はその抗体断片。

< 19 > K Q Q T V T L L P A A D L D D F S K (配列番号1)で表されるアミノ酸配列中のエピトープ、又はA A D L D D F S K Q L Q (配列番号2)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する、< 18 >に記載のモノクローナル抗体又はその抗体断片。

30

< 20 > 以下の(1) ~ (4)からなる群から選択される、< 18 >又は< 19 >のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(1) 配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(2) 配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

40

(3) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、又は

(4) 前記(1) ~ (3)のいずれかの抗体若しくはその抗体断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と、それぞれ、80%以上のアミノ酸配列の同一性を有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体若しくはその抗体断片。

50

また、本発明は、以下の実施形態も包含する。

(A) 前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片が、LLPAA (配列番号25) で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片であり、前記第二モノクローナル抗体又はその抗体断片が、LDDFSKQLQ (配列番号26) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片である、<5> ~ <9> のいずれかに記載の免疫測定方法。

(B) 前記第一モノクローナル抗体又はその抗体断片が、LLPAA (配列番号25) で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片であり、前記第二モノクローナル抗体又はその抗体断片が、LDDFSKQLQ (配列番号26) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片である、<14> ~ <17> のいずれかに記載の免疫測定キット。

(C) LLPAA (配列番号25) で表されるアミノ酸をエピトープとして認識するか、又はLDDFSKQLQ (配列番号26) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する、<19> に記載のモノクローナル抗体又はその抗体断片。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、高感度で迅速な分析が可能なSARS-CoV-2免疫測定キット及びSARS-CoV-2の免疫測定方法、並びにそれらに使用可能なモノクローナル抗体又はその抗体断片を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】ヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸配列を示す図である。

【図2】抗体のエピトープ解析に用いた合成ペプチドのアミノ酸配列とヌクレオカプシドタンパク質上のアミノ酸配列との対応関係を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

1. SARS-CoV-2の免疫測定方法

(生体試料)

本明細書における「生体試料」としては、主に生体由来の固形組織及び体液を挙げることができる。

生体試料としては、血液、血清、血漿、尿、涙液、耳漏、前立腺液、又は呼吸器分泌液が挙げられる。呼吸器分泌液が好ましい。本明細書において、「呼吸器分泌液」とは、呼吸器の組織内又は表面において分泌される体液を意味する。呼吸器分泌液としては、鼻孔、鼻腔、咽頭、鼻咽頭、口腔などにおいて分泌される体液が挙げられるが、鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液、又は喀痰が特に好ましい。なお、本明細書において「呼吸器」とは、呼吸に関係する器官の総称であり、鼻前庭から、鼻腔、咽頭、喉頭、気管、気管支、細気管支を経た肺胞(肺)までの器官をいう。

生体試料を採取する対象は、ヒト又は動物(例えば、サル、イヌ、又はネコ)を含み、好ましくはヒトである。生体試料は、対象からの生体試料そのものであってもよく、採取した生体試料に通常行われる希釈、濃縮等の処理を行ったものであってもよい。なお、本発明に用いられる生体試料の採取や調製を行う者は、本発明の免疫測定方法を行う者と同一人物でもよく、別人物であってもよい。また、本発明の免疫測定方法に用いられる生体試料は、本発明の免疫測定方法の実施時に採取又は調製されたものでよく、予め採取又は調製され保存されたものであってもよい。

生体試料は、セリンプロテアーゼをコードする遺伝子が発現されている部位から採取された生体試料、例えば、生体試料の表面のぬぐい液などを用いることが好ましい。生体試料を生体から採取してから、生体試料をセリンプロテアーゼで処理してもよい。本明細書において、「生体試料が、セリンプロテアーゼ処理されている」とは、生体試料が、セリンプロテアーゼをコードする遺伝子が発現されている部位から採取された生体試料であること、及び、生体から採取してから、生体試料をセリンプロテアーゼで処理することの両

10

20

30

40

50



方を含むものとする。

【0011】

「セリンプロテアーゼ」は、触媒残基として求核攻撃を行うセリン残基をもつプロテアーゼであり、L アルギニン及びL リジンのカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解する酵素である。

気管上皮等の器官には、TMPRSS2、TMPRSS4、TMPRSS11Dなどのセリンプロテアーゼが発現していることが知られている。本発明では、これらのセリンプロテアーゼによる分解後のヌクレオカプシドタンパク質を検出することができるために、高感度となる可能性が考えられる。

対象の気管上皮等の器官から採取された生体試料には、セリンプロテアーゼにより分解されたSARS-CoV-2が多く存在すると考えられる。セリンプロテアーゼにより、特定の抗体のエピトープも分解される可能性がある。この場合、この特定の抗体は、セリンプロテアーゼにより分解されたSARS-CoV-2への反応性を失う。また、エピトープがそれぞれ異なる2種の抗体を用いてサンドイッチ系を構築する場合には、エピトープそのものが分解されていない場合でも、2つのエピトープの間に存在する部分がセリンプロテアーゼによって切断を受けることにより、検出感度が低下する可能性がある。本発明では、セリンプロテアーゼにより分解されたSARS-CoV-2を検出できるように、高感度になる可能性が考えられる。

本明細書において、「エピトープ」とは、抗体によって認識される抗原（本発明の場合にはSARS-CoV-2）の一部をいう。

【0012】

(SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2は、coronavirus disease 2019 (COVID-19)を引き起こすウイルスである。SARS-CoV-2のウイルス粒子は、スパイクタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、膜タンパク質、及びエンベロープタンパク質として知られる4つのたんぱく質と、RNAにより構成されている。

SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質は、419アミノ酸から成るタンパク質である（配列番号21）。ヌクレオカプシドタンパク質には変異が生じる可能性があり、したがって、ヌクレオカプシドタンパク質には、配列番号21で表されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列で表されるペプチド断片が含まれる。

ヌクレオカプシドタンパク質には、NTD抗原（N末端のRNA結合ドメイン）、CTD抗原（C末端の二量体化ドメイン）、及び中央部に位置するSer/Arg(SR)リッチなリンカー領域が含まれる。

【0013】

NTD抗原領域は、ヌクレオカプシドタンパク質の第47～第174アミノ酸の領域である。

NTD抗原のアミノ酸配列を以下に示す。

NTASWFTALTQHGEDLKFPRGQGVPINTNSSSPDDQIGYY  
RRATRRI RGGDGKMKDLS PRWYFY YLGTGPEAGLPYGANK  
DGI IWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNA AIVLQLPQGTTL  
PKGFYAE（配列番号22）

リンカー領域は、ヌクレオカプシドタンパク質の第175～第247アミノ酸の領域である。

リンカー領域のアミノ酸配列を以下に示す。

GSRGGSQASSRSSRSRNS SRNSTPGSSRGTSPARMAGNG  
GDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGGQQQQGQTVTK（配列番号23）

CTD抗原は、ヌクレオカプシドタンパク質の第248～第364アミノ酸の領域であ

10

20

30

40

50

る。

C T D 抗原のアミノ酸配列を以下に示す。

K S A A E A S K K P R Q K R T A T K A Y N V T Q A F G R R G P E Q T Q G N F G D  
Q E L I R Q G T D Y K H W P Q I A Q F A P S A S A F F G M S R I G M E V T P S G  
T W L T Y T G A I K L D D K D P N F K D Q V I L L N K H I D A Y K T F P (配列番  
号 2 4 )

【 0 0 1 4 】

(モノクローナル抗体)

本明細書において、「モノクローナル抗体」とは、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体又は抗体分子を意味する。本発明の免疫測定方法では、本発明の効果が得られる限りにおいて、該モノクローナル抗体の機能を有する抗体断片も使用することができる。モノクローナル抗体の機能を有する抗体断片としては、例えば、モノクローナル抗体の酵素的消化により得られる該モノクローナル抗体の F a b 部分を含む機能性断片、遺伝子組換えによって作製される該モノクローナル抗体の F a b 部分を含む機能性断片、及びファージディスプレイ法で作製された s c F v を含む機能性断片等が挙げられる。

10

【 0 0 1 5 】

(S A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質のペプチド断片)

本発明の免疫測定方法で用いられるモノクローナル抗体又はその抗体断片は、セリンプロテアーゼで処理した S A R S - C o V - 2 と結合する。以後、セリンプロテアーゼで処理した S A R S - C o V - 2 と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を、本発明のモノクローナル抗体と呼ぶことがある。

20

本発明のモノクローナル抗体の第一の実施形態は、ヌクレオカプシドタンパク質の C 末端側の領域に存在する、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識することができ、好ましくは、L L P A A (配列番号 2 5 ) で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識する。

本発明のモノクローナル抗体の第二の実施形態は、ヌクレオカプシドタンパク質の C 末端側の領域に存在する、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識することができ、好ましくは、L D D F S K Q L Q (配列番号 2 6 ) で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する。

本発明のモノクローナル抗体は、単離されたモノクローナル抗体又はその抗体断片であることができる。

30

【 0 0 1 6 】

本発明のモノクローナル抗体は、好ましくは、セリンプロテアーゼによる分解で生じる S A R S - C o V - 2 のヌクレオカプシドタンパク質のペプチド断片中のエピトープを特異的に認識する。「エピトープを特異的に認識する」とは、モノクローナル抗体又はその抗体断片が、特定のペプチド断片又はエピトープ以外には、実質的に結合しないことを意味する。

本発明のモノクローナル抗体の第一の実施形態は、より好ましくは、N T D 抗原中のアミノ酸配列、リンカー領域中のアミノ酸配列、及び C T D 抗原中のアミノ酸配列を、いずれもエピトープとして認識しない。

40

本発明のモノクローナル抗体の第二の実施形態は、より好ましくは、N T D 抗原中のアミノ酸配列、リンカー領域中のアミノ酸配列、及び C T D 抗原中のアミノ酸配列を、いずれもエピトープとして認識しない。

本発明のモノクローナル抗体とあるアミノ酸配列を有するペプチド断片とが「実質的に結合しない」か否かを確認するために、例えば、S P R 法に基づき、B i a c o r e (登録商標) T 1 0 0 や T 2 0 0 を使用し、本発明のモノクローナル抗体を固定化して測定を行うことができる。上記 S P R 法以外の当業者に周知の方法又は手段によっても「実質的に結合しない」ことを確認できる。

【 0 0 1 7 】

ヌクレオカプシドタンパク質の C 末端側の領域において、配列番号 1 で表されるアミノ

50

酸配列の末端に位置するK（リシン）とQLQQSMSSA（配列番号27）で表されるアミノ酸配列の先頭に位置するQ（グルタミン）の間で、セリンプロテアーゼが、ヌクレオカプシドタンパク質を切断すると考えられる。その結果、配列番号1で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片が生じると考えられる。本発明のモノクローナル抗体は、このペプチド断片と結合できると考えられる。

また、後述のS32217抗体のエピトープ解析の結果を考慮すると、配列番号1で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片の末端よりもさらにC末端側を含むペプチド断片（具体的には、LDDFSKQLQ（配列番号26）から成るアミノ酸配列を含むペプチド断片）も、セリンプロテアーゼにより処理されたサンプルには含まれている可能性がある。

#### 【0018】

本発明のモノクローナル抗体を、例えば、後述の競合法を採用して、一種のみ用いることにより、SARS-CoV-2の免疫測定をすることができる。しかしながら、本発明のモノクローナル抗体を2種類用いて、SARS-CoV-2の免疫測定をすることが好ましい。この場合、2種類のモノクローナル抗体は、異なるエピトープを認識することが好ましい。「異なるエピトープを認識する」とは、エピトープとして認識するアミノ酸配列が重複しないことを意味する。なお、本発明のモノクローナル抗体を「2種類」用いるとは、本発明のモノクローナル抗体を「少なくとも2種類」用いていれば足り、2種類よりも多くの本発明のモノクローナル抗体を用いている実施形態を、本発明の範囲から除外するものではない。

#### 【0019】

本発明のモノクローナル抗体が2種類用いられる場合、2種類のモノクローナル抗体が、好ましくは、KQQTVTL LPAADLDDFSKQLQ（配列番号28）で表されるアミノ酸配列中の異なるエピトープをそれぞれ認識し、より好ましくは、一方のモノクローナル抗体が、配列番号1で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識し、もう一方のモノクローナル抗体が、配列番号2で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識し、さらに好ましくは、一方のモノクローナル抗体が、LLPAA（配列番号25）で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識し、もう一方のモノクローナル抗体が、LDDFSKQLQ（配列番号29）で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する。

#### 【0020】

本発明のモノクローナル抗体は、以下の(1)～(4)からなる群から選択されるいずれか1種又は2種であることが好ましい。

(1) 配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(2) 配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(3) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、又は

(4) 前記(1)～(3)のいずれかの抗体若しくはその抗体断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と、それぞれ、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上のアミノ酸配列の同一性を有する重鎖可変領域及び軽鎖

10

20

30

40

50

可変領域を含む抗体若しくはその抗体断片。

前記のアミノ酸配列の同一性は、重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3、並びに、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3を構成するアミノ酸配列(HCCDR1+HCCDR2+HCCDR3+LCCDR1+LCCDR2+LCCDR3)に対する配列同一性であることが好ましい。

なお、「配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1」とは、CDR1が、配列番号3のアミノ酸配列からなることを意味する。その他のCDR(Complementarity-determining region)についても同様である。

本発明のモノクローナル抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域以外に、定常領域(C領域)を含むことができる。定常領域としては、軽鎖において、CL領域を含むことができ、重鎖において、CH領域(CH1、CH2、及びCH3)を含むことができる。

#### 【0021】

本発明のモノクローナル抗体は、それぞれ、以下の(1)、(2)、及び(4)からなる群から選択されるいずれか1種又は2種であることがより好ましい。

(1) 配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、

(2) 配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体若しくはその抗体断片、又は

(4) 前記(1)~(2)のいずれかの抗体若しくはその抗体断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と、それぞれ、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上のアミノ酸配列の同一性を有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体若しくはその抗体断片。

#### 【0022】

本発明のモノクローナル抗体が2種類用いられる場合、2種類のモノクローナル抗体は、好ましくは、(1)の抗体及び(2)の抗体であることが好ましい。(1)の抗体を標識抗体として用い、(2)の抗体を固相抗体として用いることが最も好ましい。

#### 【0023】

前記抗体(1)としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する抗体、例えばS32213抗体及びS32212抗体が挙げられる。また、前記抗体(1)としては、LLPAA(配列番号25)で表されるアミノ酸配列をエピトープとして認識する抗体、例えばS32213抗体が挙げられる。

前記抗体(2)としては、AADLDDFSKQLQQSMSSA(配列番号30)のアミノ酸配列中のエピトープを認識する抗体、例えばS32217抗体及びS32209抗体が挙げられる。また、前記抗体(2)としては、LDDFSKQLQ(配列番号29)で表されるアミノ酸配列中のエピトープを認識する抗体、例えばS32217抗体が挙げられる。

前記抗体(3)としては、CTD側領域抗原中のエピトープを認識する抗体、例えばS32223抗体が挙げられる。S32223抗体は、S32217抗体と同様の反応性を有すると考えられる。

#### 【0024】

本明細書において、モノクローナル抗体又はその抗体断片が特定の物質又はアミノ酸配列と「反応する」、「認識する」、及び「結合する」は、同義で用いられる。モノクローナル抗体が抗原(化合物)と「反応する」か否かの確認は、抗原固相化ELISA、競合ELISA、又はサンドイッチELISAなどにより行うことができる。その他、表面プ

10

20

30

40

50

ラズモン共鳴 ( surface plasmon resonance ) の原理を利用した方法 ( SPR法 ) などにより行うことができる。SPR法は、Biacore ( 登録商標 ) の名称で市販されている、装置、センサー、又は試薬類を使用して行うことができる。

【 0 0 2 5 】

例えば、後述する実施例 1 のエピトープ解析 ( 抗体のエピトープ解析 1 ) と同様の操作をした場合に、最も吸光度が高くなったペプチド断片に含まれるアミノ酸配列をエピトープとして認識したと評価することができる。

【 0 0 2 6 】

( モノクローナル抗体の調製方法 )

本発明のモノクローナル抗体は、抗原 ( 免疫原 ) として、全長のヌクレオカプシドタンパク質をリン酸緩衝生理食塩水などの溶媒に溶解し、この溶液を非ヒト動物に投与して免疫することにより調製できる。必要に応じて前記溶液に適宜のアジュバントを添加した後、エマルジョンを用いて免疫を行ってもよい。アジュバントとしては、油中水型乳剤、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲルなどの汎用されるアジュバントのほか、生体成分由来のタンパク質又はペプチド性物質などを用いてもよい。例えば、フロイントの不完全アジュバント又はフロイントの完全アジュバントなどを好適に用いることができる。アジュバントの投与経路、投与量、投与時期は特に限定されないが、抗原を免疫する動物において所望の免疫応答を増強できるように適宜選択することが望ましい。

【 0 0 2 7 】

免疫に用いる動物の種類も特に限定されないが、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、アルパカ、マウス、又はラットが好ましく、より好ましくはマウス又はラットを用いることができる。動物の免疫は、一般的な手法に従って行えばよく、例えば、抗原の溶液、好ましくはアジュバントとの混合物を動物の皮下、皮内、静脈、又は腹腔内に注射することにより行うことができる。免疫応答は、一般的に免疫される動物の種類及び系統によって異なるので、免疫スケジュールは使用される動物に応じて適宜設定することが望ましい。抗原投与は最初の免疫後に何回か繰り返し行うことが好ましい。

【 0 0 2 8 】

本発明のモノクローナル抗体を得るために、引き続き以下の操作が行われることができるが、これらに限定されることはない。モノクローナル抗体それ自体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されているので当業者は前記の抗原を用いることによって本発明のモノクローナル抗体を調製することが可能である ( 例えば Antibodies, A Laboratory Manual ( Cold Spring Harbor Laboratory Press, ( 1988 ) 第 6 章などを参照のこと ) ) 。

【 0 0 2 9 】

最終免疫後、免疫した動物から抗体産生細胞である脾臓細胞あるいはリンパ節細胞を摘出し、高い増殖能を有する骨髓腫由来の細胞株と細胞融合することによりハイブリドーマを作製することができる。細胞融合には抗体産生能 ( 質・量 ) が高い細胞を用いることが好ましく、また骨髓腫由来の細胞株は融合する抗体産生細胞の由来する動物と適合性があることがより好ましい。細胞融合は、当該分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、ポリエチレングリコール法、センダイウイルスを用いた方法、又は電流を利用する方法などを採用することができる。得られたハイブリドーマは、当業界で汎用の条件に従って増殖させることができる。産生される抗体の性質を確認しつつ、所望のハイブリドーマを選択することができる。ハイブリドーマのクローニングは、例えば限界希釈法や軟寒天法などの周知の方法により行うことが可能である。

【 0 0 3 0 】

クローニング工程後、産生されるモノクローナル抗体と全長のヌクレオカプシドタンパク質との結合能を E L I S A、R I A 法、又は蛍光抗体法などの方法を用いてアッセイすることができる。これらの操作により、選択されたハイブリドーマが所望の性質を有する

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体を産生するか否かを確認することができる。

前記のようにして選別されたハイブリドーマを大量培養することにより、所望の特性を有するモノクローナル抗体を製造することができる。大量培養の方法は特に限定されないが、例えば、ハイブリドーマを適宜の培地中で培養してモノクローナル抗体を培地中に産生させる方法、及び哺乳動物の腹腔内にハイブリドーマを注射して増殖させ、腹水中にモノクローナル抗体を産生させる方法などを挙げることができる。

#### 【0031】

本発明のモノクローナル抗体としては、抗体分子全体のほかに抗原抗体反応活性を有するモノクローナル抗体の抗体断片を使用することも可能である。前記のように動物への免疫工程を経て得られたもののほか、遺伝子組み換え技術を使用して得られるモノクローナル抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等を用いることも可能である。モノクローナル抗体の断片としては例えば、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $scFv$ などが挙げられる。これらのフラグメントは前記のようにして得られるモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素（例えば、ペプシンやパパインなど）で処理すること、あるいは該抗体のDNAをクローニングして大腸菌や酵母を用いた培養系で発現させることにより調製できる。

10

#### 【0032】

SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質のペプチド断片と結合するモノクローナル抗体を2種類用いることにより、本発明の免疫測定方法においてサンドイッチ系を構築することもできる。サンドイッチ系とは、被検出物質を、異なるエピトープを認識する2種類の抗体で挟みこむことにより、高い特異性及び感度を得る方法である。

20

#### 【0033】

サンドイッチ系を構築する場合、2種類のモノクローナル抗体のうち少なくとも1つは、固相抗体であり、少なくとも1つは、標識抗体であることが好ましい。本明細書において、固相抗体とは、固相上に直接的又は間接的に固相化されたモノクローナル抗体を意味する。本明細書において、標識抗体とは、標識物質由来のシグナル測定時に、後述する当業者に周知慣用の標識物質で直接的又は間接的に標識されているモノクローナル抗体を意味する。

#### 【0034】

例えば、固相にモノクローナル抗体を物理的に吸着させる、又は化学的に結合（適当なスパーサーを介してよい）させることにより固相抗体を製造することができる。固相としては、ポリスチレン樹脂などの高分子基材、ガラスなどの無機基材、又はセルロースやアガロースなどの多糖類基材などからなる固相を用いることができる。固相の形状は特に限定されず、板状（例えば、マイクロプレートやメンブレン）、ビーズ若しくは粒子状（例えば、ラテックス粒子、磁性粒子）、又は筒状（例えば、試験管）など任意の形状を選択できる。

30

#### 【0035】

本発明の免疫測定方法に使用されるモノクローナル抗体と直接的に結合可能な標識抗体（二次抗体）を用いることにより、SARS-CoV-2又はそのペプチド断片に結合した抗体の量を測定することもできる。本明細書では、本発明のモノクローナル抗体に結合し、且つ標識物質を結合させた抗体を二次抗体と称する。この二次抗体を用いて、標識物質を本発明のモノクローナル抗体に間接的に結合させてもよい。

40

#### 【0036】

標識物質が発するシグナルの強さを測定して、生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片の量を測定することができる。標識抗体を調製するための標識物質としては、例えば金属錯体、酵素、不溶性粒子、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、放射性同位体、金コロイド粒子、又は着色ラテックスが挙げられる。標識物質とモノクローナル抗体との結合法としては、当業者に利用可能な物理吸着、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、又は過ヨウ素酸法を用いることができる。ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）又はアルカリホスファターゼ（ALP）などの酵素を標識物質として用いる場合には、その酵素の特異的基質を用いて酵素活性

50

を測定することができる。例えば、酵素がHRPの場合には、O-フェニレンジアミン(OPD)又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を用いることができ、ALPの場合にはp-ニトロフェニル・ホスフェートを用いて酵素活性を測定することができる。ビオチンを標識物質として用いる場合には、モノクローナル抗体をビオチンで標識し、酵素、色素、又は蛍光標識(好ましくはHRP)で標識したアビジン又はストレプトアビジンを反応させることもできる。本発明の免疫測定方法においては、標識物質として金コロイド粒子を使用することが好ましい。

【0037】

本明細書において、抗原や抗体を固相に物理的あるいは化学的に担持させることあるいは担持させた状態を「固定化」又は「固相化」と表現することがある。また、「分析」、「検出」、又は「測定」という用語は、SARS-CoV-2又はそのペプチド断片の存在の証明及びSARS-CoV-2又はそのペプチド断片の定量を含む。

10

【0038】

本発明の免疫測定方法としては、以下のような工程(1)~(4)を含む、競合法である競合ELISAを挙げることができる。競合ELISAを用いた場合、本発明のモノクローナル抗体を一種類用いて、免疫測定方法を行うことができる。

- (1) マイクロプレート等の固相にSARS-CoV-2又はそのペプチド断片を固定する
- (2) 分析する生体試料をマイクロプレートに添加する
- (3) 酵素で標識した本発明のモノクローナル抗体をマイクロプレートに添加する
- (4) 前記酵素の基質を添加して、酵素反応に由来するシグナルを測定する。

20

生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片と固相に固定したSARS-CoV-2又はそのペプチド断片との間で競合が生じると、シグナルの強度が低下する。また、抗体をビオチンで標識することもできる。このビオチンにHRPなどで標識したストレプトアビジンを結合させることができる。そして、基質としてOPDを添加することにより生じる発色シグナルを測定することができる。

【0039】

本発明の免疫測定方法では、異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を用いることが好ましい。なお、便宜上、一方のモノクローナル抗体を第一モノクローナル抗体と称し、他方のモノクローナル抗体を第二モノクローナル抗体と称することがある。

第一モノクローナル抗体が標識抗体であり、第二モノクローナル抗体が固相抗体である場合、本発明の免疫測定方法では、以下の工程(1)~(3)を含むことができる。

30

- (1) 生体試料と標識物質に結合している第一モノクローナル抗体とを接触させ、第一複合体(SARS-CoV-2又はそのペプチド断片、標識物質、及び第一モノクローナル抗体を含む)を形成する工程と、
- (2) 前記第一複合体と、第二モノクローナル抗体とを接触させ、第二複合体(SARS-CoV-2又はそのペプチド断片、標識物質、第一モノクローナル抗体、及び第二モノクローナル抗体を含む)を形成する工程と、
- (3) 標識物質に由来するシグナルを測定する工程。

第二複合体には、標識物質が含まれている。シグナルの測定は、標識物質に応じて、当業者に周知の測定方法を採用することができる。シグナルの測定は、測定機器を用いてもよく、目視により行ってもよい。

40

【0040】

前記1種類又は2種類のモノクローナル抗体を用いる場合において、本発明の免疫測定方法では、必要に応じて、生体試料を前処理する工程、及び/又は、得られたシグナルの強さを第一閾値と比較する工程を含んでもよい。前処理としては、生体試料のろ過、及び検体希釈液による生体試料の希釈などが挙げられる。第一閾値は、感度及び生体試料等の種類を考慮して、適宜設定することができる。

第一閾値は範囲であってもよい。「第一閾値が範囲である」とは、示される範囲の間に、具体的な閾値が存在し、測定値がその具体的な閾値より大きいか又は小さいか判定することにより疾患の有無を判断することを意味する。

50

第一閾値は、例えば、 $1.1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mLであることができる。

第一閾値が範囲である場合、第一閾値は、 $1.1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL ~  $2.0 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mLの間、 $1.1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL ~  $1.8 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mLの間、又は $1.1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL ~  $1.5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mLの間に存在することができる。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第一閾値より低い(高い)場合は、SARS-CoV-2に感染していると判定する工程を含むことができ、又はシグナルの強さが第一閾値より高い(低い)場合は、SARS-CoV-2に感染していないと判定する工程を含むことができる。

#### 【0041】

本発明の免疫測定方法は、シグナルの測定値に基づいて、SARS-CoV-2に感染している対象における、特定の医薬の治療効果を判定することができる。この場合、本発明の免疫測定方法は、上記工程に加えて、以下の工程をさらに含むことができる。

対象に、特定の医薬を投与する工程、及び/又はシグナルの強さを第二閾値と比較する工程、

この場合、第二閾値は、感度及び生体試料の種類等を考慮して、適宜設定することができるが、対象に特定の医薬を投与する前の前記対象におけるSARS-CoV-2又はそのペプチド断片の測定値であってもよい。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第二閾値より低い(高い)場合は、特定の医薬が治療効果があると判定する工程、又はシグナルの強さが第二閾値より高い(低い)場合は、特定の医薬が治療効果がないと判定する工程、を含むことができる。

前記の治療効果の判定では、数日毎に測定を行い、治療効果をモニタリングしてもよい。

#### 【0042】

(免疫測定方法)

「免疫測定方法」とは抗原と抗体の反応を利用して、生体試料の中に含まれる物質のレベルを測定する方法である。「レベル」とは、物質の量、濃度、又は存在若しくは不存在の確認等を含む。

本発明の免疫測定方法としては、電気化学発光免疫測定法(ELISA法)、酵素免疫測定法(ELISA)、ラテックス免疫比濁法(LTIA法)、化学発光免疫測定法、イムノクロマトグラフィー、及び蛍光抗体法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の免疫測定方法は、好ましくは、ELISA、又はイムノクロマトグラフィーであり、より好ましくはイムノクロマトグラフィーである。

#### 【0043】

本発明の免疫測定方法は、インビボ又はインビトロの免疫測定方法であることができる。また、感度を増強するために、増感剤を使用することもできる。

本発明の免疫測定方法は、生体試料に、 $1.1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL以上に相当する量で含まれる、SARS-CoV-2又はそのペプチド断片を分析することができる。

本発明の免疫測定方法において、本発明のモノクローナル抗体と生体試料を測定系に添加する順序は、本発明の効果が得られる限りにおいて、限定されることはない。すなわち、本発明のモノクローナル抗体を、生体試料の添加前に、生体試料の添加と同時に、又は生体試料の添加の後に、測定系に添加することができる。

以下、採用する免疫測定方法毎に、測定の手順及び原理を説明する。下記は本発明の一実施形態における測定の手順及び原理を単に例示するものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

本発明の免疫測定方法では、標識抗体として本発明のモノクローナル抗体の第一の実施形態を使用し、固相抗体として、本発明のモノクローナル抗体の第二の実施形態を使用することが好ましい。

#### 【0044】

下記の免疫測定方法の各々において、モノクローナル抗体の固相への固定化の方法、モノクローナル抗体と標識物質との結合方法、標識物質の種類等の具体的な方法は、前述の

10

20

30

40

50



ものを含め、当業者に周知の方法を制限なく使用することができる。

【0045】

(イムノクロマトグラフィー)

イムノクロマトグラフィーとは、被検出物質に結合した標識抗体、又は標識抗体がメンブレン上を流れる性質を利用した免疫測定方法である。イムノクロマトグラフィーにおける被検出物質を測定する一般的な原理は以下のとおりである。

被検出物質である抗原に対する抗体を、クロマトグラフ媒体である不溶性メンブレン担体上に固定化して、固定相である検出部を作製する。そして、コンジュゲート(上記被検出物質と結合可能な抗体によって感作された標識物質)を移動相として用いる。被検出物質と移動相であるコンジュゲートとを特異的に反応させ、さらに固定相である検出部において、コンジュゲートと結合した被検出物質を、検出部に固定化された抗体に特異的に反応させる。

10

本発明の免疫測定方法として、イムノクロマトグラフィーを採用する場合の測定手順及び原理は、以下のとおりである。

(1) 生体試料を供給するためのサンプル供給部と生体試料とを接触させる。

(2) 生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片とコンジュゲートとが接触し、第一複合体(SARS-CoV-2又はそのペプチド断片、標識物質、及び第一モノクローナル抗体を含む)が形成される。コンジュゲートは、標識物質に第一モノクローナル抗体が結合したものである。

(3) 前記第一複合体と、検出部に固定化された第二モノクローナル抗体とが接触し、第二複合体(SARS-CoV-2又はそのペプチド断片、標識物質、第一モノクローナル抗体、及び第二モノクローナル抗体を含む)が形成される。

20

(4) コンジュゲートに含まれる標識物質に由来するシグナルの強度を測定することにより、前記第二複合体の形成を確認する。

標識物質としては、金コロイド粒子、白金コロイド粒子、カラーラテックス粒子、及び磁性粒子などを挙げることができる。金コロイド粒子が好ましい。これらの標識物質の種類及び粒径は、当業者であれば、所望の感度に応じて適宜調整することができる。

【0046】

(ELISA)

免疫測定方法の中で、酵素標識を用いるELISAも、簡便且つ迅速に標的を測定することができる。本明細書においてELISAとは、試料中に含まれる被検出物質である抗原又は抗体を、前記被検出物質に対する抗体又は抗原を利用して捕捉した後に、酵素反応を利用して検出する方法を意味する。固相はプレート(イムノプレート)が好ましい。標識としては、HRP又はALPを使用することができる。本発明の免疫測定方法として、サンドイッチELISAを使用する場合の測定手順及び原理は、以下のとおりである。

30

(1) 固相抗体を固定化した固相に生体試料を添加して反応させると、生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片が固相抗体と結合し、固相上で固相抗体とSARS-CoV-2又はそのペプチド断片との複合体を形成する。

(2) 標識した別のエピトープを認識する標識抗体を固相に添加して反応させると、標識抗体は前記捕捉されたSARS-CoV-2又はそのペプチド断片に結合して前述の固相抗体-SARS-CoV-2又はそのペプチド断片複合体とサンドイッチを形成する。

40

(3) 洗浄後、酵素の基質と反応させて発色させ、吸光度を測定する。

測定した標識物質の量に応じて、生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片の量を測定することができる。

【0047】

サンドイッチELISA法において、二次抗体を用いることもできる。二次抗体を用いることにより、反応が増幅され、検出感度を高めることができる。二次抗体は、下記の場合には、一次抗体(第二モノクローナル抗体)を特異的に認識する抗体である。二次抗体を用いる場合、以下の手順(1)~(5)を採用することができる。

50

(1) 第一モノクローナル抗体を固定化した固相に適宜処理し希釈した生体試料を添加した後インキュベートし、生体試料を除去して洗浄する。

(2) 一次抗体(第二モノクローナル抗体)を添加してインキュベート及び洗浄を行う。

(3) さらに酵素標識した二次抗体を添加してインキュベートを行う。

(4) 基質を加えて発色させる。

(5) プレートリーダー等を用いて発色を測定することによりSARS-CoV-2又はそのペプチド断片の量を測定する。

#### 【0048】

(電気化学発光免疫測定法)

電気化学発光免疫測定法とは、通電により標識物質を発光させ、その発光量を検出することで被検出物質の量を測定する方法を意味する。電気化学発光免疫測定法では、標識物質として、ルテニウム錯体を用いることができる。固相(マイクロプレート等)に電極を設置してこの電極上でラジカルを発生させることによりルテニウム錯体を励起状態にして発光させる。そして、このルテニウム錯体の発光量を検出することができる。

固相として磁性粒子、そして標識物質としてルテニウム錯体を用いた際の測定手順及び原理は、以下のとおりである。

(1) 固相抗体を固定化した磁性粒子と生体試料とを接触させると、生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片が固相抗体と結合する。

(2) 磁性粒子を洗浄後に標識抗体を接触させると、磁性粒子に結合したSARS-CoV-2又はそのペプチド断片に標識抗体が結合する。

(3) 磁性粒子を洗浄後、通電するとSARS-CoV-2又はそのペプチド断片に結合した標識抗体の量に応じて発光する。この発光量を計測することにより、生体試料中の被検出物質の量を正確に測定することができる。

#### 【0049】

(ラテックス免疫比濁法)

ラテックス免疫比濁法とは、ラテックス表面に結合させた抗体と被検出物質(抗原)との凝集を利用した免疫測定方法である。ラテックス粒子としては、体外診断薬に一般的に用いられているラテックス粒子であれば特に制限されない。凝集反応測定時のラテックス粒子の濃度、ラテックス粒子の平均粒径等は、感度又は性能に応じて適宜設定することができる。本発明の免疫測定方法として、ラテックス免疫比濁法を使用する場合の測定手順及び原理は、以下のとおりである。

(1) ラテックス粒子に第一モノクローナル抗体及び第二モノクローナル抗体を結合させて生体試料と接触させる。

(2) 生体試料中のSARS-CoV-2又はそのペプチド断片が第一モノクローナル抗体及び第二モノクローナル抗体と結合し、抗体結合ラテックス粒子が凝集する。

(3) 生体試料に近赤外光を照射して、吸光度の測定又は散乱光の測定を行う。測定値に基づき、抗原の濃度を求めることができる。

本発明の免疫測定方法として、ラテックス免疫比濁法を使用する場合、ラテックスは固相であり、且つ標識物質として作用する。すなわち、第一モノクローナル抗体及び第二モノクローナル抗体のいずれもが、固相及び標識物質の各々と結合している。

#### 【0050】

2. 生体試料中のSARS-CoV-2の免疫測定キット

本発明の生体試料中のSARS-CoV-2の免疫測定キット(以下、単に本発明の免疫測定キットと称することがある)は、本発明のモノクローナル抗体を含む。

本発明の免疫測定キットは、本発明のモノクローナル抗体を一種含む、競合法、好ましくは競合ELISAのための免疫測定キットであることができる。

本発明の免疫測定キットでは、SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質のペプチド断片と結合するモノクローナル抗体を2種類用いて、SARS-CoV-2を分析することが好ましい。この場合、2種類のモノクローナル抗体は、異なるエピトープを認識することが好ましい。2種類のモノクローナル抗体は、別々の容器に入れられていて

10

20

30

40

50

もよい。

【0051】

本発明の免疫測定キットとしては、イムノクロマトグラフィー、E L I S A、電気化学発光免疫測定法、ラテックス免疫比濁法、化学発光免疫測定法、及び蛍光抗体法を実施するための免疫測定キットが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の免疫測定キットは、好ましくは、E L I S A、又はイムノクロマトグラフィーを実施するための免疫測定キットであり、より好ましくは、イムノクロマトグラフィーを実施するための免疫測定キットである。

本発明の免疫測定キットは、インビボ又はインビトロのサンプルを分析するための免疫測定キットであることができる。

10

【0052】

本発明の免疫測定キットには、ほかに、標準抗原物質、精度管理用抗原試料といった、他の検査試薬、検体希釈液、及びノ又は使用説明書などを含むこともできる。抗体を含む試薬等の濃度は、当業者であれば適宜調整可能である。

【0053】

以下、採用される免疫測定方法ごとに、キットに含まれる試薬を説明する。本発明の免疫測定キットでは、標識抗体として本発明のモノクローナル抗体の第一の実施形態を使用し、固相抗体として、本発明のモノクローナル抗体の第二の実施形態を使用することが好ましい。

【0054】

20

イムノクロマトグラフィーを使用する場合、本発明の免疫測定キットは、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを適当な容器（ハウジング）に格納・搭載した形態であることができる。イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、サンプル供給部を有するサンプルパッド、クロマトグラフ媒体である不溶性メンブレン担体、及び上記不溶性メンブレン担体の下流側端部に配置された吸収パッドから構成されることができる。不溶性メンブレン担体上に、第一モノクローナル抗体を固定化した検出部を配置し、サンプルパッドと不溶性メンブレン担体との間に、コンジュゲートを配置したコンジュゲートパッドを配置することができる。コンジュゲートは、サンプルパッド又は不溶性メンブレン担体上に、含有させてもよい。その他、イムノクロマトグラフィーの構成としては、例えば国際公開第2018/012517又は国際公開第2016/031892の記載のものを適宜採用することができる。

30

標識物質としては、金コロイド粒子、白金コロイド粒子、カラーラテックス粒子、及び磁性粒子などを挙げることができる。金コロイド粒子が好ましい。これらの標識物質の種類及び粒径は、当業者であれば、適宜調整することができる。

【0055】

サンドイッチE L I S Aを使用する場合、本発明の免疫測定キットは、以下（A）及び（B）を含むことができる。

（A）第二モノクローナル抗体と酵素（H R P又はA L P等）との結合体を含む標識試薬

（B）第一モノクローナル抗体を固定化した固相。

このようなキットでは、まず、第一モノクローナル抗体を固定化した固相に生体試料を添加した後インキュベートし、生体試料を除去して洗浄する。次に、標識試薬を添加した後インキュベートし、基質を加えて発色させる。プレートリーダー等を用いて発色を測定することにより、S A R S - C o V - 2又はそのペプチド断片を分析することができる。

40

【0056】

競合E L I S Aの場合は、本発明の免疫測定キットは、以下（A）及び（B）を含むことができる。

（A）S A R S - C o V - 2又はそのペプチド断片を固定した固相

（B）酵素で標識した本発明のモノクローナル抗体

固相とS A R S - C o V - 2又はそのペプチド断片とは、免疫測定キットにおいて、別々に含まれていてもよい。この場合、分析を行う者が、S A R S - C o V - 2又はそのペ

50

プチド断片を含むペプチド断片を固相に固定化する。

ビオチンを用いることもできる。ビオチンはHRPなどで標識したストレプトアビジンに結合していてもよい。基質として、OPDをさらに含んでもよい。

【0057】

電気化学発光免疫測定法を使用する場合、本発明の免疫測定キットは、以下(A)及び(B)を含むことができる。

(A)第二モノクローナル抗体と電気化学発光物質(例えば、ルテニウム錯体等)とのコンジュゲートを含む標識試薬、及び

(B)SARS-CoV-2又はそのペプチド断片に結合する第一モノクローナル抗体を固定化した固相。

10

例えば、固相として磁性粒子を用いたキットでは、SARS-CoV-2又はそのペプチド断片に結合する第一モノクローナル抗体を固定化した磁性粒子に、生体試料を添加して反応させた後、生体試料を除去して洗浄する。そして、コンジュゲートを添加して反応させる。磁性粒子を洗浄後、電気エネルギーを加えて発光させる。そして、標識物質の発光量を測定することにより、SARS-CoV-2又はそのペプチド断片を分析することができる。

【0058】

ラテックス免疫比濁法を使用する場合、本発明の免疫測定キットは、以下の(1)及び(2)を含むことができる。

(1)第一モノクローナル抗体を結合させたラテックス粒子、及び

20

(2)第二モノクローナル抗体を結合させたラテックス粒子。

本発明の免疫測定キットとして、ラテックス免疫比濁法用のキットを使用する場合、ラテックスは固相であり、且つ標識物質である。したがって、第一モノクローナル抗体及び第二モノクローナル抗体のいずれもが、固相及び標識物質の各々と結合している。

【0059】

以上、発明の態様(aspect)に分けて説明をしているが、それぞれの態様に記載の事項、語句の定義、及び実施形態は、他の態様においても適用可能である。

次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に説明のない限り、%は質量%を意味する。

【実施例】

30

【0060】

調製例1 モノクローナル抗体の調製

SARS-CoV-2(COVID-19)Nucleocapsid protein, His-tag 1-419 aa(以下、Nu抗原、acrobiosystems社製、NUN-C5227)を免疫原とした。Nu抗原を、初回免疫はFreund's Complete Adjuvant(Difco Laboratories)、2回目免疫以降はFreund's Incomplete Adjuvant(Difco Laboratories)と1:1で混合して用いた。Balb/cに対し、初回免疫は20µg、2回目免疫以降10µg(PBSで希釈)の免疫原量を用い、隔週で皮下免疫を継続した。3回免疫実施後に抗原固相化ELISAにより血中抗体力価を評価した。十分な力価上昇の確認できた個体については、解剖の1~3日前にPBSで希釈した免疫原を腹腔免疫した。その後、脾臓細胞、腸骨リンパ節細胞及び鼠頸部リンパ節細胞を回収し、電気融合法によりミエロマ細胞SP2/0と融合した。融合細胞は96wellプレートで培養し、融合から7又は8日後に培養上清を回収した。その後、後述する抗原固相化ELISAによるスクリーニングを実施し、Nu抗原に反応性を示し、かつNHIS-cBSAに反応性を示さない株を選択した。なお、スクリーニング前日に培地交換を行った。

40

【0061】

調製例2 抗Nu抗原抗体のスクリーニング(抗原固相化ELISA)

ELISA用96穴プレート(NUNC442404)にNu抗原及びNHIS-cB

50

SA (His - tag 抗原をBSAにconjugateしたもの(自社調製品)、100 ng/mL in PBS)を分注し(50 μL/well)、室温で2時間静置した。PBSTで3回洗浄後(400 μL/well)、ブロッキング液(1%BSA - PBST)を分注し(100 μL/well)、室温で1時間あるいは4で終夜静置した。ブロッキング液を除去後、細胞培養上清(2倍希釈)、抗血清(1000及び10000倍希釈)を分注し(50 μL/well)、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、Goat anti - Mouse IgG (H+L) PAb - HRP (Southern Biotech社製, 1031 - 05、9500倍希釈)を分注し(50 μL/well)、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、OPD発色液を分注し(50 μL/well)、室温で10分間静置した。停止液を分注し(50 μL/well)、反応停止後、プレートリーダーで測定した(Abs. 492 nm)。Nu抗原に反応性を示し、かつNHis - cBSAに反応性を示さない抗体を選抜した。選抜した抗体を、反応性等を基に、Group A(3種)、Group B(15種)、Group C1(8種)、Group C2(3種)、Group C3(3種)、Group C4(1種)、及びGroup D(1種)に分類した。

10

【0062】

分析例1 サンドイッチELISAによる抗体分類

獲得した抗体群から2種を選択してサンドイッチELISAを実施した場合にNu抗原を検出できるかを、下記手順により確認した。

ELISA用96穴プレート(NUNC442404)に1種の抗体を分注し、室温で2時間静置した。PBSTで3回洗浄後、ブロッキング液(1%BSA - PBST)を分注し(100 μL/well)、4で終夜静置した。ブロッキング液を除去後、Nu抗原を分注し室温で30分静置した。PBSTで3回洗浄後、ビオチン標識したもう1種の抗体を添加し、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、5000倍希釈したストレプトアビジン - HRPを50 μL/wellで分注し、室温で30分間静置した。PBSTで3回洗浄後、OPD発色液を分注し、室温で10分間静置した。反応停止液を分注し、プレートリーダーで吸光度を測定した(波長492 nm)。

20

サンドイッチELISAによりNu抗原を検出できなかった場合に、その2種の抗体の抗原認識部位が近いと判断し、その2種を同一の群に分類した。各群の抗体ペアによるサンドイッチ可否は下記の表1の通りである。

30

【0063】

【表1】

		固相抗体						
		Group A	Group B	Group C1	Group C2	Group C3	Group C4	Group D
液相抗体	Group A	-	+	+	+	+	+	+
	Group B	+	-	+	+	+	+	+
	Group C1	+	+	-	-	+	-	+
	Group C2	-	+	-	-	+	+	+
	Group C3	+	+	+	+	-	-	+
	Group C4	-	+	-	+	-	-	+
	Group D	+	-	-	-	-	+	-

40

+ : サンドイッチ可、- : サンドイッチ不可

【0064】

分析例2 イムノクロマトグラフィーによる抗体分類

イムノクロマトグラフィー用テストストリップを下記手順で作製した。

1) 金コロイド標識抗体液の調製

1 OD/mLの金コロイド溶液20 mLに、25 μg/mLの抗SARS - CoV - 2を含

50

むりん酸バッファー 1 mL を添加し、室温で 10 分間攪拌した。続いて金コロイド溶液に 10% BSA 溶液 2 mL を添加し、室温で 5 分間攪拌した。得られた溶液を、10、10、000 rpm で 45 分間遠心し上清を除去した。残渣を、Conjugate Dilution Buffer (Scripps 社) で懸濁し、金コロイド標識抗体液を得た。

## 2) コンジュゲートパッドの作製

1) で調製した金コロイド標識抗体液を、1.33% カゼイン、4% スクロース溶液 (pH 7.5) で 4 OD/mL に希釈しコンジュゲート液を調製した。コンジュゲート液をガラスファイバーパッドにライン状に塗布し、乾燥させてコンジュゲートパッドを得た。

## 3) 抗体固相化メンブレンの作製

0.75 mg/mL の抗 SARS-CoV-2 抗体及び 2.5% スクロースを含む PBS を調製し、テストライン塗布液とした。1.0 mg/mL ヤギ抗マウス IgG モノクローナル抗体及び 2.5% スクロースを含む PBS を調製し、コントロールライン塗布液とした。イムノクロマト法用ディスペンサー「XYZ3050」(BIO DOT 社製) を用い、ニトロセルロースメンブレン上に、テストライン塗布液及びコントロールライン塗布液をそれぞれ 1.0 µL/cm で塗布し、乾燥させることで、抗体固相化メンブレンを得た。

## 4) テストデバイスの作製

プラスチック製粘着シートに抗体固相化メンブレン、コンジュゲートパッド、吸収パッドを貼付し、5 mm 幅に裁断することで、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを得た。

## 試験方法

### 1) 試料

SARS-CoV-2 (Isolate: USA-WA1/2020) Culture Fluid (Heat Inactivated) (ZeptoMatrix 社) を Universal Transport Medium (BD 社) で  $5.0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL に希釈した。ラピッドテスト FLU・NEXT 用検体希釈液 (積水メディカル 社) でさらに 11 倍希釈し試料とした。

### 2) 試験手順

試料 120 µL をテストストリップに滴下し、10 分後に、抗体固相化メンブレン上のテストラインが発色しているかを目視で判定した。

各種抗体組合せで作製したテストストリップを用いた SARS-CoV-2 不活化抗原の検出試験結果が下記の表 2 の通りである。ELISA でサンドイッチ可能であった一部の抗体群ペアにおいて、イムノクロマトグラフィーで SARS-CoV-2 不活化抗原を検出可能であることがわかった。

【0065】

【表 2】

		固相抗体						
		Group A	Group B	Group C1	Group C2	Group C3	Group C4	Group D
標識抗体	Group A	-	-	-	-	-	-	-
	Group B	-	-	-	-	-	-	-
	Group C1	-	-	-	-	+	-	-
	Group C2	-	+	-	-	++	++	-
	Group C3	-	-	-	+	-	-	-
	Group C4	-	-	-	+	-	-	-
	Group D	-	-	-	-	-	+	-

++ : サンドイッチ可かつ高感度、+ : サンドイッチ可、- : サンドイッチ不可

10

20

30

40

50

## 【0066】

実施例1 抗体のエピトープ解析1 各抗体群から1種の抗体をそれぞれ選択し、それらの抗体がNu抗原のN末端側とC末端側のいずれに反応するのかを確認した。

5 µg/mLに調整した抗His-tag抗体を50 µL/wellで96穴ELISA用マイクロプレートに分注し、4で一晚静置した。PBSTで3回洗浄後、1%BSAを含むPBST(ブロッキング液)を100 µL/wellで分注し、4で一晚静置した。ブロッキング液を除去後、100 ng/mLに調製したNu抗原、SARS-CoV-2(COVID-19)NP NTD domain V2 Recombinant Protein His-tag, 44-180 aa(以下、NTD側領域抗原、ProSci, 92-749)、又はRecombinant nucleoprotein (C-term) antigen for COVID-19(NP-CTD), His-tag 212-417 aa(以下、CTD側領域抗原、rekombiotech, RAG0071)を50 µL/mLで分注し、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、1 µg/mLに調整したビオチン標識した各抗体を50 µL/wellで分注し、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、5000倍希釈したストレプトアビジン-HRPを50 µL/wellで分注し、室温で30分間静置した。PBSTで3回洗浄後、OPD発色液を分注し、室温で10分間静置した。反応停止液を分注し、プレートリーダーで吸光度を測定した(波長492 nm)。結果を以下の表3に示す。

10

## 【0067】

## 【表3】

20

Group	抗体	Nu抗原	NTD側領域抗原	CTD側領域抗原
A	S32201	0.680	4.177	0.012
B	S32202	0.585	0.019	4.236
C1	S32212	1.949	0.006	4.281
C2	S32213	0.679	0.006	4.209
C3	S32217	1.935	0.003	4.379
C4	S32209	0.609	0.003	4.298
D	S32205	0.357	4.177	0.014

30

## 【0068】

Group A及びDに属する抗体は、NTD側領域抗原に反応し、Nu抗原のN末端側を認識していた。Group B及びCに属する抗体は、CTD側領域抗原に反応し、Nu抗原のC末端側を認識していた。表1及び2のいずれにおいてもサンドイッチが可能であった組合せはGroup BとCの組合せ、及びGroup C同士の組合せであったため、Nu抗原のC末端側を認識する抗体2種を用いた場合に、Nu抗原を高感度で検出可能であると考えられた。

40

## 【0069】

## 実施例2 抗体のエピトープ解析2

Nu抗原のC末端側に反応する抗体について、より詳細にエピトープを解析するために、抗原固相ELISAを実施した。

Nu抗原の特定のアミノ酸配列に対応する合成ペプチド(10 µg/mL)(図2参照)を96穴ELISA用マイクロプレートにそれぞれ分注し(50 µL/well)、室温で2時間又は4一晚静置した。PBSTで3回洗浄後、ブロッキング液(1%BSA-PBST)を分注し(100 µL/well)、室温で1時間又は4一晚静置した。ブロッキング液を除去後、ビオチン標識したS32202、S32213、S32212、S32217、又はS32209抗体(1 µg/mL)を分注し(50 µL/well

50

)、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後(400 $\mu$ L/well)、ストレプトアビジン-HRP( $\times 5000$ )を分注し(50 $\mu$ L/well)、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後(400 $\mu$ L/well)、OPD発色液(2mg/mL)を分注し(50 $\mu$ L/well)、室温で10分間静置した。反応停止液を分注し(50 $\mu$ L/well)、プレートリーダーで吸光度を測定した(波長492nm)。

各群を代表する抗体と合成ペプチドとの反応性を表4に示す。反応したものを「+」、反応しなかったものを「-」で示す。Group C1及びC2に属する抗体は、ヌクレオカプシドタンパク質の第388-第405番アミノ酸の配列に反応した。Group B、C3、及びC4に属する抗体は、第397-第414アミノ酸の配列に反応した。

【0070】

【表4】

場所	アミノ酸配列	配列番号	B	C1	C2	C3	C4
208-225	ARMAGNGGDAALALLLLD	配列番号31	-	-	-	-	-
217-234	AALALLLLDRLNQLESKM	配列番号32	-	-	-	-	-
226-243	RLNQLESKMSGKGGQQQGG	配列番号33	-	-	-	-	-
235-252	SGKGGQQQGGQTVTKKSAA	配列番号34	-	-	-	-	-
244-261	QTVTKKSAAEASKKPRQK	配列番号35	-	-	-	-	-
253-270	EASKKPRQKRTATKAYNV	配列番号36	-	-	-	-	-
262-279	RTATKAYNVQTQAFGRRGP	配列番号37	-	-	-	-	-
271-288	TQAFGRRGPEQTQGNFGD	配列番号38	-	-	-	-	-
280-297	EQTQGNFGDQELIRQGT	配列番号39	-	-	-	-	-
289-306	QELIRQGTDYKHWPQIAQ	配列番号40	-	-	-	-	-
298-315	YKHWPQIAQFAPSASAFF	配列番号41	-	-	-	-	-
307-324	FAPSASAFFGMSRIGMEV	配列番号42	-	-	-	-	-
316-333	GMSRIGMEVTPSGTWLTY	配列番号43	-	-	-	-	-
325-342	TPSGTWLTYTGAIKLDDK	配列番号44	-	-	-	-	-
334-351	TGAIKLDDKDPNFKDQVI	配列番号45	-	-	-	-	-
343-360	DPNFKDQVILLNKHIDAY	配列番号46	-	-	-	-	-
352-369	LLNKHIDAYKTFPTEPK	配列番号47	-	-	-	-	-
361-378	KTFPTEPKKDKKKKADE	配列番号48	-	-	-	-	-
370-387	KDKKKKADETQALPQRQK	配列番号49	-	-	-	-	-
379-396	TQALPQRQKKQQTVTLLP	配列番号50	-	-	-	-	-
388-405	KQQTVTLLPAADLDDFSK	配列番号51	-	+	+	-	-
397-414	AADLDDFSKQLQQSMSSA	配列番号52	+	-	-	+	+
406-419	QLQQSMSSADSTQA	配列番号53	-	-	-	-	-

【0071】

### 実施例3 抗体のエピトープ解析3

S32213及びS32217抗体の詳細なエピトープ解析を、PEPPERPRINT社のPEPPERMAP(登録商標)Peptide Microarray受託解析サービスを利用して実施した。リニアエピトープマッピング(15アミノ酸残基のペプチド鎖長、14アミノ酸残基オーバーラップペプチドにより解析)、及び、立体配座エピトープマッピング(7、10、13アミノ酸残基のペプチド鎖長、それぞれ6、9、12アミノ酸残基オーバーラップペプチドにより解析)による解析結果の一部抜粋を表5及び6に示す。S32213抗体はSARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質の394-

10

20

30

40

50



398番目のアミノ酸配列であるLLPAA(配列番号25)を、S32217抗体は同タンパク質の400-408番目のアミノ酸配列であるLDDFSKQLQ(配列番号29)中に存在するエピトープを認識することが示された。

【0072】

【表5】

場所	アミノ酸配列	配列番号	S32213 抗体との反応性
385-391	RQKKQQT	配列番号 54	-
386-392	QKKQQTV	配列番号 55	-
387-393	KKQQTVT	配列番号 56	-
388-394	KQQTVTL	配列番号 57	-
389-395	QQTVTLL	配列番号 58	-
390-396	QTVTLLP	配列番号 59	-
391-397	TVTLLPA	配列番号 60	+
392-398	<u>VTLLPAA</u>	配列番号 61	+++
393-399	<u>TLLPAAD</u>	配列番号 62	+++
394-400	<u>LLPAADL</u>	配列番号 63	+++
395-401	LPAADLD	配列番号 64	+
396-402	PAADLDD	配列番号 65	-
397-403	AADLDDF	配列番号 66	-
398-404	ADLDDFS	配列番号 67	-
399-405	DLDDFSK	配列番号 68	-
400-406	LDDFSKQ	配列番号 69	-

+++ : 反応あり且つ高感度、+ : 反応あり、- : 反応なし

【0073】

10

20

30

40

50

【表 6】

場所	アミノ酸配列	配列番号	S32217 抗体との反応性
389-403	QQTVTLLPAADLDDF	配列番号 70	-
390-404	QTVTLLPAADLDDFS	配列番号 71	-
391-405	TVTLLPAADLDDFSK	配列番号 72	-
392-406	VTLLPAADLDDFSKQ	配列番号 73	-
393-407	TLLPAADLDDFSKQL	配列番号 74	+
394-408	LLPAADLDDFSKQLQ	配列番号 75	++
395-409	LPAADLDDFSKQLQQ	配列番号 76	++
396-410	PAADLDDFSKQLQQS	配列番号 77	++
397-411	AADLDDFSKQLQQSM	配列番号 78	++
398-412	ADLDDFSKQLQQSMS	配列番号 79	++
399-413	DLDDFSKQLQQSMSS	配列番号 80	++
400-414	LDDFSKQLQQSMSSA	配列番号 81	+++
401-415	DDFSKQLQQSMSSAD	配列番号 82	+
402-416	DFSKQLQQSMSSADS	配列番号 83	-
403-417	FSKQLQQSMSSADST	配列番号 84	-
404-418	SKQLQQSMSSADSTQ	配列番号 85	-

+++ : 反応あり且つ特に高感度、++ : 反応あり且つ高感度、  
+ : 反応あり、- : 反応なし

## 【0074】

実施例 4 トリプシン消化 Nu 抗原に対する抗体の反応性

ブタ膵臓由来トリプシンを PBS で希釈し、トリプシン溶液 (0 又は 2000 ng/ml) を調製した。各トリプシン溶液を PBS で希釈して調製した Nu 抗原 (2000 ng/ml) を 1 : 1 の割合で混合し、37 °C で 10 分間反応させた。反応後、protease inhibitor を溶液の 100 分の 1 量添加して酵素反応を停止させ、これをトリプシン消化 Nu 抗原とした。

試験用抗体 5 種 (5 µg/ml) を 96 穴 ELISA 用マイクロプレートに分注し (50 µL/well)、室温で 2 時間静置した。PBST で 3 回洗浄後、ブロッキング液 (1% BSA - PBST) を分注し (100 µL/well)、室温で 1 時間静置した。ブロッキング液を除去後、トリプシン消化 Nu 抗原 (1000 ng/ml) を分注し (50 µL/ml)、室温で 30 分間静置した。PBST で 3 回洗浄後 (400 µL/well)、合成ペプチド (2 µg/ml, 25 µL/well)、ビオチン標識した試験用抗体 5 種 (1 µg/ml) を分注し (50 µL/well)、室温で 1 時間静置した。PBST で 3 回洗浄後 (400 µL/well)、ストレプトアビジン - HRP (×5000) を分注し (50 µL/well)、室温で 1 時間静置した。PBST で 3 回洗浄後 (400 µL/well)、OPD 発色液 (2 mg/ml) を分注し (50 µL/well)、室温で 10 分間静置した。反応停止液を分注し (50 µL/well)、プレートリーダーで吸光度を測定した (波長 492 nm)。結果を表 7 に示す。

## 【0075】

10

20

30

40

50

【表 7】

液相抗体	S32213 (C2)	S32217 (C3)	S32212 (C1)	S32209 (C4)	S32231 (B)
固相抗体	S32217 (C3)	S32213 (C2)	S32217 (C3)	S32213 (C2)	S32217 (C3)
トリプシン消化なし	4.245	4.369	4.634	4.229	4.409
トリプシン消化あり	4.595	4.284	4.456	4.511	0.122

## 【0076】

Group Cに属する抗体同士の組合せでは、トリプシン消化を行った場合においてもNu抗原を検出可能であった。しかしながら、Group BとGroup C3の組合せでは、トリプシン消化により抗原と抗体との反応が大幅に低下した。Group Bに属する抗体は、QLQQSMSSA(配列番号27)中の任意のアミノ酸配列をエピトープとして認識していると考えられる。

10

## 【0077】

実施例5 イムノクロマトグラフィーによるSARS-CoV-2の検出

分析例2と同様に、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを作製した。標識抗体にはS32213抗体、固相抗体にはS32217抗体を用いた。

## 【0078】

## 5) 試験方法

ラピッドテストFLU・NEXT用検体希釈液(積水メディカル)を500 $\mu$ Lずつ希釈液チューブに分注した。SARS-CoV-2 PCR positive swab(Trina社)にUniversal Transport Medium(BD社)を添加して試料とした。試料に検体採取用綿棒を挿入し、検体を採取した後、希釈液チューブ内の希釈液で検体を抽出した。希釈液チューブに検体濾過フィルターを装着し、全量濾過した。上記試料をテストデバイスに120 $\mu$ Lずつ滴下し、10分後に目視でテストラインの有無を判定した。

20

同試料から、QIAmp Viral RNA mini Kit(QIAGEN社)を用いてRNAを抽出した。国立感染症研究所の『病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1』に基づき、RT-PCRを実施した。結果を表8に示す。なお、RT-PCRの結果では、29検体が陽性であり、26検体が陰性であった。検体採取時に陽性であった検体を購入し、試験に用いたが、輸送、凍結融解、及び検体希釈の影響により、一部検体が陰性化したものと考えられる。

30

## 【0079】

【表 8】

		実施例イムノクロマト		計
		陽性	陰性	
RT-PCR	陽性	29	0	29
	陰性	2	24	26
計		31	24	55

40

## 【0080】

イムノクロマトグラフィーにおけるRT-PCRとの陽性一致率は、100%(29/29 $\times$ 100)であった。イムノクロマトグラフィーにおけるRT-PCRとの陰性一致率は、92.3%(24/26 $\times$ 100)であった。使用した検体について、1テスト当たりのSARS-CoV-2のコピー数を確認した。陽性検体29例すべてが、1テスト当たり1600コピー以上のSARS-CoV-2を含んでいた。

ここで、市販のSARS-CoV-2抗原検出用試薬の添付文書には、1600コピー/テストの検体を測定した場合の陽性一致率が記載されている。

50

エスプライン（登録商標）SARS-CoV-2（富士レビオ社）は、測定時間30分で陽性一致率が92%（12/13×100）であった。

クイックナビ（登録商標）-COVID19 Ag（デンカ社）は、測定時間15分で陽性一致率が96.3%（26/27×100）であった。

したがって、本実施例のイムノクロマトグラフィーは、市販のSARS-CoV-2抗原検出用試薬と比較して、より短い測定時間で同等以上の感度を示した。したがって、本実施例のイムノクロマトグラフィーを用いることで、SARS-CoV-2を迅速かつ高感度に検出できるといえる。

#### 【0081】

##### 実施例6 イムノクロマトグラフィーの特異性評価

実施例5と同様のテストデバイスを用いた。ラピッドテストFLU・NEXT用検体希釈液を500μLずつ希釈液チューブに分注し、希釈液チューブ1本につき同一の健常人の鼻咽頭拭い綿棒2本から検体を抽出した。希釈液チューブに検体濾過フィルターを装着し、全量濾過した。上記試料を実施例5と同様のテストデバイスに120μLずつ滴下し、10分後及び30分後に目視と装置にて判定した。また、実施例5と同様の方法でRT-PCRも実施した。ドナーがそれぞれ異なる30例の試料についての判定結果を表9に示す。

#### 【0082】

10

20

30

40

50

【表 9】

検体	判定		
	実施例イムノクロマト		RT-PCR
	測定時間10分	測定時間30分	
1	—	—	—
2	—	—	—
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	—	—	—
11	—	—	—
12	—	—	—
13	—	—	—
14	—	—	—
15	—	—	—
16	—	—	—
17	—	—	—
18	—	—	—
19	—	—	—
20	—	—	—
21	—	—	—
22	—	—	—
23	—	—	—
24	—	—	—
25	—	—	—
26	—	—	—
27	—	—	—
28	—	—	—
29	—	—	—
30	—	—	—

10

20

30

40

## 【0083】

検体1～30は、いずれもRT-PCRで陰性であった。実施例のイムノクロマトグラフィーによる10分後の判定においても、いずれも陰性と判定された。さらに、実施例のイムノクロマトグラフィーの既定の測定時間を超過する30分後の判定においても、全ての検体が陰性と判定された。したがって、本実施例のイムノクロマトグラフィーは、良好な特異性を示した。

## 【0084】

実施例7 モノクローナル抗体のアミノ酸配列の解析

公益財団法人かずさDNA研究所の抗体可変領域解析を利用して、S32213抗体、

50

S32217抗体、及びS32223抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ解析した。その結果、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、それぞれ、以下の表10の通りであった。

【表10】

抗体名	重鎖又は軽鎖	CDR	アミノ酸配列	配列番号
S32213	重鎖	CDR1	GFSLSTSGMG	配列番号3
		CDR2	IYWDDDK	配列番号4
		CDR3	ARRDYGYNFDY	配列番号5
	軽鎖	CDR1	SSVSSTY	配列番号6
		CDR2	STS	配列番号7
		CDR3	HQWSSYPPT	配列番号8
S32217	重鎖	CDR1	GFTFSDYY	配列番号9
		CDR2	ITDGDNYT	配列番号10
		CDR3	ARDGNYASSPFTY	配列番号11
	軽鎖	CDR1	TGAVTTSNY	配列番号12
		CDR2	GTN	配列番号13
		CDR3	ALWYSNHVW	配列番号14
S32223	重鎖	CDR1	GFTFSDYY	配列番号15
		CDR2	ISDGYSYT	配列番号16
		CDR3	ARDQDYFGSSLAY	配列番号17
	軽鎖	CDR1	TGAVTTSNY	配列番号18
		CDR2	GTN	配列番号19
		CDR3	ALWYSNRVW	配列番号20

## 【0085】

S32223抗体は、分析例1のサンドイッチELISAによる抗体分類において、S32217抗体と同じGroup C3に属する抗体である。S32223抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のCDR1～CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ、S32217抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のCDR1～CDR3のアミノ酸配列と高い同一性を有している。したがって、S32223抗体は、SARS-CoV-2抗原に対して、S32217抗体と同様の反応性を有すると考えられる。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0086】

本発明によれば、高感度で迅速な分析が可能なSARS-CoV-2免疫測定キット及びSARS-CoV-2の免疫測定方法、並びにそれらに使用可能なモノクローナル抗体又はその抗体断片を提供することができる。

10

20

30

40

50

【要約】

【課題】高感度で迅速な分析が可能なSARS-CoV-2免疫測定キット及びSARS-CoV-2の免疫測定方法、並びにそれらに使用可能なモノクローナル抗体又はその抗体断片を提供することを課題とする。

【解決手段】SARS-CoV-2の免疫測定方法であって、生体試料と、SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質と結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片とを接触させる工程を含み、

前記モノクローナル抗体又はその抗体断片が、セリンプロテアーゼで処理したSARS-CoV-2と結合する、免疫測定方法により、前記課題を解決することができる。

【選択図】なし

【図面】

【図1】

SARS-CoV-2 Nucleocapsid (419 aa)	
1-	MSDNGPQNQR NAPRITFGGP SDSTGSNQG ERSGARSKQR RPQGLPNNTA
51-	SWFTALTQHG KEDLKFPRGQ GVPINTNSSP DDQIGYYRRA TRRIRGGDGK
101-	MKDLSRWFYF YYLGTGPEAG LPYGANKDGI IWWATEGALN TPKDHIGTRN
151-	PANNAIVLQ LPQGTTLPGK FYAEGSRGGS QASSRSSRS RNSSRNSTPG
201-	SSRGTSPARM AGNGGDAALA LLLLDRLNQL ESKMSGKQQ QQGQTVTKKS
251-	AAEASKKPRQ KRTATKAYNV TQAFGRRGPE QTQGNFGDQE LIRQGTDYKH
301-	WPQIAQFAPS ASAFFGMSRI GMEVTPSGTW LTYTGAIKLD DKDPNFKDQV
351-	ILLNKHIDAY KTFPPTPEPK DKKKKADETQ ALPQRQKKQQ TVTLLPAADL
401-	DDFSKQLQQS MSSADSTQA

【図2】

抗体のエピトープ解析 2	
	ベプチド2 ┌───────────┴───────────┐ ベプチド1                      ベプチド3
201-	SSRGTSPARM AGNGGDAALA LLLLDRLNQL ESKMSGKQQ QQGQTVTKKS
251-	AAEASKKPRQ KRTATKAYNV TQAFGRRGPE QTQGNFGDQE LIRQGTDYKH
301-	WPQIAQFAPS ASAFFGMSRI GMEVTPSGTW LTYTGAIKLD DKDPNFKDQV
351-	ILLNKHIDAY KTFPPTPEPK DKKKKADETQ ALPQRQKKQQ TVTLLPAADL
401-	DDFSKQLQQS MSSADSTQA

【配列表】

0007216948000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		
	C 1 2 Q	1/70 (2006.01)	C 1 2 Q	1/37
	G 0 1 N	33/53 (2006.01)	C 1 2 Q	1/70
	C 1 2 N	15/40 (2006.01)	G 0 1 N	33/53
			C 1 2 N	15/40
				D Z N A

東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内

(72)発明者 落合 泰史

東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内

(72)発明者 家治 翔平

東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内

(72)発明者 ヒュ - ソン クリストファー 健太

東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内

(72)発明者 河野 景吾

東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内

(72)発明者 浅井 智英

東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式会社内

合議体

審判長 樋口 宗彦

審判官 渡戸 正義

審判官 三崎 仁

(56)参考文献 Tian Xingui, Epitope mapping of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus nucleocapsid protein with a rabbit monoclonal antibody, Virus Research, 2021年5月5日, Vol. 300, 198445

Terry James S, Development of a SARS-CoV-2 nucleocapsid specific monoclonal antibody, Virology, 2021年2月1日, Vol. 558, p. 28-37

山川賢太郎, イムノクロマト法を用いた新型コロナウイルスSARS CoV 2抗原検出試薬の開発, 医学と薬学, 2020年5月27日, Vol. 77, No. 6, p. 937-944

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N33/48-33/98