

(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2013-511546
(P2013-511546A)

(43) 公表日 平成25年4月4日(2013.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/195 (2006.01)	CO7K 14/195 ZNA	4H045
CO7K 17/02 (2006.01)	CO7K 17/02	
CO7K 17/14 (2006.01)	CO7K 17/14	
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569 F	
GO1N 33/553 (2006.01)	GO1N 33/553	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-540090 (P2012-540090)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月19日 (2010.11.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年7月12日 (2012.7.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/057430
 (87) 国際公開番号 W02011/063235
 (87) 国際公開日 平成23年5月26日 (2011.5.26)
 (31) 優先権主張番号 61/263, 329
 (32) 優先日 平成21年11月20日 (2009.11.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505452771
 アバクシス、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 587 ユニオンシティー ウィップル
 ロード 3240
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

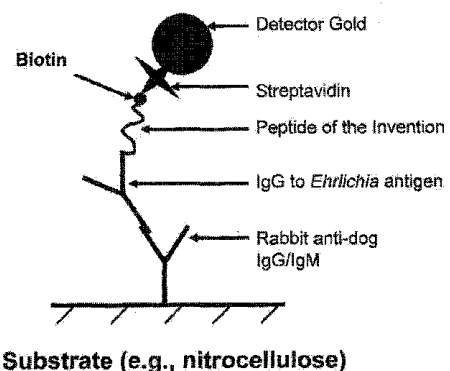
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エールリッヒア抗体の検出のためのペプチド、装置、および方法

(57) 【要約】

本発明は、エールリッヒア抗原と結合する抗体の検出に有用な組成物（例えば、ペプチド組成物）を提供する。ペプチド組成物は、エールリッヒアOuter Membrane Protein1 (OMP-1) タンパク質の免疫原性断片に基づくポリペプチド配列を含む。本発明はまた、そのようなペプチド組成物を含みかつエールリッヒア抗原と結合する抗体の検出および単球性エールリッヒア症の診断に有用な、装置、方法、およびキットも提供する。

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の式

$X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - T - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - G - L - K - Q - X_{18} - W - X_{20} - G - X_{22} - X_{23} - X_{24} - X_{25} - X_{26} - X_{27} - X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{31} - X_{32} - X_{33} - X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} - X_{40}$ (配列番号 1)

の配列を含む、単離されたペプチドであって、ここで、 $X_1 \sim X_6$ および $X_{27} \sim X_{40}$ のそれぞれは、任意のアミノ酸であり、 X_7 は、N および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、S、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{26} は、S、N および K からなる群から選択されるアミノ酸である、ペプチド。

10

【請求項 2】

X_7 が Q であり、 X_{25} が、T および P からなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

20

【請求項 3】

X_1 が、S および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_2 が、A、V、および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_3 が、K および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_4 が E であり、 X_5 が E、D、および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_6 が、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

X_1 が S であり、 X_2 が、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_3 が K であり、 X_4 が E であり、 X_5 が、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_6 が K である、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

30

【請求項 5】

$X_{27} \sim X_{40}$ が、Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 3)、M - A - P - F - H - E - L - D - V - N - N - H - P - N (配列番号 4)、S - L - N - V - S - F - L - I - D - P - M - A - P - F (配列番号 5)、および Q - D - S - N - L - Y - S - S - I - F - F - V - P - Q (配列番号 6) からなる群から選択される配列を有する、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 6】

さらなる N 末端ペプチド配列を含み、該さらなる N 末端ペプチド配列が、天然 OMP - 1 配列または非 OMP - 1 エールリッヒア抗原である、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

40

【請求項 7】

さらなる C 末端ペプチド配列を含み、該さらなる C 末端ペプチド配列が、天然 OMP - 1 配列または非 OMP - 1 エールリッヒア抗原である、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 8】

非 OMP - 1 エールリッヒア抗原が、エールリッヒア p 38、p 43、p 120、p 140、p 153、p 156、p 200、gp 19、gp 36、gp 47、gp 200、または HGE - 3 タンパク質由来である、請求項 6 または 7 記載の単離されたペプチド。

50

【請求項 9】

少なくとも 30、35、40、45、50、または 60 アミノ酸を含む、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 10】

リガンドに結合している、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 11】

ビオチン化されている、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 12】

アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン、またはその HRP もしくはコロイド状金との結合体に結合している、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

10

【請求項 13】

固体支持体に付着しているかまたは固定化されている、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 14】

ビーズ、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、マイクロタイタープレート中のウェル、またはローター中の流路に付着しているかまたは固定化されている、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 15】

配列番号 7 ~ 22 および配列番号 27 ~ 58 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

20

【請求項 16】

第 1 の単離されたペプチドおよび第 2 の単離されたペプチドを含む単離されたペプチドの混合物であって、第 1 の単離されたペプチドが第 2 の単離されたペプチドとは異なり、第 1 および第 2 の単離されたペプチドがそれぞれ、配列番号 1 の配列

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - T - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ - G - L - K - Q - X₁₈ - W - X₂₀ - G - X₂₂ - X₂₃ - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - X₂₈ - X₂₉ - X₃₀ - X₃₁ - X₃₂ - X₃₃ - X₃₄ - X₃₅ - X₃₆ - X₃₇ - X₃₈ - X₃₉ - X₄₀ (配列番号 1)

を含み、ここで、X₁ ~ X₆ および X₂₇ ~ X₄₀ のそれぞれは任意のアミノ酸であり、X₇ は、N および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀ は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁ は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂ は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₃ は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂ は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₃ は、A、S および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄ は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅ は、S、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₂₆ は、S、N および K からなる群から選択されるアミノ酸である、単離されたペプチドの混合物。

30

40

【請求項 17】

3 以上の異なる単離されたペプチドを含む単離されたペプチドの混合物であって、それぞれの単離されたペプチドが、配列番号 1 の配列

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - T - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ - G - L - K - Q - X₁₈ - W - X₂₀ - G - X₂₂ - X₂₃ - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - X₂₈ - X₂₉ - X₃₀ - X₃₁ - X₃₂ - X₃₃ - X₃₄ - X₃₅ - X₃₆ - X₃₇ - X₃₈ - X₃₉ - X₄₀ (配列番号 1)

を含み、ここで、X₁ ~ X₆ および X₂₇ ~ X₄₀ のそれぞれは任意のアミノ酸であり、X₇ は、N および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀ は、T および V からなる群から選択される

50

アミノ酸であり、 X_{11} は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、SおよびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、S、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{26} は、S、NおよびKからなる群から選択されるアミノ酸である、単離されたペプチドの混合物。

【請求項18】

それぞれの単離されたペプチドがリガンドに結合している、請求項16または17記載の混合物。

【請求項19】

単離されたペプチドの1以上がビオチン化されている、請求項16または17記載の混合物。

【請求項20】

単離されたペプチドの1以上が、アビジン、ストレプトアビジン、またはニュートラビジンと結合している、請求項16または17記載の混合物。

【請求項21】

それぞれの単離されたペプチドが固体支持体に固定化されている、請求項16または17記載の混合物。

【請求項22】

以下の工程を含む、試料中でエールリッヒア抗原のエピトープに対する抗体を検出する方法：

試料を請求項1記載の単離されたペプチドと接触させる工程；および

該単離されたペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、エールリッヒア抗原のエピトープに対する抗体が該試料中に存在することを表す、工程。

【請求項23】

前記エールリッヒア抗原が、エールリッヒア・シャフェンシス種またはエールリッヒア・カニス種由来である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

前記単離されたペプチドが固体支持体に固定化されている、請求項22記載の方法。

【請求項25】

前記固体支持体が、ビーズ、ラテラルフローアッセイ装置中の流路、マイクロタイタープレート中のウェル、またはローター中の流路である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記検出工程が、(i) ELISAアッセイを実施すること、(ii) ラテラルフローアッセイを実施すること、(iii) 凝集アッセイを実施すること、または(iv) 分析ローターを通じて試料を流すことを含む、請求項22記載の方法。

【請求項27】

前記試料がヒトまたはイヌ対象由来である、請求項22記載の方法。

【請求項28】

前記試料が血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液の試料である、請求項22記載の方法。

【請求項29】

前記試料を請求項1記載の2以上の単離されたペプチドと接触させる工程を含む、請求項22記載の方法。

【請求項30】

以下の工程を含む、対象において単球性エールリッヒア症を診断する方法：

10

20

30

40

50

対象由来の試料を請求項 1 記載の単離されたペプチドと接触させる工程；および
該ペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形
成が、該対象が単球性エールリッヒア症を有することを表す、工程。

【請求項 3 1】

請求項 1 記載の 1 以上の単離されたペプチドと、該 1 以上の単離されたペプチドのエピ
トープを認識する抗体と結合することができる標識試薬とを含む、キット。

【請求項 3 2】

前記 1 以上の単離されたペプチドが固体支持体に付着している、請求項 3 1 記載のキッ
ト。

【請求項 3 3】

前記 1 以上の単離されたペプチドが、ビーズ、管もしくはウェル、ラテラルフローアッ
セイ装置、または分析ローターに付着している、請求項 3 1 記載のキット。

【請求項 3 4】

標識試薬が、検出可能な標識に結合した抗ヒトまたは抗イヌ Ig G 抗体である、請求項
3 1 記載のキット。

【請求項 3 5】

検出可能な標識がコロイド状金粒子である、請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 3 6】

配列番号 5 9 の式

F - S - A - K - X₅ - X₆ - X₇ - A - E - T - X₁₁ - X₁₂ - T - F - G - X₁₆
- X₁₇ - X₁₈ - X₁₉ - X₂₀ - D - G - A - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - N
- X₂₉ - V - X₃₁ - N - X₃₃ - F - T - I - S - N (配列番号 5 9)

の配列を含む、単離されたペプチドであって、ここで、X₅ は、E および Q からなる群か
ら選択されるアミノ酸であり、X₆ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸で
あり、X₇ は任意のアミノ酸であり、X₁₁ は、K および R からなる群から選択されるア
ミノ酸であり、X₁₂ は任意のアミノ酸であり、X₁₆ は、L および I からなる群から選
択されるアミノ酸であり、X₁₇ は任意のアミノ酸であり、X₁₈ は、R および K からな
る群から選択されるアミノ酸であり、X₁₉ は、Q および N からなる群から選択されるア
ミノ酸であり、X₂₀ は、Y および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄
は任意のアミノ酸であり、X₂₅ は、I および L からなる群から選択されるアミノ酸であ
り、X₂₆ は任意のアミノ酸であり、X₂₇ は、D および E からなる群から選択されるア
ミノ酸であり、X₂₉ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃₁
は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₃₃ は、K および R
からなる群から選択されるアミノ酸である、単離されたペプチド。

【請求項 3 7】

X₅ が E であり、X₆ が E であり、X₁₆ が L であり、X₁₈ が K であり、X₂₀ が Y
であり、X₂₅ が I であり、X₂₉ が Q であり、X₃₁ が Q であり、X₃₃ が K である、
請求項 3 6 記載の単離されたペプチド。

【請求項 3 8】

X₇ が K であり、X₁₂ が、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、X
₁₇ が、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄ が、K および Q か
らなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₂₆ が、E および T からなる群から選
択されるアミノ酸である、請求項 3 6 記載の単離されたペプチド。

【請求項 3 9】

配列番号 9 2 の式

G - X₂ - F - S - A - K - X₇ - X₈ - K - X₁₀ - A - D - T - R - X₁₅ - T - F
- G - L - X₂₀ - K - Q - T - D - G - A - X₂₇ - I - X₂₉ - E - N - X₃₂ - V
- X₃₄ - N - X₃₆ - F - T - I - S - N (配列番号 9 2)

の配列を含む、単離されたペプチドであって、ここで、X₂ は、D および N からなる群か
ら選択されるアミノ酸であり、X₇ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸で

10

20

30

40

50

あり、 X_8 は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は任意のアミノ酸であり、 X_{15} は任意のアミノ酸であり、 X_{20} は任意のアミノ酸であり、 X_{27} は任意のアミノ酸であり、 X_{29} は任意のアミノ酸であり、 X_{32} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{34} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{36} は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸である、単離されたペプチド。

【請求項 40】

X_2 が N であり、 X_7 が E であり、 X_8 が E であり、 X_{32} が Q であり、 X_{34} が Q であり、 X_{36} が K である、請求項 39 記載の単離されたペプチド。

【請求項 41】

固体支持体に付着しているかまたは固定化されている、請求項 36 または 39 記載の単離されたペプチド。

【請求項 42】

ビーズ、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、マイクロタイタープレート中のウェル、またはローター中の流路に付着しているかまたは固定化されている、請求項 41 記載の単離されたペプチド。

【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、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる、2009年11月20日出願された米国特許仮出願番号第61/263,329号の利益を主張する。

電子出願されるテキストファイルの説明

【0002】

電子出願されたテキストファイルの説明

電子出願されたテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる：配列表のコンピュータで読み取り可能な形式のコピー（ファイル名：ABA_X_036_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2010年11月18日、ファイルサイズ41キロバイト）。

【背景技術】

【0003】

エールリッヒア (*Ehrlichia*) 菌は、哺乳動物宿主で循環リンパ球に感染する偏性細胞内病原体である。エールリッヒア・カニス (*Ehrlichia canis*) およびエールリッヒア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*) は、それぞれ、イヌおよびヒトに感染し、イヌ単球性エールリッヒア症 (CME) およびヒト単球性エールリッヒア症 (HME) を引き起こす同じ亜属のメンバーである。イヌの疾患は、発熱、リンパ節腫脹、体重減少、および汎血球減少症によって特徴付けられる。ヒトでは、この疾患は、発熱、頭痛、筋肉痛、および白血球減少によって特徴付けられる。イヌおよびヒトエールリッヒア症のどちらの治療にも早期検出と治療が重要である。

【0004】

間接免疫蛍光法 (IFA) および酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) は、これらの疾患の診断で典型的に用いられてきた。これらのアッセイは、対象の血液、血漿、もしくは血清由来の抗エールリッヒア抗体の感染細胞、細胞溶解物、もしくは部分的に精製された全エールリッヒアタンパク質に対する結合を測定または検出する。しかし、抗エールリッヒア抗体またはそれらの断片を検出するための現在知られているアッセイは、これらの試験で用いられるエールリッヒア抗原の非純粋性に直接関連する感度および特異性の問題のために、有用性が非常に制限される。すなわち、現在知られているアッセイは、多くの全エールリッヒア抗原または種特異的でない抗原の混合物を使用する。

【0005】

したがって、エールリッヒア抗原を検出するためのさらなるアッセイおよび単球性エー

10

20

30

40

50

ルリッヒア症の血清学的診断が当該技術分野で依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、一つには、エールリッヒア外膜タンパク質1 (OMP-1) タンパク質の断片のある配列変異体が、様々なエールリッヒア種に対する抗体応答のロバストな検出をもたらすという発見に基づく。したがって、本発明は、エールリッヒア抗原と結合する抗体の検出および単球性エールリッヒア症の診断に有用な組成物、装置、方法、ならびにキットを提供する。

【0007】

一態様において、本発明は、エールリッヒア抗原を認識する抗体と結合することができるペプチドを提供する。ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - T - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ - G - L - K - Q - X₁₈ - W - X₂₀ - G - X₂₂ - X₂₃ - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - X₂₈ - X₂₉ - X₃₀ - X₃₁ - X₃₂ - X₃₃ - X₃₄ - X₃₅ - X₃₆ - X₃₇ - X₃₈ - X₃₉ - X₄₀ (配列番号1)

の配列を含み、ここで、X₁ ~ X₆ および X₂₇ ~ X₄₀ のそれぞれは任意のアミノ酸であり、X₇ は、N および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀ は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁ は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂ は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₃ は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂ は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₃ は、A、S および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄ は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅ は、S、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₂₆ は、S、N および K からなる群から選択されるアミノ酸である。

【0008】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₇ が Q であり、X₂₅ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸である配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₇ が N であり、X₂₅ が S である配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁ が、S および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂ が、A、V、および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃ が、K および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₄ が E であり、X₅ が、E、D、および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₆ が、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸である配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁ が S であり、X₂ が、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃ が K であり、X₄ が E であり、X₅ が、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₆ が K である配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁ ~ X₆ が、配列 K - R - D - E - N - Q (配列番号2) を有する配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、X₂₇ ~ X₄₀ は、Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号3)、M - A - P - F - H - E - L - D - V - N - N - H - P - N (配列番号4)、S - L - N - V - S - F - L - I - D - P - M - A - P - F (配列番号5)、および Q - D - S - N - L - Y - S - S - I - F - F - V - P - Q (配列番号6) からなる群から選択される配列を有する。

【0009】

他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号59

F - S - A - K - X₅ - X₆ - X₇ - A - E - T - X₁₁ - X₁₂ - T - F - G - X₁₆ - X₁₇ - X₁₈ - X₁₉ - X₂₀ - D - G - A - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - N - X₂₉ - V - X₃₁ - N - X₃₃ - F - T - I - S - N (配列番号59)

の配列を含み、ここで、X₅ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、

X_6 は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_7 は任意のアミノ酸であり、 X_{11} は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は任意のアミノ酸であり、 X_{16} は、L および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{17} は任意のアミノ酸であり、 X_{18} は、R および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{19} は、Q および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、Y および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は任意のアミノ酸であり、 X_{25} は、I および L からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は任意のアミノ酸であり、 X_{27} は、D および E からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{29} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{31} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{33} は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸である。

10

【0010】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、 X_5 が E であり、 X_6 が E であり、 X_{16} が L であり、 X_{18} が K であり、 X_{20} が Y であり、 X_{25} が I であり、 X_{29} が Q であり、 X_{31} が Q であり、 X_{33} が K である配列番号 59 の配列を含むか、または配列番号 59 の配列から構成される。他の実施形態において、本発明のペプチドは、 X_7 が K であり、 X_{12} が、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{17} が、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} が、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{26} が、E および T からなる群から選択されるアミノ酸である配列番号 59 の配列を含むか、または配列番号 59 の配列から構成される。

20

【0011】

他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号 92 の配列

G - X_2 - F - S - A - K - X_7 - X_8 - K - X_{10} - A - D - T - R - X_{15} - T - F
- G - L - X_{20} - K - Q - T - D - G - A - X_{27} - I - X_{29} - E - N - X_{32} - V
- X_{34} - N - X_{36} - F - T - I - S - N (配列番号 92)

を含み、ここで、 X_2 は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_7 は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は任意のアミノ酸であり、 X_{15} は任意のアミノ酸であり、 X_{20} は任意のアミノ酸であり、 X_{27} は任意のアミノ酸であり、 X_{29} は任意のアミノ酸であり、 X_{32} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{34} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{36} は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸である。ある実施形態では、本発明のペプチドは、 X_2 が N であり、 X_7 が E であり、 X_8 が E であり、 X_{32} が Q であり、 X_{34} が Q であり、 X_{36} が K である配列番号 92 の配列を含むか、または配列番号 92 の配列から構成される。

30

【0012】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 1、配列番号 59、または配列番号 92 の配列を含み、さらなる N 末端ペプチド配列をさらに含む。さらなる N 末端ペプチド配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸を含み得、天然または非天然配列のいずれかであり得る。ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 1、配列番号 59、または配列番号 92 により定義される配列を含み、そしてさらなる C 末端配列をさらに含む。さらなる C 末端ペプチド配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸を含み得、そして天然または非天然配列のいずれかであり得る。ある実施形態では、非天然配列は、非 OMP - 1 エールリッヒア抗原 (例えば、エールリッヒア p 38、p 43、p 120、p 140、p 153、p 156、p 200、gp 19、gp 36、gp 47、gp 200、または HGE - 3) を含む。

40

【0013】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、少なくとも 25、30、35、40、45、50、またはそれ以上のアミノ酸を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、単離

50

された（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。ある実施形態では、本発明のペプチドはリガンドと結合する。例えば、ある実施形態では、ペプチドはビオチン化されている。他の実施形態において、ペプチドは、ストレプトアビジン、アビジン、またはニュートラビジンと結合する。他の実施形態において、ペプチドは、キャリアタンパク質（例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリンFcドメイン）と結合する。さらに他の実施形態では、ペプチドは、 dendリマーと結合する、および/または複数の抗原ペプチド系（MAPS）の一部である。

【0014】

ある実施形態では、本発明のペプチドを、固体支持体に付着させるか、または固体支持体上に固定化する。ある実施形態では、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズなど）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析ローター中の流路、または管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中）である。

10

【0015】

別の態様において、本発明は、2以上の本発明のペプチドを含む組成物を提供する。例えば、ある実施形態では、組成物は、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物を含み、この場合、各ペプチドは配列番号1の配列を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物を含み、この場合、各ペプチドは配列番号59の配列を含む。他の実施形態において、組成物は、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物を含み、ここで、各ペプチドは配列番号92の配列を含む。

20

【0016】

ある実施形態では、ペプチドはリガンドと結合している。例えば、ある実施形態では、ペプチドはビオチン化されている。他の実施形態において、ペプチドは、ストレプトアビジン、アビジン、またはニュートラビジンと結合している。他の実施形態において、ペプチドはキャリアタンパク質（例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリンFcドメイン）と結合している。さらに他の実施形態では、ペプチドは dendリマーと結合している、および/または複数の抗原ペプチド系（MAPS）の一部である。

【0017】

別の態様において、本発明は、本発明のペプチドをコード化する配列を含む核酸を提供する。加えて、本発明は、そのような核酸を含むベクター、およびそのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。ある実施形態では、ベクターはシャトルベクターである。他の実施形態において、ベクターは、発現ベクター（例えば、細菌または真核生物発現ベクター）である。ある実施形態では、宿主細胞は細菌細胞である。他の実施形態において、宿主細胞は真核生物細胞である。

30

【0018】

別の態様において、本発明は装置を提供する。ある実施形態では、装置はイムノアッセイを実施するために有用である。例えば、ある実施形態では、装置はラテラルフローイムノアッセイ装置である。他の実施形態において、装置は分析ローターである。他の実施形態において、装置は、例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中の管またはウェルである。さらに他の実施形態では、装置は、電気化学的、光学的、または光電式センサーである。

40

【0019】

ある実施形態では、装置は本発明のペプチドを含む。他の実施形態において、装置は、異なる本発明のペプチドの混合物を含む。例えば、ある実施形態では、装置は、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ある実施形態では、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を含む。ある実施形態では、ペプチドは装置に付着させるかまたは装置上に固定化する。

【0020】

別の態様において、本発明は、試料においてエールリッヒア抗原のエピトープに対する

50

抗体を検出する方法を提供する。ある実施形態では、方法は、試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および、該ペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、該試料中にエールリッヒア抗原のエピトープに対する抗体が存在することを表す工程を含む。ある実施形態では、エールリッヒア抗原は感染性エールリッヒア種、例えばエールリッヒア・カニスまたはエールリッヒア・シャフェンシス由来である。ある実施形態では、方法は、試料を 2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。

【0021】

ある実施形態では、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。ある実施形態では、ペプチドまたはペプチドの混合物を、固体支持体に付着させるか、または固体支持体上に固定化する。ある実施形態では、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズなど）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析ローター中の流路、または管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中）である。ある実施形態では、固体支持体は、金属、ガラス、セルロース系材料（例えば、ニトロセルロース）、またはポリマー（例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリスルホンなど）を含む。ある実施形態では、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物を、デンドリマーに付着させ、かつ/またはMAPS系中に組み込む。

【0022】

ある実施形態では、検出工程はELISAアッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、ラテラルフローイムノアッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、凝集アッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、分析ローター中で試料をスピンさせることを含む。さらに他の実施形態では、検出工程は、試料を、電気化学的センサー、光学的センサー、または光電式センサーで分析することを含む。

【0023】

ある実施形態では、試料は、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、粘液、または唾液などの体液である。他の実施形態において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。ある実施形態では、試料は、野生動物（例えば、シカまたは齧歯類、例えばマウス、シマリス、リスなど）由来である。他の実施形態において、試料は、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類など）由来である。他の実施形態において、試料は、家畜または野生動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）由来である。さらに他の実施形態では、試料はヒト由来である。

【0024】

別の態様において、本発明は、対象において単球性エールリッヒア症を診断する方法を提供する。ある実施形態では、方法は、対象由来の試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および、該ペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、対象が単球性エールリッヒア症に罹っていることを表す工程を含む。ある実施形態では、方法は、試料を 2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。

【0025】

ある実施形態では、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。ある実施形態では、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物を、固体支持体に付着させるか、または固体支持体上に固定化する。ある実施形態では、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズなど）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析ローター中の流路、または管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中）である。ある実施形態では、固体支持体は、金属、ガラス、セルロース系材料（例えば、ニトロセルロース）、またはポリマー（例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ

プロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリスルホンなど)を含む。ある実施形態では、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物を、デンドリマーに付着させ、かつ/またはMAPS系中に組み込む。

【0026】

ある実施形態では、検出工程はELISAアッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、ラテラルフローイムノアッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、凝集アッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、分析ローター中で試料をスピンさせることを含む。さらに他の実施形態では、検出工程は、試料を、電気化学的センサー、光学的センサー、または光電式センサーで分析することを含む。

10

【0027】

ある実施形態では、試料は、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、または唾液などの体液である。他の実施形態において、試料は、組織(例えば、組織ホモジネート)または細胞溶解物である。ある実施形態では、対象は、野生動物(例えば、シカまたは齧歯類、例えばマウス、シマリス、リスなど)である。他の実施形態において、対象は、実験動物(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類など)である。他の実施形態において、対象は、家畜または野生動物(例えば、イヌ、ネコ、ウマ)である。さらに他の実施形態では、対象はヒトである。

【0028】

更に別の態様において、本発明はキットを提供する。ある実施形態では、キットは本発明のペプチドを含む。ある実施形態では、キットは、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を含み得る。ある実施形態では、ペプチドは、固体支持体に付着させるか、または固体支持体上に固定化されている。例えば、ある実施形態では、固体支持体は、ビーズ(例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズなど)、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、分析ローター中の流路、または管もしくはウェル(例えば、プレート中)である。ある実施形態では、ペプチド(複数可)を、デンドリマーに付着させ、かつ/またはMAPS系中に組み込む。

20

【0029】

ある実施形態では、キットは、ビーズの集団またはプレート(例えば、ELISAアッセイに好適なプレート)をさらに含む。他の実施形態において、キットは、装置、例えばラテラルフローイムノアッセイ装置、分析ローター、電気化学的センサー、光学的センサー、または光電式センサーをさらに含む。ある実施形態では、ビーズの集団、プレート、または装置は、イムノアッセイの実施に有用である。例えば、ある実施形態では、ビーズの集団、プレート、または装置は、試料由来の抗体および本発明のペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成の検出に有用である。ある実施形態では、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物を、ビーズ、プレート、もしくは装置に付着させるか、またはビーズ、プレート、もしくは装置上に固定化する。

30

【0030】

ある実施形態では、キットは使用説明書をさらに含む。例えば、ある実施形態では、キットは、エールリッヒア抗原に対する抗体を検出するためまたは単球性エールリッヒア症を診断するための本発明のペプチドの使用法を示す使用説明書を含む。ある実施形態では、キットは、エールリッヒア抗原に対する抗体を検出するためまたは単球性エールリッヒア症を診断するためのビーズの集団、プレート、または装置(例えば、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物を含む)の使用法を示す使用説明書を含む。

40

【0031】

本発明のさらなる態様および実施形態は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0032】

50

【図1】エールリッヒア抗原に対する抗体を検出するために用いることができる間接的サンドイッチアッセイの線図である。この実施形態において、抗ヒトIgG/IgMまたは抗イヌIgG/IgM抗体を、好適な基質（例えば、ニトロセルロース膜）に試験部位で固定化する。試験試料中の抗体を、固定化抗体により結合する。適切なエールリッヒア抗原に対する試験試料抗体は、次いで本発明のペプチドに結合する。本発明のペプチドがビオチンに結合する場合、コロイド状金で標識されたストレプトアビジンを用いて、試験部位でのペプチドの存在を検出することができる。間接的サンドイッチアッセイを逆に操作することができる - すなわち、本発明のペプチドを基質に固定化して、試験試料中の抗エールリッヒア抗体を捕捉し、そして標識（例えばコロイド状金）と結合した抗ヒトIgG/IgMまたは抗イヌIgG/IgM抗体を用いて、試験部位で固定化ペプチドに結合した抗体の存在を検出できると理解される。

10

【図2】図1の間接的サンドイッチアッセイに基づくラテラルフローイムノアッセイ装置の線図である。ラテラルフローイムノアッセイ装置のこの実施形態では、試料を試料ローディングパッドで適用し、次に結合体パッドを通して試験膜へと流れる。ペプチド-ビオチン-ストレプトアビジン-金複合体は、試料が結合体パッドを通過する際に可溶化され、本発明のペプチドと適切な抗エールリッヒア抗原抗体との間に複合体が形成される。試験部位は、試料中のすべての抗体と結合する試料に適切な抗IgGまたは抗IgM抗体を含む。例えば、タンパク質Lを、抗IgGまたは抗IgM抗体の代わりに用いることができる。試料中の十分な抗体が本発明のペプチドと結合した場合、試験部位で正のシグナルが出現するであろう。ラテラルフローイムノアッセイ装置の別の実施形態において、本発明のペプチドは、試験部位（T）で固定化され、検出可能な標識（例えばコロイド状金粒子）に結合した試料に適切な抗IgGまたは抗IgM抗体（例えば、抗ヒトまたは抗イヌ）が結合体パッド中に存在する。結合体パッドを通過する試料は、標識された抗体を可溶化し、そして試験試料中に存在する任意の抗エールリッヒア抗原抗体は、標識された抗体に結合し、そのような抗体複合体は、本発明の固定化されたエールリッヒアペプチドにより試験部位で捕捉され、それにより正のシグナルを産生する。いずれの実施形態でも、装置は、結合体パッド中の標識されたペプチドまたは標識された抗体を認識する結合パートナーが固定化された対照部位（C）をさらに含み得る。

20

【図3】エールリッヒア抗原に対する抗体を検出するために用いることができるダブル抗原サンドイッチアッセイの線図である。この実施形態において、本発明のペプチドは、試験部位で好適な基質（例えば、ニトロセルロース膜、ELISAプレートのウェル）に固定化される。試験試料中の抗体は本発明の固定化されたペプチドにより結合される。適切なエールリッヒア抗原に対する試験試料抗体は、次いで、試験部位で固定化されたペプチドの第1のセットと結合した抗体の存在を検出する、ディテクター分子（例えば、コロイド状金、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP））に結合した本発明のペプチドの第2のセットと結合する。

30

【発明を実施するための形態】

【0033】

本明細書中で用いられる場合、以下の用語は以下の意味を有する：

【0034】

「抗原」という用語は、本明細書中で用いられる場合、抗体によって認識され得る分子を指す。抗原は、例えば、ペプチドまたはその修飾形態であり得る。抗原は、1以上のエピトープを含み得る。

40

【0035】

「エピトープ」という用語は、本明細書中で用いられる場合、抗体によって特異的に認識される抗原の一部である。エピトープは、例えば、ペプチド（例えば、本発明のペプチド）の一部を含み得るか、またはペプチドの一部から構成され得る。エピトープは、直線状エピトープ、連続エピトープ、または立体構造エピトープであり得る。

【0036】

「OMP-1タンパク質」という用語は、これらに限定されるものではないが、E.カ

50

ニス (canis) P-30、E. カニス P30-1、E. シャフェンシス (chaffensis) P28、E. シャフェンシス OMP-1C、E. シャフェンシス OMP-1D、E. シャフェンシス OMP-1E、および E. シャフェンシス OMP-1F をはじめとする エールリッヒア の外膜タンパク質 1 パラログのいずれかを指す。

【0037】

「核酸」、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書中で交換可能に用いられ、DNA、RNA、cDNA (1本鎖であるかまたは2本鎖であるかによらない)、ならびにそれらの化学修飾物を包含する。

【0038】

本明細書中で用いられる一文字アミノ酸略語は、当該技術分野でのそれらの標準的な意味を有し、本明細書中で記載する全てのペプチド配列を、慣例に従って、N末端を左手に、そしてC末端を右手に記載する。

【0039】

更なる用語は、必要に応じて、以下の詳細な説明で定義する。

【0040】

組成物および装置

本発明は、一つには、エールリッヒア OMP-1 タンパク質の断片におけるある配列変異体は、様々なエールリッヒア種に対する抗体応答のロバストな検出をもたらすという発見に基づく。したがって、一態様において、本発明は、エールリッヒア抗原を認識する抗体と結合することができるペプチドを提供する。

【0041】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 1

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - T - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ - G - L - K - Q - X₁₈ - W - X₂₀ - G - X₂₂ - X₂₃ - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - X₂₈ - X₂₉ - X₃₀ - X₃₁ - X₃₂ - X₃₃ - X₃₄ - X₃₅ - X₃₆ - X₃₇ - X₃₈ - X₃₉ - X₄₀ (配列番号 1)

の配列を含み、ここで、配列番号 1 は本明細書全体にわたって用いられる場合、特に更に特定されない限り、次の特性を有する：X₁ ~ X₆ および X₂₇ ~ X₄₀ のそれぞれは任意のアミノ酸であり、X₇ は、N および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀ は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁ は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂ は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₃ は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂ は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₃ は、A、S および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄ は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅ は、S、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆ は、S、N および K からなる群から選択されるアミノ酸である。

【0042】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₇ が Q であり、X₂₅ が、T および P からなる群から選択されるアミノ酸である配列番号 1 の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₇ が N であり、X₂₅ が S である配列番号 1 の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁ が、S および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂ が、A、V、および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃ が、K および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₄ が E であり、X₅ が、E、D、および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X₆ が、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸である配列番号 1 の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁ が S であり、X₂ が、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃ が K であり、X₄ が E であり、X₅ が、E および D からなる群から選択され

10

20

30

40

50

るアミノ酸であり、そしてX₆がKである配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁~X₆が、配列K-R-D-E-N-Q(配列番号2)を有する配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、X₂₇~X₄₀は、Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E(配列番号3)、M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N(配列番号4)、S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F(配列番号5)、およびQ-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q(配列番号6)からなる群から選択される配列を有する。

【0043】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁がSであり、X₂が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃がKであり、X₄がEであり、X₅が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₆がKであり、X₇がQであり、X₂₅が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸である配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁がSであり、X₂が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃がKであり、X₄がEであり、X₅が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₆がKであり、X₇がNであり、X₂₅がSである配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁がSであり、X₂が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃がKであり、X₄がEであり、X₅が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₆がKであり、X₇がQであり、X₂₅が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、そしてX₂₇~X₄₀が、Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E(配列番号3)、M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N(配列番号4)、S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F(配列番号5)、およびQ-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q(配列番号6)からなる群から選択される配列を有する配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁がSであり、X₂が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₃がKであり、X₄がEであり、X₅が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₆がKであり、X₇がNであり、X₂₅がSであり、そしてX₂₇~X₄₀が、Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E(配列番号3)、M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N(配列番号4)、S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F(配列番号5)、およびQ-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q(配列番号6)からなる群から選択される配列を有する配列番号1の配列を含む。

【0044】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁~X₆が、配列K-R-D-E-N-Q(配列番号2)を有し、X₇がQであり、X₂₅が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸である配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁~X₆が、配列K-R-D-E-N-Q(配列番号2)を有し、X₇がNであり、X₂₅がSである配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁~X₆が、配列K-R-D-E-N-Q(配列番号2)を有し、X₇がQであり、X₂₅が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、そしてX₂₇~X₄₀が、Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E(配列番号3)、M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N(配列番号4)、S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F(配列番号5)、およびQ-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q(配列番号6)からなる群から選択される配列を有する配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、本発明のペプチドは、X₁~X₆が、配列K-R-D-E-N-Q(配列番号2)を有し、X₇がNであり、X₂₅がSであり、そしてX₂₇~X₄₀が、Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q-E(配列番号3)、M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P-N(配列番号4)、S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P-F(配列番号5)、およびQ-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P-Q(配列番号6)からなる群から選択

10

20

30

40

50

される配列を有する配列番号 1 の配列を含む。

【 0 0 4 5 】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列 S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 7) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 8) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 9) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 10) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 11) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 12) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 13) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 14) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 15) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 16) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 17) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 18) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 19) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 20) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 21) ; または S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - S - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 22) を含むか、またはこれらからなる。この段落の実施形態のいずれかにおいて、ペプチドの最初の 6 個のアミノ酸残基は、S - V - K - E - E - K (配列番号 23)、S - A - K - E - D - K (配列番号 24)、S - A - K - E - E - K (配列番号 25)、および K - R - D - E - N - Q (配列番号 26) からなる群から選択される配列により置換することができる。この段落の実施形態のいずれかにおいて、ペプチドの最後の 14 個のアミノ酸残基は、Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 3)、M - A - P - F - H - E - L - D - V - N - N - H - P - N (配列番号 4)、S - L - N - V - S - F - L - I - D - P - M - A - P - F (配列番号 5)、および Q - D - S - N - L - Y - S - S - I - F - F - V - P - Q (配列番号 6) からなる群から選択される配列により置換することができる。

【 0 0 4 6 】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列 S - A - K - E - E - K - Q - T - T -

T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 27) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 28) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 29) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 30) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 31) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 32) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 33) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 34) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 35) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 36) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 37) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 38) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 39) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 40) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 41) ; または S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - N - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 42) を含むか、またはこの配列から構成される。この段落の実施形態のいずれかにおいて、ペプチドの最初の6個のアミノ酸残基は、S - V - K - E - E - K (配列番号 23)、S - A - K - E - D - K (配列番号 24)、S - A - K - E - E - K (配列番号 25)、および K - R - D - E - N - Q (配列番号 26) からなる群から選択される配列により置換することができる。

【0047】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列 S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 43) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 44) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 45) ; S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号 46) ; S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y -

10

20

30

40

50

G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号47); S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号48); S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号49); S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - T - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号50); S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号51); S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号52); S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号53); S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - S - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号54); S - A - K - E - E - K - Q - T - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号55); S - A - K - E - E - K - Q - P - T - T - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号56); S - A - K - E - E - K - Q - T - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号57); または S - A - K - E - E - K - Q - P - T - V - G - L - Y - G - L - K - Q - D - W - D - G - V - A - A - P - K - Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号58) を含むか、またはこの配列から構成される。この段落の実施形態のいずれかにおいて、ペプチドの最初の6個のアミノ酸残基は、S - V - K - E - E - K (配列番号23)、S - A - K - E - D - K (配列番号24)、S - A - K - E - E - K (配列番号25)、および K - R - D - E - N - Q (配列番号26) からなるリストから選択される配列により置換することができる。この段落の実施形態のいずれかにおいて、ペプチドの最後の14個のアミノ酸残基は、Q - R - K - N - D - P - S - E - T - S - P - G - Q - E (配列番号3)、M - A - P - F - H - E - L - D - V - N - N - H - P - N (配列番号4)、S - L - N - V - S - F - L - I - D - P - M - A - P - F (配列番号5)、および Q - D - S - N - L - Y - S - S - I - F - F - V - P - Q (配列番号6) からなる群から選択される配列により置換することができる。

10

20

30

【0048】

他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号59の配列

F - S - A - K - X₅ - X₆ - X₇ - A - E - T - X₁₁ - X₁₂ - T - F - G - X₁₆ - X₁₇ - X₁₈ - X₁₉ - X₂₀ - D - G - A - X₂₄ - X₂₅ - X₂₆ - X₂₇ - N - X₂₉ - V - X₃₁ - N - X₃₃ - F - T - I - S - N (配列番号59)

40

を含むか、またはこの配列から構成され、ここで、X₅ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₆ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₇ は任意のアミノ酸であり、X₁₁ は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂ は任意のアミノ酸であり、X₁₆ は、L および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₇ は任意のアミノ酸であり、X₁₈ は、R および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₉ は、Q および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀ は、Y および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄ は任意のアミノ酸であり、X₂₅ は、I および L からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆ は任意のアミノ酸であり、X₂₇ は、D および E からなる群から選択されるアミノ

50

酸であり、 X_{29} は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{31} は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{33} は、KおよびRからなる群から選択されるアミノ酸である。

【0049】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、 X_5 がEであり、 X_6 がEであり、 X_{16} がLであり、 X_{18} がKであり、 X_{20} がYであり、 X_{25} がIであり、 X_{29} がQであり、 X_{31} がQであり、 X_{33} がKである、配列番号59の配列を含むか、または配列番号59の配列から構成される。他の実施形態において、本発明のペプチドは、 X_7 がKであり、 X_{12} が、KおよびRからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{17} が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} が、KおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、そして X_{26} が、EおよびTからなる群から選択されるアミノ酸である、配列番号59の配列を含むか、または配列番号59の配列から構成される。

10

【0050】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列 F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - K - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号60) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - K - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号61) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - Q - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号62) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - Q - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号63) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - K - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号64) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - K - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号65) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - Q - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号66) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - K - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - Q - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号67) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - K - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号68) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - K - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号69) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - Q - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号70) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - E - K - N - Y - D - G - A - Q - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号71) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - K - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号72) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - K - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号73) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - Q - I - E - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号74) ; または F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - K - R - T - F - G - L - D - K - N - Y - D - G - A - Q - I - T - D - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号75) を含むか、またはこの配列から構成される。

20

30

40

【0051】

他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列 F - S - A - K - E - E - K - A -

50

E - T - R - K - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - K - I - E - E - N -
 Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 7 6) ; F - S - A - K - E - E -
 K - A - E - T - R - K - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - K - I - T -
 E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 7 7) ; F - S - A - K -
 E - E - K - A - E - T - R - K - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - Q -
 I - E - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 7 8) ; F - S -
 A - K - E - E - K - A - E - T - R - K - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G -
 A - Q - I - T - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 7 9) ;
 F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - K - T - F - G - L - D - K - Q - Y -
 D - G - A - K - I - E - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 10
 8 0) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - K - T - F - G - L - D - K -
 Q - Y - D - G - A - K - I - T - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号
 8 1) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - K - T - F - G - L -
 D - K - Q - Y - D - G - A - Q - I - E - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I -
 S - N (配列番号 8 2) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - K - T - F -
 G - L - D - K - Q - Y - D - G - A - Q - I - T - E - N - Q - V - Q - N - K - F -
 T - I - S - N (配列番号 8 3) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - R -
 T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - K - I - E - E - N - Q - V - Q - N -
 K - F - T - I - S - N (配列番号 8 4) ; F - S - A - K - E - E - K - A - E - T -
 R - R - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - K - I - T - E - N - Q - V - 20
 Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 8 5) ; F - S - A - K - E - E - K - A -
 E - T - R - R - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - Q - I - E - E - N -
 Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 8 6) ; F - S - A - K - E - E -
 K - A - E - T - R - R - T - F - G - L - E - K - Q - Y - D - G - A - Q - I - T -
 E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 8 7) ; F - S - A - K -
 E - E - K - A - E - T - R - R - T - F - G - L - D - K - Q - Y - D - G - A - K -
 I - T - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 8 8) ; F - S -
 A - K - E - E - K - A - E - T - R - R - T - F - G - L - D - K - Q - Y - D - G -
 A - K - I - E - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号 8 9) ;
 F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - R - T - F - G - L - D - K - Q - Y - 30
 D - G - A - Q - I - E - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S - N (配列番号
 9 0) ; または F - S - A - K - E - E - K - A - E - T - R - R - T - F - G - L - D
 - K - Q - Y - D - G - A - Q - I - T - E - N - Q - V - Q - N - K - F - T - I - S
 - N (配列番号 9 1) を含むか、またはこの配列から構成される。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号 9 2 の配列
 G - X₂ - F - S - A - K - X₇ - X₈ - K - X₁₀ - A - D - T - R - X₁₅ - T - F
 - G - L - X₂₀ - K - Q - T - D - G - A - X₂₇ - I - X₂₉ - E - N - X₃₂ - V
 - X₃₄ - N - X₃₆ - F - T - I - S - N (配列番号 9 2)
 を含むか、またはこの配列から構成され、ここで、X₂ は、D および N からなる群から選
 40
 択されるアミノ酸であり、X₇ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり
 、X₈ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀ は任意のアミノ
 酸であり、X₁₅ は任意のアミノ酸であり、X₂₀ は任意のアミノ酸であり、X₂₇ は任
 意のアミノ酸であり、X₂₉ は任意のアミノ酸であり、X₃₂ は、E および Q からなる群
 から選択されるアミノ酸であり、X₃₄ は、E および Q からなる群から選択されるアミノ
 酸であり、そして X₃₆ は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸である。ある
 実施形態では、本発明のペプチドは、X₂ が N であり、X₇ が E であり、X₈ が E であり
 、X₃₂ が Q であり、X₃₄ が Q であり、X₃₆ が K である、配列番号 9 2 の配列を含む
 か、または配列番号 9 2 の配列から構成される。他の実施形態において、本発明のペプチ
 ドは、配列番号 9 3 の配列、DNQVQNKFTISNYSFKEYEDNP (配列番号 9 50

3)を含むか、またはこの配列から構成される。

【0053】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列およびさらなるN末端ペプチド配列(例えば、N末端伸長)を含む。さらなるN末端ペプチド配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、またはそれ以上のアミノ酸を含み得る。ある実施形態では、N末端ペプチド配列は、約5~約10、約10~約15、約15~約20、約20~約25、約25~約30、約30~約40、または約40~約50アミノ酸の長さを有する。一実施形態において、N末端ペプチド配列は、G-NまたはG-Dであり得る。例えば、ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号59の配列およびG-NまたはG-DのさらなるN末端ペプチド配列を含む。さらなるN末端ペプチド配列は、天然配列であり得る。本明細書中で用いられる場合、「天然」配列は、天然に存在するエールリッヒアOMP-1配列、またはその変異体由来のペプチド配列である。ある実施形態では、ペプチド配列は、天然に存在するエールリッヒアOMP-1配列の断片である。ペプチド配列は、例えば、OMP-1の保存領域または非保存領域由来であり得る。ペプチド配列は、例えば免疫優性エピトープなどのエピトープまたは宿主(例えば、ヒト、イヌなど)免疫系により認識可能な任意の他のエピトープを含み得る。OMP-1タンパク質およびそれらのペプチドは、例えば米国特許第6,544,517号、第6,893,640号、第6,923,963号、第7,063,846号、および第7,407,770号、米国特許出願第2004/0265333号および第2009/0075368号、および欧州特許第1026949号(その内容は、参照により本明細書中に組み込まれる)中に記載されている。

10

20

【0054】

変異体ポリペプチドは、配列番号1、配列番号7~22、および配列番号27~94で示されるペプチドと少なくとも約80、85、90、95、98、または99%同一であり、本発明のポリペプチドでもある。%配列同一性は、当該技術分野で認められている意味を有し、2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の同一性を測定するための方法は数多くある。例えば、Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); および Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991)を参照。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを整列させる方法は、GCGプログラムパッケージ(Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12:387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul et al., J Molec. Biol. 215:403 (1990))、ならびにSmithおよびWatermanの局所的相同性アルゴリズム(Adv. App. Math., 2:482-489 (1981))を使用するBestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711)をはじめとするコンピュータプログラムで体系化されている。例えば、FASTAアルゴリズムを利用するコンピュータプログラムALIGN(ギャップ

30

40

50

オープンペナルティ (- 1 2) およびギャップ伸長ペナルティ (- 2) でアフィンギャップ検索) を使用することができる。

【0055】

配列アラインメントプログラムのいずれかを用いて、特定の配列が、例えば基準配列と約95%同一であるかどうかを判断する場合、パラメータは、同一性のパーセンテージが基準ポリヌクレオチドの全長にわたって算出されるように、そして基準ポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの総数の5%までの同一性におけるギャップが許容されるように、設定される。

【0056】

ペプチド配列の変異体は、一つには、配列の既知特性に基づいて、当業者が容易に決定することができる。例えば、変異体ペプチドは、アミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)および/または欠失(例えば、小さな単一アミノ酸の欠失、または2、3、4、5、10、15、20、もしくはそれ以上の連続したアミノ酸を含む欠失)を含み得る。したがって、ある実施形態では、天然ペプチド配列の変異体は、(i) 1以上(例えば、2、3、4、5、6、もしくはそれ以上)の保存的アミノ酸置換、(ii) 1以上(例えば、2、3、4、5、6、もしくはそれ以上)のアミノ酸の欠失、または(iii) それらの組み合わせにより、天然に存在する配列とは異なるものである。欠失アミノ酸は連続的であり得るか、または非連続的であり得る。保存的アミノ酸置換は、それらの側鎖および化学的性質に関連するアミノ酸のファミリー内で起こるものである。これらとしては、例えば(1) 酸性アミノ酸: アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩; (2) 塩基性アミノ酸: リシン、アルギニン、ヒスチジン; (3) 非極性アミノ酸: アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン; (4) 非荷電極性アミノ酸: グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン; (5) 脂肪族アミノ酸: グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン(セリンおよびトレオニンは、場合によって、別に脂肪族-ヒドロキシルとして分類される); (6) 芳香族アミノ酸: フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン; (7) アミドアミノ酸: アスパラギン、グルタミン; ならびに(9) 硫黄含有アミノ酸: システインおよびメチオニンが挙げられる。例えば、Biochemistry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, W H Freeman and Co.: 1981を参照。変異体ペプチドが好適であることを確認するための方法は、通常通りであり、慣例的である。

【0057】

ペプチド配列の変異体は、先に定義したペプチド配列に関する変化を含む。例えば、既知エピトープを含む前述のペプチド配列は、一端もしくは両端で(例えば約1~3アミノ酸)延長または短縮することができ、および/または1、2、3、4またはそれ以上のアミノ酸を保存的アミノ酸などにより置換することができる。さらに、タンパク質の領域が対象のエピトープを含むと確認されているならば、研究者は、対象の領域を、オリジナルのラフな領域のエンドポイントから(例えば、いずれかの方向に約5アミノ酸)「シフト」させて、活性を最適化することができる。

【0058】

ある実施形態では、さらなるN末端ペプチド配列は、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を有する別のペプチドを含む可能性があるか、またはこの配列から構成される可能性がある。したがって、いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を有する配列の多量体である可能性がある。他の実施形態において、N末端ペプチド配列は、天然では配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列のN末端に隣接する天然OMP-1ペプチド配列である。例えば、一実施形態において、ペプチドは配列番号94、(KEEKAEKTRKTFGLEKQYDGAKEEENQVQNKGGGG)N、(ここで、N=1~10)の多量体を含む可能性がある。他の実施形態において、ペプチドは、配列番号1、配列番号59、配列番号92、または配列番号94の配列の、場合によって1以上の連結アミ

10

20

30

40

50

ノ酸を介した化合物を含み得る。例えば、一実施形態において、ペプチドは、場合によって1以上の連結アミノ酸（例えばグリシン残基）を介して配列番号94に連結した配列番号1の配列を含む可能性がある。別の実施形態において、ペプチドは、場合によって1以上の連結アミノ酸（例えばグリシン残基）を介して配列番号92に連結した配列番号1の配列を含む可能性がある。

【0059】

ある実施形態では、さらなるN末端ペプチド配列は非天然配列である。本明細書中で用いられる場合、「非天然」配列は、エールリッヒアタンパク質であるかどうかにかかわらず、天然OMP-1ペプチド配列以外の任意のタンパク質配列である。ある実施形態では、さらなるN末端ペプチド配列は、エールリッヒア表面抗原のエピトープを含む。ある実施形態では、さらなるN末端ペプチド配列は、エールリッヒア抗原のエピトープ、例えばp38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3を含む。エールリッヒア抗原に対応するタンパク質およびペプチド配列は記載されている。例えば、米国特許第6,306,402号、第6,355,777号、第7,204,992号、および第7,407,770号、第WO2006/138509号（その内容は、参照により本明細書中に組み込まれる）を参照。他の微生物由来のポリペプチドまたはペプチドも用いることができる。

10

【0060】

ある実施形態では、さらなるN末端ペプチド配列は配列の組み合わせである。例えば、さらなるN末端ペプチド配列は、天然配列、非天然配列、またはそのような配列の任意の組み合わせ（例えば、2以上の天然配列、2以上の非天然配列、もしくは1以上の非天然配列と組み合わせた1以上の天然配列）を含み得る。

20

【0061】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92によって定義される配列を含み、そしてさらなるC末端配列をさらに含む。さらなるC末端ペプチド配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、またはそれ以上のアミノ酸を含み得る。ある実施形態では、さらなるC末端配列は、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、約25～約30、約30～約40、または約40～約50アミノ酸の長さを有する。さらなるC末端ペプチド配列は、天然OMP-1配列であり得る。ある実施形態では、C末端ペプチド配列は、天然に存在するエールリッヒアOMP-1配列の断片である。ペプチド配列は、例えばOMP-1の保存領域または非保存領域由来であり得る。ペプチド配列は、例えば、免疫優性エピトープまたは宿主（例えば、ヒト、イヌなど）免疫系によって認識可能な任意の他のエピトープなどのエピトープを含み得る。ある実施形態では、さらなるC末端ペプチド配列は、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を有する別のペプチドを含む可能性があるか、またはこの配列から構成される可能性がある。例えば、ある実施形態では、本発明のペプチドは、それぞれが配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を有する配列の多量体であり得る。他の実施形態において、天然配列は天然では、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列のC末端に隣接するOMP-1配列である。

30

40

【0062】

ある実施形態では、さらなるC末端ペプチド配列は非天然配列である。ある実施形態では、さらなるC末端ペプチド配列は、OMP-1以外のエールリッヒア表面抗原のエピトープを含む。ある実施形態では、さらなるC末端ペプチド配列は、エールリッヒア抗原のエピトープ、例えばp38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3を含む。他の微生物由来のポリペプチドまたはペプチドも用いることができる。

【0063】

ある実施形態では、さらなるC末端ペプチド配列は配列の組み合わせである。例えば、さらなるC末端ペプチド配列は、天然、非天然配列、またはそのような配列の任意の組み

50

合わせ（例えば、2以上の天然配列、2以上の非天然配列、もしくは1以上の非天然配列と組み合わせた1以上の天然配列）を含み得る。

【0064】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92によって定義される配列を含み、さらなるN末端ペプチド配列およびさらなるC末端ペプチド配列をさらに含む。さらなるN末端およびC末端ペプチド配列は前記の通りであり得る。本発明のペプチドは、完全長OMP-1タンパク質から構成されない。しかし、ある実施形態では、本発明のペプチドは、完全長OMP-1タンパク質を含み得る。他の実施形態において、本発明のペプチドは、完全長OMP-1タンパク質を含まない。

【0065】

さらなるN末端および/またはC末端ペプチド配列を含む本発明のペプチドは、感染後早期（例えば、感染の開始後1~2週間以内）に、エールリツヒア感染を診断するために設計することができる。例えば、ある実施形態では、さらなるN末端および/またはC末端ペプチド配列は、エールリツヒア感染の初期段階と関連する抗原またはエピトープを含む。

【0066】

前記配列に加えて、さらなるN末端およびC末端配列は、イムノアッセイ（例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローイムノアッセイ、凝集アッセイなど）での検出のために本発明のペプチドをより良好に提示するように設計されたフレキシブル配列を含む可能性があるか、またはフレキシブル配列から構成される可能性がある。そのようなフレキシブル配列は、当業者によって容易に同定され得る。

【0067】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、25以上（例えば、26、27、28、29、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、または25以上のアミノ酸残基から構成される。ある実施形態では、本発明のペプチドは、30以上（例えば、31、32、33、34、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、または30以上のアミノ酸残基から構成される。ある実施形態では、本発明のペプチドは、35以上（例えば、36、37、38、39、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、または35以上のアミノ酸残基から構成される。ある実施形態では、本発明のペプチドは、40以上（例えば、41、42、43、44、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、または40以上のアミノ酸残基から構成される。ある実施形態では、本発明のペプチドは、45以上（例えば、46、47、48、49、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、または45以上のアミノ酸残基から構成される。ある実施形態では、本発明のペプチドは、50以上（例えば、51、52、53、54、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、または50以上のアミノ酸残基から構成される。ある実施形態では、本発明のペプチドは、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、またはそれ以上のアミノ酸残基を含むか、またはこれから構成される。

【0068】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、本明細書中に記載されるペプチド配列のエピトープを含む。例えば、ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号7~配列番号22、配列番号27~配列番号94からなる群から選択される配列のエピトープを含む。

【0069】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、本明細書中に記載されるペプチド配列の断片を含む。例えば、ある実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号7~配列番号22、および配列番号27~配列番号94からなる群から選択される配列の断片を含む。断片は、例えば少なくとも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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または44アミノ酸の長さであり得る。断片は連続的であり得るか、また

10

20

30

40

50

は1以上の欠失(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失)を含み得る。ある実施形態では、断片は、米国特許第6,306,402号、第6,355,777号、第7,204,992号、もしくは第7,407,770号、または第WO2006/138509号に記載されている配列を含む。ある実施形態では、断片は、米国特許第6,306,402号、第6,355,777号、第7,204,992号、および第7,407,770号、ならびに第WO2006/138509号の1以上で記載される配列から構成されない。本明細書中に記載されるペプチド配列の断片を含む本発明のペプチドは、さらなるN末端ペプチド配列、さらなるC末端ペプチド配列、またはそれらの組み合わせをさらに含み得る。さらなるN末端およびC末端ペプチド配列は前記のとおりであり得る。

10

【0070】

さらなるN末端またはC末端ペプチド配列を含む本発明のペプチドは、ペプチド(例えば、配列番号1、配列番号59、配列番号92のペプチド、またはその断片)をさらなるN末端もしくはC末端ペプチド配列と連結するリンカーを更に含み得る。リンカーは、例えばペプチドスペーサーであり得る。そのようなスペーサーは、例えば、約1~5(例えば、約3)個のアミノ酸残基、好ましくは非荷電アミノ酸、例えばグリシンもしくはアラニンなどの脂肪族残基から構成される可能性がある。一実施形態において、スペーサーは、トリプレットグリシンスペーサーである。別の実施形態において、スペーサーはトリプレットアラニンスペーサーである。さらに別の実施形態において、スペーサーはグリシン残基およびアラニン残基の両方を含む。あるいは、リンカーは、化学(すなわち非ペプチド)リンカーであり得る。

20

【0071】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、合成化学によって産生される(すなわち、「合成ペプチド」)。他の実施形態において、本発明のペプチドは生物学的に(すなわち、リボソームなどの細胞機構により)産生される。ある実施形態では、本発明のペプチドは単離される。本明細書中で用いられる場合、「単離された」ペプチドは、合成的または生物学的のいずれかで産生され、次いでペプチドを産生するために使用される化学物質および/または細胞機構から、少なくとも部分的に精製されたペプチドである。ある実施形態では、本発明の単離されたペプチドは実質的に精製される。「実質的に精製された」という用語は、本明細書中で用いられる場合、細胞物質(タンパク質、脂質、炭水化物、核酸など)、培地、化学前駆体、ペプチドの合成で使用される化学物質、またはそれらの組み合わせが実質的にない、ペプチドなどの分子を指す。実質的に精製されたペプチドは、約40%未満、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%以下のペプチドの合成で用いられる細胞物質、培地、他のポリペプチド、化学前駆体、および/または化学物質を有する。したがって、実質的に純粋なペプチドなどの分子は、対象の分子の少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%(乾燥重量規準)であり得る。本発明の単離されたペプチドは、例えばキットの一部として再構成のために準備されている、水、緩衝液の中、または乾燥形態であり得る。本発明の単離されたペプチドは、薬剂的に許容される塩の形態であり得る。本発明のペプチドと塩を形成することができる好適な酸および塩基は、当業者に周知であり、無機および有機酸および塩基を含む。

30

40

【0072】

ある実施形態では、本発明のペプチドはアフィニティー精製される。例えば、ある実施形態では、本発明のペプチドは、それらが抗エールリッヒア抗体(例えば、OMP-1タンパク質および、場合によって他のエールリッヒア抗原に対する抗体)と結合する能力を利用して、そのような抗体を本発明のペプチドと接触させて、ペプチド-抗体複合体が形成され得るようにし、このペプチド-抗体複合体を洗浄して不純物を除去し、次いでペプチドを抗体から溶出させることにより精製される。抗体を、例えば固体支持体に付着させることができる。アフィニティー精製の方法は、当業者に周知であり、日常的である。

【0073】

50

ある実施形態では、本発明のペプチドを修飾する。本発明のペプチドは、熱および/または洗浄剤（例えば、SDS）での変性によるなど、種々の技術により修飾することができる。あるいは、本発明のペプチドを、1以上のさらなる部分との会合により修飾することができる。会合は共有または非共有であり得、そして、例えば、リシンもしくはシステインなどの末端アミノ酸リンカー、化学カップリング剤、またはペプチド結合によるものであり得る。さらなる部分は、例えば、リガンド、リガンド受容体、融合パートナー、検出可能な標識、酵素、またはペプチドを固定化する基質であり得る。

【0074】

本発明のペプチドを、リガンド、例えばビオチン（例えば、システインもしくはリシン残基による）、脂質分子（例えば、システイン残基による）、またはキャリアタンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリンFcドメイン（例えば、システインまたはリシン残基による））に結合させることができる。ビオチンなどのリガンドとの結合は、ペプチドをリガンド受容体、例えばアビジン、ストレプトアビジン、ポリマーストレプトアビジン（例えば、US2010/0081125およびUS2010/0267166（どちらも参照により本明細書中に組み込まれる）参照）、またはニュートラビジンと会合させるために有用であり得る。アビジン、ストレプトアビジン、ポリマーストレプトアビジン、またはニュートラビジンを、次に、シグナリング部分（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）もしくはアルカリホスファターゼなどの酵素、またはコロイド状金もしくは蛍光部分などの可視化できる他の部分）あるいは固体基質（例えば、Immobilon（商標）またはニトロセルロース膜）に結合させることができる。あるいは、本発明のペプチドをアビジン、ストレプトアビジン、ポリマーストレプトアビジン、またはニュートラビジンなどのリガンド受容体と融合または連結させ、それによりペプチドと対応するリガンド、例えばビオチンおよびそれに結合した任意の部分（例えば、シグナリング部分）または固体基質との会合を促進することができる。他のリガンド-受容体対の例は、当該技術分野で周知であり、同様に用いることができる。

【0075】

本発明のペプチドを、精製の改善、宿主細胞におけるペプチドの発現の増強、検出の支援、ペプチドの安定化などのために使用することができる融合パートナー（例えば、ペプチドまたは他の部分）に融合させることができる。融合パートナーに好適な化合物の例としては、キャリアタンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリンFcドメイン）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、ベータ-ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジントグなどを挙げることができる。融合は、例えばペプチド結合によって達成することができる。例えば、本発明のペプチドおよび融合パートナーは融合タンパク質であり得、さらなるN末端およびC末端ペプチド配列に関連して前述したように、インフレームで直接融合させることができるか、またはペプチドリンカーを含むことができる。

【0076】

加えて、本発明のペプチドは、種々の既知化学基または分子のいずれかを含むように修飾することができる。そのような修飾としては、グリコシル化、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ポリエチレングリコールに対する共有結合（例えば、ペグ化）、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、ユビキチン化、脂肪酸での修飾、アルギニル化などのトランスファーRNAにより媒介されたアミノ酸のタンパク質への付加などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。アミノ酸（非天然アミノ酸を含む）の類似体および置換結合を有するペプチドも含まれる。本明細書中で検討される配列のいずれかから構成される本発明のペプチドは、検討される

10

20

30

40

50

修飾のいずれかにより修飾することができる。そのようなペプチドもやはりアミノ酸から「構成される」。

【0077】

前述の修飾は当業者に周知であり、科学文献で非常に詳細に記載されている。いくつかの特に一般的な修飾、例えば、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化は、例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993)などの多くの基本的なテキストに記載されている。World, F., Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983); Seifter et al. (1990) Meth. Enzymol. 182: 626-646およびRattan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62など、このテーマに関して多くの詳細な総説が入手可能である。

10

【0078】

ある実施形態では、本発明のペプチドは、固体または半固体支持体などの基質に付着しているか、または基質上に固定化されている。結合は、共有または非共有であり得、共有または非共有結合を可能にするペプチド、例えば担体、支持体または表面に付着している成分に対して高親和性を有する部分と結合する部分により促進される可能性がある。例えば、ペプチドは、ビオチンなどのリガンドと結合する可能性があり、そして、表面と関連する成分は、アビジンなどの対応するリガンド受容体であり得る。ペプチドは、イムノアッセイ中に抗体を含む試料を添加する前もしくは添加後のいずれかに、基質に付着させることができるか、または基質上に固定化することができる。

20

【0079】

ある実施形態では、基質は、ビーズ、例えばコロイド粒子（例えば、金、銀、白金、銅、金属複合体、他の軟質金属、コア・シェル構造粒子、もしくは中空金ナノスフェアから作製されたコロイド状ナノ粒子）または他の種類の粒子（例えば、磁気ビーズあるいはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、もしくはPVDを含有する粒子またはナノ粒子）である。そのような粒子は、標識（例えば、比色用、化学発光、または蛍光標識）を含む可能性があり、イムノアッセイ中にペプチドの位置を可視化するために有用であり得る。ある実施形態では、本発明のペプチドの末端システインを用いて、ペプチドを金、銀、白金、銅、金属複合体、他の軟質金属などから作製されたナノ粒子に直接結合させる。

30

【0080】

ある実施形態では、基質は、ドットプロットまたはラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路である。例えば、ペプチドを、PVD膜（例えば、Immobilon（商標）膜）、ニトロセルロース膜、ポリエチレン膜、ナイロン膜、または類似の種類の膜などの多孔質膜に付着させるか、または多孔質膜上に固定化することができる。

40

【0081】

ある実施形態では、基質は分析ローター中の流路である。他の実施形態において、基質は、管もしくはウェル、例えば、ELISAアッセイでの使用に好適なプレート（例えば、マイクロタイプレート）中のウェルである。そのような基質は、ガラス、セルロース系材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、もしくはポリエステルなどの熱可塑性ポリマー、粒子状物質から構成される焼結構造（例えば、ガラスまたは種々の熱可塑性ポリマー）、またはニトロセルロース、ナイロン、ポリスルホンなどから構成されるキャスト膜フィルムを含み得る。基質は、通常、多孔性ポリエチレンとして知られるポリエチレンの焼結微粒子、例えば、Chromex Corporation（ニューメキシコ州アルバカーキ）製の0.2~15ミクロンの多孔性ポリエチレンであり得る。これらの基質材料

50

はすべて、フィルム、シート、もしくはプレートなどの好適な形状で使用することができるか、あるいはそれらを、紙、ガラス、プラスチックフィルム、もしくは織物などの適切な不活性担体にコーティングまたは接着または積層することができる。ペプチドを固相上に固定化するための好適な方法としては、イオン性、疎水性、共有結合性相互作用などが挙げられる。

【0082】

したがって、別の態様において、本発明は装置を提供する。ある実施形態では、装置はイムノアッセイを実施するために有用である。例えば、ある実施形態では、装置はラテラルフローイムノアッセイ装置である。他の実施形態において、装置は分析ローターである。他の実施形態において、装置はドットプロットである。他の実施形態において、装置は、例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中の管またはウェルである。さらに他の実施形態では、装置は、電気化学的センサー、光学的センサー、または光電式センサーである。

10

【0083】

ある実施形態では、装置は本発明のペプチドを含む。他の実施形態において、装置は、異なる本発明のペプチドの混合物を含む。例えば、ある実施形態では、装置は、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ある実施形態では、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、配列番号1、配列番号59または配列番号92の配列を含む。他の実施形態において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは配列番号1の配列を含む。ある実施形態では、ペプチドは装置に付着しているかまたは装置上に固定化されている。

20

【0084】

別の態様において、本発明は、1以上の本発明のペプチドを含む組成物を提供する。例えば、ある実施形態では、本発明は、配列番号1の配列を含むペプチド、またはその混合物を含む組成物を提供する。ある実施形態では、組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、またはそれ以上のペプチド（例えば、配列番号1によって定義されるすべての可能なペプチド）の混合物を含む。ある実施形態では、ペプチドは、本明細書中で記載されるように、N末端および/またはC末端付加を含み、および/または（例えば、1以上のさらなる部分との会合により）修飾される。ある実施形態では、ペプチドは、同じN末端および/またはC末端付加を含む。他の実施形態において、ペプチドは、異なるN末端および/またはC末端付加を含む。さらに他の実施形態では、本発明は、配列番号59もしくは配列番号92の配列を含むペプチド、またはその混合物を含む組成物を提供する。ある実施形態では、組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、またはそれ以上のペプチド（例えば、配列番号59または配列番号92により定義されるすべての可能なペプチド）の混合物を含む。

30

【0085】

ある実施形態では、当該組成物は、1以上の本発明のペプチドおよび1以上のさらなるペプチド、例えばエールリッヒアペプチドもしくは抗原、1以上の感染性エールリッヒア種由来のペプチドもしくは抗原、または単球性エールリッヒア症の1以上の原因物質由来のペプチドもしくは抗原を含む。エールリッヒアペプチドまたは抗原は、任意のエールリッヒア表面ペプチドもしくは抗原、または本明細書中に記載される任意のペプチドもしくは抗原（例えば、OMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3タンパク質の任意のペプチドもしくは抗原、またはその任意の断片もしくはエピトープであり得る。組み合わせは、個々のペプチドもしくはポリペプチドのカクテル（単純混合物）を含み得、融合ペプチドまたはポリペプチド（例えば、多量体ペプチド）の形態であり得るか、またはペプチドは dendrimer（例えば、MAPS構造においてと同様）により連結され

40

50

る可能性がある。本発明のペプチドを、そのN末端またはC末端で別の好適なペプチドに融合させることができる。2コピー以上の本発明のペプチドを、単独で、または1以上のさらなるペプチドと組み合わせて、互いに結合させることができる。融合および非融合ペプチドまたはポリペプチドの組み合わせを用いることができる。一実施形態において、さらなるペプチドは、エールリッヒアペプチドもしくは抗原由来のB細胞および/またはT細胞エピトープ、感染性エールリッヒア種由来のペプチドもしくは抗原、あるいは単球性エールリッヒア症の原因物質由来のペプチドもしくは抗原を含む。

【0086】

別の態様において、本発明は、本発明のペプチドをコード化する配列を含む核酸を提供する。本発明の核酸は全微生物ゲノムよりも少ないゲノムを含み、1本鎖または2本鎖であり得る。核酸は、RNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学的に合成されたRNAもしくはDNAまたはそれらの組み合わせであり得る。核酸は、タンパク質、脂質、および他のポリヌクレオチドなどの他の成分を含まないように精製することができる。例えば、核酸は、50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%精製することができる。本発明の核酸は本明細書中に記載されるペプチドをコード化する。ある実施形態では、核酸は、配列番号1、配列番号7~22、もしくは配列番号27~94の配列、またはその組み合わせを有するペプチドをコード化する。本発明の核酸は、他のヌクレオチド配列、例えばリンカーをコードする配列、シグナル配列、TMRストップトランスファー配列、膜貫通ドメイン、またはタンパク質精製で有用なりガンド、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、およびブドウ球菌プロテインAを含む可能性がある。

10

20

【0087】

本発明の核酸を単離することができる。「単離された」核酸は、天然では関連する5'および3'フランキングゲノム配列の一方または両方と直接隣接しないものである。単離された核酸は、例えば、任意の長さの組換えDNA分子であり得る。ただし、天然では、天然に存在するゲノム中の組換えDNA分子に直接隣接して見いだされる核酸配列が除去されているかまたは存在しないものとする。単離された核酸は、天然に存在しない核酸分子も含む。本発明の核酸は、免疫原性ペプチドをコード化する断片も含み得る。本発明の核酸は、完全長ポリペプチド、ペプチド断片、および変異体または融合ペプチドをコード化することができる。

30

【0088】

本発明の核酸を、少なくとも一部では、例えば、感染した個体からの血液、血清、唾液、または組織などの生物試料中に存在する核酸配列から単離することができる。核酸は、例えば、自動合成装置を用いて、実験室で合成することもできる。PCRなどの増幅法を用いて、核酸を、少なくとも一部では、ポリペプチドをコード化するゲノムDNAまたはcDNAのいずれかから増幅することができる。

【0089】

本発明の核酸は、天然に存在するポリペプチドのコーディング配列を含み得るか、または天然に存在しない改変された配列をコード化することができる。所望により、核酸を、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、または宿主細胞において本発明のポリヌクレオチドの発現を引き起こす他の調節エレメントをはじめとする発現制御エレメントを含む発現ベクター中にクローンすることができる。発現ベクターは、例えば、pBR322、pUC、もしくはColE1などのプラスミド、またはアデノウイルス2型ベクターもしくは5型ベクターなどのアデノウイルスベクターであり得る。場合によって、これらに限定されるものではないが、シンドビスウイルス、シミアンウイルス40、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ならびにサイトメガロウイルスおよびレトロウイルスベクター、例えばネズミ肉腫ウイルス、マウス乳ガンウイルス、モロニーネズミ白血病ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスをはじめとする他のベクターを用いることができる。ミニ染色体、例えばMCおよびMC1、バクテリオファージ、ファージミド、酵母人工染色体、細菌人工染色体、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、コスミド(ファー

40

50

ジラムダcos部位が挿入されているプラスミド)およびレプリコン(細胞中で自身の制御下で複製できる遺伝因子)も用いることができる。

【0090】

発現制御配列に機能的に連結されたポリヌクレオチドを調製し、宿主細胞においてそれらを発現する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、米国特許第4,366,246号を参照。ポリヌクレオチドの転写および/または翻訳を引き起こす1以上の発現制御エレメントに隣接または近接した位置にある場合に、本発明の核酸は機能的に連結される。

【0091】

したがって、例えば、本発明のペプチドを、通常の遺伝子操作技術にしたがって組換え的に産生することができる。本発明の組換えペプチドを産生するために、ペプチドをコード化する核酸を好適な発現系に挿入する。一般的に、選択されたペプチドをコード化するポリヌクレオチド配列が発現制御配列に機能的に連結されて、当該ペプチドの発現が可能になる、組換え分子またはベクターが構築される。例えば、細菌、ウイルス、酵母、真菌、昆虫またはほ乳動物発現系を含むベクターをはじめとする多種の適切な発現ベクターが当該技術分野で公知である。そのような発現ベクターを得る方法および使用方法は周知である。本発明の組成物または方法について用いられるこれらの分子生物学技術のガイドンスについては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, current edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298 (Plenum Press, current edition)、Wu et al., Methods in Gene Biotechnology (CRC Press, New York, N.Y., current edition), Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, N.J., current edition)、および Current Protocols in Molecular Biology, (Ausabel et al, Eds.,) John Wiley & Sons, NY (current edition)、ならびにそれらの引用文献を参照。

【0092】

したがって、本発明は、本発明の核酸を含むベクター、およびそのようなベクターを含む宿主細胞も提供する。ある実施形態では、ベクターはシャトルベクターである。他の実施形態において、ベクターは、発現ベクター(例えば、細菌または真核生物発現ベクター)である。ある実施形態では、宿主細胞は細菌細胞である。他の実施形態において、宿主細胞は真核生物細胞である。

【0093】

この方法による本発明のトランスフェクションの組換え核酸またはベクターに好適な宿主細胞または細胞系には細菌細胞が含まれる。例えば、大腸菌(E. coli)の種々の株(例えば、HB101、MC1061)がバイオテクノロジーの分野で宿主細胞として周知である。枯草菌(B. subtilis)、シュードモナス属(Pseudomonas)、ストレプトマイセス属(Streptomyces)、および他の桿菌などの種々の株もこの方法で用いることができる。あるいは、本発明のペプチドは、通常の手順を用いて、酵母、昆虫、ほ乳動物、または他の細胞型で発現することができる。

【0094】

本発明は、組換えペプチドまたはポリペプチドを産生するための方法であって、例えば、エレクトロポレーションなどの通常的手段により、本発明のポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現ベクターで、発現制御配列(例えば、転写調節配列)の制御下で宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換する工程を含む方法も提供する。トランスフェク

10

20

30

40

50

トまたは形質転換された宿主細胞を次いで、ペプチドまたはポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養する。発現されたペプチドまたはポリペプチドは、細胞から（または細胞外で発現される場合は培地から）、HPLC、FPLCなどを用いた順相もしくは逆相などの液体クロマトグラフィー、無機リガンドまたはモノクローナル抗体などを用いたアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、固定化金属キレートクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などをはじめとする当業者に公知の適切な手段により、回収、単離、そして場合により精製される。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、最も適切な単離および精製技術を選択することができる。当業者は、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、キャピラリー電気泳動、カラムクロマトグラフィー（例えば、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC））、または

10

【0095】

方法

別の態様において、本発明は、試料においてエールリッヒア抗原のエピトープに対する抗体を検出する方法を提供する。ある実施形態では、当該方法は、試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および、該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、該試料中のエールリッヒア抗原のエピトープに対する抗体の存在を表す工程を含む。ある実施形態では、エールリッヒア抗原は感染性エールリッヒア種由来である。ある実施形態では、エールリッヒア抗原は、エールリッヒア・シャ

20

【0096】

ある実施形態では、当該方法は、試料を、2、3、4、またはそれ以上（例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、またはそれ以上）の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。ある実施形態では、当該方法は、試料を、1以上の本発明のペプチドおよび1以上の他のペプチド（例えば、エールリッヒアペプチド、またはその抗原断片もしくはエピトープ、例えばエールリッヒア表面抗原、またはOMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3タンパク質）の混合物と接触させる工程を含む。

30

【0097】

ある実施形態では、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。ある実施形態では、ペプチドまたはペプチドの混合物は、固体支持体に付着しているか、または固体支持体上に固定化されている。ある実施形態では、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズなど）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析ローター中の流路、管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中）、またはセンサー（例えば、電気化学的、光学的、もしくは光電式センサー）である。

40

【0098】

ある実施形態では、検出工程はELISAアッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、ラテラルフローイムノアッセイを実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、凝集アッセイ（例えば、血球凝集または粒子/ビーズ凝集アッセイ）を実施することを含む。他の実施形態において、検出工程は、分析ローター中で試料をスピンさせることを含む。さらに他の実施形態では、検出工程は、試料を電気化

50

学的、光学的、もしくは光電式センサーで分析することを含む。

【0099】

本発明のペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出するための様々な通常のアッセイがある。例えば、検出工程は、ELISAアッセイを実施すること、ラテラルフローイムノアッセイを実施すること、凝集アッセイを実施すること、分析ローター中の試料を分析すること、または試料を電気化学的、光学的、もしくは光電式センサーで分析することを含み得る。これらの異なるアッセイは前述され、および/または当業者に周知である。

【0100】

一実施形態では、当該方法は、感染した対象の免疫系によりその生体液組織中で産生され、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび、場合によって、1以上の好適なさらなる抗原性ポリペプチドまたはペプチドの組み合わせに対して特異的に結合することができる、エールリツヒア抗原（例えば、E・シャフェンシスまたはE・カニスなどの病原性エールリツヒアの抗原）に対する天然に存在する抗体の存在を検出する工程を含む。

10

【0101】

好適なイムノアッセイ法は、典型的には：（例えば、患者から）抗体を含む可能性がある体液もしくは組織の試料を受け取るかまたは入手すること；分析される試料を本発明のペプチドと、特異的ペプチド - 抗体複合体の形成に（例えば、ペプチドの抗体に対する特異的結合のために）有効な条件下、接触（例えば、インキュベートまたは反応）させること；および接触（反応）させた試料を抗体 - ペプチド反応の存在について分析すること（例えば、抗体 - ペプチド複合体の量を測定すること）を含む。多量の抗体 - ペプチド複合体の存在は、対象が感染性エールリツヒア種にさらされ、感染性エールリツヒア種に感染したことを示す。エールリツヒア抗原に対する抗体に対して「特異的に結合する」（例えば、「特異的である」かまたは「優先的に」結合する）ペプチド（その修飾された形態を含む）は、抗体と相互作用するか、または抗体の検出を可能にするために十分な量および時間で抗体と物理的結合を形成するかもしれない物理的に結合される。「特異的に」または「優先的に」という用語により、ペプチドが、そのような抗体について、試料中の他の抗体よりも高い親和性（例えば、より高度の選択性）を有することを意味する。例えば、ペプチドはその抗体について、試料中の他の抗体についてよりも少なくとも約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、またはそれ以上高い親和性を有する可能性がある。そのような親和性または特異性の程度は、例えば、競合的結合研究をはじめとする種々の通常の手続きによって決定することができる。ELISAアッセイでは、陽性反応は、健常対照群の平均値よりも2または3標準偏差高い値として定義される。いくつかの実施形態において、単球性エールリツヒア症の明確な血清学的診断を提供するためには、第2段アッセイが必要である。

20

30

【0102】

「抗体を含む試料」または「試料中の抗体を検出する」などの言い回しは、抗体が含まれないかまたは検出されない試料または定量（例えば、検出未遂）を除外することを意味しない。一般的な意味で、本発明は、感染性エールリツヒアでの感染に反応して産生される抗体が試料中に存在するかどうかを、それが検出されるかどうかにかかわらず決定するためのアッセイを含む。

40

【0103】

ペプチドおよび抗体が特異的に反応するようにするためのペプチドおよび抗体の反応条件は、当業者に周知である。例えば、Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc)を参照。

【0104】

当該方法は、抗体を含む可能性がある体液または組織の試料を対象から受け取るかまたは入手する工程を含む。抗体は、例えば、IgG、IgE、IgD、IgM、またはIgA型のものであり得る。一般的に、IgMおよび/またはIgA抗体は、例えば、感染の

50

初期段階での検出に関して検出される。前述のさらなるペプチドのいくつかが当該方法で用いられる場合に I g G 抗体を検出することができる（例えば、鞭毛タンパク質の検出のためのペプチド）。試料は、好ましくは、入手が容易であり、静脈血試料もしくはさらには指穿刺から得られる全血、血漿、または血清であってよい。他の身体部位由来の組織または脳脊髄液（CSF）、唾液、胃液、粘液、尿などの他の体液は、抗体を含むことが知られており、試料源として用いることができる。

【0105】

ペプチド抗原および試料抗体が好適な培地中で反応することが許容されたら、アッセイを実施して、抗体 - ペプチド反応の有無を決定する。当業者には明らかなように、多くの種類の好適なアッセイには、免疫沈降および凝集アッセイが含まれる。

10

【0106】

本発明のある実施形態において、アッセイは、試料中の抗体を固定化する工程；本発明のペプチドを添加する工程；および、例えば、標識されるペプチドにより、あるいは標識された結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン - HRP もしくはストレプトアビジン - コロイド状金複合体）またはペプチドを特異的に認識する標識された抗体などの標識された物質を添加することにより、ペプチドに結合した抗体の程度を検出する工程を含む。例えば、図1を参照。他の実施形態において、アッセイは、本発明のペプチドを固定化する工程；抗体を含む試料を添加する工程；および、例えば、標識（例えば、コロイド状金複合体、蛍光標識、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ））に直接または間接的に結合した本発明の別のペプチドを添加することによるか、または結合パートナーもしくは試料抗体（例えば、抗ヒト I g G 抗体、抗ヒト I g M 抗体、抗イヌ I g G 抗体、抗イヌ I g M 抗体、タンパク質 A、タンパク質 G、タンパク質 L、またはそれらの組み合わせなど）を特異的に認識する標識された抗体などの標識された物質を添加することにより、ペプチドに結合した抗体の量を検出する工程を含む。例えば、図3を参照。さらに他の実施形態では、アッセイは、反応物質のいずれも固定化することなく、ペプチドと抗体を含む試料とを反応させる工程、および次いで例えば、標識されるペプチドによるか、あるいは標識された結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン - HRP もしくはストレプトアビジン - コロイド状金複合体）またはペプチドを特異的に認識する標識された抗体などの標識された物質を添加することにより、抗体およびペプチドの複合体の量を検出する工程を含む。

20

30

【0107】

本発明のペプチドの固定化は、共有的または非共有的のいずれかであり得、非共有的固定化は非特異的（例えば、例えば、マイクロタイターウェル中のポリスチレン表面に対する非特異的結合）であり得る。固体もしくは半固体担体、支持体または表面に対する特異的または半特異的結合は、固体もしくは半固体担体、支持体または表面に対するその共有または非共有結合を可能にする部分が結合しているペプチドにより達成することができる。例えば、この部分は、担体、支持体または表面に付着している成分に対する親和性を有する可能性がある。この場合、この部分は、例えば、6 - アミノヘキサ酸などのペプチドのアミノ酸基に結合したビオチンもしくはビオチニル基またはその類似体であり得、成分はその場合アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン、またはその類似体である。別の可能性は、この部分が、アミノ酸配列 His - His - His - His - His - His（配列番号95）を有し、担体が Ni⁺⁺ または Co⁺⁺ イオンで荷電したニトリロトリ酢酸（NTA）誘導体を含む状況である。好適な担体、支持体、および表面としては、これらに限定されるものではないが、ビーズ（例えば、磁気ビーズ、コロイド粒子またはナノ粒子、例えばコロイド状金、またはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、もしくは PDVF を含む粒子もしくはナノ粒子）、スチレン - ジビニルベンゼン、ヒドロキシル化スチレン - ジビニルベンゼンなどのコポリマーのラテックス、ポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、カーボンブラックのビーズ、非活性化またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル活性化ガラス、エポキシ - 活性化多孔性磁性ガラス、ゼラチンまたは多糖粒子または他のタンパク質粒子、赤血球、モノクローナル抗体もし

40

50

くはポリクローナル抗体またはそのような抗体の F a b 断片が挙げられる。

【0108】

特異的抗体の検出用抗原を用いたイムノアッセイのプロトコルは、当該技術分野で周知である。例えば、通常のサンドイッチアッセイを用いることができるか、または通常の競合アッセイ形式を用いることができる。いくつかの好適な種類のアッセイの考察については、Current Protocols in Immunology (上記)を参照。ある実施形態では、本発明のペプチドは、抗体を含む試料の添加前または添加後のいずれかに、共有または非共有結合により、固体もしくは半固体表面または担体上に固定化される。

【0109】

特異的結合アッセイ、特にイムノアッセイを実施する装置は、公知であり、本発明の方法での使用のために容易に適応させることができる。固相アッセイは、一般的に、沈殿、遠心分離、ろ過、クロマトグラフィー、または磁気などの分離工程を必要とする不均一アッセイ法よりも実施するのが容易である。なぜなら、試薬の分離がより速く、より簡単であるからである。固相アッセイ装置としては、マイクロタイタープレート、フロースルーアッセイ装置 (例えば、ラテラルフローイムノアッセイ装置)、計深棒、およびイムノキャピラリーまたはイムノクロマトグラフィーイムノアッセイ装置が挙げられる。

【0110】

本発明の実施形態において、固体もしくは半固体表面または担体は、マイクロタイターウェル中の底もしくは壁、フィルター表面または膜 (例えば、ニトロセルロース膜もしくは P V D F (ポリフッ化ビニリデン)膜、例えば Immobilon (商標)膜) 中空繊維、ビーズ状クロマトグラフィー媒体 (例えば、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル)、磁気ビーズ、繊維状セルロースマトリックス、H P L Cマトリックス、F P L Cマトリックス、ペプチドが結合した分子が、液相中に溶解または分散された場合、フィルターにより保持され得るようなサイズの分子を有する物質、ミセルを形成できるか、またはミセルの形成に関与して、ミセルを連行することなく液相の変更もしくは交換を可能にする物質、水溶性ポリマー、または任意の他の好適な担体、支持体もしくは表面である。

【0111】

本発明のいくつかの実施形態において、ペプチドは検出を可能にする好適な標識を備えている。単独または他の組成物もしくは化合物と共同して、検出可能なシグナルを提供できる通常の標識を用いることができる。好適な標識としては、これらに限定されるものではないが、酵素 (例えば、H R P、ベータ-ガラクトシダーゼなど)、蛍光標識、放射性標識、および金属結合標識 (例えば、コロイド状金結合標識) が挙げられる。好適な検出方法としては、例えば、(例えば、H R Pまたはベータ-ガラクトシダーゼ活性の検出のために) 比色用アッセイで直接的もしくは間接的に標識された作用物質の検出、光学顕微鏡検査法、免疫蛍光顕微鏡検査法、例えば共焦点顕微鏡法を用いるか、またはフローサイトメトリー (F A C S)、オートラジオグラフィー (例えば、放射標識された化学物質の検出のため)、電子顕微鏡法、免疫染色、細胞下分画などによる視覚的検査が挙げられる。一実施形態において、放射性元素 (例えば、放射性アミノ酸) をペプチド鎖中に直接組み入れ; 別の実施形態では、蛍光標識を、ビオチン/アビジン相互作用、フルオレセイン結合抗体との結合などによりペプチドと結合させる。一実施形態において、抗体の検出可能な特異的結合パートナーを混合物に添加する。例えば、結合パートナーは、第1の抗体と結合する検出可能な二次抗体または他の結合剤 (例えば、タンパク質 A、タンパク質 G、タンパク質 L) であり得る。この二次抗体または他の結合剤は、例えば、放射性、酵素、蛍光、発光、または他の検出可能な標識、例えばアビジン/ビオチン系で標識することができる。別の実施形態において、結合パートナーは、直接的または間接的に (例えばビオチン/アビジン相互作用により) 酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼに結合させることができる本発明のペプチドである。そのような実施形態では、検出可能なシグナルは、検出可能なシグナルを産生する酵素の基質、例えば発色性、蛍光発生、または化学発光基質を添加することにより産生される。

10

20

30

40

50

【0112】

結合したペプチドを検出するための「検出系」は、本明細書中で用いられる場合、ペプチドに特異的な抗体などの検出可能な結合パートナーを含み得る。一実施形態において、結合パートナーは直接的に標識される。別の実施形態において、結合パートナーは、好適な基質の存在下で検出可能なシグナルを産生できる酵素などのシグナル生成試薬と結合させる。ペプチドを固定化するための表面は、場合によって検出系を伴っていてもよい。

【0113】

本発明の実施形態において、検出手順は、変色について抗体 - ペプチド複合体を目視検査するか、または物理化学的变化について抗体 - ペプチド複合体を検査することを含む。物理化学的变化は、酸化反応または他の化学反応とともに起こり得る。それらは、分光光度計等を用いて目で検出することができる。

10

【0114】

特に有用なアッセイ形式は、ラテラルフローイムノアッセイ形式である。ヒトもしくは動物（例えば、イヌ、マウス、シカなど）免疫グロブリン、または *staph A*、*G*、もしくは *L* タンパク質に対する抗体を、乾燥し、ガラス繊維パッド（試料アプリケーションパッドまたは結合体パッド）上に配置されたシグナルジェネレーターまたはレポーター（例えば、コロイド状金）で標識することができる。診断ペプチドをニトロセルロースまたは *PVDF*（ポリフッ化ビニリデン）膜（例えば、*Immobilon*（商標）膜）などの膜上に固定化する。試料（血液、血清など）の溶液を試料アプリケーションパッド上に施用する（または結合体パッド中に流す）場合、これは標識されたレポーターを溶解し、これは次に試料中の全抗体と結合する。結果として得られる複合体は次いで、次の膜（診断ペプチドを含む *PVDF* またはニトロセルロース）中に毛管作用により輸送される。診断ペプチドに対する抗体が存在するならば、それらは膜上の縞状の診断ペプチドと結合し、それによりシグナル（例えば、見ることができるかまたは可視化することができるバンド）を生成する。標識された抗体または第2の標識された抗体に対して特異的なさらなる抗体を用いて、対照シグナルを産生することができる。このアッセイ形式に関する変形として、試料中の抗体が診断ストリップ上のペプチドへと移動し、このペプチドと結合することを可能にする方法で試料アプリケーションパッド上に試料を施用し、第2の「展開」液を試料アプリケーションパッドに添加することができる。この場合、この展開液は標識されたレポーターを含む（または、例えば試料アプリケーションパッドもしくは結合体パッド中に存在する標識されたレポーターを可溶化する）。展開液は次いで、毛管作用により、標識されたレポーターを診断ストリップへと運び、ここで、標識されたレポーターは、診断ストリップに位置するペプチドと結合した任意の試料抗体を結合することができる。

20

30

【0115】

ラテラルフローイムノアッセイの別の形式は、リガンド（例えば、ビオチン）と結合し、標識されたリガンド受容体（例えば、ストレプトアビジン - コロイド状金）と複合体形成した本発明のペプチドまたは組成物を含む。標識されたペプチド複合体を試料アプリケーションパッドまたは結合体パッド上に配置することができる。抗ヒト *IgG* / *IgM* または抗動物（例えば、イヌ、マウス、シカ）*IgG* / *IgM* 抗体または他の本発明のペプチドを *PVDF* のニトロセルロースなどの膜上に、試験部位（例えば、試験ライン）で固定化する。試料を試料アプリケーションパッドに添加する場合、試料中の抗体は標識されたペプチド複合体と反応するので、本発明のペプチドと結合する抗体が間接的に標識されるようになる。試料中の抗体は次いで毛管作用により次の膜（診断ペプチドを含む *PVDF* またはニトロセルロース）中へ輸送され、固定化された抗ヒト *IgG* / *IgM* または抗動物 *IgG* / *IgM* 抗体（またはタンパク質 *A*、タンパク質 *G*、タンパク質 *L*、もしくはそれらの組み合わせ）または固定化された本発明のペプチドと結合する。試料抗体のいずれかが標識された本発明のペプチドと結合するならば、ペプチドと結合した標識は、試験部位で見ることができるか、または可視化することができる。この種のラテラルフロー装置の一実施形態を図2に示す。試験部位で固定化された捕捉剤として、かつ試料中の抗体と反応するための可溶性の標識された複合体として本発明のペプチドが用いられるこの種

40

50

のラテラルフロー装置の別の実施形態を図3に示す。このアッセイに好適な対照としては、例えば、試料アプリケーションパッドまたは結合体パッドに位置するニワトリIgY-コロイド状金結合体、および試験部位の近くに位置する対照部位で固定化された抗ニワトリIgY抗体を挙げることができる。この形式は、「展開」液を含むように変更することもできる。例えば、展開液は、標識されたリガンド受容体を含む（または可溶化する）ことができる。

【0116】

血液製剤または他の生理液もしくは生体液をスクリーニングするための別のアッセイは、酵素結合免疫吸着測定法、すなわちELISAである。ELISAで典型的には、本発明の単離されたペプチドまたは組成物は、直接または捕捉マトリックス（例えば、抗体）を介してマイクロタイターウェルの表面に吸着される。表面上の残存する非特異的タンパク質結合部位を次いで、ウシ血清アルブミン（BSA）、熱失活した正常ヤギ血清（NGS）、またはBLOTTO（防腐剤、塩、および消泡剤も含む脱脂粉乳の緩衝液）などの適切な作用物質でブロックする。ウェルを次いで特異的抗エールリッヒア（例えば、抗E・シャフェンシスまたは抗E・カニス）抗体を含むと推測される生物試料とともにインキュベートする。試料をそのまま適用することができるか、または、通常、少量（0.1から5.0重量%）のタンパク質、例えばBSA、NGS、またはBLOTTOを含む緩衝液中で希釈できることが多い。特異的結合が起こるために十分な時間インキュベートした後、ウェルを洗浄して、非結合タンパク質を除去し、次いで最適濃度の適切な抗免疫グロブリン抗体（例えば、ヒト対象については、イヌ、マウス、ウシなどの別の動物由来の抗ヒト免疫グロブリン（HuIg））または標準的手続により酵素もしくは他の標識に結合させ、ブロッキング緩衝液中に溶解させた本発明の別のペプチドとともにインキュベートする。標識は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、ベータ-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどをはじめとする種々の酵素から選択することができる。特異的結合が再度起こるために十分な時間をおき、次いでウェルを再度洗浄して非結合結合体を除去し、酵素に好適な基質を添加する。発色させ、ウェルの内容物の光学密度を目視または機器によって測定する（適切な波長で測定する）。カットオフOD値は、エールリッヒア症が固有でない地域からの個体から集めた少なくとも50の血清試料の平均OD + 3標準偏差（SD）として、または他のそのような通常の定義により定義することができる。非常に特異的なアッセイの場合、OD + 2SDをカットオフ値として用いることができる。

【0117】

ELISAの一実施形態において、本発明のペプチドを、ストレプトアビジンまたは同等のビオチン結合化合物、例えばアビジンもしくはニュートラビジンで、アルカリ性コーティング緩衝液中最適濃度にてコーティングした96ウェルELISAプレートあるいは同等の固相などの表面上に固定化し、4で一晚インキュベートする。標準的な洗浄緩衝液で好適な回数洗浄した後、通常のプロッキング緩衝液中に溶解させた、最適濃度の本発明のペプチドまたは組成物のビオチン化形態を各ウェルに施用する。試料を次いで添加し、アッセイは前記のように進行する。ELISAアッセイを実施するための条件は、当該技術分野で周知である。

【0118】

ELISAアッセイの別の形式は、本発明のペプチドがHRPなどの適切な酵素に付着（例えば融合）していることを特徴とする。そのようなELISAを実施するための工程は：プレートのウェルを抗イヌまたは抗ヒトIgG/IgMでコーティングし；本発明のペプチドに対する抗体を含むと推測される試料を固定化された抗種IgG/IgMとともにインキュベートし；未反応試料を除去し、そしてウェルを好適な洗浄緩衝液で洗浄し；本発明の酵素結合（例えば、HRP結合）ペプチドを適用し、それを任意の捕捉された抗エールリッヒア抗体と反応させ；そして適切な酵素基質（例えば、TMB）により酵素結合ペプチドを可視化することを含む。

【0119】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、方法は凝集アッセイを含む。例えば、ある実施形態では、コロイド粒子（例えば、コロイド状金など）またはラテックスビーズを本発明のペプチドまたは組成物に結合させる。その後、生体液をビーズ/ペプチド結合体とともにインキュベートし、それにより反応混合物を形成する。反応混合物を次いで分析して、抗体の存在を究明する。ある実施形態では、凝集アッセイは、（１）競合アッセイの場合は、本発明の組成物のペプチドに特異的な抗体、または（２）サンドイッチアッセイの場合は、試料抗体（例えば、抗ヒトIgGもしくはIgM抗体、抗イヌIgGもしくはIgM抗体など）を検出できる抗体に結合したコロイド粒子（例えば、コロイド状金など）またはラテックスビーズなどの粒子の第２集団の使用を含む。好適な凝集法は、凝集の程度を評価する手段として遠心分離を含み得る。

10

【0120】

さらに他の実施形態において、本発明のペプチドまたは組成物をニトロセルロース紙上にエレクトロプロットまたはドットプロットする。その後、生体液（例えば、血清または血漿）などの試料をプロットされた抗原とともにインキュベートし、そして生体液中の抗体を抗原と結合させる。結合した抗体は、例えば、標準的な免疫酵素法によるか、または二次抗体またはタンパク質A、タンパク質G、タンパク質L、もしくはそれらの組み合わせなどの他の抗体結合剤に対するコロイド状ナノ粒子カップルを用いて可視化することにより検出できる。

【0121】

任意の数の通常のタンパク質アッセイ形式、特にイムノアッセイ形式を、対象においてエールリッヒア抗体および病原性エールリッヒア（例えば、E.シャフェンシスまたはE.カニス）による感染を検出するために、本発明の単離されたペプチドを利用するように設計することができることは、当業者には理解されるはずである。本発明は、したがって、特定のアッセイ形式の選択により限定されず、当業者に公知のアッセイ形式を包含すると考えられる。

20

【0122】

ある実施形態では、当該方法で使用される試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液などの体液である。他の実施形態において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。ある実施形態では、試料は、野生動物（例えば、シカまたは齧歯類、例えばマウス、シマリス、リスなど）由来である。他の実施形態において、試料は、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類など）由来である。他の実施形態において、試料は、家畜または野生動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）由来である。さらに他の実施形態では、試料はヒト由来である。

30

【0123】

前記考察の多くは病原性エールリッヒアに対する抗体の検出に関する。しかし、考察は、インビトロまたはインビボのいずれかでの予備刺激されたT細胞の検出にも適用されると理解されるべきである。

【0124】

IgGが産生されるので、細胞性免疫反応（例えば、Tヘルパー応答）が生じると予想される。したがって、予備刺激されたT細胞と本発明のペプチドとの間の免疫学的反応性を測定することが可能であると予想される。インビトロでは、これは、対象から単離されたT細胞を本発明のペプチドとともにインキュベートし、そして免疫反応性を、例えばその後のT細胞増殖を測定することによるか、またはT細胞からのサイトカイン、例えばIFN- γ の放出を測定することによって行うことができる。これらの方法は当該分野で周知である。

40

【0125】

本発明の方法をインビボで実施する場合、種々の通常のアッセイのいずれかを用いることができる。例えば、アッセイを皮膚試験の形態で、例えば対象に本発明のペプチドを皮内注射することにより、実施することができる。注射位置での陽性の皮膚反応は、対象が単球性エールリッヒア症の原因となり得る病原性エールリッヒアにさらされ、これに感染

50

したことを示し、注射位置で陰性の皮膚反応は、対象がそのように暴露/感染しなかったことを示す。このようなインビボ試験は、対象におけるT細胞応答の検出に依存する。

【0126】

別の態様において、本発明は、対象において単球性エールリッヒア症を診断する方法を提供する。対象は、単球性エールリッヒア症の原因物質に対する抗体を有すると推測される対象であり得る。この診断法は、単球性エールリッヒア症の臨床症状を示す対象を診断するために有用である。

【0127】

ある実施形態では、この方法は、対象由来の試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および、該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、対象がエールリッヒア症に罹っていることを表す工程を含む。ある実施形態では、方法は、試料を2、3、4、またはそれ以上（例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、またはそれ以上）の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。ある実施形態では、方法は、試料を1以上の本発明のペプチドと1以上の他のペプチド（例えば、エールリッヒアペプチド、またはその抗原断片もしくはエピトープ、例えばエールリッヒア表面タンパク質またはエールリッヒアOMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3タンパク質由来のもの）との混合物と接触させる工程を含む。

10

20

【0128】

ある実施形態では、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。ある実施形態では、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物を基質（例えば、固体または半固体支持体）に付着させるか、または基質上に固定化する。例えば、ある実施形態では、基質はビーズ（例えば、コロイド状または他の種類の粒子もしくはナノ粒子）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析ローター中の流路、または管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート中）である。

【0129】

本発明のペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するための様々な通常のアッセイが数多くある。例えば、検出工程は、ELISAアッセイを実施すること、ラテラルフローイムノアッセイを実施すること、凝集アッセイを実施すること、分析ローター中の試料を分析すること、または試料を電気化学的、光学的、もしくは光電式センサーで分析することを含み得る。これらの異なるアッセイは前述され、および/または当業者に周知である。

30

【0130】

ある実施形態では、試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液などの体液である。他の実施形態において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。ある実施形態では、対象は、野生動物（例えば、シカまたは齧歯類、例えばマウス、シマリス、リスなど）である。他の実施形態において、対象は、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類など）である。他の実施形態において、対象は、家畜または野生動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）である。さらに他の実施形態では、対象はヒトである。

40

【0131】

キット

更に別の態様において、本発明はキットを提供する。ある実施形態では、キットは本発明のペプチドを含む。ある実施形態では、キットは、2、3、4、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ペプチドは、配列番号1、配列番号59、または配列番号92の配列を含み得る。ある実施形態では、ペプチドは、固体支持体に付着しているか、または固体支持体上に固定化されている。例えば、ある実施形態では、固体支持体は、ビー

50

ズ（例えば、コロイド粒子もしくはナノ粒子）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、分析ローター中の流路、または管もしくはウェル（例えばプレート中）である。

【0132】

特定の種類のアッセイ用の試薬は、本発明のキットで提供することもできる。したがって、キットは、（例えば、凝集アッセイまたはラテラルフローアッセイに好適な）ビーズの集団、またはプレート（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート）を含み得る。他の実施形態において、キットは、ラテラルフローイムノアッセイ装置、分析ローター、または電気化学的、光学的、もしくは光電式センサーなどの装置を含む。ビーズの集団、プレート、および装置はイムノアッセイを実施するために有用である。例えば、それらは、試料由来の抗体および本発明のペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するために有用である可能性がある。ある実施形態では、ペプチド、本発明の異なるペプチドの混合物、または本発明のペプチド組成物をビーズ、プレート、もしくは装置に付着させるかまたは固定化させる。

10

【0133】

加えて、キットは、種々の希釈剤および緩衝液、標識された結合体または特異的に結合した抗原もしくは抗体の検出用の他の作用物質、および他のシグナル生成試薬、例えば酵素基質、コファクターおよびクロモゲンを含み得る。キットの他の成分を当業者は容易に決定することができる。そのような成分は、コーティング試薬、本発明のペプチドに特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル捕捉抗体、または2以上の抗体のカクテル、標準としてこれらの抗原の精製もしくは半精製抽出物、モノクローナル抗体ディテクター抗体、抗マウス、抗イヌ、抗ニワトリ、もしくは抗ヒト抗体とそれに結合したインジケータ分子、比色用表示図、使い捨て手袋、除染指示書、アプリケーションスティックまたは容器、試料準備カップなどを含み得る。一実施形態において、キットは、緩衝液またはペプチド-抗体複合体を形成させる反応培地を構成するために適切な他の試薬を含む。

20

【0134】

そのようなキットは、E.シャフエンシスまたはE.カニスなどの病原性エールリッヒアによる感染を診断するための臨床検査室に好都合で有効な手段を提供する。したがって、ある実施形態では、キットは使用説明書をさらに含む。例えば、ある実施形態では、キットは、エールリッヒア抗原に対する抗体を検出するためまたは単球性エールリッヒア症を診断するための本発明のペプチドの使用法を示す使用説明書を含む。ある実施形態では、キットは、エールリッヒア抗原に対する抗体を検出するためまたは単球性エールリッヒア症を診断するためのビーズの集団、プレート、または装置（例えば、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物を含む）の使用法を示す使用説明書を含む。

30

【0135】

本発明のペプチド、当該ペプチドを含む組成物および装置、キットおよび方法は、多くの利点をもたらす。例えば、これらにより、簡単で、安価、迅速、感受性かつ正確な単球性エールリッヒア症の検出が可能になり、類似した症状を有する他の状態との血清学的交差反応を回避する。これにより、正確な診断が可能になる。さらに、本発明の診断検査（例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローイムノアッセイ、または凝集アッセイ）は、抗OMP-1抗体またはエールリッヒアの細胞表層タンパク質に基づくワクチンに反応して産生される他の抗体を含む血清試料において有用である。

40

【0136】

以下の実施例は、本発明の様々な態様を説明する。実施例は、もちろん、本発明のある実施形態のみを単に例示するものであって、本発明の範囲に対する制限を構成するものではないと理解されるべきである。

【実施例】

【0137】

実施例 1

エールリッヒアについて陽性であるか、または陰性であることがわかっている血清試料を用いて、計深棒試験を実施した。計深棒は、幅2mmのHF180ニトロセルロースか

50

らなり、17mmのCF6上部芯とニトロセルロース膜に付着したAIRM-2ペプチドを含む捕捉ラインとを有する。AIRM-2ペプチドは、それぞれが配列番号1の配列を有するビオチン化ペプチドの混合物であり、ストレプトアビジンを介して膜に付着していた。計深棒の下半分をPBS、1%のBSA、1%のTriton X-100、pH7.4の溶液でブロックした。

【0138】

最初は、計深棒に付着したAIRM-2ペプチドの量は、0.1mg/ml、0.5mg/ml、および1.0mg/mlの間で変化し、ペプチド：ストレプトアビジンの比は、ペプチド濃度のそれぞれについて1：1、1：4、および1：8の間で変化した。

【0139】

試験は、各計深棒を、40μlのTBSを含むウェル中に入れ、そしてウェルを空にする工程（洗浄工程）；1μlの試料スポットを、各計深棒のブロックされた下半分につける工程；各計深棒を、40μlの結合体を含むウェル中に入れて、ウェルを空にする工程；各計深棒の捕捉ラインに存在するシグナルを読み取る工程からなった。結合体は、OD1またはOD2で金結合ウサギ抗イヌIgGから構成されていた。

【0140】

エールリッヒア陽性試料（R09266-007（BH19））についての結果を表1および2に示す。

【0141】

【表1】

OD1結合体+0.1mg/mlの AIRM-2		OD1結合体+0.5mg/mlの AIRM-2		OD1結合体+1.0mg/mlの AIRM-2	
SA比	(OpI)	SA比	(OpI)	SA比	(OpI)
1:1	8	1:1	9	1:1	11
1:4	9	1:4	11	1:4	11
1:8	9	1:8	11	1:8	11

【0142】

【表2】

OD2結合体+0.1mg/mlの AIRM-2		OD2結合体+0.5mg/mlの AIRM-2		OD2結合体+1.0mg/mlの AIRM-2	
SA比	(OpI)	SA比	(OpI)	SA比	(OpI)
1:1	10	1:1	8	1:1	11
1:4	4	1:4	11	1:4	11
1:8	11	1:8	11	1:8	5

【0143】

エールリッヒア陰性試料（R09266-008）についての対応する結果は全て0であった。表1および2で示すエールリッヒア陽性試料に関する結果は全て捕捉ラインで正のシグナルを生じたが、1：4または1：8比のペプチド：ストレプトアビジンを有する0.5mg/mlのAIRM-2ペプチドは更なる試験について最適の捕捉条件を提供するようであった。

【0144】

実施例2

0.5mg/mlのAIRM-2ペプチド、ペプチド：ストレプトアビジン比1：4、およびOD1結合体を用いて実施例1の方法にしたがって計深棒試験を実施し、エールリッヒア陽性および陰性血清試料のパネルを試験した。結果を表3に示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 5 】

【 表 3 】

試料	計深棒1 (Op1)	計深棒2 (Op1)	平均	標準偏差
BH1	10	10	10	0
BH2	10	10	10	0
BH5	10	10	10	0
BH9	10	10	10	0
BH15	10	10	10	0
BH16	10	10	10	0
BH17	10	10	10	0
BH18	10	10	10	0
BH19	10	10	10	0
陰性: R09266-008	0	0	0	0
陰性: ボレリア試料2	0	0	0	0
陰性: ボレリア試料5	0	0	0	0
陰性: ボレリア試料8	0	0	0	0
陰性: ボレリア試料9	0	0	0	0
陰性: ボレリア試料10	0	0	0	0
結合体単独	0	0	0	0

10

20

【 0 1 4 6 】

表 3 の結果は、試験条件下で、全エールリッヒア陽性試料は r a n n 1 0 のシグナルで検出され、一方、エールリッヒア陰性試料に関しては疑陽性シグナルは観察されなかったことを示す。

30

【 0 1 4 7 】

実施例 3

実施例 1 の方法に従って計深棒試験を実施し、エールリッヒア陰性 R 0 9 2 6 6 - 0 0 8 血清試料でのエールリッヒア陽性 B H 1 9 血清試料の連続希釈を分析した。結果を表 4 に示す。

【 0 1 4 8 】

【表 4】

希釈係数	計深棒1(0p1)	計深棒2(0p1)	計深棒3(0p1)	平均	標準偏差
0	10	10	10	10	0
2	10	10	10	10	0
10	10	9	10	9.7	0.6
50	9	9	9	9	0
100	8	8	8	8	0
150	6	6	6	6	0
200	6	6	6	6	0
300	5	5	5	5	0
500	4	4	4	4	0
1000	3	3	3	3	0
2000	3	3	3	3	0

10

20

【0149】

表 4 に示すように、エールリッヒア陽性血清をエールリッヒア陰性血清の希釈度を増大させた結果、観察されるシグナル強度が減少した。これは、エールリッヒア特異的シグナルが、陽性試料中に存在する抗体の結果として検出され、マトリックス干渉または他の非特異的結合によるものではないことを示す。

【0150】

実施例 4

それぞれ配列番号 96 または配列番号 97 の配列を有するビオチン化ペプチドの 2 つの異なる混合物を、標準的合成手順を用いて合成した：

配列番号 96 : F - S - A - K - E - E - X₇ - A - E - T - K - X₁₂ - T - F - G
- L - X₁₇ - K - N - Y - D - G - A - X₂₄ - I - X₂₆ - D - N - Q - V - Q - N
- K - F - T - I - S - N

30

配列番号 97 : F - S - A - K - E - E - X₇ - A - E - T - R - X₁₂ - T - F - G
- L - X₁₇ - K - Q - Y - D - G - A - X₂₄ - I - X₂₆ - E - N - Q - V - Q - N
- K - F - T - I - S - N (ここで、X₇、X₁₂、X₁₇、X₂₄、および X₂₆ は任意のアミノ酸である)。

40

【0151】

各混合物は、「X」位置が全て天然の L - アミノ酸の等モル混合物であった。これら 2 つのペプチド混合物を個々に蒸留水中に 1 mg / ml で溶解させた。40 ℃ に加熱することにより溶解を促進した。商業的に購入したストレプトアビジンを室温で水中に溶解させた。ストレプトアビジンを個々のペプチドと混合して、最終濃度 5 μg / ml のストレプトアビジンおよび 2.5 μg / ml の配列番号 96 または配列番号 97 を有するペプチドを、Tris 緩衝液を用いて得た。

【0152】

このように形成されたストレプトアビジン - ペプチド複合体を用いて、ELISA プレートのウェルをコーティングした。非結合混合物を捨て、プレートをブロックして、望ましくない非特異的結合を防止した。エールリッヒア種に対して陽性のイヌ血清試料 (間接免疫蛍光法により測定) を次いで配列番号 96 または配列番号 97 の配列を含むペプチドと反応させた。1 時間インキュベーション後、非結合物質を除去し、プレートを洗浄した。イヌ IgG のウェルに対する結合は、結合した IgG を (i) ヤギ抗イヌ HRP 結合体

50

と反応させ、そして (i i) 結合した H R P を市販の T M B 基質で可視化することによって実現された。

【 0 1 5 3 】

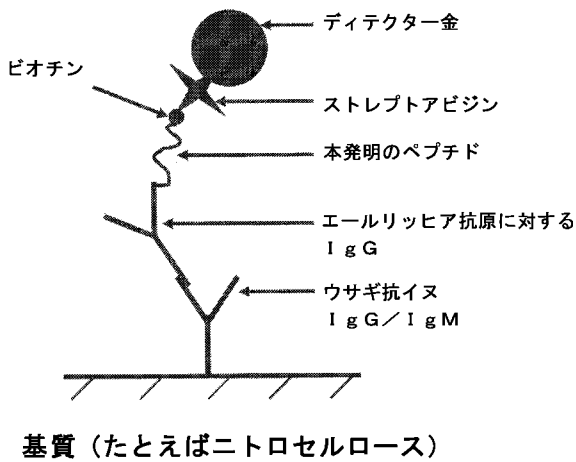
2つのイヌ血清試料は、配列番号96または配列番号97の配列を含むペプチドの両混合物と反応するが、E.シャフェンシスを特異的に同定するように設計されたペプチドとは反応しないことが見いだされた。同様に、13のイヌ血清試料は、E.シャフェンシスを検出するように設計されたペプチドと反応したが、配列番号96または配列番号97を含むペプチドとは反応しなかった。したがって、配列番号96を含むペプチド、配列番号97を含むペプチドおよびE.シャフェンシスを検出するペプチドの組み合わせは、エールリツヒア種カニス、シャフェンシスおよびエウイング (e w i n g i i) に対する抗体を有するすべての動物を検出できる。

10

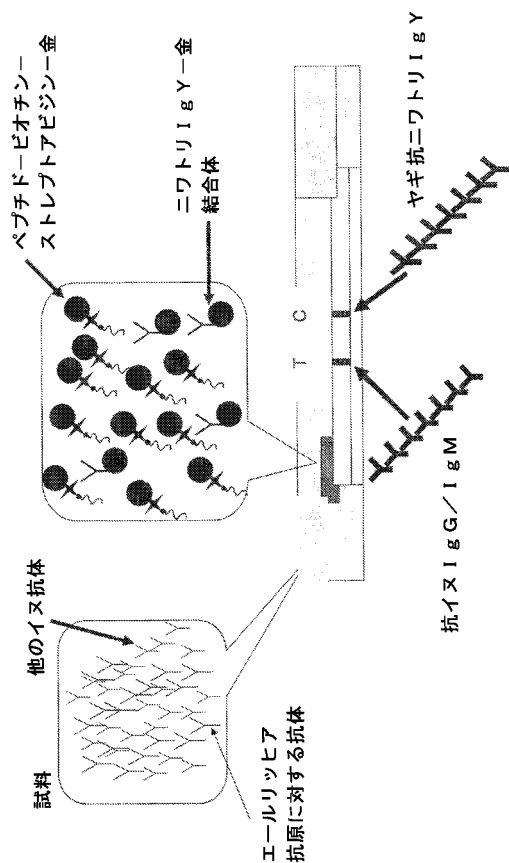
【 0 1 5 4 】

参照により組み込まれる文書中の定義が本明細書中で提供される定義と一致しない場合は、本明細書中で提供する定義が支配する。本発明の好ましい実施形態および前記非限定例を参照して本発明を記載したが、当業者には明らかであるような、種々の変化および修飾を、本発明の精神から逸脱することなく事ができることと理解されるべきである。したがって、本発明は以下の請求の範囲によってのみ限定される。

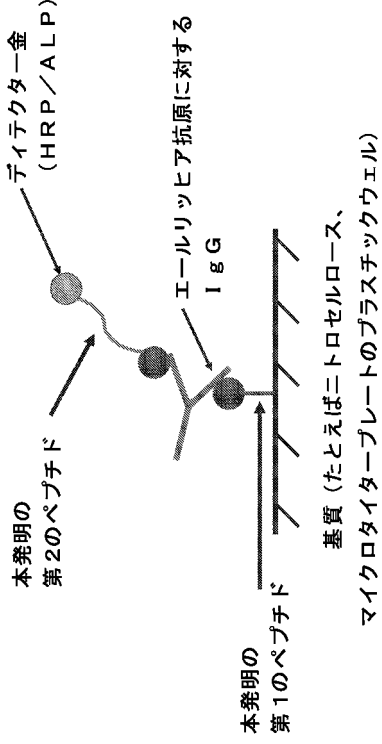
【 図 1 】



【 図 2 】





【 図 3 】



【 配列表 】

201351154600001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/057430
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 14/195(2006.01); C07K 19/00(2006.01); G01N 33/53(2006.01);</i>		
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) C07K 14/195; C07H 21/04; C07H 21/02; A61K 39/38; C07K 16/00; A61K 48/00; C07K 16/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords:ehrlichia, ehrlichia chaffeensis, ehlichia canis, outer membrane protein, OMP		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank: AAG44899.1 06 November 2001 See whole document	36-38, 41, 42
A	US 2002-0120115 A1 (RIKIHISA et al.) 29 August 2002 See abstract, claims, Figure 32B, page 1	1-29, 31-42
A	US 2002-0132789 A1 (BARBET et al.) 19 September 2002 See abstract, claims	1-29, 31-42
A	US 2002-0177178 A1 (LAWTON et al.) 28 November 2002 See abstract, claims	1-29, 31-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 AUGUST 2011 (10.08.2011)		Date of mailing of the international search report 10 AUGUST 2011 (10.08.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHO, Jeong Han Telephone No. 82-42-481-5589 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/057430

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.: 30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claim 30 pertains to methods for diagnosing human diseases thus relates to a subject matter which this ISA is not required to search under the PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/057430

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002-0120115 A1	29.08.2002	US 2003-0103991 A1	05.06.2003
		US 2004-0265333 A1	30.12.2004
		US 2004-0265334 A1	30.12.2004
		US 2009-075368 A1	19.03.2009
		US 6544517 B1	08.04.2003
		US 6893640 B2	17.05.2005
		US 6923963 B2	02.08.2005
		US 7063846 B2	20.06.2006
		US 7709622 B2	04.05.2010
		US 7888491 B2	15.02.2011
US 2002-0132789 A1	19.09.2002	US 2004-0126871 A1	01.07.2004
		US 6025338 A	15.02.2000
		US 6251872 B1	26.06.2001
		US 6593147 B1	15.07.2003
		US 6653128 B2	25.11.2003
		WO 98-16554 A1	23.04.1998
US 2002-0177178 A1	28.11.2002	AT 426172 T	15.04.2009
		AU 2002-251784 B2	14.09.2006
		AU 2003-223421 A1	27.10.2003
		AU 2003-223421 A8	27.10.2003
		AU 2006-216934 A1	31.08.2006
		AU 2006-216934 B2	24.03.2011
		CA 2433394 A1	25.07.2002
		CA 2481349 A1	23.10.2003
		CA 2597730 A1	31.08.2006
		DE 60231607 D1	30.04.2009
		EP 1386167 A2	04.02.2004
		EP 1386167 B1	18.03.2009
		EP 1576350 A2	21.09.2005
		EP 1576350 A4	16.08.2006
		EP 1832601 A2	12.09.2007
		EP 1832601 A3	05.12.2007
		EP 1853912 A2	14.11.2007
		EP 1853912 B1	24.11.2010
		EP 2056112 A1	06.05.2009
		ES 2324401 T3	06.08.2009
		JP 04-384851 B2	02.10.2009
		JP 2005-502586 A	27.01.2005
		JP 2005-502586 T	27.01.2005
		JP 2008-530996 A	14.08.2008
		JP 2009-185037 A	20.08.2009
		JP 4384851 B2	16.12.2009
		KR 10-2007-0121694 A	27.12.2007
US 2002-0160432 A1	31.10.2002		
US 2003-0119082 A1	26.06.2003		
US 2003-0129680 A1	10.07.2003		
US 2003-0194756 A1	16.10.2003		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/057430

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2003-0194757 A1	16.10.2003
		US 2005-0124015 A1	09.06.2005
		US 2006-0189537 A1	24.08.2006
		US 2006-0211062 A1	21.09.2006
		US 2007-0020733 A1	25.01.2007
		US 2007-0026474 A1	01.02.2007
		US 2007-0161782 A1	12.07.2007
		US 2009-0042222 A1	12.02.2009
		US 2010-0330661 A1	30.12.2010
		US 6964855 B2	15.11.2005
		US 7087372 B2	08.08.2006
		US 7183060 B2	27.02.2007
		US 7407770 B2	05.08.2008
		US 7439321 B2	21.10.2008
		US 7445788 B2	04.11.2008
		US 7449191 B2	11.11.2008
		US 7696310 B2	13.04.2010
		US 7744872 B2	29.06.2010
		WO 02-057794 A2	25.07.2002
		WO 02-057794 A3	25.07.2002
		WO 03-087758 A2	23.10.2003
		WO 03-087758 A3	23.10.2003
		WO 2006-091421 A2	31.08.2006
		WO 2006-091421 A3	31.08.2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 0 1 A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

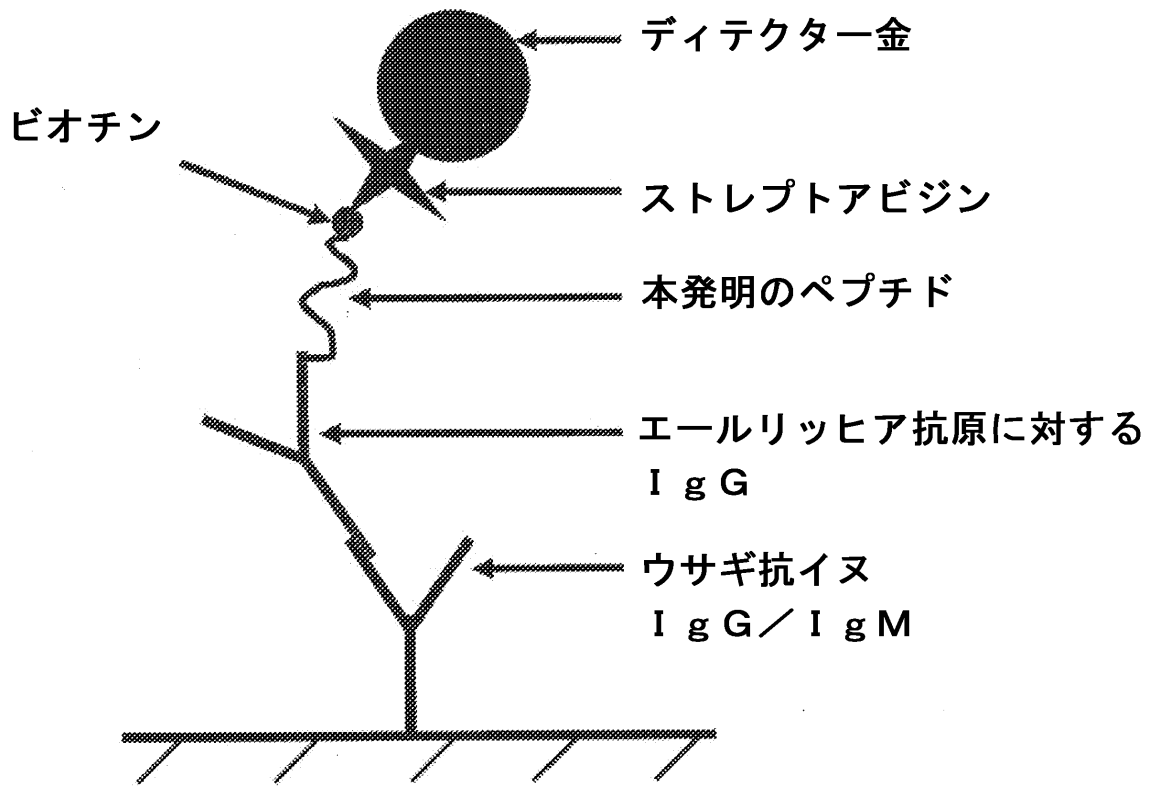
(72) 発明者 メーラ ラジェシュ ケイ .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニーベール サン コンラド テラス 6 0 6 ユニット
5

(72) 発明者 アロン ケネス ピー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 バーリングゲーム シャーマン アベニュー 1 6 0 0

(72) 発明者 ブレイル デニス エム .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンラモン ウィンターサイド サークル 8 0 0

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 CA11 DA86 EA50 GA20

【要約の続き】



基質 (たとえばニトロセルロース)

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013511546A5	公开(公告)日	2013-12-26
申请号	JP2012540090	申请日	2010-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	艾巴希斯公司		
申请(专利权)人(译)	Abakushisu公司		
[标]发明人	メーララジェシユケイ アロンケネスピー ブレイルデニスエム		
发明人	メーラ ラジェシユ ケイ. アロン ケネス ピー. ブレイル デニス エム.		
IPC分类号	C07K14/195 C07K17/02 C07K17/14 G01N33/569 G01N33/553 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306 C07K14/195 G01N33/54353 G01N33/54366 G01N33/56911 G01N2333/29		
FI分类号	C07K14/195.ZNA C07K17/02 C07K17/14 G01N33/569.F G01N33/553 G01N33/543.501.A G01N33/53.N G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/GA20		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/263329 2009-11-20 US		
其他公开文献	JP2013511546A JP6161291B2		

摘要(译)

本发明提供了用于检测与EhIricha抗原结合的抗体的组合物(例如,肽组合物)。肽组合物包含基于埃立克体外膜蛋白1(OMP-1)蛋白的免疫原性片段的多肽序列。本发明还提供了包含这种肽组合物的装置,方法和试剂盒,其可用于检测与EhIricha抗原结合的抗体和用于诊断单核细胞埃立克体病。