

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6374720号
(P6374720)

(45) 発行日 平成30年8月15日 (2018. 8. 15)

(24) 登録日 平成30年7月27日 (2018. 7. 27)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/571 (2006. 01)

GO 1 N 33/571 Z N A

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 N

GO 1 N 33/531 (2006. 01)

GO 1 N 33/531 Z

CO 7 K 19/00 (2006. 01)

CO 7 K 19/00

CO 7 K 14/28 (2006. 01)

CO 7 K 14/28

請求項の数 10 外国語出願 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-146428 (P2014-146428)
 (22) 出願日 平成26年7月17日 (2014. 7. 17)
 (65) 公開番号 特開2015-28479 (P2015-28479A)
 (43) 公開日 平成27年2月12日 (2015. 2. 12)
 審査請求日 平成29年1月19日 (2017. 1. 19)
 (31) 優先権主張番号 13003633. 8
 (32) 優先日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツァーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗トレポネーマ属 (Treponema) 抗体の検出のためのTpN17に基づくイムノアッセイにおける、抗干渉添加剤としてのコレラ菌 (Vibrio cholerae) リポタンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離試料において、梅毒トレポネーマ (Treponema pallidum) の TpN17 抗原に対する抗体を検出するための方法であって、コレラ菌 (Vibrio cholerae) リポタンパク質 15 (VcLp15) のペプチド配列を、干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための試薬として用いる、前記方法。

【請求項 2】

UniProtID Q9KQN6 (配列番号 1) または配列番号 2 記載のペプチド配列、あるいは配列番号 1 または 2 の部分配列を用いる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

VcLp15 の前記部分配列が、配列番号 1 または 2 のアミノ酸 26 ~ 163 を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記 VcLp15 ペプチド配列またはその部分配列がシャペロンに融合している、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 5】

配列番号 1 または 2 記載の VcLp15 ペプチド配列およびシャペロンを含む融合ポリペプチドであって、配列番号 3 または 4 を含む、前記融合ポリペプチド。

【請求項 6】

干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするためのイムノアッセイにおける添加

10

20

剤としての、請求項 5 記載の融合ポリペプチドの使用。

【請求項 7】

T p N 1 7 抗原および請求項 5 記載の融合ポリペプチドを含む、イムノアッセイにより単離試料において梅毒トレポネーマ抗原に対する抗体を検出するための、試薬キット。

【請求項 8】

単離試料において、梅毒トレポネーマの T p N 1 7 抗原に対する抗体を検出するための方法であって、

a) 体液試料を、前記試料中に存在する前記抗体が特異的に結合可能な特異的結合パートナーと混合することによって、免疫反応混合物を形成し、

b) 請求項 5 記載の融合ポリペプチドを、前記特異的結合パートナーを前記試料に添加する前、添加すると同時、または添加した後のいずれかに、前記免疫反応混合物に添加し、

c) 前記体液試料中に存在する抗体が、前記特異的結合パートナーと免疫反応して、免疫反応産物を形成することを可能にするのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持し；そして

d) 前記免疫反応産物のいずれかの存在および / または濃度を検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 9】

2 つの T p N 1 7 抗原、

第一の T p N 1 7 抗原であって、T p N 1 7 配列および第一のシャペロンを含み、固相に結合可能である、前記の第一の T p N 1 7 抗原、

第二の T p N 1 7 抗原であって、T p N 1 7 配列および第二のシャペロンを含み、検出可能標識を所持する、前記の第二の T p N 1 7 抗原

を、単離試料中で検出しようとする抗体に関する特異的結合パートナーとして用い、

どちらの T p N 1 7 抗原も同一であるかまたは免疫学的に交差反応性であり、したがって、これらは試料中に存在する抗体によって特異的に結合可能であり、そして

第一および第二のシャペロンが異なる

請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

第一の T p N 1 7 抗原がシャペロンとして大腸菌 (E . c o l i) F k p A を含み、そして第二の T p N 1 7 抗原がシャペロンとして大腸菌 S k p を含む、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単離試料において、梅毒トレポネーマ (T r e p o n e m a p a l l i d u m) の T p N 1 7 抗原に対する抗体を検出するための方法であって、コレラ菌 (V i b r i o c h o l e r a e) リボタンパク質 15 (V c L p 15) のペプチド配列を、干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための試薬として用いる、前記方法に関する。さらに、本発明は、V c L p 15 ペプチド配列およびシャペロンを含む融合ポリペプチド、干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための、イムノアッセイにおける添加剤としての該融合ポリペプチドの使用、ならびに T p N 1 7 抗原および前記 V c L p 15 - シャペロン融合ポリペプチドを含む単離試料において、梅毒トレポネーマ抗原に対する抗体を検出するための試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

梅毒 (S y p h i l i s 、また L u e s と呼ばれる) は、スピロヘータ細菌科に属する梅毒トレポネーマによって引き起こされる重症感染性疾患である。梅毒は、主に、性的接触によって伝染するが、また、妊婦である母親から妊娠中に胎児にうつる可能性もある。この疾患は、別個の臨床段階および長期間の潜伏性無症候性感染によって特徴付けられ

る。多くの感染個体は症状に気づかず、そしてしたがって梅毒感染に何年も気づかない。一次感染は限定され、そして通常、小さい無痛の潰瘍を引き起こす（第一段階、「梅毒Ⅰ」）。ペニシリンによって治療されずに放置されると、疾患は第二段階の梅毒Ⅱに進行し（感染約8週後）、これはインフルエンザ様症状、かゆみのない皮膚発疹およびリンパ節腫脹を伴う。数年後、梅毒Ⅲの段階で、梅毒性結節が全身に現れる。最終段階（梅毒Ⅳ）は、中枢神経系の崩壊によって特徴付けられ、最終的に、神経学的障害および心臓障害、全身麻痺、運動失調、認知症および失明につながる。

【0003】

20世紀半ばにペニシリンが導入されて以来、有効な療法が利用可能になっているが、梅毒はなお、毎年、全世界で1200万人の新規感染があると概算される、重要な世界的健康問題であり続けている。抗生物質療法を開始し、そしてしたがって梅毒のさらなる蔓延を防止するため、トレポネーマ属に感染した患者を信頼可能に同定することが必須である。そのため、梅毒トレポネーマに対する抗体の検出のため、イムノアッセイなどの信頼性がある診断ツールを提供する必要がある。さらに、血清学的適用における特異的化合物として用いるため、組換え由来タンパク質は、可溶性、安定性および抗原性などのいくつかの必要条件を満たす必要がある。

【0004】

成熟型では134アミノ酸残基からなる小分子タンパク質であるTpN17（梅毒トレポネーマ株ニコルス（Nichols）、17kDa）は、梅毒の原因病原体である梅毒トレポネーマの免疫優性抗原である（J. Clin. Lab. Immunol.（1998）, 50, 27-44; Folia Microbiol.（2003）48（4）, 549-553）。TpN17に向けられる抗体は、トレポネーマ属に感染した個体において頻繁にそして豊富に見られ、そしてトレポネーマ属感染の高感度でそして信頼性がある検出を目的とするイムノアッセイにおいて、TpN17を使用することが必須である。

【0005】

しかし、本発明者らは、TpN17を抗原として用いるイムノアッセイが、偽陽性結果を示す傾向があり、すなわち見かけ上、陽性のシグナルを提供するが、実際にはトレポネーマ属に対する抗体がその試料中にまったく存在しないことを観察した。これらの干渉は稀であるが、有意な現象である。これらはイムノアッセイの特異性を損ない、そしてこれらは、明らかに、梅毒イムノアッセイにおいて実質的に不可欠である梅毒トレポネーマ抗原TpN17を使用しているためである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】J. Clin. Lab. Immunol.（1998）, 50, 27-44

【非特許文献2】Folia Microbiol.（2003）48（4）, 549-553

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の根底にある問題は、したがって、抗トレポネーマ属抗体の検出のための、TpN17に基づくイムノアッセイの偽陽性結果を回避し、そして特異性を増加させるための手段および方法を提供する際に明らかになりうる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

問題は、請求項によって特徴付けられるような本発明によって解決される。特に、本発明は、単離試料において、梅毒トレポネーマのTpN17抗原に対する抗体を検出するための方法であって、コレラ菌リボタンパク質15（VcLp15）のペプチド配列または

10

20

30

40

50

その部分配列を、干渉を減少させるため、すなわち偽陽性結果を最小限にするための試薬として用いる、前記方法に関する。V c L p 1 5 ポリペプチド配列の前記部分配列は、配列番号 1 のアミノ酸 2 6 ~ 1 6 3 を含むことも可能である。さらなる態様において、前記 V c L p 1 5 ペプチド配列またはその部分配列をシャペロンに融合させる。

【 0 0 0 9 】

本発明はまた、配列番号 1 記載の V c L p 1 5 ペプチド配列またはその部分配列およびシャペロンを含む、融合ポリペプチドにも関する。好ましい態様において、V c L p 1 5 ペプチド配列に融合させるシャペロンを、S l y D、S l p A、F k p A、および S k p からなる群より選択する。

【 0 0 1 0 】

10

さらなる好ましい態様において、融合ポリペプチドは、大腸菌 (E . c o l i) S l y D および V c L p 1 5 の融合ポリペプチド (E c S l y D - V c L p 1 5) である配列番号 3 を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明にやはり含まれるのは、干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための、イムノアッセイにおける添加剤としての、V c L p 1 5 ペプチドおよび場合によってシャペロンを含む、融合ポリペプチドの使用である。

【 0 0 1 2 】

さらなる態様において、本発明は、イムノアッセイにより、単離試料において、梅毒トレポネーマ抗原に対する抗体を検出するための試薬キットであって、T p N 1 7 抗原、ならびに V c L p 1 5 ペプチドおよび場合によってシャペロンを含む融合ポリペプチドを含む、前記試薬キットに関する。

20

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、単離試料において、梅毒トレポネーマの T p N 1 7 抗原に対する抗体を検出するための方法であって、

a) 体液試料を、前記試料中に存在する前記抗体が特異的に結合可能な特異的結合パートナーと混合することによって、免疫反応混合物を形成し

b) V c L P 1 5 ペプチドおよび場合によってシャペロンを含む融合ポリペプチドを、前記特異的結合パートナーを前記試料に添加する前、添加すると同時、または添加した後のいずれかに、前記免疫反応混合物に添加し、

30

c) 前記体液試料中に存在する抗体が、前記特異的結合パートナーと免疫反応して、免疫反応産物を形成することを可能にするのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持し；そして

d) 前記免疫反応産物のいずれかの存在および / または濃度を検出する工程を含む、前記方法にも関する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】図 1 は、本発明記載の融合ポリペプチド E c S l y D - V c L p 1 5 の近 UV C D スペクトル (紫外円二色性スペクトル) を示す ; より詳細には、C D 分光測定によって監視した際の E c S l y D - V c L p 1 5 の熱誘導性アンフォールディングを記載する、実施例 4 を参照されたい。

40

【図 2】図 2 は、近 UV 領域において C D 分光測定によって監視するような、本発明記載の融合ポリペプチド E c S l y D - V c L p 1 5 の融解曲線を示す。詳細には、実施例 4 を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

表 1 は、本研究 (実施例 2) で用いる融合ポリペプチドのタンパク質パラメータを示す。

表 2 ~ 5 は、梅毒イムノアッセイにおけるコレラ菌 L p 1 5 の抗干渉活性に対する、実施例 5 にしたがって行う実験の結果を示す。

50

【 0 0 1 6 】

表 2 は、単量体 V c L p 1 5 (シャペロンとしての S l y D と融合) を干渉減少のために添加する、トレポネーマ属特異的抗原としてのオリゴマー T p N 1 7 に関する結果を示す。

【 0 0 1 7 】

表 3 は、単量体 V c L p 1 5 (シャペロンとしての S l y D と融合) を干渉減少のために添加する、トレポネーマ属特異的抗原としての単量体 T p N 1 7 に関する結果を示す。

表 4 は、オリゴマー V c L p 1 5 (シャペロンとしての S k p と融合) を干渉減少のために添加する、トレポネーマ属特異的抗原としてのオリゴマー T p N 1 7 に関する結果を示す。

10

【 0 0 1 8 】

表 5 は、オリゴマー V c L p 1 5 (シャペロンとしての S k p と融合) を干渉減少のために添加する、トレポネーマ属特異的抗原としての単量体 T p N 1 7 に関する結果を示す。

【 0 0 1 9 】

配列番号 1 は、公的データベース UniProt、寄託番号 Q 9 K Q N 6 から回収可能であるような、コレラ菌リボタンパク質 1 5 (V c L p 1 5) の完全アミノ酸配列 (1 6 3 残基) を示す。アミノ酸残基 1 ~ 2 5 は、シグナル配列を構成し ; 成熟 V c L p 1 5 はアミノ酸残基 2 6 ~ 1 6 3 (下線) を含む。

【 0 0 2 0 】

20

【 化 1 】

MMKKSIFALS ALTLILVGCD NQQDAKVEVE KVVDVAAAAPA EQSAAQPSTA SVDAAHNAQN
SLDWAGIYQG TLPCADCGGI ETELTLNADG TYALTEKYLD KEGEPFASQG TFWWNEAGNI
VTLQGTGDTG RQFMVGENTL SHLDMEGKVI EGELAEFYVL SKQ

【 0 0 2 1 】

配列番号 2 は、異なるシャペロン・モジュールとの融合に用いられるような V c L p 1 5 配列 (2 6 ~ 1 6 3) を示す。成熟 V c L p 1 5 配列 (アミノ酸残基 2 6 ~ 1 6 3) は N 末端シグナル配列 (アミノ酸 1 ~ 2 5) を欠き、そしてシステイン残基を欠く。再フォールディングプロセスを容易にし、そしてジスルフィド付加物形成を抑制するため、74 位および 77 位 [前駆体タンパク質の番号付け] の V c L p 1 5 の 2 つの真正のシステイン残基をアラニン残基によって置換した - 下線 - 。 V c L p 1 5 は、精製を容易にし、そして金属カラム (N i 、 Z n 、 C u) を通じたマトリックスカップリング再フォールディングを可能にするため、C 末端にヘキサ - ヒスチジンタグ (下線) を所持する。

30

【 0 0 2 2 】

【 化 2 】

KVEVEKVVDV AAAPAEQSAA QPSTASVDAA HNAQNSLDWA GIYQGTLPA A DAGGIETELT
LNADGTYALT EKYLDKEGEP FASQGTFWWN EAGNIVTLQT GDQTGRQFMV GENTLSHLD
EGKVI EGELA EFYVLSKQLE HHHHHH

40

【 0 0 2 3 】

配列番号 3 は、本発明記載の融合ポリペプチドであり、シャペロンとして大腸菌 S l y D の 1 分子および成熟 V c L p 1 5 配列 (2 6 ~ 1 6 3 、 下線) を含む、E c S l y D - V c L p 1 5 を示す。

【 0 0 2 4 】

【化 3】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGKV EVEKVVDVAA APAEQSAAQP STASVDAAHN AQNSLDWAGI YQGTLPAAADA
GGIETELTLN ADGTYALTEK YLDKEGEPFA SQGTFVWNEA GNIVTLQTGD QTGRQFMVGE
NTLSHLDMEG KVIEGELAEF YVLSKQLEHH HHHH

【0025】

10

配列番号 4 は、本発明記載の融合ポリペプチドであり、シャペロンとして大腸菌 S k p の 1 分子および成熟 V c L p 1 5 配列 (2 6 ~ 1 6 3 、下線) を含む、E c S k p - V c L p 1 5 を示す。

【0026】

【化 4】

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDUMA QRQTFQAQKQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGKVEVE KVVDVAAAAPA
EQSAAQPSTA SVDAAHNAQN SLDWAGIYQG TLPAADAGGI ETELTLNADG TYALTEKYLD
KEGEPFASQG TFWNEAGNI VTLQTGDQTG RQFMVGENTL SHLDMEGKVI EGELAEFYVL
SKQLEHHHHH H

20

【0027】

配列番号 5 は、UniProt ID P29722 の元にアクセス可能な公的データベース UniProt から回収されるような梅毒トレポネーマの完全 T p N 1 7 配列 (アミノ酸残基 1 ~ 1 5 6) を示す。

【0028】

【化 5】

MKGSVRALCA FLGVGALGSA LCVSCTTVCP HAGKAKAEKV ECALKGGIFR GTLPAADCPG
 IDTTVTFNAD GTAQKVELAL EKKSAPSPLT YRGTMVRED GIVELSLVSS EQSKAPHEKE
 LYELIDNSV RYMGAPGAGK PSKEMAPFYV LKKTKK

30

【0029】

配列番号 6 は、実施例 5 に用いるような T p N 1 7 配列を示す。このイムノアッセイのため、シグナル配列 (アミノ酸残基 1 ~ 2 2) を欠く成熟 T p N 1 7 タンパク質 (アミノ酸残基 2 3 ~ 1 5 6) を用いた。本発明者らは、T p N 1 7 の 4 つの真正システイン残基が、該タンパク質の抗原性に不可欠であることを見出した (データ未提示) 。したがって、再フォールディングプロセスを容易にし、そしてジスルフィド付加物形成などの有害な副反応を抑制するため、2 5 位、2 9 位、4 2 位および 5 8 位 (前駆体タンパク質の番号付け) のシステイン残基をアラニン残基によって置換した (下線) 。

40

【0030】

【化 6】

VSATTVAPHA GKAKAEKVEA ALKGGIFRGT LPAADAPGID TTVTFNADGT AQKVELALEK
 KSAPSPLTYR GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKELY ELIDNSVRY MGAPGAGKPS
 KEMAPFYVLK KTKK

【0031】

配列番号 7 は、異なるシャペロン・モジュールとの融合に用いられるような T p N 1 7 配列アミノ酸残基 2 3 ~ 1 5 6 (配列番号 6 も参照されたい) を示す。T p N 1 7 は、精

50

製を容易にし、そして金属カラム (Ni、Zn、Cu) を通じたマトリックスカップリング再フォールディングを可能にするため、C末端にヘキサ-ヒスチジンタグ (下線) を所持する。天然様コンホメーションにあるタンパク質の成熟 (プロセッシング) 型を得るために、TpN17のN末端シグナル配列 (アミノ酸残基1~22) を除いた。

【0032】

【化7】

VSATTVAPHA GKAKAEKVEA ALKGGIFRGT LPAADAPGID TTVTFNADGT AQKVELALEK
KSAPSPITYR GTWMVREDGI VELSLVSSEQ SKAPHEKELY ELIDSNSVRY MGAPGAGKPS
KEMAPFYVLK KTKKLEHHHH HH

10

【0033】

配列番号8は、大腸菌SlyDの2分子 (「タンデムSlyD」) がN末端に融合しているTpN17配列 (下線) を示す; この分子はまた、EcSlyD-EcSlyD-TpN17またはEcSS-TpN17と称される。

【0034】

【化8】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGKV AKDLVVSLEY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHHDHD HDGGSGGGG
GGSGGGSGG GSGGGVSATT VAPHAGKAKA EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF
NADGTAQKVE LALEKKSAPS PLTYRGTMV REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS
NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP FYVLKTKTKL EHHHHHH

20

【0035】

配列番号9は、パストレラ・マルトシダ (Pasteurella multocida) SlyDの2分子 (「タンデムSlyD」) がN末端に融合しているTpN17配列 (下線) を示す; この分子はまた、PmSlyD-PmSlyD-TpN17またはPmSS-TpN17と称される。

【0036】

【化9】

MKIAKNVVVS IAYQVRTEDG VLVDEAPVNQ PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
GNHMLAGQEL LFSVEVVATR EATLEEIAHG HIHQEGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGKIA
KNVVVSIAYQ VRTEDGVLVD EAPVNQPLEY LQGHNNLVIG LENALEGKAV GDKFEVRVKP
EEAYGEYNEN MVQRVPKDV QGVDELVVGM RFIADTDIGP LPVVITEVAE NDVVVDGNHM
LAGQELLFSV EVVATREATL EEIAHGHIGHQ EGGGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGVSATT
VAPHAGKAKA EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF NADGTAQKVE LALEKKSAPS
PLTYRGTMV REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP
FYVLKTKTKL EHHHHHH

40

【0037】

配列番号10は、大腸菌FkpAの1分子がN末端に融合しているTpN17配列 (下線) を示す; この分子はまた、EcFkpA-TpN17と称される。

50

【 0 0 3 8 】

【 化 1 0 】

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGV SATTVAPHAG KAKAEKVEAA LKGGIFRGTL
PAADAPGIDT TVTFNADGTA QKVELALEKK SAPSPLTYRG TWMVREDGIV ELSLVSSEQS
KAPHEKELYE LIDNSVRYM GAPGAGKPSK EMAPFYVLKK TKKLEHHHHH H

10

【 0 0 3 9 】

配列番号 1 1 は、大腸菌 S k p の 1 分子が N 末端に融合している T p N 1 7 配列（下線）を示す；この分子はまた、E c S k p - T p N 1 7 と称される。

【 0 0 4 0 】

【 化 1 1 】

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDUMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGVSATT VAPHAGKAKA
EKVEAALKGG IFRGTLPAAD APGIDTTVTF NADGTAQKVE LALEKKSAPS PLTYRGTTMV
REDGIVELSL VSSEQSKAPH EKELYELIDS NSVRYMGAPG AGKPSKEMAP FYVLKTKTKL
 EHHHHHH

20

【 0 0 4 1 】

配列番号 1 2 は、いくつかのシャペロン部分間の、柔軟で、可溶性であり、そしてプロテアーゼ耐性であるスペーサーまたはリンカーとして使用可能な、グリシンリッチスペーサー（セリンによって分離される 3 つのグリシン単位を含む）の amino 酸配列を示す。

【 0 0 4 2 】

【 化 1 2 】

GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG GGG

30

【 0 0 4 3 】

発明の詳細な説明

梅毒トレポネーマに対する抗体の検出のためのイムノアッセイは、本発明者らによって立証可能であるように、偽陽性結果を示す傾向がある。特に、トレポネーマ属抗原 T p N 1 7 を用いる場合、偽陽性シグナルの数は、有意に上昇する。この現象は、抗トレポネーマ属陰性であると間違いなく性質決定されているヒト血清で観察されてきている：T p N 1 7 抗原を用いる場合、かなりの数の偽陽性が見出された（実施例 5 を参照されたい）。それでも、T p N 1 7 は、トレポネーマ属感染における非常に重要な免疫原および梅毒血清学における最重要抗原である。その結果、T p N 1 7 抗原を単に除くことによって、この干渉問題を回避するのは、実行可能なオプションではない。

40

【 0 0 4 4 】

本発明者らは、したがって、抗 T p N 1 7 抗体の信頼性があり、そして高感度である検出を可能にする、組換え T p N 1 7 変異体の設計から始めた。より正確には、本発明者らは、T p N 1 7 を、グリシンおよびセリン残基が豊富で柔軟なリンカーを通じて、可溶性を与えるシャペロン（タンデム S l y D、すなわち E c S l y D - E c S l y D および P m S l y D - P m S l y D）に融合させた。融合したフォールディングヘルパーの有益な影響のため、生じる融合ポリペプチドは、血清学的目的のための（すなわちイムノアッセイにおいて使用するための）優れた抗原の、物理化学的および免疫学的必要条件すべてを

50

満たす。

【0045】

本発明者らが自動化梅毒イムノアッセイのために設計したシャペロン - T p N 1 7 融合タンパク質は、非常に可溶性でそして反応性であり、そして二重抗原サンドイッチ形式で好適に使用される。上述のように、梅毒イムノアッセイのための実行可能性研究中、T p N 1 7 は、実際に、驚くべき診断重要性を持つ、免疫優性トレポネーマ属抗原であることがわかった。言い換えると、望ましい感受性を保証するため、梅毒イムノアッセイにおいて T p N 1 7 変異体を用いることが不可欠である。しかし、T p N 1 7 のシャペロンポリペプチド融合構築物を二重抗原サンドイッチ (D A G S) 形式で用いる場合、問題が明らかになった: T p N 1 7 融合構築物が非対称形式で設計されている (すなわち、D A G S 形式の対称性を、ビオチン側およびルテニウム側で、異なる融合パートナーを使用することによって、故意に無効にした) もの、そして抗干渉添加剤としてシャペロン・ポリマーを使用しているにもかかわらず、よく性質決定された抗トレポネーマ属陰性ヒト血清の一団において、かなりの数の陽性結果が生じ、アッセイ特異性の実質的な悪化を導いた。明らかに、いくつかの抗トレポネーマ属陰性ヒト血清は、T p N 1 7 抗原と特異的に相互作用することが可能な、少なくとも1つの未知の因子を含有した。

10

【0046】

驚いたことに、特定の配列相同性があるにもかかわらず、梅毒トレポネーマとはまったく関連しない生物であるヒト病原体コレラ菌由来の組換え由来タンパク質 L p 1 5 (V c L p 1 5) をイムノアッセイ混合物に添加すると、実施例 5 および表 2 ~ 5 に見られうるように、偽陽性のシグナル上昇が、陰性血清のシグナルレベルにまで減少することがわかった。本発明者らは、V c L p 1 5 が (非標識型で添加された際)、T p N 1 7 に対して向けられる未知の干渉因子 (単数または複数) を認識し、これに結合し、そしてこれを抑えることが可能であると結論づける。実際、V c L p 1 5 が、偽陽性結果を減少させ、そしてトレポネーマ属抗原 T p N 1 7 に基づく梅毒イムノアッセイの特異性を改善するための、非常に有益なツールであることがわかった。

20

【0047】

詳細には、本発明は、単離試料において、梅毒トレポネーマの T p N 1 7 抗原に対する抗体を検出するための方法であって、コレラ菌リボタンパク質 1 5 (V c L p 1 5) のペプチド配列またはその部分配列を、干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための試薬として用いる、前記方法に関する。

30

【0048】

抗原のコンホメーションが、試料中に存在する抗体によって認識されるために十分に天然様であるという条件で、任意の T p N 1 7 抗原またはその変異体を使用可能である。自然宿主、梅毒トレポネーマにおいて、T p N 1 7 の N 末端シグナル配列 (残基 1 ~ 2 2) は前駆体タンパク質から切断され、成熟 T p N 1 7 部分が天然コンホメーションにフォールディングすることが可能になる。言い換えると、T p N 1 7 を原核宿主、例えば大腸菌において組換え的に産生する場合には、シグナル配列はなくてもよい。シグナル配列は、むしろ、ターゲット分子の適切なフォールディングを妨げ、そしてしたがって除かれる。好ましくは、UniProt ID P 2 9 7 2 2 (配列番号 5) または配列番号 6 記載のペプチド配列、あるいは配列番号 5 または 6 の部分配列を用いる。部分配列は、配列番号 5 または 6 の少なくとも約 1 0 0 アミノ酸を含む。最も好ましいのは、配列番号 5 のアミノ酸残基 2 3 ~ 1 5 6 または配列番号 6 のアミノ酸残基 1 ~ 1 3 4 を含むアミノ酸配列である。

40

【0049】

好ましい T p N 1 7 抗原は、配列番号 7 ~ 1 1 記載のポリペプチドであり、ここで、T p N 1 7 は、多様なシャペロンペプチド配列に融合している。精製後の再フォールディングプロセスを容易にし、そしてジスルフィド付加物形成を抑制するため、すべての予測される T p N 1 7 抗体中のシステイン残基を、他のアミノ酸残基、例えばアラニンまたはセリンによって置換してもよい。これらの残基は、システイン側鎖の酸化感受性チオール部

50

分を置換するが、サイズがシステイン残基とほぼ同じである。したがって、これらは通常、全体の三次元タンパク質構造に適合し、そしてシステイン不含タンパク質変異体のフォールディングおよび安定性をひどくは損なわない。

【0050】

本発明の方法にしたがって、コレラ菌リポタンパク質15 (V c L p 1 5) のペプチド配列またはその部分配列を、干渉を減少させるための、すなわち偽陽性結果を最小限にするための試薬として用いる。好ましくは、V c L p 1 5 の前記部分配列は、配列番号1または2のアミノ酸残基26 ~ 163を含む。配列番号1の残基1 ~ 25を含むN末端シグナル配列はなくてもよい。本発明のさらなる様式において、配列番号1または2のアミノ酸残基26 ~ 163の前記V c L p 1 5 部分配列を、N末端またはC末端あるいは両端で1 ~ 5アミノ酸、一部切除 (t r u n c a t e d) することも可能である。別の態様において、配列番号1または2のアミノ酸残基26 ~ 163の前記V c L p 1 5 部分配列は、例えば、セリン残基またはシステインによるアラニン残基の置換のように、保存的アミノ酸置換を導入可能であるような方式で、修飾可能である。これらの3つのアミノ酸のいずれも、他の2つのアミノ酸によって置換可能である。当業者に知られる保存的アミノ酸置換の他の例は、セリン/システイン/アラニン、イソロイシン/バリンまたはフェニルアラニン/チロシンである。任意のこれらの修飾のため、コレラ菌リポタンパク質15 (V c L p 1 5) の三次元構造が不変のままであることが重要である。

【0051】

好ましくは、上述の方法において用いるV c L p 1 5 ペプチド配列またはその部分配列を、シャペロンに融合させて、高い発現収量を提供し、そして精製後の再フォールディングプロセスを容易にする。

【0052】

本発明のさらなる側面は、配列番号1または2記載のV c L p 1 5 ペプチド配列あるいは配列番号1または2の部分配列およびシャペロンを含む融合ポリペプチドである。

困難なターゲット抗原配列にシャペロンを融合させて、該配列を可溶化し、そしてより良性にする、ポリペプチド融合タンパク質の使用が、当該技術分野に周知であり、そして国際特許出願WO 2003/000878などに以前に非常に詳細に記載されてきている。有用な融合シャペロンの、既知であり、そしてよく文書化された例は、S l y D、F k p A、S k p およびS l p Aである。欧州特許出願EP 2 1 2 7 6 7 8 A 1 もまた参照されたい。

【0053】

したがって、本発明のさらなる側面は、V c L p 1 5 ペプチド配列およびシャペロンを含む融合ポリペプチドである。好ましい態様において、シャペロンは、S l y D、S l p A、F k p A およびS k p からなる群より選択される。これらのシャペロンは多様な生物から生じることも可能であり、好ましくは、シャペロン配列は大腸菌由来である。

【0054】

本発明の別の態様において、V c L p 1 5 ペプチド配列を含む融合ポリペプチドは、配列番号3 (E c S l y D - V c L p 1 5) を含む。

干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための、イムノアッセイにおける添加剤としての、V c L p 1 5 ペプチドおよびシャペロンを含む融合ポリペプチドの使用もまた、本発明の側面である。

【0055】

本発明の別の側面は、T p N 1 7 抗原、ならびに上記にさらに詳細に記載するような、V c L p 1 5 ペプチド配列およびシャペロンを含む融合ポリペプチドを含む、イムノアッセイにより単離試料において梅毒トレポネーマ抗原に対する抗体を検出するための、試薬キットである。

【0056】

さらに、本発明は、単離試料において、梅毒トレポネーマのT p N 1 7 抗原に対する抗体を検出するための方法であって、

a) 体液試料を、前記試料中に存在する前記抗体が特異的に結合可能な特異的結合パートナーと混合することによって、免疫反応混合物を形成し

b) 上に定義するようなVcLp15ペプチド配列を含む融合ポリペプチドを、前記特異的結合パートナーを前記試料に添加する前、添加すると同時、または添加した後のいずれかに、前記免疫反応混合物に添加し、

c) 前記体液試料中に存在する抗体が、前記特異的結合パートナーと免疫反応して、免疫反応産物を形成することを可能にするのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持し；そして

d) 前記免疫反応産物のいずれかの存在および/または濃度を検出する工程を含む、前記方法を含む。

10

【0057】

本発明の融合ポリペプチドを、前記結合パートナーを試料に添加する前、添加すると同時、または添加した後のいずれかに、イムノアッセイ混合物（試料および試料中の分析物抗体に特異的に結合する結合パートナーを含む）に添加してもよい。好ましくは、融合ポリペプチドを、分析物抗体を含有する体液試料を特異的結合パートナーと接触させる前に、試験試薬に添加する。

【0058】

本発明の1つの態様において、いわゆる二重抗原サンドイッチ概念(DAGS)にしたがって、単離試料における抗トレポネーマ属抗体を検出するためのイムノアッセイを実行する。ときに、このアッセイ概念はまた、二重抗原架橋概念とも称され、これは2つの抗原が抗体分析物によって架橋されるためである。こうしたアッセイにおいて、抗体が、2つ(IgG、IgE)、4つ(IgA)または10/12(IgM)のパラトープで、所定の抗原の少なくとも2つの異なる分子と結合する能力が必要であり、そしてこうした能力が用いられる。

20

【0059】

より詳細には、2つの異なるTpN17抗原、すなわち第一の(「固相」)TpN17抗原および第二の(「検出」)TpN17抗原と、抗トレポネーマ属抗体を含有する試料をインキュベーションすることによって、二重抗原架橋形式にしたがった抗トレポネーマ属抗体の決定のためのイムノアッセイを行い、ここで前記抗原は各々、前記抗トレポネーマ属抗体に特異的に結合する。第一の抗原は、固相に直接または間接的に結合するかまたは結合可能であり、そして通常、ビオチン/アビジンのようなバイオアフィン(bioaffine)結合対の一部であるエフェクター基を所持する。例えば、第一の抗原をビオチンにコンジュゲート化させた場合、固相をアビジンまたはストレプトアビジンのいずれかでコーティングする。第二の抗原は、検出可能標識を所持する。次いで、第一の抗原、試料抗体および第二の抗原を含む免疫反応混合物が形成される。前記抗原に試料を添加する前、または免疫反応混合物が形成された後のいずれかに、第一の抗原が結合可能な固相を添加する。体液試料中の前記TpN17抗原に対する抗トレポネーマ属抗体が、前記TpN17抗原と免疫反応して、免疫反応産物を形成するのに十分な期間、この免疫反応混合物を維持する。次の工程は、液相を固相から分離する分離工程である。最終的に、任意の前記免疫反応産物の存在を、固相または液相あるいは両方で検出する。

30

40

【0060】

前記DAGSイムノアッセイにおいて、「固相抗原」および「検出抗原」の基本構造は同じである。二重抗原架橋アッセイにおいて、免疫学的に交差反応性である、類似であるが異なるTpN17抗原を使用することもまた可能である。こうしたアッセイを実行するための本質的な必要条件は、単数または複数の適切なエピトープが両方の抗原上に存在することである。本発明にしたがって、各TpN17抗原に関する異なる融合部分を用いることが望ましく(例えばEcFkpAを固相側でTpN17に融合させ、そしてEcSkpを検出側でTpN17に融合させる)、これはこうした変動が、DAGS形式の対称性を壊し、そしてしたがって、イムノアッセイの偽陽性結果を導くであろう融合シャペロンの抗体仲介性架橋の問題を減少させるためである。簡潔には、構造的に離れた融合パート

50

ナーをDAGS形式の両側で使用すると、望ましくない免疫学的交差反応が減少し、そしてしたがって特異性が改善される。

【0061】

したがって、本発明はまた、単離試料において、梅毒トレポネーマのTpN17抗原に対する抗体を検出するための方法であって、VcLp15のペプチド配列を、干渉を減少させ、そして偽陽性結果を最小限にするための試薬として用いる、前記方法にも関する。前記方法は、該アッセイが二重抗原サンドイッチ形式(DAGS)で実行されることでさらに特徴付けられる。さらに、前記アッセイは、2つのTpN17抗原融合ポリペプチド - 第一および第二のTpN17抗原 - を用い、ここで、どちらのTpN17抗原も同一であるか、または少なくとも同じ抗体に対して免疫学的に交差反応性であり、したがって、試料中に存在する抗体によって、両方の抗原が架橋されることが可能である。さらに、第一および第二の抗原を、先行する段落に記載するように、異なるシャペロンに融合させる。

10

【0062】

さらに、SkpおよびFkpAのような特異的シャペロン融合パートナーの使用は、かなり改善されたIgM認識および検出を容易にしうる。結合のアビディティ様式のため、IgM分子は、中程度から高いエピトープ密度を所持するポリマー性抗原としか反応できない。SkpおよびFkpAの両方は、グラム陰性細菌の周辺質におけるフォールディングヘルパーとしての役割を果たすオリゴマーシャペロンである。驚いたことに、本発明者らは巨大ターゲット分子がシャペロンのC末端に融合した際、SkpおよびFkpAのクオターリー(quarternary)構造が維持されることを見出している。その結果、FkpA - TpN17およびSkp - TpN17融合タンパク質は、IgM分子を検出するのに十分な定義されるエピトープ密度を持つ天然オリゴマーを、再現可能に形成する。高感度でそして特異的なIgM検出は、初期および一次梅毒感染の信頼性がある検出を保証する、非常に重要な特徴である。本発明者らは、総免疫グロブリン検出(すなわちIgGおよびIgM両方の検出)のためのイムノアッセイを発展させることを目的としているため、オリゴマー抗原モジュールFkpA - TpN17およびSkp - TpN17は、DAGS形式の両側の特定因子として、好適に使用可能である(例えばFkpA - TpN17 - ビオチンおよびSkp - TpN17 - ルテニウム)。FkpAおよびSkpは構造の点では非常に別個の型であるため、望ましくない免疫学的交差反応および融合パートナーを通じた架橋のリスクは非常に低い。化学的に重合させたFkpAおよびSkp抗干渉添加剤をアッセイに添加することによって、これはさらに減少する。

20

30

【0063】

分析物を検出するためのイムノアッセイの多様なさらなる形式および原理、ならびに異なる様式の検出が、広く記載されてきており、そしてこれらは、当業者によく知られる。

本発明にしたがって、トレポネーマ属抗体が検出可能でありうる任意の生物学的単離試料が使用可能である。特に、ヒト血液、血清、血漿または唾液は、試料材料として適切である。

【0064】

本発明はさらに、実施例セクションに例示される。

40

【実施例】

【0065】

実施例 1

TpN17およびVcLp15シャペロン融合ポリペプチドのクローニングおよび精製 発現カセットのクローニング

Novagen(米国ウィスコンシン州マディソン)のpET24a発現プラスミドに基づいて、TpN17およびVcLp15融合タンパク質をコードする発現カセットを、本質的に記載されるように得た(Scholz, C.ら, J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241)。TpN17およびVcLp15抗原の配列を、SwissProtデータベース(それぞれ、SwissProt ID P2

50

9722およびQ9KQN6)から回収した。インフレイムでN末端に融合させたグリシンリッチリンカー領域を含む、成熟TpN17 aa 23~156(アミノ酸残基1~22に渡るシグナルペプチドを除いた)をコードする合成遺伝子をMedigenomix(ドイツ・マルティンスリート)から購入した。酸化または分子間ジスルフィド架橋などの望ましくない副次的影響を防止するため、25位、29位、42位および58位のTpN17のシステイン残基を、アラニン残基に変化させた。BamHIおよびXhoI制限部位は、それぞれ、TpN17コード領域の5'および3'端であった。グリシンリッチリンカー領域を通じて連結され、そしてC末端にさらなるリンカー領域部分を含む、2つのEcSlyD単位(配列番号1記載の残基1~165、SwissProt寄託番号第P0A9K9号)をコードするさらなる合成遺伝子を、同様に、Medigenomixから購入した。NdeIおよびBamHI制限部位は、それぞれ、このカセットの5'および3'端であった。単純な連結による、シャペロン部分EcSlyD-EcSlyDおよびTpN17抗原部分のインフレイム融合を可能にするように、遺伝子および制限部位を設計した。偶発的な組換えプロセスを回避し、そして大腸菌宿主における発現カセットの遺伝的安定性を増加させるため、EcSlyD単位をコードするヌクレオチド配列を、伸長されたリンカー領域をコードするヌクレオチド配列と同様に、縮重させ、すなわち、同一のアミノ酸配列をコードするように、異なるコドンの組み合わせを用いた。

【0066】

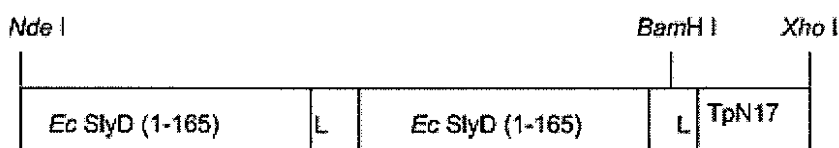
pET24aベクターをNdeIおよびXhoIで消化し、そしてインフレイムでトレポナーマ属TpN17 23~156に融合させたタンデム-SlyDを含むカセットを挿入した。パスツレラ・マルトシダSlyD(1~156、SwissProt ID Q9CKP2)あるいは大腸菌Skp(21~161、SwissProt ID P0AEU7)またはFkpA(26~270、SwissProt ID P45523)を含む発現カセットを、それに応じて構築し、同様に、TpN17と異なるターゲットポリペプチド、特にコレラ菌リボタンパク質Lp15(26~163、SwissProt ID Q9KQN6)を含む発現カセットを構築した。TpN17のように、酸化または分子間ジスルフィド架橋などの望ましくない副次的影響を防止するため、74位および77位(前駆体Lp15の番号付け)のVcLp15の真正システイン残基をアラニン残基に変化させた。すべての組換え融合ポリペプチド変異体は、Ni-NTA補助精製および再フォールディングを容易にするためC末端ヘキサヒスチジンタグを含有した。QuickChange(Stratagene、カリフォルニア州ラホヤ)および標準的PCR技術を用いて、それぞれの発現カセットにおいて、点突然変異、欠失、挿入および伸長変異体または制限部位を生成した。

【0067】

以下の図は、N末端にインフレイムで融合した2つのSlyDシャペロン単位を所持するトレポナーマ属TpN17全長抗原23~156のスキームを示す。SlyD融合パートナーが大腸菌起源であることを示すため、図示する融合ポリペプチドは、EcSlyD-EcSlyD-TpN17(23~156)と命名されている；配列番号8も参照されたい。

【0068】

【化13】



L = (GGGS)₈GGG-リンカー

【0069】

生じたプラスミドの挿入物を配列決定し、そして望ましい融合タンパク質をコードすることを見出した。TpN17およびVcLp15融合ポリペプチドの完全アミノ酸配列を

配列番号 2 ~ 4 (V c L p 1 5) および 7 ~ 1 1 (T p N 1 7) に示す。リンカー L のアミノ酸配列を配列番号 1 2 に示す。

【 0 0 7 0 】

T p N 1 7 または V c L p 1 5 を含む融合タンパク質の精製

実質的に同一のプロトコルを用いることによって、すべての T p N 1 7 および V c L p 1 5 融合タンパク質変異体を精製した。特定の p E T 2 4 a 発現プラスミドを宿する大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 細胞を、カナマイシン (3 0 μ g / m l) を加えた L B 培地中、37 で 1 . 5 の O D ₆₀₀ まで増殖させ、そして 1 m M イソプロピル - β - D - チオガラクトシドを添加することによって、細胞質溶解性過剰発現を誘導した。誘導 3 時間後、遠心分離 (5 0 0 0 g で 2 0 分) によって細胞を採取し、凍結し、そして - 2 0 で保存した。細胞溶解のため、冷却した 5 0 m M リン酸ナトリウム p H 8 . 0、7 . 0 M G d m C l、5 m M イミダゾール中に凍結ペレットを再懸濁し、そして再懸濁物を氷上で 2 時間攪拌して、細胞溶解を完了させた。遠心分離および濾過 (0 . 4 5 μ m / 0 . 2 μ m) 後、未精製溶解物を、5 . 0 m M T C E P を含む溶解緩衝液で平衡化させた N i - N T A カラム上に適用した。続く洗浄工程を、それぞれのターゲットタンパク質用に調整して、そしてこれは、5 ~ 1 5 m M イミダゾール (5 0 m M リン酸ナトリウム p H 8 . 0、7 . 0 M G d m C l、5 . 0 m M T C E P 中) の範囲であった。少なくとも 1 0 ~ 1 5 体積の洗浄緩衝液を適用した。次いで、G d m C l 溶液を、5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l、1 0 m M イミダゾール、5 . 0 m M T C E P によって置換して、マトリックスに結合したタンパク質のコンホメーション的再フォールディングを誘導した。同時精製プロテアーゼの再活性化を回避するため、プロテアーゼ阻害剤カクテル (C o m p l e t e (登録商標) E D T A 不含、R o c h e) を再フォールディング緩衝液中に含んだ。総計 1 5 ~ 2 0 カラム体積の再フォールディング緩衝液を一晩反応で適用した。次いで、3 ~ 5 カラム体積の 5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l、1 0 m M イミダゾールで洗浄することによって、T C E P および C o m p l e t e (登録商標) E D T A 不含阻害剤カクテルを除去した。続いて、非特異的に結合しているタンパク質混入物質を除去するため、イミダゾール濃度を、なお 5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l 中で、2 5 ~ 5 0 m M (それぞれのターゲットタンパク質に応じる) に上昇させた。次いで、同じ緩衝液中、5 0 0 m M イミダゾールによって、天然タンパク質を溶出させた。T r i c i n e - S D S - P A G E によって、純度に関してタンパク質含有分画を評価し、そしてプールした。最後に、タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィ (S u p e r d e x H i L o a d、A m e r s h a m P h a r m a c i a) に供し、そしてタンパク質含有分画をプールし、そして A m i c o n セル (Y M 1 0) 中、1 0 ~ 2 0 m g / m l に濃縮した。

【 0 0 7 1 】

カップリングした精製および再フォールディングプロトコル後、それぞれのターゲットタンパク質に応じて、およそ 1 0 ~ 3 0 m g のタンパク質収量を、1 g の大腸菌湿細胞から得ることが可能であった。

【 0 0 7 2 】

実施例 2

分光光度測定

U v i k o n X L 二重光線分光光度計を用いて、タンパク質濃度測定を実行した。P a c e (1 9 9 5) , P r o t e i n S c i . 4 , 2 4 1 1 - 2 4 2 3 によって記載される方法を用いることによって、モル消光係数 (ϵ_{280}) を決定した。別個の融合ポリペプチドに用いたモル消光係数 (ϵ_{M280}) を表 1 に明記する。

【 0 0 7 3 】

表 1 : 本研究で用いた融合ポリペプチド変異体のタンパク質パラメータ。すべてのパラメータは、それぞれのタンパク質単量体を指す。

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

【表 1】

融合タンパク質	ターゲット タンパク質 の長さ (aa 残基)	融合ポリペプチ ドの分子量 (Da)	pI	ϵ_{M280} $M^{-1}cm^{-1}$	Abs _{0.1%} (= 1 mg/ml)
TpN17 変異体					
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN17	23-156	54048	5.0	23380	0.433
<i>PmSlyD-PmSlyD</i> -TpN17	23-156	52171	4.9	23380	0.448
<i>EcFkpA</i> -TpN17	23-156	42995	8.3	27390	0.637
<i>EcSkp</i> -TpN17	23-156	32461	9.3	12950	0.399
<i>VcLp15</i> 変異体					
<i>EcSlyD-VcLp15</i>	26-163	35156	4.6	22920	0.652
<i>EcSkp-VcLp15</i>	26-163	33010	5.3	18450	0.559

【 0 0 7 5 】

融合ポリペプチド変異体のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 3、4、8、9、10 および 11 に示す。

実施例 3

TpN17 融合タンパク質へのビオチンおよびルテニウム部分のカップリング

TpN17 融合ポリペプチドのリジン ϵ -アミノ基を、10 ~ 30 mg/ml のタンパク質濃度で、それぞれ、N-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化ビオチンおよびルテニウム標識分子で修飾した。標識/タンパク質比は、それぞれの融合タンパク質に応じて、2 : 1 ~ 5 : 1 (mol : mol) で多様であった。反応緩衝液は、150 mM リン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、0.5 mM EDTA であった。反応を室温で 15 分間行い、そして 10 mM の最終濃度まで緩衝 L-リジンを添加することによって、停止させた。標識の加水分解不活性化を回避するため、それぞれのストック溶液を乾燥 DMSO (seccosolv 品質、Merck、ドイツ) 中で調製した。反応緩衝液中の最大 25% の DMSO 濃度は、研究したすべての融合タンパク質によく許容された。カップリング反応後、未精製タンパク質コンジュゲートをゲル濾過カラム (Superdex 200 HiLoad) 上に通過させることによって、未反応未結合標識を除去した。

【 0 0 7 6 】

実施例 4

CD に検出される、EcSlyD-VcLp15 の熱誘導性アンフォールディング

サーモスタットを備えた細胞ホルダーを持つ Jasco-720 分光旋光計を用いて、近 UV CD スペクトルを記録し、そして平均残基楕円率に変換した。緩衝液は、50 mM リン酸カリウム pH 7.0、250 mM KCl、0.5 mM EDTA であった。経路長は 0.2 cm であり、タンパク質濃度は ~ 74 μ M (2.6 mg/ml) であった。測定範囲は 250 ~ 330 nm であり、バンド幅は 1.0 nm であり、スキャン速度は 0.5 nm/deg の解像度で 20 nm/分であり、そして反応は 1 秒であった。シグナル対ノイズ比を改善するため、スペクトルを 9 回測定し、そして平均した。

【 0 0 7 7 】

円二色性分光測定 (CD) は、タンパク質の二次構造および三次構造両方を評価する最適な方法である。芳香族領域 (260 ~ 320 nm) における楕円率は、タンパク質内の三次接触 (すなわち通常通りにフォールディングしたタンパク質の球状構造) に関して報告し、そして天然様フォールド (コンホメーション) のフィンガープリント領域と見なさ

れる。

【0078】

E c S l y D - V c L p 1 5 の近 U V C D スペクトルを監視して、精製プロセスにおいて非常に重要な工程であるマトリックスカップリング再フォールディング法後に、融合タンパク質が秩序だったコンホメーションを採用するかどうかの疑問に取り組んだ。答えは非常に明快である：E c S l y D - V c L p 1 5 の近 U V C D シグナルは、明白に、融合ポリペプチドの秩序だった三次構造を報告する。E c S l y D - V c L p 1 5 の芳香族残基は、明らかに、親油性タンパク質コア中に包埋されており、そしてしたがって、融合構築物内の E c S l y D および V c L p 1 5 両方が天然様コンホメーションであることを強く示す非対称環境を経験する（図1）。 10

【0079】

E c S l y D - V c L p 1 5 の熱誘導性アンフォールディングが可逆性であるかどうかの疑問に取り組むため、281nmの検出波長の近UV領域において、融解曲線を監視した。温度範囲は20～80 であり、バンド幅は1.0nmであり、温度勾配は1 / 分であり、そして反応は4秒であった（図2を参照されたい）。

【0080】

熱誘導性アンフォールディングを281nm（E c S l y D - V c L p 1 5 に関する最大シグナル振幅の波長である）で監視した。加熱した際、E c S l y D - V c L p 1 5 分子の天然コンホメーションを安定化する非共有接触は、ゆるくなり、そして最終的に分解される。この熱誘導性アンフォールディングは、図2に示すようなCDシグナル中の増加に反映される。80 で、E c S l y D - V c L p 1 5 は、完全にアンフォールディングされる。驚くべきことに、タンパク質溶液を20 まで冷却すると、天然様CDシグナルが再び回復する。わずかな履歴現象にもかかわらず、アンフォールディング曲線および再フォールディング曲線は、実質的に重ね合わせであり、E c S l y D - V c L p 1 5 が可逆的再フォールディングの振る舞いをすることが強く示唆される。アンフォールディングの協同性はかなり低く、そしてタンパク質融解曲線の典型的なシグモイド形状は、E c S l y D - V c L p 1 5 の場合には観察されないことを認めざるを得ない。それでも、本発明者らは、タンパク質溶液を80 から20 に冷却した際、明らかに、E c S l y D - V c L p 1 5 が天然様コンホメーションを再採用可能であることを見出した。実際、熱誘導性アンフォールディング前および後に監視した近UV C D スペクトルは、実質的に重ね合わせである（図1を参照されたい）。結論として、E c S l y D - V c L p 1 5 は、ロバストなフォールディング特性を所持し、これは融合ポリペプチドに関しては傑出しており、そしてイムノアッセイにおいて抗干渉添加剤として働く分子に関しては非常に望ましい。これらの良性物理化学的特性は、傑出した可溶性（リン酸緩衝生理食塩水中、> 130mg / ml）および抗トレポネーマ属イムノアッセイにおいて抗干渉潜在能力を有することと組み合わせて、E c S l y D - V c L p 1 5 を、梅毒血清学において、高い特異性を保証する、非常に魅力的な分子としている。 20 30

【0081】

実施例 5

梅毒イムノアッセイにおけるコレラ菌 L p 1 5 の抗干渉活性

コレラ菌 L p 1 5 のポリペプチド融合変異体の抗干渉活性を、自動化 E l e c s y s （登録商標）2010分析装置（R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H）において評価した。E l e c s y s （登録商標）は、R o c h e グループの登録商標である。二重抗原サンドイッチ形式で測定を行った。 40

【0082】

E l e c s y s （登録商標）2010におけるシグナル検出は、電気化学発光に基づく。ピオチン・コンジュゲート（すなわち捕捉抗原）はストレプトアビジン・コーティング磁気ビーズの表面上に固定される一方、検出抗原は、シグナル伝達部分として、複合体化されたルテニウム・カチオン（レドックス状態2+および3+の間で切り替え）を所持する。特異的免疫グロブリン分析物の存在下で、発色物質ルテニウム複合体を固相に架橋し 50

、そして該複合体は、白金電極での励起後、620nmで光を放出する。シグナル出力は、恣意的光単位である。

【0083】

組換え抗干渉Lp15ポリペプチドを二重抗原サンドイッチ(DAGS)イムノアッセイ形式で評価した。この目的に向けて、組換えトレポネーマ属抗原TpN17を、それぞれ、ビオチンおよびルテニウム・コンジュゲートとして用いて、ヒト血清中の抗TpN17抗体を検出した。TpN17は、梅毒トレポネーマの免疫優性抗原の1つであり、そしてTpN17の可溶性変異体は、本特許出願において開示するように、梅毒感染の検出のための非常に有益なツールである。抗TpN17 IgG分子を検出するため、EcSlyD - EcSlyD - TpN17 - ビオチンおよびPmSlyD - PmSlyD - TpN17 - ルテニウムを、それぞれ、R1(試薬緩衝液1)およびR2(試薬緩衝液2)中で用いた。抗TpN17 IgMおよびIgG分子の両方を検出するため、EcFkpA - TpN17 - ビオチンおよびEcSkp - TpN17 - ルテニウムを、それぞれ、R1(試薬緩衝液1)およびR2(試薬緩衝液2)中で用いた。R1およびR2中の抗原コンジュゲートの濃度は、それぞれ、各200ng/mlであった。

【0084】

第一の実験において、トレポネーマ属に関して陰性であるヒト血清を、前述のDAGSイムノアッセイ・セットアップで評価した。もっぱらTpN17部分をターゲティングする偽陽性の発生率に関するヒントを得るため、抗干渉物質として通例用いられる、GDA架橋可溶性異種性SlyDポリマーであるSS-らせん(GDA、P)の存在下でスクリーニングを行った。さらに、まさにTpN17部分であるものとは異なる部分による干渉現象を排除するため、別の抗干渉モジュールであるEcSkp - EcSlyD - EcSlyDをアッセイ緩衝液に含めた。SS-らせん(GDA、P)およびEcSkp - EcSlyD - EcSlyDを、非常に過剰な量で(10μg/ml)、R1(ビオチン・コンジュゲートを含有する試薬1緩衝液)に添加した。75μl R1(試薬1緩衝液、ビオチン・コンジュゲートおよび抗干渉ポリマー)、75μl R2(試薬2緩衝液、ルテニウム・コンジュゲート)、10μl試料(ヒト血清)および40μlビーズ懸濁物を次いで混合し、そしてインキュベーションして、ほぼ200μlの反応体積を生じた。

【0085】

このアプローチによって、TpN17を抗原として用いた際、抗梅毒トレポネーマ抗体に関して明らかに陰性であるが、DAGS形式で上昇したシグナルを示す、およそ8(〜2500陰性ヒト血清のうち)のヒト血清を見出すことが可能であった。しかし、TpN17の代わりにTpN15またはTpN47などの他のトレポネーマ属抗原を用いた場合、E1ecsys(登録商標)シグナルは増加しなかった。この知見は、特異的抗TpN17干渉因子を示す。

【0086】

表2は、オリゴマーTpN17アッセイ・セットアップにおける非標識単量体EcSlyD - VcLp15の抗干渉効果を例示する。EcFkpA - TpN17 - Bi(DDS)およびEcSkp - TpN17 - BPRu(SK(2)DSS)をオリゴマー検出抗原として用い、そして増加する濃度で、非標識EcSlyD - VcLp15をR1に添加した。真の陽性血清のシグナルは、Lp15の添加に際して有意に抑えられることが明らかである。それでも、陽性シグナルは、VcLp15を1μg/mlなどの高濃度でR1に添加した際であっても、明らかに陽性のままである。予期されるように、トレポネーマ属感染が明らかに排除されている、よく性質決定されたヒト血清(Trina Bioreactives AG、スイス・ネーニコン)は、VcLp15の添加とは関わりなく、システムに生得的なバックグラウンドシグナル(〜450カウント)に近い、非常に低いシグナルを示した。干渉血清、例えばC131839、C132663、C132723、R183554およびC132976は、VcLp15抗干渉モジュールがまったく添加されない場合、有意に上昇したシグナルを示す。陰性血清の平均シグナルは、〜770カウントであったため、15,146カウント(ヒト血清C132663に関するもの)

または 8,503 カウント (ヒト血清 C132723 に関するもの) のシグナルレベルは、梅毒感染を疑わせる、真の陽性結果を示すであろうことが明らかである。R1 中、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で VcLp15 を添加すると、シグナル上昇が、正常のバックグラウンドシグナルレベルまで減少し、推定上の陽性結果が偽陽性であることが明らかになることは注目に値する。同じことは、非標識単量体 EcSl y D - VcLp15 を単量体 TpN17 D A G S セットアップで添加した場合にも当てはまる (表 3)。この場合も、EcSl y D - VcLp15 を 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で R1 に添加した際、ヒト血清 C132663 と同様に、有意に上昇したシグナルレベルが、11,128 カウントから 651 カウントに減少する。逆に、オリゴマー VcLp15 (EcSkp - VcLp15) は、それぞれ、上昇してそして偽である陽性シグナルを、オリゴマー (表 4) および単量体 (表 5) TpN17 D A G S セットアップの両方において、陰性シグナルバックグラウンドまで効率的に抑える。

10

【0087】

梅毒トレポネーマ由来の TpN17 およびコレラ菌由来のリボタンパク質 15 は、97 アミノ酸残基のストレッチに渡って、34% の配列同一性および 55% の相同性を共有する。免疫学的交差反応が起こるのは、おそらく、この共有配列 (およびおそらく構造的) モチーフを通じてであり、高いシグナルを誘発し、そしてしたがって TpN17 抗原に基づくトレポネーマ属アッセイにおける陽性結果を偽する。表 2 ~ 5 に示すように、アッセイ混合物に VcLp15 抗干渉タンパク質を添加すると、上昇したシグナルが正常の陰性にまで減少する。開示するデータは、非常に強い干渉があったとしても、すなわち高い偽陽性であったとしても、単量体型またはオリゴマー型のコレラ菌リボタンパク質 15 を添加することによって、効率的に排除可能であるという説得力がある証拠を提供する。表 2 ~ 5 に示す結果の結論は、以下の通りである: D A G S イムノアッセイにおいて組換え TpN17 抗原を使用したための干渉は、かなり頻繁であり (500 の陰性血清中、>1)、そしてこれらは、梅毒トレポネーマから系統樹的にかなり遠い細菌属であるコレラ菌由来のリボタンパク質 15 を添加することによって効率的に軽減可能である。簡単に言うと、本出願は、容易に入手可能な組換えタンパク質の添加が、抗トレポネーマ属抗体の検出のための TpN17 に基づく梅毒イムノアッセイの特異性を有意に改善することを開示する。

20

【0088】

表 2:

オリゴマー TpN17 ; 単量体 VcLp15 の添加

【0089】

30

【表 2】

R1 *EcFkpA*-TpN17-Bi(DDS)
 R2 *EcSklp*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1 c (μg/ml)		<i>EcSlyD-VdLp15</i>					
		0	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
		カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント
陽性血清							
PLTP_124	未希釈	1,274,726	1,171,468	1,166,110	1,092,657	973,974	793,911
PLTP_124	1:50	154,146	156,165	136,898	131,248	101,395	62,840
PLTP_121	1:50	223,230	211,697	205,298	190,606	151,374	93,737
PLTP_121	1:100	112,031	105,466	103,909	91,727	72,926	47,972
BM 146027	SC_056	1,408,728	1,357,227	1,258,085	1,217,480	1,149,624	1,133,749
BM 146623	SC_058	1,187,013	1,158,037	1,083,204	1,083,952	1,078,868	1,050,374
陰性血清							
Trina #0642	陰性	778	716	722	698	698	661
Trina #0645	陰性	725	703	722	682	715	706
Trina #0646	陰性	797	795	817	802	784	784
Trina #0647	陰性	774	786	764	773	762	742
干渉血清							
C131839	偽陽性	5,795	5,090	4,464	3,861	2,851	1,555
C132663	偽陽性	15,146	2,116	1,110	878	765	724
C132723	偽陽性	8,503	7,725	6,811	5,357	2,298	941
R183554	偽陽性	11,072	10,030	9,142	7,413	4,488	2,534
C132976	偽陽性	5,687	5,174	4,446	3,690	2,509	1,419

【 0 0 9 0 】

表 3 :

単量体 T p N 1 7 ; 単量体 V c L p 1 5 の添加

【 0 0 9 1 】

【表 3】

R1 *EcSS-TpN17-Bi(DDS)*
 R2 *PmSS-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)*

R1 c (μg/ml)		<i>EcSlyD-VcLp15</i>					
		0	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
		カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント
陽性血清							
PLTP_124	未希釈	1,467,523	1,374,990	1,272,604	1,272,720	1,208,354	1,164,404
PLTP_124	1:50	167,294	155,940	153,077	136,428	124,244	89,204
BM 146624	未希釈	1,451,271	1,423,730	1,376,393	1,359,799	1,370,884	1,369,198
BM 146624	1:10	436,534	403,003	384,434	365,742	329,370	259,984
BM 145855	SC_055	901,047	816,640	766,258	707,030	616,574	511,011
BM 146027	SC_056	1,721,399	1,708,261	1,678,979	1,651,647	1,641,513	1,641,787
陰性血清							
Trina #0642	陰性	657	613	638	626	623	610
Trina #0643	陰性	698	703	699	704	687	665
Trina #0644	陰性	660	653	638	636	620	616
Trina #0646	陰性	634	617	634	628	621	613
Trina #0647	陰性	623	614	606	620	618	623
干渉血清							
C131839	偽陽性	4,206	3,707	3,364	2,996	2,309	1,383
C132663	偽陽性	11,128	1,812	1,119	895	729	651
R179865	シグナル上昇	1,630	1,338	1,219	1,114	1,000	873
R183554	シグナル上昇	1,015	894	883	819	790	740
C132976	偽陽性	4,866	4,041	3,454	2,911	2,057	1,230

【 0 0 9 2 】

表 4 :

オリゴマー T p N 1 7 ; オリゴマー V c L p 1 5 の添加

【 0 0 9 3 】

【表 4】

R1 *EcFkpA*-TpN17-Bi(DDS)
 R2 *EcSkp*-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)

R1 c (μg/ml)		<i>EcSkp-VcLp15</i>		
		0	0.1	1.0
		カウント	カウント	カウント
陽性血清				
PLTP_121	1:50	230,387	225,976	104,039
PLTP_121	1:100	116,383	112,747	55,150
BM 140149	SC_052	1,136,096	1,077,292	508,996
BM 200680	SC_054	826,355	737,483	354,883
BM 145855	SC_055	745,762	704,713	322,241
BM 146027	SC_056	1,446,006	1,380,464	1,192,282
陰性血清				
Trina #0642	陰性	750	757	744
Trina #0646	陰性	840	847	815
Trina #0872	陰性	846	805	750
Trina #0873	陰性	764	763	754
干渉血清				
R179865	偽陽性	3,951	1,580	782
C131839	偽陽性	6,142	4,805	1,587
C132663	偽陽性	16,565	2,510	755
C132723	偽陽性	7,868	4,406	875
R183554	偽陽性	10,511	8,747	1,306
C132976	偽陽性	6,274	3,062	1,088

10

20

30

【 0 0 9 4 】

表 5 :

単量体 T p N 1 7 ; オリゴマー V c L p 1 5 の添加

【 0 0 9 5 】

【表 5】

R1 *EcSS-TpN17-Bi(DDS)*
 R2 *PmSS-TpN17-BPRu(SK(2)DSS)*

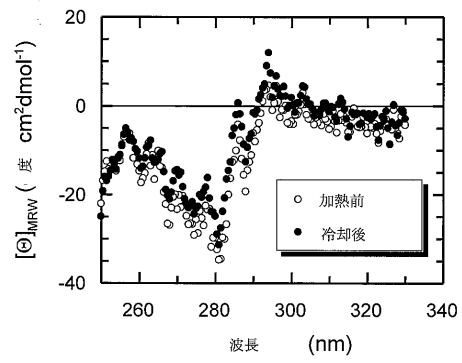
R1 c (μg/ml)		<i>EcSkp-VcLp15</i>		
		0	0.1	1.0
		カウント	カウント	カウント
陽性血清				
PLTP_121	1:50	235,946	221,210	112,238
PLTP_121	1:100	118,333	113,770	60,259
BM 140149	SC_052	1,142,874	1,048,211	637,784
BM 200680	SC_054	757,518	672,745	382,894
BM 145855	SC_055	861,637	823,346	475,266
BM 146027	SC_056	1,550,267	1,553,275	1,516,740
陰性血清				
Trina #0642	陰性	673	673	632
Trina #0646	陰性	651	659	646
Trina #0872	陰性	680	683	639
Trina #0873	陰性	690	661	651
干渉血清				
C132221	シグナル上昇	1,301	1,204	950
C131839	偽陽性	3,928	3,108	1,144
C132663	偽陽性	11,457	2,270	671
C132927	シグナル上昇	1,551	1,284	877
R183554	シグナル上昇	1,003	858	672
C132976	偽陽性	4,476	2,373	829

10

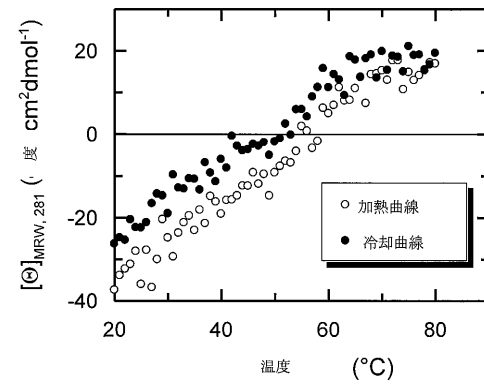
20

30

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

0006374720000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 14/245 (2006.01) C 0 7 K 14/245
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100187540

弁理士 國枝 由紀子

(72)発明者 エルケ・ファーツ

ドイツ国 8 2 3 8 6 フーグルフィンゲ, シュタインクロイツ 1

(72)発明者 ペーター・シャアーシュミット

ドイツ国 8 9 0 7 3 ウルム, ウンター・デア・メッツィヒ 8

(72)発明者 ウルバン・シュミット

ドイツ国 8 2 4 3 1 コッヘル, オルタラー・シュトラーセ 1 3

(72)発明者 クリスティアン・ショルツ

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ジンデルスドルファー・シュトラーセ 3 5 アー

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開 2 0 0 9 - 2 8 4 9 0 2 (J P , A)

特開平 1 1 - 0 2 3 5 7 3 (J P , A)

欧州特許出願公開第 0 2 1 2 7 6 7 8 (E P , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

(54)【発明の名称】抗トレポネーマ属(Treponema)抗体の検出のためのTpN17に基づくイムノアッセイにおける、抗干渉添加剤としてのコレラ菌(Vibriocholerae)リポタンパク質15(Lp15)変異体

专利名称(译)	Vibrio cholerae 脂蛋白 15 (Lp15) 突变体作为抗干扰添加剂在 TpN 17 基免疫分析中检测 密螺旋体 抗体		
公开(公告)号	JP6374720B2	公开(公告)日	2018-08-15
申请号	JP2014146428	申请日	2014-07-17
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	エルケファーツ ペーター・シャアーシュミット ウルバンシュミット クリスティアン・ショルツ		
发明人	エルケ・ファーツ ペーター・シャアーシュミット ウルバン・シュミット クリスティアン・ショルツ		
IPC 分类号	G01N33/571 G01N33/53 G01N33/531 C07K19/00 C07K14/28 C07K14/245 C12N15/09		
CPC 分类号	G01N33/6854 C07K14/245 C07K14/28 C07K2319/35 G01N33/5306 G01N33/571 G01N2333/20 G01N2333/28 G01N2469/20 G01N2800/26		
FI 分类号	G01N33/571.ZNA G01N33/53.N G01N33/531.Z C07K19/00 C07K14/28 C07K14/245 C12N15/00.A C12N15/31 C12N15/62.Z		
F-TERM 分类号	4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/ /HA03 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA52		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 國枝 由紀子		
优先权	2013003633 2013-07-18 EP		
其他公开文献	JP2015028479A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在分离的样品中检测针对梅毒螺旋体 TpN17 抗原的抗体的方法，其中霍乱弧菌霍乱弧菌蛋白 15 (Vc Lp15) 的肽序列或其部分序列用作减少干扰的试剂，即用于尽量减少假阳性结果。此外，本发明涉及包含 Vc Lp15 肽序列和伴侣蛋白的融合多肽，其用作免疫测定中的添加剂，用于所述减少干扰和最小化假阳性结果，以及用于检测针对梅毒螺旋体抗原的抗体的试剂盒。在包含 TpN17 抗原和所述 Vc Lp15-伴侣融合多肽的分离样品中。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6374720号 (P6374720)
(45) 発行日 平成30年8月15日 (2018. 8. 15)	(24) 登録日 平成30年7月27日 (2018. 7. 27)	
(51) Int. Cl. G01N 33/571 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/28 (2006.01)	FI GO1N 33/571 ZNA GO1N 33/53 N GO1N 33/531 Z C07K 19/00 C07K 14/28	
請求項の数 10 外国語出願 (全 24 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-146428 (P2014-146428)	(73) 特許権者 591003013 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチー・4070バーゼル・ グレンツァーヘルストラッセ124	
(22) 出願日 平成26年7月17日 (2014. 7. 17)	(74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎	
(65) 公開番号 特開2015-28479 (P2015-28479A)	(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰	
(43) 公開日 平成27年2月12日 (2015. 2. 12)	(74) 代理人 100101373 弁理士 竹内 茂雄	
審査請求日 平成29年1月19日 (2017. 1. 19)	(74) 代理人 100118902 弁理士 山本 修	
(31) 優先権主張番号 13003633.8	最終頁に続く	
(32) 優先日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)		
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 抗トレポネーマ属 (Treponema) 抗体の検出のための TpN17 に基づくイムノアッセイにおける、抗干渉添加剤としてのコレラ菌 (Vibrio cholerae) リポタンパク質