

(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2019-511708

(P2019-511708A)

(43) 公表日 平成31年4月25日 (2019.4.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	Z N A F 4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 1
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
CO 7 K 14/35 (2006.01)	CO 7 K 14/35	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)		

(21) 出願番号 特願2018-544825 (P2018-544825)
 (86) (22) 出願日 平成29年2月24日 (2017.2.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月25日 (2018.9.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2017/050418
 (87) 国際公開番号 W02017/144830
 (87) 国際公開日 平成29年8月31日 (2017.8.31)
 (31) 優先権主張番号 1651610
 (32) 優先日 平成28年2月26日 (2016.2.26)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 518297880
 オムニス
 フランス国 クラピエ アヴニユ ドゥ
 ルーロップ 9 キャブ アルファ
 (71) 出願人 518297891
 アクセルエール サット デュ ラング
 ドック ルシヨン
 フランス国 モンペリエ リュ サンーブ
 リエスト セエスユ バティマン 6 9
 50

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原性ペプチド及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、活動性結核に罹患した個体の血清に由来する抗体を認識することが可能な該当する免疫原性ペプチドをスクリーニングするインビトロ方法であって、該方法は、・ -

活動性結核に罹患した患者に由来する血清のペプチドを接触させること、・ - 前のステップの免疫複合体の形成を検出すること、及び・ - R比の値が1.5以上となる該当するペプチドを選択すること、を含み、R比が対照試料から得られた測定値に対する免疫複合体の形成の測定値である、インビトロ方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

活動性結核に罹患した個体の血清に由来する少なくとも 1 種の抗体を認識することが可能な該当する少なくとも 1 種の免疫原性ペプチドをスクリーニングするインビトロ方法であって、前記少なくとも 1 種の免疫原性ペプチドが、疎水性タンパク質に由来する親水性ペプチドであり、前記疎水性タンパク質が、マイコバクテリウム属の細菌の壁のタンパク質であるか、又は前記マイコバクテリウム属の細菌から分泌され、前記疎水性タンパク質が、脂質分解活性を有し、

前記方法が、以下のステップ：

- 少なくとも 1 種の疎水性タンパク質から生じた少なくとも 1 種の親水性ペプチドを、
- 連続で、前記抗体と前記スクリーニングされるペプチドとの免疫複合体の形成を可能にする、確認された活動性結核に罹患した患者に由来する少なくとも 2 つの独立した血清プールと、

- 結核に罹患していない個体に由来する少なくとも 1 種の対照試料と、

に接触させるステップと、

- 前のステップにおける免疫複合体の前記形成を検出するステップと、
- 確認された活動性結核に罹患した患者に由来する独立した血清のプールの少なくとも 1 つについて R 比の値が 1 . 5 以上となる、該当するペプチドの第一の選択を実行するステップと、

を含み、

前記 R 比が、前記健常な個体に由来する試料から得られた正規化された測定値に対する、免疫複合体の前記形成の正規化された測定値である、スクリーニング方法。

【請求項 2】

以下のステップ：

- 前記第一の選択ステップで選択された前記ペプチドを、確認された活動性結核に罹患した患者に由来する前記独立した血清プールを構成する個々の血清それぞれと接触させて、前記抗体と前記スクリーニングされるペプチドとの免疫複合体を形成させるステップと、

- 前のステップにおける免疫複合体の前記形成を検出するステップと、

- 確認された活動性結核を有する患者の前記独立した血清プールを構成する個々の血清それぞれで R 比の値が 1 . 5 以上となる、該当するペプチドの第二の選択を実行するステップと、

をさらに含む、請求項 1 に記載にスクリーニング方法。

【請求項 3】

前記第一の選択の際に、確認された活動性結核に罹患した患者に由来する独立した血清プールの少なくとも 2 つについて、R 比の値が 1 . 5 以上となるペプチドのみが選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記親水性ペプチドが、15 ~ 25 アミノ酸のサイズを有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

疎水性タンパク質に由来する 15 ~ 25 のアミノ酸を含む、又は前記アミノ酸からなる、親水性ペプチドであって、前記疎水性タンパク質が、マイコバクテリウム属の細菌の壁のタンパク質であるか、又は前記マイコバクテリウム属の細菌から分泌され、前記疎水性タンパク質が、脂質分解活性を有する、親水性ペプチド。

【請求項 6】

以下の配列：配列番号 1 ~ 配列番号 30 のいずれか 1 つ、特に以下の配列：配列番号 1 ~ 配列番号 5 のいずれか 1 つにより表される、請求項 6 に記載の親水性ペプチド。

【請求項 7】

活動性結核に罹患している可能性のある個体を診断するインビトロ方法であって、

10

20

30

40

50

- 前記個体の血液試料を、上記で定義された少なくとも１種の親水性ペプチドと接触させるステップと、
 - 前記血液試料の少なくとも１種の抗体と前記ペプチドとの免疫複合体を検出するステップと、
- を含む、インビトロ方法。

【請求項 8】

- 請求項 5 又は 6 のいずれか 1 項に定義された少なくとも１種の親水性ペプチドと、
 - 個体の血液試料に由来する少なくとも１種の抗体と、前記少なくとも１種のペプチドと、の間の免疫複合体を同定するための手段と、
- を含む、活動性結核を診断するためのキット。

10

【請求項 9】

クロマトグラフィータイプの基質上に配列された、個体の血液試料に由来する少なくとも１種の抗体との間の免疫複合体を同定するための手段を含む、請求項 8 に記載の診断キット。

【請求項 10】

前記少なくとも１種の親水性ペプチドが、磁気ナノシェルと連結されている、請求項 8 に記載の診断キット。

【請求項 11】

個体における活動性結核を診断する上で使用するための、請求項 5 又は 6 に記載の親水性ペプチド。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に病理を診断する上での、免疫原性ペプチド及びその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

結核（TB）は、世界の人口の３分の１が感染し、２０秒ごとに１人が死亡するため、依然として世界中で最も死亡率の高い疾患の１つとされる。現在のところ、健康機関、特に世界保健機関（WHO）の予測により確証された迅速かつ精密な診断試験は存在せず、参考試験は、結果を得るのに数週間を要する。

30

【0003】

今日、TBを診断するための国際的参考法は、肺試料を使用し、セキュリティレベル３の検査室及び患者の入院を必要とするため、長期間で（細菌培養に最大８週間）、性能が低く、高価で、実施が困難である。

【0004】

２０１１年に歴史上初めて、WHOが、TBの診断のために市場に出た第一世代の血清学的試験の使用に関する、明白にネガティブな一般的方策提言を発表した（WHO ２０１１、TBの診断に関する市販の血清診断試験：方策表明（commercial serodiagnostic tests for diagnosis of TB:policy statement））。

【0005】

40

臨床的に確証されておらず、性能が乏しいこれらの試験の１００万を超える数が、毎年世界中で、特に南半球（アフリカ、アジア）の国々で、地域的規制が弱いことを利用して販売されている。これらの試験のほぼ全てが、同じ抗原を利用しており、それらは、厳格な臨床的確認を受けていないため、患者のリスクに関する性能が非常に低い。

【0006】

したがってWHOは、厳密な品質及び臨床的確認規準に適う新世代の試験を得ようと門戸を開いた。

【0007】

潜在性感染の間、結核菌はマクロファージに含まれるが、該マクロファージは脂質性液胞が飽和した細胞質を顕微鏡観察で認めるため泡沫状と言われる。結核菌（Mycobacterium

50

tuberculosis)は、脂肪酸をトリグリセリド(TG)の形態で貯蔵して、細菌を休眠期に入れることができる(潜在性TB)。これらの脂質性液胞は、細菌の炭素供給源となり、細菌によって、休眠期を離れて再活性化されるのに用いられる(活動性TB)。TBの再活性化の際のTGレベルの減少が、特定タンパク質の活性上昇によるTGの分解と同時に起こる。これまで比較的研究の少なかったこれらのタンパク質の一部は、潜在性形態からのTBの再活性化に密接に関連すると思われる、それゆえ活動性TBを早期に同定すること、又は該疾患の重篤形態を発症するリスクが高い潜在性TB症例をモニタリングすることに大きな関心が寄せられている。

【0008】

特許出願WO/2012/164088(特許文献1)は、最新技術を知らせており、脂質分解活性を有するリパーゼタンパク質を用いてELISpot Bに基づき活動性結核を診断するための方法を教示している。

10

【0009】

しかしそのような方法は、活動性結核の早期検出に効果的であるが、設備のある検査室の重厚な設備でしか実行され得ず、特殊な技術的スキルを必要とし、それゆえリスクのある集団がいる現場で早期に使用することはできない。

【0010】

それゆえ、出願WO/2012/164088の方法で得られるのと少なくとも同程度に良好な活動性TB検出感度レベルを保持するより簡便な方法を提供することが求められている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際特許出願WO/2012/164088号明細書

【発明の概要】

【0012】

それゆえ本発明の一目的は、全ての状況で容易に実行することができ、特に高度の設備を備えた病院施設を利用することなく、活動性結核を診断するための方法を提供することである。

本発明の別の目的は、この新しい迅速かつ効果的な診断方法を実行させる最良のペプチド候補を決定することである。

30

【0013】

それゆえ本発明は、活動性結核に罹患した個体の血清に由来する少なくとも1種の抗体を認識することが可能な該当する(of interest)少なくとも1種の免疫原性ペプチドをスクリーニングするインビトロ方法であって、前述の少なくとも1種の免疫原性ペプチドが、疎水性タンパク質に由来する親水性ペプチドであり、前述の疎水性タンパク質が、マイコバクテリウム属の細菌の壁のタンパク質であるか、又は該細菌から分泌され、前述の疎水性タンパク質が、脂質分解活性を有し、前述の方法が、以下のステップ：

- + 少なくとも1種の疎水性ペプチドから生じた少なくとも1種の親水性ペプチドを、
 - 連続で、前述の抗体と前述のスクリーニングされるペプチドとの免疫複合体の形成を可能にする、確認された活動性結核に罹患した患者に由来する少なくとも2つの独立した血清プールと、
 - 結核に罹患していない個体に由来する少なくとも1種の対照試料と、
- に接触させるステップと、
- + 前のステップにおける免疫複合体の形成を検出するステップと、
- + 確認された活動性結核に罹患した患者に由来する独立した血清のプールの少なくとも1つについてR比の値が1.5以上となる、該当するペプチドの第一の選択を実行するステップと、
- を含み、
- 該R比は、

40

50

血清と、免疫複合体を検出するために用いられた成分との各バックグラウンドノイズと比較した免疫複合体形成の正規化測定値の、
健常な個体に由来する試料から得られた正規化された測定値の、血清と、免疫複合体を検出するために用いられた成分との各バックグラウンドノイズと比較した値に対する、すなわちこの値で割った比である、
インビトロ方法に関する。

【 0 0 1 4 】

本発明は、決定されたタンパク質に由来する特定のペプチドが、病理を高レベルで検出するための感度及び有効性を提示しながら、活動性結核を診断するための方法を実行するための非常に良好な候補になる、という本発明者らにより行われた驚くべき観察に基づく。

10

【 0 0 1 5 】

本発明により提案された診断は、ヒト及び動物で実施され得る。

【 0 0 1 6 】

本明細書では以後、結核は、均一に「結核」又は「T B」と称される。

【 0 0 1 7 】

本発明において、用語「脂質分解活性を有する疎水性タンパク質」は、脂質分解活性を有する酵素を指すために用いられ、ホスホリパーゼ A、B、C 又は D、及びリパーゼ、特にトリグリセリドリパーゼ、リパーゼ又はジグリセリド、モノグリセリドリパーゼを包含する。

20

【 0 0 1 8 】

感染の際、結核菌は、脂質が充填された細胞内封入体を蓄積するが、その脂質は、おそらく宿主の細胞膜の分解により発生する。その上、脂肪酸が休眠期の炭素供給源であるという事実を裏づける強力な証拠を有する。結核菌は、非反復性の持続的段階（潜伏期）に入ると、脂肪酸をトリアシルグリセリド（T A G）の形態で貯蔵する。さらに、リン脂質に取り囲まれた多量の中性脂肪を細胞質内に含有する細胞である泡沫状マクロファージを含む肉芽腫が見出されている。これらの脂質体は、細菌のインターナリゼーションによって導入され、それにより病原体の生存及び再活性化のために炭素供給源を提供する。より一般的にこれらの発見は、脂質の分解に関与する酵素が著しい生理学的機能を担い得、感染細胞から得られた結核菌の並外れた生存能力及び再活性化に関与し得る、という事柄を裏づけている。結核菌による宿主の脂質の分解は、おそらくクチナーゼ酵素のファミリーなど、リパーゼ及びホスホリパーゼなどの脂質分解酵素により実施される。

30

【 0 0 1 9 】

リパーゼは、脂質分解活性を有する水溶性タンパク質であり、エステラーゼの群に属し、トリアシルグリセロール及びリン脂質のエステル結合のように、水に不溶性の基質の加水分解を触媒する。

【 0 0 2 0 】

この状況において、該脂質分解触媒反応は、界面での異なるプロセスを必要とし、水中油エマルジョン、膜二重層、ミセル及び小胞の中に存在する脂質基質の構造に密接に依存する。該触媒プロセスは、油／水界面で起こるリパーゼの吸着／脱離と、その後の界面での酵素／基質複合体の形成及び脂質分解産物の放出という可逆的ステップとして記載することができる。同定された結核菌リパーゼのうち、24種が、「L i pファミリー」と呼ばれる酵素ファミリーに分類された。しかしこの分類は、エステラーゼと、 α / β ホールドを有するヒドロラーゼファミリーのメンバーとの特徴である G X S X G コンセンサス配列の存在のみに基づく。

40

【 0 0 2 1 】

それゆえ本発明において、免疫原性ペプチドを検出するための方法は、操作が困難になり、及び／又は生成を高価で複雑にする可能性がある全タンパク質での作業の困難さを排除しながら、脂質分解活性（これは活動性結核を検出することを可能にする）を有するタンパク質の特性を利用することに基づく。

50

【 0 0 2 2 】

事実、前述のタンパク質が、膜タンパク質（脂質二重層に挿入された）であり、それゆえ疎水性であるため、又は単に脂質を分解するタンパク質であり、それゆえ疎水性であるため、脂質分解活性を有する前述のタンパク質の小さな免疫原性フラグメントを見出すことが、特に適切である。

【 0 0 2 3 】

本発明において、「疎水性タンパク質」は、全体として水性溶液への親和性をほとんど有さないと見なされ、水性液に溶解する能力をほとんど有さない、タンパク質を指す。

【 0 0 2 4 】

タンパク質は、極性（親水性）又は疎水性であり得るアミノ酸で構成される。該タンパク質が、合成される時、配列内の互いに離れたアミノ酸が、空間的に互いに接近して見出され得るように、該タンパク質は、活性又は機能に関して特異的三次元構造をとる。タンパク質のフォールディングの際、極性アミノ酸の全てが、疎水性アミノ酸に取り囲まれたポケットの中に見出されれば、親水性アミノ酸の割合が、疎水性アミノ酸よりも高い場合であっても、該全タンパク質は疎水性と見なされるであろう。

10

【 0 0 2 5 】

同様に、タンパク質表面に存在するアミノ酸の大部分が親水性になるような、タンパク質の三次元構造であれば、該タンパク質は親水性と見なされるであろう。

【 0 0 2 6 】

タンパク質の親水性及び疎水性の観念は、当業者に周知である。タンパク質の一次配列から、その構造及び疎水性指数を予測することにより親水性／疎水性プロフィールを決定することもまた、当業者に可能である。

20

【 0 0 2 7 】

本発明において、「疎水性タンパク質に由来する親水性ペプチド」は、先に定義された前述の疎水性タンパク質のフラグメントを指し、その特性は、水性液、即ち水又は極性溶媒に容易に可溶性であり安定している。

【 0 0 2 8 】

疎水性タンパク質から本発明によりスクリーニングされる親水性ペプチドを予測するために、特に前述のペプチドの溶解度のみに基づくことが可能である。多くの塩基性残基を有し、介在する酸残基を含まない（酸／塩基平衡）配列は、溶解が困難になり得る。その結果、スクリーニング後に免疫原性になり得るペプチド配列それぞれの溶解度を分析するために、平衡が決定される。

30

【 0 0 2 9 】

それゆえ、式：

$$B_{a\ b} = A_{a\ a} - B_{b\ b}$$

（式中、

$A_{a\ a} = (N_a / N) \times 100$ 、 N_a = 配列内のアミノ酸の酸性残基の数、 N = アミノ酸の数、及び

$B_{b\ b} = (N_b / N) \times 100$ 、 N_b = 配列内の塩基性アミノ酸残基の数、 N = アミノ酸の数）

40

を用いて酸／塩基平衡 $B_{a\ b}$ が最大になるようなペプチドを選択することが、重要となる。

【 0 0 3 0 】

溶解度は、電荷を帯びた残基の数をカウントし、それにペプチドの遊離末端を相加することによっても予測され得る。理論的には、5残基ごとに少なくとも1電荷が、最小溶解度を得るのに必要となる。3より多く4までの疎水性残基の連結を回避する必要もある。 $pH\ 6\sim 8$ での疎水性により、水性緩衝液中のペプチドの溶解度の検証が可能になる。この値により、キャリアタンパク質へのコンジュゲーションステップの間の、連結緩衝液との相溶性を検証することが可能になる。

【 0 0 3 1 】

50

pH 6.8での疎水性が、検討されるペプチドのアミノ酸総数に対するpH 6.8でのアミノ酸それぞれの疎水性の値に対応することに、留意されたい。

【0032】

特に、免疫原性を試験する前に、スクリーニングされるペプチドが、例えばi)フレキシブルである、即ち空間的に拘束されない、即ちペプチドの一般構造に比較して任意の抗体に自由に接近し得るエピトープを有すること、ii)それらが、特異性を低下させるような、保持されたタンパク質のパターン又は二次構造（ヘリックス、βフォールディング）で配置されているか否か、iii)それらが、誘導される全タンパク質の露出した領域に見出されるか否か、を検証することが有利になり得る。当業者は、潜在的に免疫原性のペプチドの選択を完全にし得る他の適当な特徴を見出すこともできる。

10

【0033】

親水性ペプチドが同定されたら、その後、以下の方法を利用して、免疫原性を試験する：

- 1 - 各ペプチドを、臨床的に確認された活動性TBに罹患した患者に由来する少なくとも2つの血清プールと接触させ、
- 2 - 並行して、結核、特に活動性結核に罹患していない健常個体、即ち結核と接触したことの無い個体、又は結核の潜伏期にある（つまり活動性結核を発症していない）患者に由来する対照試料でも行う。

【0034】

この目的は、被験ペプチドが、活動性TBに罹患した個体からの前述の血清プールに含まれる少なくとも1種の抗体と免疫複合体を形成することが可能であるか否か、つまりペプチドが潜在的に変異原性であることを決定することである。

20

【0035】

潜在的な免疫複合体は、定量を可能にするマーカーと連結した抗体の一定部分の特異的免疫グロブリンを用いて、スクリーニングされるペプチドと潜在的に相互作用した抗体の該一定部分を検出する、という免疫複合体の存在をマーキング及び同定することからなる伝統的な方法により検出される。

【0036】

これらの免疫複合体を検出するための伝統的な検査法は、ELISA（酵素免疫測定法）試験からなる。この検出方法は、検査室の外部での免疫複合体の同定を容易にするために、異なる固体基板上でも適合させることができる。

30

【0037】

どのペプチドが該当するかを決定するために、R比を計算するが、該R比は、血清と、免疫複合体を検出するために用いられた成分との各バックグラウンドノイズと比較した免疫複合体形成の正規化測定値の、健常な個体に由来する試料から得られた正規化された測定値の、血清と、免疫複合体を検出するために用いられた成分との各バックグラウンドノイズと比較した値に対する、すなわちこの値で割った比である。

【0038】

これは、以下の式が適用されることを意味する：

40

【数1】

$$R = \frac{(Vp + e - VBlanc) - (Vs + e - VBlanc)}{(Vp + n - VBlanc) - (Vs + n - VBlanc)}$$

（式中、

Vp + e は、ペプチド（p）が活動性TB（e）に罹患した患者の血清と接触した時の

50

、
免疫複合体の検出の際に測定された値に対応し、

V s + e は、ペプチドの溶媒 (s) が活動性 T B (e) に罹患した患者の血清と接触した時の、免疫複合体の検出の際に測定された値に対応し、

V p + n は、ペプチド (p) が健常個体 (n) の血清と接触した時の、免疫複合体の検出の際に測定された値に対応し、

V s は、ペプチドの溶媒 (s) が健常個体 (n) の血清と接触している免疫複合体の検出の際に測定された値に対応し、

V B l a n c は、いずれかの血清、ペプチド及び溶媒の非存在下での免疫複合体の検出の際に測定された値に対応する)。

【 0 0 3 9 】

各測定で、各生体材料、即ち血清 (陽性血清を健常個体の血清と比較する)、ペプチド (ペプチドを溶媒と比較する) などの潜在的バックグラウンドノイズが考慮されているため、該値は正規化されていると言われる。

【 0 0 4 0 】

R 比を得るために用いられる方法に関係なく、決定されたペプチドについて、先に計算された比率が 1 . 5 以上であれば、該ペプチドは、特に興味深く、活動性 T B のマーカー抗体を効果的に検出することが可能であると見なされる。逆に、R 比が 1 . 5 未満であれば、その R 比は用いられないであろう。

【 0 0 4 1 】

本発明では、先に述べられた通り、各ペプチドを、少なくとも 2 つの血清プールと接触させる。最初のアプローチでは、各々が臨床的に立証された活動性 T B (陽性微生物培養の生成物 - 参考臨床試験) を有する別々の患者に由来する複数の血清のプール又は混合物を用いる。これらのプールにより、血清混合物を有すること、つまり検出され得る抗体の多様性を増大させることが可能になる。

【 0 0 4 2 】

独立したプール、即ち同じ起源を有さない血清の混合物が、用いられる。例えば、第一のプールが、異なる 4 個体から得られた血清 4 種を含む場合、第二の独立したプールは、第一のプールの血清の少なくとも 1 つと共通しない複数の血清を含むことになる。

【 0 0 4 3 】

有利には先に述べられた通り、ペプチドとプールに含まれる抗体との免疫複合体は、検出薬と連結された免疫グロブリンを用いる免疫検出により定量される。例えば、用いられるマーカーによるが、光学密度 O D を測定することが可能である。用いられるマーカーによるが、当業者は、免疫複合体を定量するための最良の方法を決定する方法を認識しているであろう。

【 0 0 4 4 】

本発明において、好ましいペプチドは、少なくとも 2 つの血清プールのうちのプールの全てで 1 . 5 よりも大きな R 比を有するものである。もちろん、少なくとも 2 つの血清プールのうちの 1 つのプールに対して 1 . 5 以上の R 比を有するペプチドもまた、該当するであろう。逆に、少なくとも 2 つの血清プールのうち検討されるプールに関係なく R 比が 1 . 5 未満であるペプチドは、選択されないであろう。

【 0 0 4 5 】

1 つの有利な実施形態において、本発明は、以下のステップ：

- 第一の選択ステップで選択されたペプチドを、確認された活動性結核に罹患した患者に由来する前述の独立した血清プールを構成する個々の血清それぞれと接触させて、前述の抗体と前述のスクリーニングされるペプチドとの免疫複合体を形成させるステップと、
- 前のステップにおける免疫複合体の形成を検出するステップと、
- 確認された活動性結核を有する患者の前述の独立した血清プールを構成する個々の血清それぞれで R 比の値が 1 . 5 以上となる、該当するペプチドの第二の選択を実行するステップと、

10

20

30

40

50

をさらに含む、上述のスクリーニング方法に関する。

【0046】

有利には、ペプチドが、上述の方法を利用して同定されたら、少なくとも2つのプールを構成する血清それぞれで個別に第二の反応性試験を実行することも有利である。そのような二重スクリーニングによって、選択を確認し、プールの血清のうちの1つで大きな比率を占める抗体のみを認識する選択されたペプチドを潜在的に排除することが可能になる。

【0047】

第一のスクリーニングの際と同様に、R比は、上述の式に従って測定され、R比が1.5以上のペプチドが、最良に機能するペプチド、即ち活動性結核（活動性TB）の特異的抗体に強い親和性を有するペプチドであるとして選択される。

10

【0048】

有利には本発明は、第一の選択の際に、確認された活動性結核に罹患した患者に由来する独立した血清プールの少なくとも2つについてR比の値が1.5以上となるペプチドのみが選択される、上述の方法に関する。

【0049】

もちろん、プールでの第一のスクリーニングの際に、前述の少なくとも2つのプールのそれぞれでR比が1.5以上になるペプチド、及び前述の少なくとも2つのプールを構成する前述の血清のそれぞれでR比が1.5以上になるペプチドを選択することが、特に興味深く、かつ有利になる。

20

【0050】

別の有利な実施形態において、本発明は、親水性ペプチドがそれらの見かけの親水性に基づいて生物情報学により同定される、先に定義された方法に関する。

【0051】

先に議論された通り、異なる基準（クライテリア）を用いて、本発明の方法により免疫原性を決定するために試験されなければならない潜在的親水性ペプチドを決定することができる。このペプチド選択は、ハイドロパシー、安定性、溶解度、二次構造、全ペプチド中の該ペプチドのアクセシビリティ、フレキシビリティなど、当業者ごとに異なる適合基準を推定することによる情報学により、実施され得る。当業者は、ペプチドが本発明の意味において親水性と見なされるかどうか、そして前述の方法を利用してスクリーニングされるべきかどうかを決定するための最も適切な基準（又は複数の基準）を選択する方法を認識しているであろう。

30

【0052】

別の有利な実施形態によれば、本発明は、親水性ペプチドが15～25アミノ酸のサイズを有する、上述の方法に関する。

【0053】

本発明でスクリーニングされるペプチドは、15～25アミノ酸の平均サイズを有する、即ち15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25の天然アミノ酸を有する、ペプチドである。

【0054】

これらのペプチドはまた、1つ又は複数のアミノ酸残基で修飾され得る。例えば、システインII残基などの特定の残基を保護することにより、これらのペプチド上で、他のN-末端又はC-末端化学基を付加し、それにより迅速な試験（基板へのグラフティング、エピトープ提示、コンフォメーションなど）での操作及び使用をより容易にすることができる。これらの基は、例えばビオチン、BSAの可溶性「キャリア」タンパク質、チオール又はNH₂タイプであり得る（該当するペプチド配列中に存在しないのであれば）。

40

【0055】

有利には本発明は、免疫複合体が免疫グロブリンの一定部分に対する標識抗体を用いて免疫検出により検出される、先に記載された方法に関する。

【0056】

50

本発明はまた、上記の方法を用いて獲得又はスクリーニングすることが可能な、患者の血液試料中の活動性結核を検出することを意図した少なくとも１種の親水性ペプチドに関する。

【００５７】

さらに本発明は、個体の活動性結核を診断する上で使用するための、上述の方法を用いてスクリーニングすることが可能なペプチドに関する。

【００５８】

本発明はさらに、疎水性タンパク質に由来する、１５～２５のアミノ酸を含む少なくとも１種の親水性ペプチドであって、前述の疎水性タンパク質が、マイコバクテリウム属の細菌壁タンパク質であり、前述の疎水性タンパク質が、脂質分解活性を有する、少なくとも１種の親水性ペプチドに関する。

10

【００５９】

本発明はまた、個体における活動性結核を診断する上で使用するための、疎水性タンパク質に由来する１５～２５のアミノ酸を含む親水性ペプチドであって、前述の疎水性タンパク質が、マイコバクテリウム属の細菌壁タンパク質であり、前述の疎水性タンパク質が、脂質分解活性を有する、親水性ペプチドに関する。

【００６０】

これまで述べられた通り、上述の方法を利用してスクリーニングされたペプチドは、個体における活動性結核を診断するための方法を実施するために特に有利である。事実、これらのペプチドは、活動性結核に罹患した患者の血清中に特異的に存在する抗体を検出する能力について選択されるため、該ペプチドは、結核に関して個体の血清学的状況を決定する際に特に効果的である。

20

【００６１】

１つの有利な実施形態において、本発明は、以下の配列：配列番号１～配列番号３０のいずれか１つにより表される、上記で定義された親水性ペプチドに関する。

【００６２】

本発明において、配列番号１～配列番号３０は、以下の配列：配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９及び配列番号３０を指す。

30

【００６３】

本発明の最も有利なペプチドは、４つの独立した血清プールで１．５よりも有意に大きいＲ比を有する、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４及び配列番号５のペプチドである。

【００６４】

Ｒ比が被験血清４つのうち３つで１．５より大きくなる限り、ペプチド配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８及び配列番号１９もまた興味深い。

40

【００６５】

本発明はまた、有利には、個体における活動性結核を診断する上で使用するための、以下の配列：配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９及び配列番号３０を有するペプチドのうちから選択されるペプチドの少なくとも１種を含む組成物に関する。

50

【 0 0 6 6 】

有利には本発明は、以下の配列：配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 及び配列番号 5 を有するペプチドのうちから選択されるペプチドの少なくとも 1 種を含む、前述の使用のための組成物に関する。

【 0 0 6 7 】

有利には本発明は、以下の配列：配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19 を有するペプチドのうちから選択されるペプチドの少なくとも 1 種を含む、前述の使用のための組成物に関する。

10

【 0 0 6 8 】

本発明はまた、活動性結核に罹患している可能性のある個体を診断するインビトロ方法であって、

- 前述の個体の血液試料を、先に定義された少なくとも 1 種の親水性ペプチドと接触させるステップと、

- 前述の血液試料の少なくとも 1 種の抗体と前述のペプチドとの免疫複合体を検出するステップと、

を含む、インビトロ方法に関する。

【 0 0 6 9 】

別の態様によれば、本発明は、前述の個体からの血液試料、特に血清を、配列：配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29 及び配列番号 30 を有するペプチドのうちから選択される少なくとも 1 種のペプチドと接触させるためのステップと、

20

前述の血液試料の少なくとも 1 種の抗体と前述の少なくとも 1 種のペプチドとの少なくとも 1 種の免疫複合体を検出するためのステップと、

を含む、個体における活動性結核を診断するための方法に関する。

30

【 0 0 7 0 】

本発明はさらに、

- 先に定義された少なくとも 1 種の親水性ペプチドと、

- 個体の血液試料に由来する少なくとも 1 種の抗体と、前述の少なくとも 1 種のペプチドと、の間の免疫複合体を同定するための手段と、

を含む、活動性結核を診断するためのキットに関する。

【 0 0 7 1 】

本発明によるキットにおいて、前述の少なくとも 1 種のペプチドは、特に配列：配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29 及び配列番号 30 を有するペプチドのうちから選択されるペプチドである。

40

【 0 0 7 2 】

免疫複合体を検出するための手段は、抗体、特にヒト抗体の一定部分を特異的に認識し、特に蛍光色素、酵素などと連結することが可能である、免疫グロブリンを提供することを含み得る。当業者は、どのタイプの標識免疫グロブリンがそのようなキットを製造するのに、そして免疫複合体の検出を実施するのに適するかを認識している。

【 0 0 7 3 】

50

有利には本発明は、クロマトグラフィータイプの基質上に配列された、個体の血液試料に由来する少なくとも１種の抗体の間の免疫複合体を同定するための手段を含む、先に定義されたキットに関する。磁気ボール又は「エレクトロセンサー」などの他の形式もまた、使用され得る。

【００７４】

本発明の１つの有利な態様によれば、キットは、血液の液滴を付着させることにより全ての状況で使用可能になる可搬式キットの形態で活動性結核を検出するために提供される。そのようなキットは、２、３分しかかからない迅速検出キットである。そのような可搬式キットの例が、図１に示される。

【００７５】

有利には本発明は、少なくとも１種の陽性対照をさらに含む、前述のキットに関する。それが、検査室で用いられるキットを含むか、又はとりわけ可搬式キットを含むか、に関係なく、陽性対照、即ち活動性結核が存在する、又は活動性結核が臨床的に確認されている１人又は複数の患者に由来する血清を有することが特に適切である。

【００７６】

静脈血又は毛細管血から活動性ＴＢを簡便に、合理的に、かつ迅速に診断する可能性は、他の感染（例えば、ＨＩＶ）を検出するための迅速な試験と少なくとも同等な医療的及び経済的成功である。該試験の特異性は、最適でないが、良好な予測陰性値により、疾患をスクリーニングして確認試験への方向づけを提供するための非常に広範なファーストライン使用の試験が可能になる。活動性ＴＢのスクリーニング又は診断のための迅速な試験の開発は、結核の根絶のためにＷＨＯにより設定された目的の適合に極めて著しく貢献する。

【００７７】

別の有利な実施形態において、本発明は、前述の少なくとも１種の親水性ペプチドが磁気ナノシェルと連結されている、上述のキットに関する。

【００７８】

本発明によるペプチドと磁気ナノシェルとの連結により、伝統的なＥＬＩＳＡ免疫試験と類似の結果を、より少量のペプチドで、とりわけ１０分未満で（伝統的なＥＬＩＳＡでのおよそ２時間に対し）得ることができる。免疫複合体は、それらが形成されるシェルのおかげで磁気により単離されるため、そのような連結の利点は、非特異的相互作用を排除するために必要となる洗浄時間が抑制されることである。

【００７９】

本発明はさらに、個体における活動性結核を診断する上で使用するための、先に定義された親水性ペプチド、特に配列：配列番号１～３０のいずれか１つから本質的になる、又はそれからなる親水性ペプチドに関する。

【００８０】

先に述べられた通り、本発明の特異的ペプチドは、結核菌ペプチドに対する抗体を検出するのに、つまり個体において活動性結核の診断を可能にするのに非常に適する。

【００８１】

本発明は、以下の図及び実施例を参照すればより良好に理解されよう。

【００８２】

【図面の簡単な説明】

【００８３】

【図１】本発明による例示的な可搬式キットを示す。

【００８４】

【図２】図１の実施形態の代表的な図を示す。

【００８５】

【図３】活動性結核の陽性診断（＋＋）又は陰性診断（－）で得られた視覚的結果の略図である。Ｔは、試料の陽性の顕著な表示を表し、Ｔ＋は、反応の陽性対照を示す。矢印は、移動方向を示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

【 図 4 】 指数形態（本発明による R 比）の被験ペプチドの反応性のヒストグラムを示す。

【 図 5 】 同上。

【 図 6 】 同上。

【 図 7 】 同上。

【 0 0 8 7 】

【 図 8 】 指数形態（本発明による R 比）のペプチド C 2、C 1 2、M 3、V 5 及び G 9（それぞれ配列：配列番号 1～5 により示される）の反応性のヒストグラムを示す。バーは、ペプチドそれぞれについて試験された 4 つのプールを示す。

【 0 0 8 8 】

【 図 9 】 ペプチド：配列番号 3 を用いて伝統的な E L I S A 技術（暗灰色の棒）とナノシエル技術（明灰色の棒）との、得られた結果の比較を示すヒストグラムを表す。試料 1 及び 2 は、陽性対照に対応し、試料 3 及び 4 は、陰性対照に対応し、試料 5～7 は、患者の血清に対応し、試料 8 は、陰性と告知され試料に対応する。

【 0 0 8 9 】

【 図 1 0 】 検査室からの「実験台」バージョン（黒色の棒）と、開発された試作品の「可搬式」バージョン（灰色の棒）と、の 1 9 種のヒト血清（試料 1～2 7 の活動性 T B の陽性 1 3 種、及び試料 N e g 1～N e g 6 の非感染の陰性 6 種）の評価結果の比較を示すヒストグラムを表す。

【 0 0 9 0 】

【 図 1 1 】 最適化された可搬式試作品により一重盲検で試験された試料 2 0 種（1 5 種の陽性及び 5 種の陰性）の分析で得られたシグナルの平均を示したヒストグラムを示す。陽性試料は、1、3、4、5、7、8、1 0、1 1、1 2、1 4、1 5、1 6、1 7、1 9、2 0 番である。陰性試料は、2、6、9、1 3、1 8 番である。

【 0 0 9 1 】

【 図 1 2 】 陰性（N e g 6）又は陽性（P o s 1）試料で磁気ナノシエル - 診断候補ペプチド連結物の経時的な安定性の評価を示したヒストグラムを表す。このヒストグラムは、ナノシエルで異なる時間間隔でグラフトされた同じペプチド（M 3）を用いた、磁気ナノシエルでの同じ技術による 2 種の患者血清試料（陰性 1 種及び陽性 1 種）の評価を示す。両者で、グラフトされて 2 0 1 6 年 1 1 月 2 4 日に試験されたペプチドを、2 0 1 7 年 9 月 1 2 日にグラフトされて、2 0 1 6 年 1 1 月 3 0 日及び 2 0 1 6 年 1 2 月 1 日（患者 2 名それぞれの最初の 2 つのヒストグラム）に試験された同じペプチドと比較して分析した。このペプチドで経時的なシグナルの減少が認められ、それは溶液中のペプチドの不安定性、又はグラフティングの再現性の欠如により説明され得る。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 9 2 】

図 1 を参照すると、本発明による活動性結核を診断するためのキットは、試料と陽性対照との反応性を検出すること、試料と本発明による少なくとも 1 種のペプチドとの反応性を検出すること、及び試験される血清の試料を付着させること、を可能にする、それぞれ 3 つのウィンドウ 2、3、4 を含むカセット 1 を含むデバイスで構成される。カセット 1 は、ウィンドウ 4 より下に配置された、

- 該付着された試料（血液、血清、ヒト血漿）の高分子ろ過を行い、マトリックス（イオン強度（i o n i c f o r c e）、吸収速度など）のモニタリングを可能にする、試料基板 5 と、

- 試験される試料中に含有され、かつ、コロイド金、ラテックス、カーボンなどのトレーサーと連結され得る抗体に対する検出抗体を含むコンジュゲーション基板 6 と、を含むリザーバーを覆っている。

【 0 0 9 3 】

ウィンドウ 3 及び 2 の下に配置されるのが、ラインの形態の本発明による少なくとも 1 種のペプチド（ウィンドウ 3 の下）及びビオチン化ウシアルブミン（ウィンドウ 2 の下）

10

20

30

40

50

のラインが固定されたニトロセルロース、ナイロン又はフッ化ポリビニリデン（P V D F）で作製された膜 7 である。

【 0 0 9 4 】

リザーバーは、膜 7 と並置された吸収基板 8 をさらに含み、吸収基板 8 の機能は、残留液リザーバーとして働くこと、及び移動速度の安定化のためにある。

【 0 0 9 5 】

図 2 は、使用の際の図 1 のデバイスを示す。最初に生体試料（特に血液又は血清）を、ウィンドウ 4 を介して試料基板 5 に付着させる。吸収基板 8 により生じた毛細管現象、及び該毛細管現象を促進する特異的移動緩衝液の効果の下、試料の内容物が、一定速度で徐々にコンジュゲーション基板 6 へ移行し、その後、生体試料の抗体が、検出抗体と連結することが可能になる。

10

【 0 0 9 6 】

さらに毛細管現象の効果の下で、試料の内容物が、コンジュゲーション基板 6 から膜 7 へ移動する。それらが、本発明によるペプチドラインを通過すると、本発明のペプチドに対する抗体が免疫反応により固定され、試料の残りは移動し続ける。同じことが、対照ラインにもあてはまる。

【 0 0 9 7 】

図 3 に示される通り、試験される試料が、膜 7 に付着されている本発明のペプチドに対する抗体を含む場合、該ペプチドは固定及び蓄積され、標識された該抗体との連結により、試験ゾーン T で、反応の指示ラインの出現を認めることができる。

20

【 0 0 9 8 】

【実施例】

【 0 0 9 9 】

[実施例 1] - スクリーニングされるペプチドの同定

【 0 1 0 0 】

本発明者らは、脂質分解酵素のファミリーにおける 2 5 種の組換えタンパク質から、8 0 0 種を超えるペプチドをコンピュータにより異なる特徴：疎水性、二次構造などに基づいて階層化するために、エピトープスクリーニングを実施した。このランキングにより、活動性結核の診断のための最も有望な特徴をそろえた 2 0 0 種の候補を選択することができた。次に 2 0 0 種のペプチドそれぞれの免疫原性を、これらのペプチドのスクリーニングのための E L I S A 試験で評価した。患者プールで得られた結果から、3 0 種の最良候補が、連続の技術的評価のためにとり置かれた。

30

【 0 1 0 1 】

コンピュータアルゴリズムを使用し、提供された遺伝子配列から、診断候補タンパク質の主な特徴を同定して、最良の潜在的ペプチドの分類を確立した。全てにおいて、本発明者らは、コンピュータでの理論的免疫原性に基づき 4 群（1、2、3 及び「b a d」）（1 は最も良く、「b a d」は最も悪い）に分類された 1 5 種のアミノ酸による 8 3 3 種の重複ペプチドのリストを得た。被験ペプチド 2 0 0 種に関する情報を、以下の表 1 に示す：

【表 1 - 1】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
1	LipC (Rv0220)	C2	71-85aa	DLLTPGINEVRRRDR	1
	LipC (Rv0220)	C12	321-335aa	RNAPPFLVIHGSRDC	2
	LipM (Rv2284)	M3	131-145aa	GGTAKTPGPLRMLRI	3
	Rv2349c (PLCC)	V5	351-365aa	TPLTAPEGTPGEWIP	4
	LipG (Rv0646c)	G9	141-155aa	KTLAVIFSSNNHRFL	5
2	LipO (Rv1426c)	O7	301-315aa	FTTDAPGRREFVGLL	6
	Rv2301	Z1	31-45aa	TAACPDAEVVFARGR	7
	Rv1984	E8	101-115aa	QRTVASCPNTRIVLG	8
	Rv3452	D7	191-205aa	CNNGDPICSDGNRWR	9
	Rv3452	D1	1-15aa	MIPRPQPHSGRWAG	10
	Rv2351c (PLCA)	P2	91-105aa	AGVTIPFRLDTTRGP	11
	LipT (Rv2045c)	T9	481-495aa	RAVLVFDRCRIEFD	12
	LipW (Rv0217c)	W3	81-95aa	GYVMGTAQQDDRCL	13
	LipW (Rv0217c)	W5	181-195aa	DDRPSIAPANPHYRL	14
	LipW (Rv0217c)	W7	211-225aa	DADARVAVPGRRDDL	15
	Rv0183	B15	251-265aa	MPRRAPALTAPLLVL	16
	LipC (Rv0220)	C14	61-75aa	ASDFLSATAKDLLTP	17
	LipC (Rv0220)	C18	221-235aa	VDKFGGDRNFIAVAG	18
	Rv1984	E5	31-45aa	HADPCSDIAVVFARG	19
	LipC (Rv0220)	C6	141-155aa	QLLDVWRRKDMPTKP	20

10

20

30

【表 1 - 2】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
	LiPc (Rv0220)	C7	241-255aa	HLSALAGLTANDPQY	21
	Rv3452	D5	161-175aa	AIALFGNPSGRAGGL	22
	Rv2301	Z3	161-175aa	NFSPAYNDRTIELCH	23
	LipF (Rv3487c)	F7	1-15aa	VRAPGVRAADGAGRV	24
	Rv0183	B6	271-285aa	RLIPIEGSRRLVECV	25
	LipG (Rv0646c)	G3	51-65aa	AKGLRVIRYDNRDVG	26
	Rv2351c (PLCA)	P6	341-355aa	DENGGFDFHVTPTTA	27
	Rv2350c (PLCB)	S13	501-512aa	TAPTRGIPSGLC	28
	LipT (Rv2045c)	T6	451-465aa	RVSNEVQRRWRCFSQ	29
	LipC (Rv0220)	C20	281-295aa	DRSTPERARFVDFLE	30
3	Rv0183	B1	1-15aa	MWAEKSPRRSSAGSR	31
	Rv0183	B16	281-295aa	LVECVGSADVQLKEY	32
	LipC (Rv0220)	C1	1-15aa	MNQRRAAGSTGVAYI	33
	LipC (Rv0220)	C10	301-315aa	RTIDRHPEVFRDASP	34
	LipC (Rv0220)	C4	111-125aa	APERTPPVCGALRHR	35
	LipC (Rv0220)	C24	361-375aa	ELPGAGHGFDLLDGA	36
	LipC (Rv0220)	C3	101-115aa	SPDDLAVEWPAPERT	37
	LipC (Rv0220)	C5	121-135aa	ALRHRRYVHRRRVLY	38
	LipC (Rv0220)	C21	331-345aa	GSRDCVIPVEQARSF	39
	LipC (Rv0220)	C19	261-275aa	EGSDTSVDAVVGIYG	40

10

20

【表 1 - 3】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
	Rv3452	D9	91-105aa	PANGDFLAAADGAND	41
	Rv1984	E2	91-105aa	NGSDDASAHIQRTVA	42
	Rv1984	E9	201-217aa	MTSQAATFAANRLDH AG	43
	Rv1984	E1	41-55aa	VFARGTHQASGLGDV	44
	LipF (Rv3487c)	F12	131-145aa	PNIGTDAMFPARAFD	45
	LipI (Rv1400c)	I1	1-15aa	MPSLDNTADEKPAID	46
	Rv3802c	K5	71-85aa	SCPDVQMISVPGTWE	47
	LipO (Rv1426c)	O3	121-135aa	ATLPTEPMRSRGRNL	48
	LipO (Rv1426c)	O6	271-285aa	TPNDPRFQPGFEQVD	49
	Rv2351c (PLCA)	P9	501-512aa	TPVRGTPSGLCS	50
	Rv2351c (PLCA)	P3	101-115aa	TTRGPFLDGECVNDP	51
	LipQ (Rv2485c)	Q6	201-215aa	ICVSINYSKSPRCTW	52
	LipQ (Rv2485c)	Q9	341-355aa	GEKDPMVPSAQSR AF	53
	LipQ (Rv2485c)	Q10	401-415aa	IYGRMGARKGSLAL	54
	LipQ (Rv2485c)	Q4	151-165aa	ENLLDIWRRPDLAPG	55
	LipQ (Rv2485c)	Q8	331-345aa	SEAPPFVVLHGKDP	56
	LipR (Rv3084)	R3	121-135aa	EEMAAVYTRLLDDGL	57
	Rv2350c (PLCB)	S7	261-275aa	FKQAADPRSNLARFG	58
	Rv2350c (PLCB)	S3	91-105aa	DPAGVTLPYRFDTTR	59
	Rv2350c (PLCB)	S8	281-295aa	PLDFAADVRRNNRLPK	60

10

20

30

40

【表 1 - 4】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
	Rv2350c (PLCB)	S4	101-115aa	FDTTRGPLVAGECVN	61
	LipT (Rv2045c)	T4	431-445aa	IYRTRFGALLTAAAD	62
	LipT (Rv2045c)	T2	31-45aa	DGVHRWRSIPYARAP	63
	LipT (Rv2045c)	T7	461-475aa	RCFSQIGVPGDDWPA	64
	LipU (Rv1076)	U1	71-85aa	GGAF LTCGANS HGRL	65
	Rv1755c (PLCD)	X6	271-280aa	PTRGIPSGPC	66
	LipY (Rv3097c)	Y1	221-235aa	SVVQITPAHPTGEYV	67
bad	Rv0183	B12	161-175aa	FAYGVERPDNYDLMV	68
	Rv0183	B10	131-145aa	DFDTLVGIATREYPG	69
	Rv0183	B8	81-95aa	HGLGEHARRYDHVAQ	70
	Rv0183	B14	241-255aa	GRALLQVGETMPRRA	71
	Rv0183	B7	11-25aa	SAGSRPEFSASTLTS	72
	Rv0183	B17	301-315aa	EVFN EPERNQVLDDV	73
	Rv0183	B11	141-155aa	REYPGCKRIVLG HSM	74
	Rv0183	B2	61-75aa	RIVYDVWTPDTAPQA	75
	Rv0183	B13	211-225aa	DFTAISRDP EVVQAY	76
	Rv0183	B9	121-135aa	LVRDISEYTADFDTL	77
	Rv0183	B5	261-275aa	PLLVLHGTDDRLIPI	78
	Rv0183	B3	101-115aa	GLVTYALDHRGHGRS	79
	Rv0183	B4	111-125aa	GHGRSGGKRVLVRDI	80

10

20

30

【表 1 - 5】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
10	LipC (Rv0220)	C22	341-355aa	QARSFVERLRAVSRS	81
	LipC (Rv0220)	C15	81-95aa	RRRDRASTQEVSVAA	82
	LipC (Rv0220)	C13	11-25aa	GVAYIRWLLRARPAD	83
	LipC (Rv0220)	C8	251-265aa	NDPQYQAELPEGSDT	84
	LipC (Rv0220)	C16	131-145aa	RRVLYGDDPAQLLDV	85
	LipC (Rv0220)	C9	271-285aa	VGIYGRYDWEDRSTP	86
	LipC (Rv0220)	C11	311-325aa	RDASPIQRVTRNAPP	87
	LipC (Rv0220)	C17	201-215aa	HRWPRHILDVKTAIA	88
	LipC (Rv0220)	C23	351-365aa	AVSRSQVGYLELPGA	89
	LipC (Rv0220)	C25	371-385aa	LLDGARTGPTAHAIA	90
20	Rv3452	D6	181-195aa	PQFGSKTINLCNNGD	91
	Rv3452	D2	51-65aa	EVVFARGTGEPPLG	92
	Rv3452	D8	41-55aa	PPASAGCPDAEVVFA	93
	Rv3452	D3	71-85aa	FVSSLRQQTNKSI GT	94
	Rv3452	D10	151-165aa	LPPAADDHIAAIALF	95
	Rv3452	D4	101-115aa	DGANDASDHIQQMAS	96
	Rv1984	E3	81-95aa	ASDDYRASASNGSDD	97
	Rv1984	E4	21-35aa	VSAPAGGRAAHADPC	98
	Rv1984	E6	51-65aa	GLGDVGEAFVDSLTS	99
	Rv1984	E7	71-85aa	SIGVYAVNYPASDDY	100

10

20

30

【表 1 - 6】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
10	LipF (Rv3487c)	F13	151-165aa	VRAAAAKNMVDGRP E	101
	LipF (Rv3487c)	F11	101-115aa	QRLQCDDEKPAAIV A	102
	LipF (Rv3487c)	F4	241-255aa	FIRDATADSSLSPV H	103
	LipF (Rv3487c)	F1	71-85aa	YQWLRARGYRPEQI V	104
	LipF (Rv3487c)	F2	161-175aa	DGRPEDLYEPLDHI E	105
	LipF (Rv3487c)	F5	251-265aa	LSPVHRSRYVAGSP R	106
	LipF (Rv3487c)	F14	231-245aa	ATRLRQIGQFIRD A	107
	LipF (Rv3487c)	F8	31-45aa	SHSRIVNALSGFAE S	108
	LipF (Rv3487c)	F10	81-95aa	PEQIVLAGDSAGGY L	109
	LipF (Rv3487c)	F3	171-185aa	LDHIESSLPPTLIH V	110
20	LipF (Rv3487c)	F6	261-277aa	AGSPRAASRGAFGQ SPI	111
	LipF (Rv3487c)	F9	61-75aa	GMALDDCHDAYQWL R	112
	LipG (Rv0646c)	G5	171-185aa	PPDSPRDVIVDNAV R	113
	LipG (Rv0646c)	G2	11-25aa	GDVKLYYEDMGDL H	114
	LipG (Rv0646c)	G4	61-75aa	NRDVGLSTKTERHR P	115
	LipG (Rv0646c)	G7	291-301aa	GELTRNFSEAG	116
	LipG (Rv0646c)	G11	191-205aa	GSPAYPIPEDQVRA E	117
	LipG (Rv0646c)	G1	1-15aa	VDIRSGTAVSGDVK L	118
	LipG (Rv0646c)	G10	181-195aa	DNAVRVSKIIGSPA Y	119
	LipG (Rv0646c)	G8	71-85aa	ERHRPGQPLATRLV R	120

10

20

30

40

【表 1 - 7】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
	LipG (Rv0646c)	G6	281-295aa	LPRQLWDRVIGELTR	121
	LipH (Rv1399c)	H1	41-55aa	QLKTPPELLPELRIE	122
	LipI (Rv1400c)	I3	41-55aa	RLRDLPRQPVHPELR	123
	LipI (Rv1400c)	I2	31-45aa	IDDGIEAVRQRLRDL	124
	Rv3451	J3	91-105aa	RLQLHGGDGANDAIS	125
	Rv3451	J2	41-55aa	ADGCPDAEVTFARGT	126
	Rv3451	J5	191-205aa	TDPICHVGPNEFSG	127
	Rv3451	J1	1-15aa	VNNRPIRLLTSGRAG	128
	Rv3451	J4	161-175aa	VFGNPSNRAGGSLSS	129
	Rv3451	J7	251-262aa	TAAPAPESLHGR	130
	Rv3451	J6	221-235aa	FVVQRLRAGSVPHLP	131
	Rv3802c	K6	131-145aa	HNPLTTDNQMSYNDS	132
	Rv3802c	K9	251-265aa	QGDLCAPAQAFSP	133
	Rv3802c	K8	211-225aa	RQQGVGNQVPPSPRG	134
	Rv3802c	K4	61-75aa	HKPRPAFQDASCPDV	135
	Rv3802c	K2	31-45aa	AVVIMLRGAESPPSA	136
	Rv3802c	K7	181-195aa	AGDVASDIGNGRPV	137
	Rv3802c	K1	1-15aa	MAKNSRRKRHRILAW	138
	Rv3802c	K3	51-65aa	LPPGPTPAHPHKPRP	139
	LipM (Rv2284)	M2	121-135aa	SAGLWRRPAGGGTAK	140

10

20

【表 1 - 8】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
	LipM (Rv2284)	M4	141-155aa	RMLRIYRDYAHGDGI	141
	LipM (Rv2284)	M5	271-285aa	ALTPNDPRFQPGFEE	142
	LipM (Rv2284)	M1	111-125aa	SGLGPDRRTASAGLW	143
	LipN (Rv2970c)	N3	281-295aa	YLRDSVDVPADPRLS	144
	LipN (Rv2970c)	N2	271-285aa	KRDIDWFHTQYLRDS	145
	LipN (Rv2970c)	N1	111-125aa	DLSIPGPAGEIPARH	146
	LipO (Rv1426c)	O5	211-225aa	VCVSLNYRVSPRHTW	147
	LipO (Rv1426c)	O8	321-335aa	KRKFS THRDI FVDAS	148
	LipO (Rv1426c)	O4	161-175aa	ANLADIWRRRDLPD	149
	LipO (Rv1426c)	O2	61-75aa	ALRRGRRGDFGGLKG	150
	LipO (Rv1426c)	O1	1-15aa	MRFRMARPRPLTRA	151
	Rv2351c (PLCA)	P8	411-425aa	SQLKLIRARFGVPVP	152
	Rv2351c (PLCA)	P1	1-15aa	MSRREFLTCLTGAGA	153
	Rv2351c (PLCA)	P7	351-365aa	TPPTAPPGTPGEFVT	154
	Rv2351c (PLCA)	P5	251-265aa	NNGLVQAFRQAADPR	155
	Rv2351c (PLCA)	P4	221-235aa	IMPENLEDAGVSWKV	156
	LipQ (Rv2485c)	Q2	131-145aa	GPHRRYAAQTSDIPY	157
	LipQ (Rv2485c)	Q1	101-115aa	PDFRDLVWHPTGEQS	158
	LipQ (Rv2485c)	Q7	261-275aa	SANDPALQPGFESAD	159
	LipQ (Rv2485c)	Q3	141-155aa	SDIPYGP GGRENLLD	160

10

20

30

40

【表 1 - 9】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:
	LipQ (Rv2485c)	Q5	161-175aa	DLAPGRRAPVLIQV P	161
	LipR (Rv3084)	R1	1-15aa	MNLRKNVIRSVLRG A	162
	LipR (Rv3084)	R5	241-255aa	ICVDADKIETACAA S	163
	LipR (Rv3084)	R2	41-55aa	RAPKGTRFQRVSI A G	164
	LipR (Rv3084)	R7	291-308aa	RLRGHLHQSQQQPR GVVK	165
	LipR (Rv3084)	R4	131-145aa	LDDGLDPKTTVIAG D	166
	LipR (Rv3084)	R6	251-265aa	ACAASKTSIEHRRF A	167
	Rv2350c (PLCB)	S5	221-235aa	SWRIMPENLEDAGV S	168
	Rv2350c (PLCB)	S10	401-415aa	RGPLMVHDTFDHTS T	169
	Rv2350c (PLCB)	S12	491-505aa	PFPQSMPTQETAPT R	170
	Rv2350c (PLCB)	S6	251-265aa	VVGYNGLVNDFKQA A	171
	Rv2350c (PLCB)	S9	361-375aa	GTPGEFVTVPDIDS V	172
	Rv2350c (PLCB)	S2	51-65aa	QENRSFDHYFGTLS D	173
	Rv2350c (PLCB)	S1	41-55aa	TDIEHIVLLMQENR S	174
	Rv2350c (PLCB)	S11	451-465aa	PNPSKPNLDHPRLN A	175
	LipT (Rv2045c)	T5	441-455aa	TAAADRRAALRVSN E	176
	LipT (Rv2045c)	T1	1-15aa	VALESATVGSMHER T	177
	LipT (Rv2045c)	T3	401-415aa	YLYRYDYAPRTL RW S	178
	LipT (Rv2045c)	T10	491-505aa	RIEFDPHQHRRIAW D	179
	LipT (Rv2045c)	T8	471-485aa	DDWPAYTQDDRAVL V	180

10

20

30

40

【表 1 - 10】

	タンパク質	ペプチド	アミノ酸位置	ペプチド配列	SEQ ID NO:	
	LipU (Rv1076)	U3	281-297aa	AIRSLRQIGEYIRE ATG	181	
	LipU (Rv1076)	U2	201-215aa	VASAAARNQVDGEP E	182	
	Rv2349c (PLCC)	V4	251-265aa	RNGYVGSFKQAADP R	183	
	Rv2349c (PLCC)	V7	401-415aa	GLMVHDFDHTSQL Q	184	10
	Rv2349c (PLCC)	V1	71-85aa	TPTPLFQQKGWNPE T	185	
	Rv2349c (PLCC)	V6	361-375aa	GEWIPNSVDIDKVD G	186	
	Rv2349c (PLCC)	V2	191-205aa	ISATVNPDDGQGGP Q	187	
	Rv2349c (PLCC)	V8	451-465aa	PSPPNLDHPVRQLP K	188	
	Rv2349c (PLCC)	V3	241-255aa	LGGLNDTSLSRNGY V	189	20
	LipW (Rv0217c)	W1	41-55aa	MSRTPPDIEVLTLE S	190	
	LipW (Rv0217c)	W6	191-205aa	PHYRLWNGRANRFG W	191	
	LipW (Rv0217c)	W2	51-65aa	LTLESGVGVRLYRP A	192	
	LipW (Rv0217c)	W4	91-105aa	DRLCLRFSSRLGIT V	193	
	Rv1755c (PLCD)	X4	251-265aa	NRGIPYRVPDPQIM P	194	30
	Rv1755c (PLCD)	X1	131-145aa	TPGEYVTVPDIDQV P	195	
	Rv1755c (PLCD)	X3	171-185aa	GPQMVHDTFDHTSQ L	196	
	Rv1755c (PLCD)	X5	261-275aa	PQIMPTQETTPTRG I	197	
	Rv1755c (PLCD)	X2	141-155aa	IDQVPGSGGIRGPI G	198	
	Rv2301	Z2	61-75aa	ALRSKVNKNVGVYA V	199	40
	Rv2301	Z4	171-185aa	IELCHGDDPVCHPA D	200	

表 1：試験されたペプチド 200 種のリスト

【0102】

ペプチドの免疫原性を決定するために、ペプチドを以下の E L I S A 試験を用いて試験する。

【0103】

ペプチドを M a x i s o r p (高結合) プレートに固定する： 4 で一晩インキュベ

ション、タンパク質濃度 $20 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

【0104】

ウェルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) $300 \mu\text{L}$ ですすぐ。

【0105】

「ウェル」を、2%ウシ血清アルブミン (BSA) $200 \mu\text{L}$ 及び 0.01% Tween 20 により周囲温度 ($19 \sim 25$) で2時間ブロックする。

【0106】

ウェルを PBS $200 \mu\text{L}$ ですすぐ。

【0107】

ブロッキング溶液で $1/100$ に希釈された活動性 TA に罹患した患者の血清 $100 \mu\text{L}$ を付着させて、 37°C で1時間インキュベートする。 10

【0108】

($300 \mu\text{L}$) PBS - TWEEN 20 (0.05%) で3回の洗浄を実施する。

【0109】

ペルオキシダーゼをコンジュゲートされた抗体 $100 \mu\text{L}$ を添加して、ブロッキング溶液で $1/20$, 000 に希釈し、 37°C で1時間インキュベートする。

【0110】

($300 \mu\text{L}$) PBS - TWEEN 20 (0.05%) で3回の洗浄を実施する。

【0111】

3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) $100 \mu\text{L}$ を添加して、暗所で20分間インキュベートする。 20

【0112】

1N硫酸 $50 \mu\text{L}$ を付着させる。

【0113】

分光光度計を 450 nm で使用して、ペルオキシダーゼにより変換された TMB の量 (ペプチドと、血清に含有される抗体との免疫複合体の形成を示す) を読み取る。

【0114】

図4～7は、異なる被験ペプチドの R 比 (指数) を示したヒストグラムを示す。

【0115】

図8は、最も有望なペプチド C 2、C 1 2、M 3、V 5 及び G 9 (それぞれ配列：配列番号 1～5 により示される) の反応性を示す。 30

【0116】

[実施例2] - スクリーニングに用いられたプール中の異なる個々の患者からの試料に対するペプチド4種の反応性

【0117】

断片化されたペプチドが、実際に活動性結核を診断し得ることを確認するために、本発明者らは、ペプチド4種 (M 3：配列番号3、C 1 2：配列番号2、C 2：配列番号1及びO 7：配列番号6) の反応性を試験した。

【0118】

以下の表は、患者16名の血清で得られた結果を示す。 40

【表 2】

患者	M3	C12	C2	07
#1	+++	+++	+++	+++
#2	+++	+++	+	+/-
#3	+++	+/-	+/-	+/-
#4	+++	+++	+/-	+
#5	+++	+	+	+/-
#6	+++	+	+/-	+++
#7	+++	+++	+/-	+/-
#8	+++	+/-	+++	+++
#9	+++	+++	+/-	-
#10	+++	+++	+++	+++
#11	+	+/-	+/-	-
#12	+	+/-	+/-	+/-
#13	+	+	+/-	-
#14	+/-	+	+	+
#15	+/-	-	+/-	-
#16	-	+++	-	-

10

20

【0119】

+++：極度な陽性； +：陽性； +/-：低い陽性値； -：陰性

【0120】

この結果から、最良の同定された候補5種のうち3種（M3、C2、C12）が、活動性TBに罹患した被験個体の大部分（又は94%）を検出し、患者プールで得られた結果が確認されることが示される。逆に、07の診断性能はより低く、これらの被験患者での活動性TBの症例の同定について70%未満の感度である。

【0121】

【実施例3】 - 用いられた試料のプール数によるペプチドの反応性の比較

【0122】

ペプチドの反応性を評価すること、及び活動性結核診断試験に最も有望なものを選択することを目的として、本発明者らは、複数の異なる試料プールでペプチドそれぞれの免疫原性を評価した。被験プールの全てについて反応性を有するものを、最良の候補として選択した。以下の表は、3種の被験ペプチドと、異なる2種の陽性試料プールとの実施例を示す。

30

【表 3】

ペプチド	陰性プールの OD	陽性プール 1 の比率	陽性プール 2 の比率
D7	0.303	1.7	1.7
C4	0.077	-0.3	1.8
B4	0.408	0.9	1.0

40

【0123】

比率1.5が見出されたペプチドを、スクリーニング終了時に選択し、活動性TBの最良の診断候補の1つとする。被験ペプチド全てのうち、一部は、両方の患者プールで1.5を超える比率を有し（例D7）、その他は、2つのプールの一方で陽性（例C4）又は両方のプールで陰性である（例B4）。次に、ペプチドのスクリーニングを、活動性TBにより感染されている、又は感染されていない個々の患者の試料を用いることにより精査した。

50

【 0 1 2 4 】

[実施例 3] - 結核を検出するための別の方法

【 0 1 2 5 】

本発明者らにより実施されたコンセプトの E L I S A 立証法に続いて、本発明に記載された最良の結核診断候補ペプチドを統合することにより、ラテラルフロー試験を開発した。これらの結果は、本仕様（スペシフィケーション）の予測及び W H O の目的生成物のプロファイルを満たすほど十分に良好ではなかった。それゆえ本発明者らは、このラテラルフロー方策を取り止めて、より良好な性能の別法を模索することを選択した。

【 0 1 2 6 】

本発明者らは、磁気ナノシェルでの技術を開発し、それにより E L I S A 試験の性能を著しく改善し、洗浄をなくしてわずか 2、3 分以内で実施することができた。この方策は、既存の構成要素を小型化して迅速な検査室診断解決法及び今後のポイントオブケア試験を提案するという見通しに適合する。ナノシェル技術は、検査室の実験台バージョンで開発されており、現場から持ち出すことができない。これは、初期試験バージョンである。このバージョンで実施された最初の試験は、磁気ナノシェルを本発明の最良の診断候補ペプチドと組み合わせることにより、そして患者血清中の抗体を検出するための方策を用いることにより、本発明者らが E L I S A の結果と少なくとも同程度に良好な結果を、より少量のペプチドで、とりわけ 10 分未満で（伝統的な E L I S A でのおよそ 2 時間に対して）得たことを示している。最良のペプチド 5 種のうち 1 種の結果の例を、図 9 に示す。

10

【 0 1 2 7 】

それゆえ本発明者らは、実験を押し進め、最適化試験（血清の希釈、組み合わせでのペプチドの試験、検出抗体の選択、バックグラウンドノイズの制御など）の後に、本発明者らは、最良の候補 5 種のうちから用いられる最良ペプチドを同定した。並行して、可搬式試作品を開発して、本発明者らは 19 種の試料を試験した（活動性 T B の患者 13 名及び当該疾患について陰性の患者 6 名）。図 10 の結果から、この可搬式試作品により本発明者らにより過去に開発された実験台システムで得られた結果と少なくとも同程度に良好な結果を得ることができ、こうして陽性患者と陰性患者を明白に識別し得ることが示される。

20

【 0 1 2 8 】

最後に、他の試料 20 種で実施された直近の試験で、活動性 T B の患者と感染していない患者とを識別する可搬式試作品の能力を一重盲検により評価し（図 11）、診断候補ペプチドと、可搬式ナノシェルによる技術との組み合わせを統合した試験の性能を確認した。

30

【 0 1 2 9 】

再現性試験も実施したが、いずれの変動も示されていない。試験シグナルの経時的に緩徐な低下が観察されたため（図 12）、ナノシェル - ペプチド連結物の安定性を改善することが可能である。

【 0 1 3 0 】

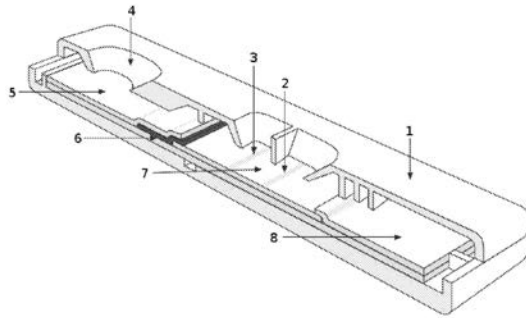
それゆえ、可搬式試作品は、非常に期待の持てる結果を示す。

【 0 1 3 1 】

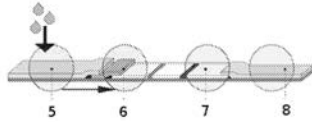
本発明は、示された実施形態に限定されず、他の実施形態が、当業者に明白に案出されるであろう。

40

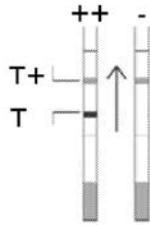
【図 1】



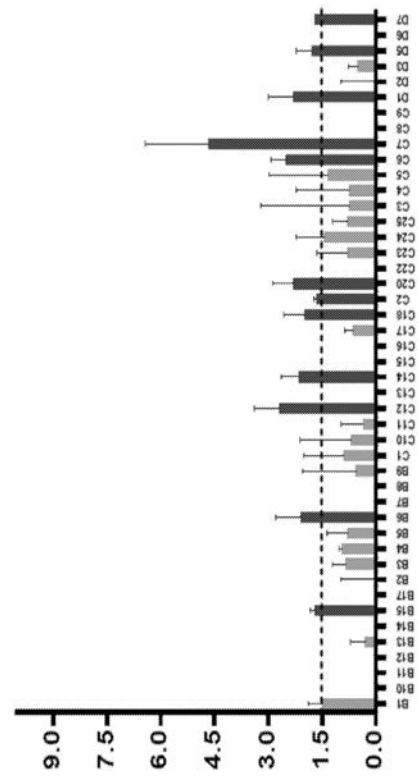
【図 2】



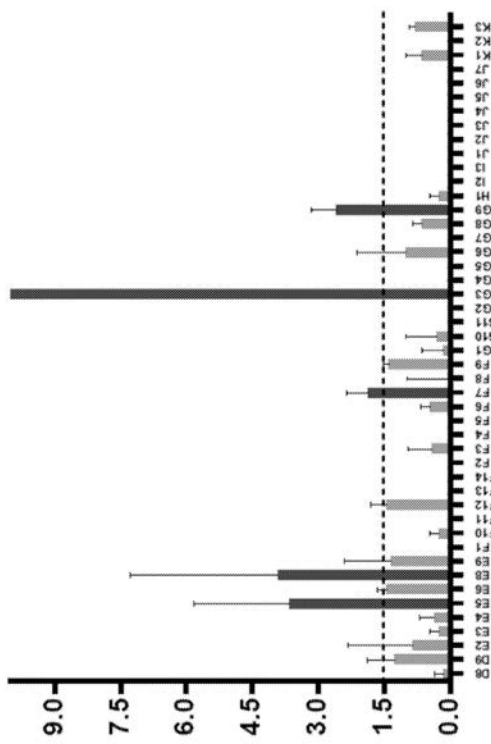
【図 3】



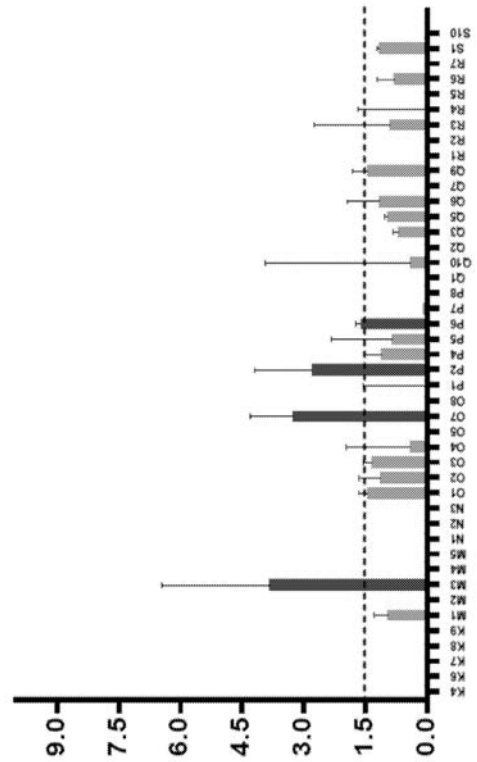
【図 4】



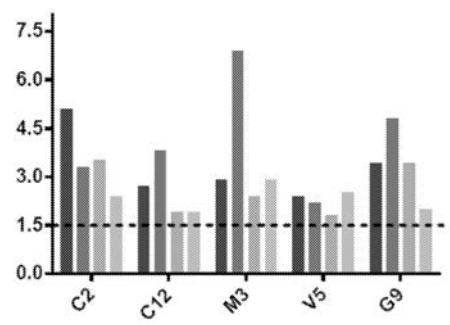
【図 5】



【図 6】

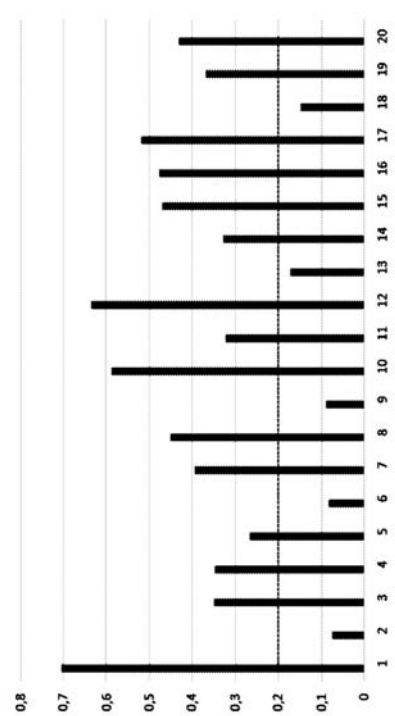


【 図 8 】

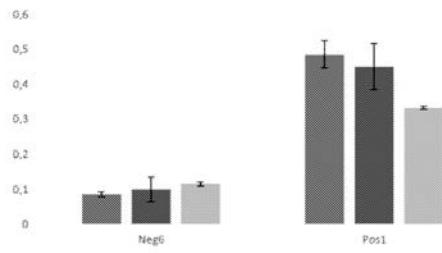


Tissue	Control Group (Dark Grey)	100 mg/kg Group (Light Grey)
1. heart	1.00	0.98
2. skeletal muscle	0.98	0.95
3. liver	0.60	0.62
4. kidney	0.52	0.50
5. brain	0.85	0.78
6. testis	1.00	0.92
7. spleen	0.52	0.48
8. thymus	0.65	0.80

【 図 1 1 】



【図 12】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/050418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/569 C07K14/35
ADD.

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)

G01N C07K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, FSTA, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/129521 A2 (UNIV NEW YORK [US]; LAAL SUMAN [US]; ZOLLA-PAZNER SUSAN [US]) 22 October 2009 (2009-10-22) the whole document abstract Example X, pages 55-57 et tableau 3 sequences 125-126, 133, 141, 143, 147 -----	5,6
X	WO 2011/119484 A1 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 29 September 2011 (2011-09-29) the whole document abstract Sequence listing ----- -/--	5,6

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

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2017

Date of mailing of the international search report

13/06/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gall-Truchot, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/050418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/040142 A2 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 21 March 2013 (2013-03-21) the whole document abstract Sequence listing -----	5,6
X	ZHANG GUOQIANG ET AL: "Screening and Assessing 11Mycobacterium tuberculosisProteins as Potential Serodiagnostical Markers for Discriminating TB Patients from BCG Vaccinees", GENOMICS PROTEOMICS AND BIOINFORMATICS, vol. 7, no. 3, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 107-115, XP029709980, ISSN: 1672-0229, DOI: 10.1016/S1672-0229(08)60039-X the whole document abstract page 108, left-hand column, paragraph 2 page 108, colonne de droite, section "Selection of H37Rv proteins recognized serologically by sera of TB patients" tables 1-3 page 109, colonne de gauche, section "Establishment of the cutoffs and evaluation of the 11 serological antigens with sera from TB patients and BCGG-vaccinated individuals" page 111, colonne de droite, section "Conclusion" page 112, colonne de gauche, section "Antibody detection by ELISA" page 112, colonne de droite, section "Data analysis" ----- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/050418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. WELDINGH ET AL: "Assessing the Serodiagnostic Potential of 35 Mycobacterium tuberculosis Proteins and Identification of Four Novel Serological Antigens", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 43, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 57-65, XP055316935, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.43.1.57-65.2005 the whole document abstract page 59, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 2 table 2 page 59, right-hand column, paragraph 3 - paragraph 1 page 60, right-hand column, paragraph 1 page 63, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 1 page 64, left-hand column, paragraph 1 -----	1-11
X	BELINDA BRUST ET AL: "Mycobacterium tuberculosis Lipolytic Enzymes as Potential Biomarkers for the Diagnosis of Active Tuberculosis", PLOS ONE, vol. 6, no. 9, 22 September 2011 (2011-09-22), page e25078, XP055014990, DOI: 10.1371/journal.pone.0025078 the whole document abstract page 2, right-hand column, last paragraph table 1 page 3, left-hand column, paragraph 2 page 3, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 3 page 7, left-hand column, paragraph 4 -----	1-11
X	WO 2012/164088 A1 (UNIV MONTPELLIER II [FR]; UNIV MONTPELLIER I [FR]; CT HOSPITALIER UNIV) 6 December 2012 (2012-12-06) cited in the application the whole document abstract examples 2, 4 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/050418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009129521 A2	22-10-2009	CA 2758124 A1 EP 2281198 A2 US 2011104194 A1 WO 2009129521 A2 ZA 201007978 B	22-10-2009 09-02-2011 05-05-2011 22-10-2009 30-05-2012
WO 2011119484 A1	29-09-2011	EP 2550529 A1 US 2013330335 A1 WO 2011119484 A1	30-01-2013 12-12-2013 29-09-2011
WO 2013040142 A2	21-03-2013	EP 2771349 A2 WO 2013040142 A2	03-09-2014 21-03-2013
WO 2012164088 A1	06-12-2012	EP 2715363 A1 FR 2976081 A1 US 2014220599 A1 WO 2012164088 A1	09-04-2014 07-12-2012 07-08-2014 06-12-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050418

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N33/569 C07K14/35 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, FSTA, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2009/129521 A2 (UNIV NEW YORK [US]; LAAL SUMAN [US]; ZOLLA-PAZNER SUSAN [US]) 22 octobre 2009 (2009-10-22) le document en entier abrégé Example X, pages 55-57 et tableau 3 séquences 125-126, 133, 141, 143, 147 -----	5,6
X	WO 2011/119484 A1 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 29 septembre 2011 (2011-09-29) le document en entier abrégé Sequence listing ----- -/--	5,6
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
22 mai 2017		13/06/2017
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé
		Gall-Truchot, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050418

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2013/040142 A2 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 21 mars 2013 (2013-03-21) le document en entier abrégé Sequence listing	5,6
X	----- ZHANG GUOQIANG ET AL: "Screening and Assessing 11Mycobacterium tuberculosisProteins as Potential Serodiagnostical Markers for Discriminating TB Patients from BCG Vaccinees", GENOMICS PROTEOMICS AND BIOINFORMATICS, vol. 7, no. 3, 1 septembre 2009 (2009-09-01), pages 107-115, XP029709980, ISSN: 1672-0229, DOI: 10.1016/S1672-0229(08)60039-X le document en entier abrégé page 108, colonne de gauche, alinéa 2 page 108, colonne de droite, section "Selection of H37Rv proteins recognized serologically by sera of TB patients" tableaux 1-3 page 109, colonne de gauche, section "Establishment of the cutoffs and evaluation of the 11 serological antigens with sera from TB patients and BCGG-vaccinated individuals" page 111, colonne de droite, section "Conclusion" page 112, colonne de gauche, section "Antibody detection by ELISA" page 112, colonne de droite, section "Data analysis" ----- -/--	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050418

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	K. WELDINGH ET AL: "Assessing the Serodiagnostic Potential of 35 Mycobacterium tuberculosis Proteins and Identification of Four Novel Serological Antigens", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 43, no. 1, 1 janvier 2005 (2005-01-01), pages 57-65, XP055316935, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.43.1.57-65.2005 le document en entier abrégé page 59, colonne de droite, alinéa 1 - alinéa 2 tableau 2 page 59, colonne de droite, alinéa 3 - page 60, colonne de droite, alinéa 1 page 63, colonne de droite, alinéa 2 - page 64, colonne de gauche, alinéa 1 -----	1-11
X	BELINDA BRUST ET AL: "Mycobacterium tuberculosis Lipolytic Enzymes as Potential Biomarkers for the Diagnosis of Active Tuberculosis", PLOS ONE, vol. 6, no. 9, 22 septembre 2011 (2011-09-22), page e25078, XP055014990, DOI: 10.1371/journal.pone.0025078 le document en entier abrégé page 2, colonne de droite, dernier alinéa tableau 1 page 3, colonne de gauche, alinéa 2 page 3, colonne de gauche, alinéa 3 - colonne de droite, alinéa 3 page 7, colonne de gauche, alinéa 4 -----	1-11
X	WO 2012/164088 A1 (UNIV MONTPELLIER II [FR]; UNIV MONTPELLIER I [FR]; CT HOSPITALIER UNIV) 6 décembre 2012 (2012-12-06) cité dans la demande le document en entier abrégé exemples 2, 4 -----	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050418

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009129521 A2	22-10-2009	CA 2758124 A1	22-10-2009
		EP 2281198 A2	09-02-2011
		US 2011104194 A1	05-05-2011
		WO 2009129521 A2	22-10-2009
		ZA 201007978 B	30-05-2012

WO 2011119484 A1	29-09-2011	EP 2550529 A1	30-01-2013
		US 2013330335 A1	12-12-2013
		WO 2011119484 A1	29-09-2011

WO 2013040142 A2	21-03-2013	EP 2771349 A2	03-09-2014
		WO 2013040142 A2	21-03-2013

WO 2012164088 A1	06-12-2012	EP 2715363 A1	09-04-2014
		FR 2976081 A1	07-12-2012
		US 2014220599 A1	07-08-2014
		WO 2012164088 A1	06-12-2012

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(71)出願人 500181278

アンスティテュ ナショナル ドゥ ラ サント エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
(イ エン エス ウ エル エム)
フランス国 1 3 セデクス パリー リュ ドゥ トルビアック 1 0 1

(71)出願人 515011944

ユニヴェルシテ・ドゥ・モンペリエ
フランス・F - 3 4 0 9 0・モンペリエ・リュ・オーギュスト・ブルソネ・1 6 3

(71)出願人 518298865

サントル オスピタリエ ユニヴェルシテール ドゥ モンペリエ
フランス国 モンペリエ セデクス 5 アヴニユ デュ ドイヤン ガストン ジロー 1 9 1

(74)代理人 100106091

弁理士 松村 直都

(74)代理人 100079038

弁理士 渡邊 彰

(74)代理人 100060874

弁理士 岸本 瑛之助

(72)発明者 ルッポ ピエール - アラン

フランス国 モンペリエ リュ チコ メンデス 1 0 0

(72)発明者 テュアイヨン エドゥアール

フランス国 カステルノー - ル - レ シュマン デュ マ デュ ディアブル 1 8 7

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA17 BA18 DA86 EA52 FA20

专利名称(译)	免疫原性肽及其用途		
公开(公告)号	JP2019511708A	公开(公告)日	2019-04-25
申请号	JP2018544825	申请日	2017-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	研究所国立拉萨在水泥埃杜拉尔外壳格哈德医疗日元上课以及EM海胆威赛引用和蒙彼利埃		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉RECHERCHE医疗 (李EN ESÇLM) Univerushite蒙彼利埃		
发明人	ルッポ ピエール-アラン テュアイヨン エドゥアール		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 C07K14/35		
CPC分类号	G01N33/5695 G01N2333/35		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.F G01N33/53.N G01N33/543.521 G01N33/553 C07K14/35		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA20		
代理人(译)	渡边晃		
优先权	2016051610 2016-02-26 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种用于筛选相应的免疫原性肽的体外方法，所述免疫原性肽能够识别源自患有活动性肺结核的个体的血清的抗体，该方法包括：接触来自患者的血清肽，在上一步中检测免疫复合物的形成，并选择R比值为1.5或更高的相应肽。包括并且涉及一种体外方法，其中R比率是免疫复合物形成的量度相对于从对照样品获得的量度。[选择图]无

(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2019-511708 (P2019-511708A) (43) 公表日 平成31年4月25日 (2019. 4. 25)
(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考) 4 H O 4 5
G O 1 N 33/569 (2006. 01)	G O 1 N 33/569 Z N A F		
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 N		
G O 1 N 33/543 (2006. 01)	G O 1 N 33/543 5 2 1		
G O 1 N 33/553 (2006. 01)	G O 1 N 33/553		
C O 7 K 14/35 (2006. 01)	C O 7 K 14/35		
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)	
(21) 出願番号 特願2018-544825 (P2018-544825)		(71) 出 願 人 518297880	
(86) (22) 出 願 日 平成29年2月24日 (2017. 2. 24)		オムニス	
(85) 翻訳文提出日 平成30年9月25日 (2018. 9. 25)		フランス国 クラピエ アヴニュ ドゥ	
(86) 国際出願番号 PCT/FR2017/050418		ルーロップ 9 キャブ アルファ	
(87) 国際公開番号 W02017/144830		(71) 出 願 人 518297891	
(87) 国際公開日 平成29年8月31日 (2017. 8. 31)		アクスエルエール サット デュ ラング	
(31) 優先権主張番号 1651610		ドック ルシヨン	
(32) 優先日 平成28年2月26日 (2016. 2. 26)		フランス国 モンベリエ リュ サンーブ	
(33) 優先権主張国 フランス (FR)		リエスト セエスユ バティマン 6 9 5 0	
		最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 免疫原性ペプチド及びその使用			