

(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2017-534055

(P2017-534055A)

(43) 公表日 平成29年11月16日(2017.11.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 A	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
<b>CO 7 K 14/44 (2006.01)</b>	CO 7 K 14/44 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2017-523282 (P2017-523282)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成27年11月4日 (2015.11.4)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月26日 (2017.5.26)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/075691		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02016/071392		T
(87) 国際公開日	平成28年5月12日 (2016.5.12)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	14192004.1		グレンツァーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成26年11月6日 (2014.11.6)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シャーガス病の検出のための抗原組成物

## (57) 【要約】

本発明は、3種のポリペプチド1F8、JL7、およびクルジパインからなる、単離された生体試料においてトリパノソーマ・クルージ(Trypanosoma cruzi)(T.クルージ)に対する抗体の検出に好適なポリペプチドの組成物に関する。当該ポリペプチド組成物を使用した、T.クルージに対する抗体の検出に好適な可溶性で免疫反応性のポリペプチド組成物を製造する方法も、本発明の一部である。さらに、本発明は、単離された試料において、T.クルージに対して特異的な抗体を検出する方法であって、当該T.クルージポリペプチドの組成物を使用する方法、ならびに当該T.クルージポリペプチドの組成物を含む試薬キットにも関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離された生体試料におけるトリパノソーマ・クルージ (Trypanosoma cruzi) に対する抗体の検出に好適なポリペプチドの組成物であって、トリパノソーマ・クルージに対して特異的な、遺伝子組み換えまたは合成により製造された 3 種のポリペプチドからなり、前記ポリペプチドが、1F8、JL7、およびクルジパインである、組成物。

## 【請求項 2】

ポリペプチドの 1F8 が配列番号 1 で表される配列を含み、ポリペプチドの JL7 が配列番号 2 で表される配列を含み、およびポリペプチドのクルジパインが配列番号 3 で表される配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチドの組成物。

10

## 【請求項 3】

1 リットルあたり 0.1 ミリモルから 10 ミリモルの濃度においてカルシウムイオンを含有する、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドの組成物。

## 【請求項 4】

遺伝子組み換えにより製造された 3 種のポリペプチドからなる、トリパノソーマ・クルージに対する抗体の検出に好適な可溶性で免疫反応性のポリペプチドの組成物を製造する方法であって、

a) 第 1 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの 1F8 をコードする作動可能に連結された遺伝子組み換え DNA 分子を含む発現ベクターによってトランスフォームされた

20

ホスト細胞を培養するステップ、

b) トリパノソーマ・クルージポリペプチドの発現ステップ、

c) トリパノソーマ・クルージポリペプチドの精製ステップ、

d) 第 2 の T.クルージポリペプチドの JL7 をコードする作動可能に連結された遺伝子組み換え DNA 分子を含む発現ベクターを用いて、a) から d) のステップを繰り返す

ステップ、

e) 第 3 の T.クルージポリペプチドのクルジパインをコードする作動可能に連結された遺伝子組み換え DNA 分子を含む発現ベクターを用いて、a) から d) のステップを繰り返す

ステップ、ならびに、

f) ステップ c)、d)、および e) において得られた T.クルージポリペプチドの混

30

和物を形成し、それによって、トリパノソーマ・クルージに対する抗体の検出に好適な可

溶性で免疫反応性のポリペプチドの組成物を製造するステップ、

を含む、前記方法。

## 【請求項 5】

単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに特異的な抗体を検出する方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物または請求項 4 の方法によって得られるトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物が、前記トリパノソーマ・クルージ抗体に対する捕捉試薬としておよび / または結合

パートナーとして使用される、前記方法。

40

## 【請求項 6】

単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに特異的な抗体を検出する方法であって、

a) 体液試料を、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と、または請求項 4 に記載の方法によって得られるトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と混和することによって、免疫反応混和物を形成する

ステップ、

b) ポリペプチド試料の組成物に対する、体液試料中に存在する抗体をトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と免疫反応させて免疫反応生成物を形成させるのに十分な期間、免疫反応混和物を維持するステップ、ならびに、

c) いかなる免疫反応生成物についてもその存在および / または濃度を検出するステッ

50

ブ、  
を含む、前記方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに特異的な抗体を検出する方法であって、前記免疫反応が、下記を含む二重抗原サンドイッチ形式において実施される、前記方法：

a) 前記試料に、固相に直接的または間接的に結合することができ、かつそれぞれが、バイオアフィン結合対の一部であるエフェクター基を有する第 1 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と、それぞれが検出可能な標識を有する第 2 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物とを加えるステップであって、ここで第 1 および第 2 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドが、前記抗トリパノソーマ・クルージ抗体に特異的に結合する、

b) 第 1 のトリパノソーマ・クルージポリペプチド、試料抗体、および第 2 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドを含む免疫反応混和物を形成するステップであって、ここで前記バイオアフィン結合対における対応するエフェクター基を有する固相が、免疫反応混和物を形成する前、形成中、または形成後に加えられる、

c) 体液試料中の第 1 および第 2 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドに対するトリパノソーマ・クルージ抗体を第 1 および第 2 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドと免疫反応させて免疫反応生成物を形成させるのに十分な期間、免疫反応混和物を維持するステップ、

d) 固相から液相を分離するステップ、ならびに、

e) 固相もしくは液相またはその両方において、いかなる免疫反応生成物についてもその存在を検出するステップ。

【請求項 8】

前記第 1 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドがビオチン部分を有し、および前記第 2 のトリパノソーマ・クルージポリペプチドが、電気化学ルミネセンス性のルテニウム錯体によって標識されている、請求項 7 に記載のトリパノソーマ・クルージに特異的な抗体を検出する方法。

【請求項 9】

抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のためのインビトロ診断試験における、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物または請求項 4 の方法によって得られるトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物の使用。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物または請求項 4 の方法によって得られるトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物を含む、抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

シャーガス病は、鞭毛原生動物のトリパノソーマ・クルージ (*Trypanosoma cruzi*) が引き起こす熱帯性の寄生虫症である。T.クルージは、一般的に、媒介昆虫であるオオサシガメ亜科の吸血性「オオサシガメ」(サシガメ科；ドイツ語では「*Raubwanzen*」) によってヒトおよび他の哺乳動物に感染する。当該疾患は、輸血および臓器移植、寄生生物で汚染された食べ物の摂取によって、ならびに母体から胎児へと伝わり得る。

【0002】

トリパノソーマ・クルージは、様々な形態および成長段階において現れる。再生形態は上鞭毛型と呼ばれ、オオサシガメがヒトなどの感染した動物を吸血した直後にこの形態に変化する。当該上鞭毛型は、吸血動物の直腸細胞壁上に移動する。当該吸血動物は、次の吸血において排便することで、糞を介して病原体を次の宿主へと移す。感染形態は錐鞭毛

10

20

30

40

50

型と呼ばれ、咬創によってヒトの体内へと侵入する。したがって、当該錐鞭毛型は、ヒトの血液中において見出すことができる。例えば、ヒトの心筋細胞の細胞質内などにおいて見出されるさらなる形態は、無鞭毛型 (amastigote または micromastigote) と呼ばれる。T.クルージのライフサイクルの間、当該無鞭毛型は、錐鞭毛型へと変化し、これは、オオサシガメによる次の吸血において吸い込まれ得る。

#### 【0003】

シャーガス病の症状は、感染の過程において変化する。多くの場合、急性期の後には慢性期が存在する。さらに、感染の後には潜伏期も存在し得る。各段階は、症状がないかまたは生命に危険を及ぼし得る。急性期である早期では、症状は、一般的に軽症で、通常、感染部位における単なる局所的腫れに過ぎない。初期の急性期は、60～90%の治癒率において、抗寄生虫治療による効果がある。4～8週間後、急性感染症の個体は、シャーガス病の慢性期に入るが、この慢性期は、慢性的感染個体の60～80%がその生存期間において無症候性である。慢性期の間、何人かの患者は、拡張型心筋症、心臓麻痺、心拍変動、および突然死を引き起こす心合併症を発症する。摂食および排便の困難を引き起こす腸管合併症は、慢性段階において典型的である。

10

#### 【0004】

抗寄生虫治療も、当該疾患の慢性期の間、疾患症状の発症を遅延または予防すると考えられるが、米国疾病対策センターによれば、これらの合併症の1つまたは複数を生ずる平均生涯リスクは約30%であり、これは、これらの慢性的感染個体が、依然として、最終的に、生命に危険を及ぼす心臓および消化器系障害を生ずるであろうことを意味している。シャーガス病に対して現在利用可能な抗寄生虫治療は、ベンズニダゾールおよびニフルチモックスであり、これらは、多くの患者において、皮膚障害、脳毒性、および消化器系の炎症を含む、一時的な副作用を引き起こし得る。

20

#### 【0005】

シャーガス病は主に、メキシコおよび中央アメリカ、および南アメリカの貧しい田舎地域において見られ、アメリカ合衆国南部では、ごく稀にしか見出されていない。しかしながら、血液ドナーは、これらの国において、インビトロ診断法によって、トリパノソーマ・クルージの感染に対して検査される。

#### 【0006】

今日、例えば、間接免疫蛍光法、間接赤血球凝集反応、補体結合、免疫プロット法、およびELISAによるT.クルージに対する抗体の検出など、いくつかの血清学的診断法が、T.クルージの感染を検出するために利用可能である。分子生物学による方法（例えば、PCR）および入念な外因診断法も適用される。媒介生物による感染の外因診断では、研究室で育てられた無菌の昆虫（ここでは、オオサシガメ）に患者を吸血させる。当該昆虫の腸の内容物が、病原菌（ここでは、トリパノソーマ・クルージ）の存在について調べられる。

30

#### 【0007】

これらの方法のそれぞれは、感度および特異度に関して、それ自体の短所および長所を示し、したがって、今のところ、利用可能なゴールドスタンダードとなる方法は存在しない。

40

#### 【0008】

抗体の検出のためのシャーガス病アッセイの開発の当初、天然の抗原溶解物が適用されていたが、それは依然として用いられている。しかしながら、溶解物を使用する場合、この抗原組成物中に対応物が含まれるのはT.クルージの3つの発症段階のうちの1つについてのみであり、したがって、他の2つの段階の感染を見逃してしまう可能性がある程度ある。より現代的なアッセイは、遺伝子組み換え抗原の混合物を適用し、T.クルージ感染の全ての段階を示す。

#### 【0009】

天然の抗原溶解物を使用する場合、当該診断的アッセイは、多くの場合、別の寄生虫であるリーシュマニア (Leishmania) に感染している患者の試料において観察さ

50

れる、特異度および交差反応性における問題に直面する。さらに、抗原溶解物の製造は、T・クルージの抗原組成物の複雑さから、かなりのロット間変動を生じる。その上、頻繁に、天然の溶解物ベースの希少試薬は、いくつかの溶解物が全てのライフサイクルの段階の抗原を十分には含んでいないかまたは全く含まないために、弱い感度を示す。

#### 【0010】

遺伝子組み換え抗原を適用することにより、上記の課題を避けることができる。しかしながら、遺伝子組み換え抗原組成物をベースとしたシャーガス病を検出するための市販のアッセイキットは、感度および特異度に関してかなりの違いを示すため、顧客、すなわち民間試験所もしくは臨床検査室または血液検査ユニットは、多くの場合、信頼できる結果を得るためには、いくつかのキットを並行して使用しなければならない。結果として、患者の試料が反応しているかどうかについての判断は、異なる抗原組成物をベースとするいくつかのキットによって同じ試料に対して得られた、過半数を占める陽性または陰性の結果に基づいて為される。複数の診断試験を適用するこの時間のかかる手順は、実験設備および人手、時間、ワークロード、およびコストの増加を生じるために、経済的に妥当でないことは明白である。

#### 【0011】

トリパノソーマ・クルージ抗原に対する抗体を検出するための血清学的アッセイは、従来技術の文献において広く説明されてきており、総説については、例えば、Silveiraら Trends in Parasitology 2001, Vol. 17 No. 6を参照されたい。血清学的診断に関連するT・クルージ遺伝子組み換え抗原は、いくつかの研究室によって単離されている。これらの遺伝子のうちのいくつかは、縦列反復配列を有する。トリパノソーマ・クルージは極めて多数の抗原タンパク質（公的データベースにおけるおよそ23000の予測されるタンパク質コード配列および偽遺伝子）を発現するため、免疫アッセイのための抗原の可能な組み合わせの数は、膨大である。遺伝子組み換え製造のための方法は、数十年間知られているが、診断アッセイを設定するためにどの抗原が必要かを見出すことは、依然として困難なままである。免疫学的診断アッセイのための好適な抗原を選択する場合、病原体のライフサイクルの全ての段階における抗原を考慮すること、ならびに感染の全ての段階（急性期、ウインドウ期、および慢性期）に対して抗体を見出すことができる抗原を適用することも心に留めておかなければならない。同時に、技術的問題（例えば、溶解性および安定性の不足、信号のクエンチを引き起こす望ましくない交差反応、例えばリーシュマニアに対する交差反応性の回避）から、さらには、各抗原を十分に開発し、評価し、および大規模において生産する必要があるという経済的問題からも、抗原の数は、約5または10を超えるべきではない。Silveriaら（上記）によれば、市販のアッセイは、多くの場合、6種または7種の異なるT・クルージ抗原の組み合わせを使用しており、場合により、T・クルージ全長抗原に由来するより短い合成ペプチドの組み合わせも使用する。

#### 【0012】

高い感度の診断試験を提供するための別のアプローチは、個別に別々のビーズ上にコーティングされた多数の様々な種類のT・クルージ抗原を適用する、多成分アッセイに基づいている。WO 2009/017736および米国特許第8,329,411号には、生体試料において、トリパノソーマ・クルージによる感染を検出するための装置および方法が開示されている。この設定は、16種の異なるタンパク質（最初に59の候補タンパク質から選択され、抗原として働く）を含み、これらのタンパク質は、アレイ状の診断ツールを提供する、標識されたビーズ上に個別にコーティングしなければならない。抗体が試料中に存在する場合、当該抗体は、これらのコーティングされたタンパク質に結合する。その結果、結合した抗体は、標識された二次抗体による当該試料抗体への結合によって検出される。この手順は、研究手法のためには妥当であるが、抗原の数が多いと大きな生産コストを生じ、民間試験所もしくは臨床検査室でのルーチンアッセイとして使用するにはコストが高すぎる。

#### 【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0013】

まとめると、当技術分野において既知の、感染した個体からの試料においてT・クルージ抗体を検出するためのイムノアッセイは、高い感度および特異度を達成するために、多数の異なる抗原を適用する。真にゴールドスタンダードで経済的に手頃なアッセイは、依然として、利用可能ではない。

## 【0014】

したがって、トリパノソーマ・クルージによる感染を検出するための従来技術のアッセイにおける再現性、感度、および特異度に関する欠点を克服する診断的組成物および方法を提供することにおいて課題を認めることができる。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0015】

この課題は、特許請求の範囲において指定される本発明によって解決される。

本発明は、ポリペプチド1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含む、単離された生体試料においてトリパノソーマ・クルージ(T・クルージ)に対する抗体の検出に好適なポリペプチドの組成物に関する。本発明のさらなる態様は、T・クルージ抗体の検出に好適なポリペプチドの組成物であって、ポリペプチド1F8が配列番号1を含み、ポリペプチドJL7が配列番号2を含み、クルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち当該少なくとも1つが、配列番号3(クルジパイン)、配列番号4(KMP-11)、および配列番号5(PAR2)からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む、組成物である。特に、本発明は、トリパノソーマ・クルージに対して特異的な、遺伝子組み換えによってまたは合成によって製造された3種のポリペプチドからなるポリペプチドの組成物であって、当該ポリペプチドが、1F8、JL7、およびクルジパインである、組成物に焦点を当てている。当該組成物における当該ポリペプチドは、配列番号1を含む1F8、配列番号2を含むポリペプチドJL7、および配列番号3を含むクルジパインである。

20

## 【0016】

別の実施形態において、上記ポリペプチドの組成物中に存在する、T・クルージに特異的な3種のポリペプチド1F8、JL7、およびクルジパインは、それぞれ、配列番号1、2、および3からなる。

30

## 【0017】

別の実施形態は、単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに対する抗体を検出するのに好適な、上記において説明したポリペプチドの、可溶性で免疫反応性の組成物を製造する方法に関する。T・クルージ特異的抗体の検出のためのインビトロ診断アッセイにおける上記ポリペプチドの組成物の使用も、本発明の一部である。

## 【0018】

さらに、本発明は、単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに対して特異的な抗体を検出するための方法であって、上記トリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物および、当該トリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物を含む試薬キットが使用される、方法に関する。

40

## 開示されるアミノ酸配列の説明

配列番号1は、FCaBP、TC24、またはTC28としても知られる、T・クルージタンパク質1F8(UniProtエントリ:Q4D1Q2)を示している(完全記述名:鞭毛カルシウム結合タンパク質3)。配列番号1は、アミノ酸位置1~211を示す。本発明により、システイン残基をアラニン(A)またはセリン(S)で置換することにより、分子内ジスルフィド結合の形成に起因する正しくないフォールディングを避けることができる。したがって、システイン(C)が天然において現れる全ての位置(この場合、4つの位置)は、Xによって標識される(X=C、A、またはS)。

## 【0019】

50

## 【化1】

MGAXGSKGST SDKGLASDKD GKNAKDRKEA WERIRQAIPR EKTAEAKQRR IELFKKFDKN  
 ETGKLYDEV HSGXLEVLKL DEFTPRVRDI TKRAFDKARA LGSKLENKGS EDFVEFLEPR  
 LMLXYIYDFE ELTVMFDEID ASGNMLVDEE ELKRAVPKLE AWGAKVEDPA ALFKELDKN  
 TGSVTFDEFA AWASAVKLDA DGDPDNVPE A

## 【0020】

配列番号2は、FRA、Ag1、H49としても知られる、T・クルージタンパク質の部分配列JL7(UniProtエントリ:Q4CS87)を示している(完全記述名:カルパインシステムペプチダーゼ(推定上))。配列番号2は、上記のUniProtデータベースエントリのアミノ酸位置62~287を示しており、結果として226のアミノ酸長さを有するポリペプチドを示す。当該全長タンパク質は、1~1275のアミノ酸を含む。

10

## 【0021】

## 【化2】

MEQERRQLE KPRRNAREI AALEESMNAR AQELAREKKL ADRAFLDQKP EGVPLRELPL  
 DDDSDFVAME QERRQLEKD PRRNAKEIAA LEESMNARAQ ELAREKKLAD RAFLDQKPEG  
 VPLRELPLDD DSDFVSMEQE RRQLEKDP RNVQKIADLE ESMNARAQEL AREKKLADRA  
 FLDQKPEGVS LRELPLDDDS DFVSMEQERR QLEKDPKRN VQIVAD

20

## 【0022】

配列番号3は、クルザイン、gp51/57、Ag163B6としても知られる、T・クルージタンパク質の部分配列クルジパイン(UniProtエントリ:Q9TW51)を示している(完全記述名:主要システインプロテイナーゼ)。配列番号3は、上記のUniProtデータベースエントリのアミノ酸位置6~135を示しており、結果としてC-クルジパインとも呼ばれる、130のアミノ酸長さを有するポリペプチドを示す。当該全長タンパク質は、1~135のアミノ酸を含む。

## 【0023】

## 【化3】

GPGPTPEPTT TTTTSAPGPS PSYFVQMSCT DAACIVGCEN VTLPTGQCLL TTSGVSAIVT  
 CGAETLTTEEV FLTSTHCSGP SVRSSVPLNK CNRLLRGSVE FFCGSSSSGR LADVDRQRH  
 QPYHSRHRRL

30

## 【0024】

配列番号4は、T・クルージタンパク質の部分配列KMP-11(UniProtエントリ:Q9U6Z1)を示す(完全記述名:キネトプラスチド膜タンパク質11)。このタンパク質は、1~92のアミノ酸位置を含む。

## 【0025】

## 【化4】

MATLLEEFSA KLDRLDAEFA KKMEEQNKKF FADKPDESTL SPEMKEHYEK FEKMIQEHTD  
 KFNKKMHEHS EHFKAFAEL LEQQKNAQFP GK

40

## 【0026】

配列番号5は、PFR2としても知られる、T・クルージタンパク質の部分配列PAR2(UniProtエントリ:Q01530)を示す(完全記述名:主要副鞭毛桿タンパク質)。配列番号5は、PAR2のC末端部分(C-PAR2)、すなわち、UniProtデータベースエントリの277~600のアミノ酸位置を示しており、結果として324のアミノ酸長さを有するポリペプチドを示す。当該全長タンパク質は、1~600のアミノ酸を含む。

## 【0027】

50

## 【化5】

FQETSAIKDA KRRLKQRCED DLKNLHDAIQ KADMEDAEAM KRFATQKEKS EKFIQENLDR  
 QDEAWRRIQE IERVLQRLGT ERFEEVKRRI EENDREEKRK VEYQQFLDVC GQHKKLELS  
 VYNCDLAMRC IGMMEELVAE GCSAIKSRHD KTNEELGDLR LQVHQEYLEA FRRLYKTLGQ  
 LVYKKEKRL EIDRNIRTH IQLEFAIETF DPNAKKHSDA KKELYKLRAQ VEELEMLKD  
 KMAQALEMFG PTEDALNQAG IEFVHPAEEV EDGNLTRRSK MVEYRAHLAK QEEVKIAAER  
 BELKRSKTLQ SQQYRGKTVQ QITQ

## 【0028】

配列番号6は、UniProtデータベースにおいてID P0A9K9によってもアクセス可能である、完全な大腸菌 (*E. coli*) SlyDアミノ酸配列(196のアミノ酸残基)を表している。本発明に従って、SlyDをT.クルージポリペプチドのシャペロン融合パートナーとして使用する場合、一実施形態において、以下に一覧される配列のアミノ酸残基1~165に及び、大腸菌SlyDのC末端が切断された形態が使用される。別の実施形態(実施例1において適用される)において、本発明により、2つのSlyDユニットの縦列形態が、ポリペプチドのN末端に追加される。結果として得られる溶融ポリペプチドの発現後のクローニングおよびリフォールディングを容易にするために、これら2つのSlyDユニットは、配列番号7に示されるようなリンカー配列によって隔てられていてもよい。

10

## 【0029】

## 【化6】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRF LAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDH HH DHDHDGCCGG HGHDHGHEHG  
 GEGCCGGKGN GGCGCH

20

## 【0030】

配列番号7は、融合ポリペプチド部分の間におけるフレキシブルで可溶性のプロテアーゼ耐性スペーサーもしくはリンカーとして使用することができる、グリシンリッチなスペーサーのアミノ酸配列(セリンで隔てられた3つのグリシンユニットを含む)を示している。

30

## 【0031】

## 【化7】

GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGG

## 【0032】

配列番号8は、本発明によるポリペプチドのN末端に、または別の実施形態ではC末端に追加することができるヘキサ-ヒスチジンタグを示している。当該タグは、タンパク質の精製およびリフォールディングを容易にするために使用される。

## 【0033】

## 【化8】

GGGSGGGLEH HHHHH

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0034】

【図1a】3種の市販のシャーガス病アッセイと比較した、遺伝子組み換えT.クルージ抗原変異型を使用することによる、ヒト血清における抗T.クルージ抗体の検出の実験結果を示す表2を含む図(図1aおよび1bを含む)である(実施例4も参照のこと)。Architect Chagasアッセイの場合、試料は、カットオフ値に対する信号(S/CO)が1.0の場合、陽性である(すなわち、T.クルージ抗体を含む)とみなされ; S/CO値が<0.8の場合、陰性(T.クルージ抗体を含まない)とみなされ、

50

S / C O 値が 0 . 8 かつ < 1 . 0 の場合、「不定 ( e q u ) 」とみなされる。「不定 ( e q u ) 」は、曖昧 ( または中間 ) を意味し、すなわち、結果はグレーゾーンにある。信頼できる最終結果を受け取るために、これらの「不定 ( e q u ) 」試料は、市販のプロバイダーの取扱説明書に応じて、1 つまたは 2 つの追加のアッセイによって確認する必要がある ( すなわち、多数決 ) 。対応する S / C O 値が、B i o l i s a シャーガスおよび N o v a l i s シャーガス I g G E L I S A に対して示されている。本発明によるポリペプチドの場合、絶対測定カウント ( c o b a s ( 登録商標 ) e 6 0 1 アナライザ、R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H、実施例 4 ) および個別のカットオフ値が、各抗原に対して示されている。

【図 1 b】3 種の市販のシャーガス病アッセイと比較した、遺伝子組み換え T . クルージ抗原変異型を使用することによる、ヒト血清における抗 T . クルージ抗体の検出の実験結果を示す表 2 を含む図 ( 図 1 a および 1 b を含む ) である ( 実施例 4 も参照のこと ) 。 A r c h i t e c t C h a g a s アッセイの場合、試料は、カットオフ値に対する信号 ( S / C O ) が 1 . 0 の場合、陽性である ( すなわち、T . クルージ抗体を含む ) とみなされ ; S / C O 値が < 0 . 8 の場合、陰性 ( T . クルージ抗体を含まない ) とみなされ、S / C O 値が 0 . 8 かつ < 1 . 0 の場合、「不定 ( e q u ) 」とみなされる。「不定 ( e q u ) 」は、曖昧 ( または中間 ) を意味し、すなわち、結果はグレーゾーンにある。信頼できる最終結果を受け取るために、これらの「不定 ( e q u ) 」試料は、市販のプロバイダーの取扱説明書に応じて、1 つまたは 2 つの追加のアッセイによって確認する必要がある ( すなわち、多数決 ) 。対応する S / C O 値が、B i o l i s a シャーガスおよび N o v a l i s シャーガス I g G E L I S A に対して示されている。本発明によるポリペプチドの場合、絶対測定カウント ( c o b a s ( 登録商標 ) e 6 0 1 アナライザ、R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H、実施例 4 ) および個別のカットオフ値が、各抗原に対して示されている。

【図 2】本発明による個々の遺伝子組み換え T . クルージ抗原変異型を使用した結果と比較した、ヒト血清における抗 T . クルージ抗体の検出のために 3 種の市販のシャーガス病アッセイで試験した試験体の結果を含む図 ( 表 3 ) である ( 実施例 4 も参照のこと ) 。

【図 3】市販の抗シャーガス病アッセイと比較した、遺伝子組み換え T . クルージ抗原混合物の感度に関する、実施例 6 の実験データを示す図 ( 表 5 ) である。

【図 4】シャペロン融合の有無における遺伝子組み換え T . クルージ抗原の免疫学的反応性の比較を示す図 ( 表 6 ) である ( 実施例 7 も参照のこと ) 。

【図 5】1 F 8 のカルシウム依存反応性に関する実験データを示す図 ( 表 7 ) である ( 実施例 8 ) 。

【発明を実施するための形態】

【0035】

背景のセクションにおいて説明したように、感染個体由来の試料において T . クルージ抗体を検出するための、先行技術において公知のイムノアッセイは、高い感度および特異度を実現するために、多数の異なる抗原を使用する。ほとんどの場合、患者が感染しているか否かの判断は、異なるイムノアッセイにおける多数を占める結果に基づいている。今のところ、ゴールドスタンダードであり、利用可能である経済的に手頃なアッセイは存在しない。

【0036】

驚くべきことに、本発明者らは、1 F 8、J L 7、ならびにクルジバイン、K M P - 1、および P A R 2 からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも 1 つを含む、トリパノソーマ・クルージ特異的抗原の組成物または混合物を使用することによって、先行技術の欠点を克服する診断的組成物および方法を提供することができた。当該新規の組成物は、単離された患者の試料においてトリパノソーマ・クルージに対する抗体を検出するための再現性、感度、および特異度に関して、先行技術に匹敵するか、さらには優れている。その上、T . クルージ特異的抗体を信頼性高く検出するための組成物またはキットに必要なのは、3 種のトリパノソーマ・クルージ特異的抗原のみである。当該組成物

10

20

30

40

50

は、少なくとも3種、4種、または5種のT・クルージポリペプチドを含む。ある実施形態において、T・クルージ特異的ポリペプチドの数は、3と5の間であり、さらなる実施形態では、3種のポリペプチド、すなわち、1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つである。さらなる実施形態において、当該組成物は、3種のトリパノソーマ・クルージ特異的抗原の1F8、JL7、およびクルジパインからなる。さらなる実施形態は、1F8、JL7、クルジパイン、およびKMP-11を含む組成物である。別の実施形態において、当該組成物は、1F8、JL7、クルジパイン、およびKMP-11からなる。さらに別の実施形態において、当該組成物は、配列番号1(1F8)、配列番号2(JL7)、および配列番号3(クルジパイン)において開示されるポリペプチドからなる。

10

**【0037】**

用語トリパノソーマ・クルージ(=T・クルージ)特異的抗原、T・クルージ特異的ポリペプチド、T・クルージポリペプチド、およびT・クルージ抗原は、同じ意味で使用することができ、それぞれが、UniProtなどの国際タンパク質データベースによってアクセス可能な任意の天然に存在するT・クルージ菌株に見出すことができるポリペプチド配列を意味する。本発明において、適用される抗原配列のアミノ酸鎖は、約90のアミノ酸(KMP-11)から最大約400のアミノ酸(C-PAR2)までの間の範囲の長さを示す。ある実施形態において、各T・クルージ抗原の長さは、この範囲内である。

**【0038】**

実施例4、表2(図1aおよび1b)に見られるように、1F8、JL7、クルジパイン、KMP-11、またはPAR2ペプチド配列を含む個々のT・クルージポリペプチドは全て、各ポリペプチドが個別の単一の抗原として使用される場合のイムノアッセイにおいて著しい抗原性を示す。しかしながら、この実施例は、個々のT・クルージ抗原の反応性が個別の患者の血清に強く依存することも示している。単一の抗原の使用では検出されないいくつかの試料が常に存在している。この知見は、市販のシャーガス病アッセイとの比較によく対応している。表3(図2)を見ると、全ての反応性の試料を検出する単一の市販のアッセイ(それぞれが、少なくとも4種から10種の異なる遺伝子組み換えT・クルージ特異的抗原を使用している)も存在しないということが分かる。T・クルージ特異的抗体を信頼性高く検出するためには、どの試料が反応性であり、T・クルージ特異的抗体を含むかを、過半数アプローチ(すなわち、3種の市販のアッセイのうち2種が感染を検出する)において決定するために、各試料を、3種全ての市販のアッセイによって分析しなければならない。

20

30

**【0039】**

本発明によれば、1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含む、当該トリパノソーマ・クルージ特異的ポリペプチドの組成物は、およそ99.8%の特異度を示し、これは、市販のアッセイに匹敵および合致している(表4、実施例5を参照のこと)。発明者らは、2種のキット例、すなわち、1F8、JL7、およびクルジパインを含むキット1と、1F8、JL7、およびクルジパイン、ならびにKMP-11を含むキット2を試験した。さらに、実施例6および表5/図3から分かるように、両方のキット/組成物は、3種の市販の抗シャーガス病アッセイと比較した場合に優れた希釈感度を示す。

40

**【0040】**

組成物なる用語は、単離された別々のT・クルージポリペプチドが混和物へと混合されることを意味する。この用語は、全てのポリペプチドが多重抗原融合ポリペプチドとしての1つだけのポリペプチド鎖上に位置するように、アミノ酸からなる単一鎖上において遺伝子組み換え的に発現させたかまたは合成した(化学的に製造された)ポリペプチドを含まない。換言すれば、天然において単一のペプチド鎖上には現れないいくつかのエピトープの多重エピトープ融合抗原は除かれる。むしろ、T・クルージポリペプチドの1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つのそれぞれは、別々のポリペプチド鎖上に発現す

50

るか、別々のポリペプチド鎖として化学的に合成される。ある実施形態において、当該組成物は、T・クルージに対して特異的な、遺伝子組み換え的にまたは合成によって製造された3種のポリペプチドからなり、この場合、当該ポリペプチドは、1F8、JL7、およびクルジパインである。当該組成物は、個々のT・クルージポリペプチドを1つの容器または管において混合することによって作製され、結果として組成物を生じる。

#### 【0041】

当該組成物は、液体であり得、すなわち、当該T・クルージポリペプチドは、水可溶性形態または緩衝液可溶性形態において混合物に加えられる。好適な緩衝液の原料成分は、当業者に既知である。当該組成物は、固体であってもよく、すなわち、T・クルージ抗原を凍結乾燥状態またはそれ以外の乾燥状態において含む。

10

#### 【0042】

ある実施形態において、上記ポリペプチドの組成物は、配列番号1による1F8アミノ酸配列、配列番号2によるJL7配列を含み、クルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つは、配列番号3（クルジパイン）、配列番号4（KMP-11）、および配列番号5（PAR2）からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む。

#### 【0043】

別の実施形態において、当該ポリペプチドの組成物は、ポリペプチド1F8、JL7、およびクルジパインを含む。さらに別の実施形態において、当該組成物は、配列番号1（1F8）、2（JL7）、および3（クルジパイン）によるポリペプチドを含む。さらなる実施形態において、上記組成物は、配列番号1（1F8）、2（JL7）、および3（クルジパイン）を含む3つのポリペプチドからなる。さらなる実施形態において、T・クルージに対して特異的な部分は、配列番号1（1F8）、2（JL7）、および3（クルジパイン）からなる。別の実施形態において、当該組成物は、配列番号1（1F8）、2（JL7）、3（クルジパイン）、および4（KMP-11）を含むポリペプチドからなる。

20

#### 【0044】

表現「T・クルージに対して特異的な部分は、配列番号1（あるいは2、または3など）からなる」は、例えば、配列番号1が、このポリペプチド鎖上に存在しかつT・クルージ-特異的抗体と反応する、T・クルージに存在する抗原に由来するポリペプチド部分のみであることを意味する。しかしながら、非T・クルージ特異的リンカーもしくはペプチド状融合アミノ酸配列の追加は、これらの配列がT・クルージに特異的ではなく、T・クルージ特異的抗体によって認識されないであろうことから、可能である。

30

#### 【0045】

本発明によれば、配列番号1、2、3、4、または5による1F8、JL7、クルジパイン、KMP-11、およびPAR2抗原の変異型も、当該組成物に含められる。これは、3種のT・クルージ特異的ポリペプチドからなる組成物中に存在するポリペプチド1F8、JL7、およびクルジパインについても当てはまる。これとの関連において、用語「変異型」は、上記タンパク質と実質的に同じタンパク質もしくはタンパク質断片（すなわち、ポリペプチドまたはペプチド）に関する。特に、変異型は、最も一般的なタンパク質のイソ体のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の交換、欠失、または挿入を示すイソ体であり得る。一実施形態において、そのような実質的に同じタンパク質は、当該タンパク質の最も一般的なイソ体に対して、少なくとも80%の配列類似性、別の実施形態では、少なくとも85%または少なくとも90%、さらに別の実施形態では少なくとも95%の配列類似性を有する。用語「変異型」は、翻訳後の修飾タンパク質、例えば、グリコシル化またはホスホリル化されたタンパク質などにも関する。本発明によれば、変異型は、インビトロ診断イムノアッセイにおける免疫反応性が維持される限り、そのようなものとして分類され、すなわち、当該変異型は、依然として、試料中に存在する抗T・クルージ抗体に結合することができ、それらを検出することができる。「変異型」は、例えば、ポリペプチドまたは抗原への、リンカーアミノ酸配列、標識、タグアミノ酸配列、または担体部

40

50

分などの共有結合によって修飾された当該ポリペプチドまたは抗原でもある。

【0046】

本発明によるポリペプチド組成物は、当業者に既知であるように、生理的緩衝条件下において可溶性である。用語「T・クルージに対して特異的な」は、当該ポリペプチドが、ヒト血清などの単離された試料中に存在するトリパノソーマ・クルージに特異的な抗体に結合することができる、それらによって認識されることができる、またはそれらによって結合されることができることを意味する。

【0047】

本発明による全てのT・クルージ特異的ポリペプチドは、非T・クルージ特異的ポリペプチド配列を有する融合タンパク質、例えば、シャペロンのようなフォールディングヘルパー分子など、として発現し得る。これらの融合パートナーの目的は、検体特異的ポリペプチドのクローニング、発現、および精製を容易にすることである。しかしながら、本発明により、当該T・クルージ特異的ポリペプチドは、シャペロン融合パートナーを全く持たないスタンドアロンのポリペプチドとして、同様に製造することができる。ある実施形態において、本発明によるT・クルージ特異的抗原の組成物を形成する個別のポリペプチドは、シャペロン融合パートナーを用いずに製造される。実施例7および表6(図4)は、T・クルージ特異的抗体を検出するためのイムノアッセイにおける抗原性が、各抗原に対するシャペロン融合パートナーの存在に依存しないことを示している。

10

【0048】

本発明は、トリパノソーマ・クルージに対する抗体の検出に好適な、可溶性で免疫反応性のポリペプチドの組成物を製造する方法にも関する。全ての個別のT・クルージ特異的抗原は、実施例1または2において説明する方法に従って製造した。ある実施形態において、当該方法は、

20

a) 第1のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの1F8をコードする作動可能に連結された遺伝子組み換えDNA分子を含む発現ベクターによってトランスフォームされた宿主細胞を培養するステップ、

b) トリパノソーマ・クルージポリペプチドの発現ステップ、および

c) トリパノソーマ・クルージポリペプチドの精製ステップ、

d) 第2のT・クルージポリペプチドのJL7をコードする作動可能に連結された遺伝子組み換えDNA分子を含む発現ベクターを用いて、a)からd)のステップを繰り返すステップ、

30

e) クルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択される第3のT・クルージポリペプチドをコードする作動可能に連結された遺伝子組み換えDNA分子を含む発現ベクターを用いて、a)からd)のステップを繰り返すステップ、

f) ステップc)、d)、およびe)において得られたT・クルージポリペプチドの混和物を形成し、それによって、トリパノソーマ・クルージに対する抗体の検出に好適な、可溶性で免疫反応性のポリペプチドの組成物を製造するステップ、を含む。

【0049】

ある実施形態において、上記において詳述した、ポリペプチドの組成物を製造する方法は、遺伝子組み換えにより製造された3種のポリペプチドからなる組成物に関するものである。この場合、ステップe)は、第3のT・クルージポリペプチドのクルジパインをコードする作動可能に連結された遺伝子組み換えDNA分子を含む発現ベクターを用いて繰り返される。

40

【0050】

本発明の別の態様は、単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに対して特異的な抗体を検出する方法であって、ポリペプチド1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含むトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物が、上記トリパノソーマ・クルージ抗体に対する捕捉試薬および/または結合パートナーとして使用される、方法

50

に関する。

【0051】

ある実施形態において、単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに対して特異的な抗体を検出する当該方法は、上記において詳細に説明した1F8、JL7、およびクルジパインである3種のトリパノソーマ・クルージポリペプチドからなる組成物を適用する。ある実施形態において、ポリペプチド1F8は配列番号1を含み、JL7は配列番号2を含み、クルジパインは配列番号3を含む。さらに別の実施形態において、1F8は配列番号1からなり、JL7は配列番号2からなり、クルジパインは配列番号3からなる。上記において説明した、T・クルージ特異的抗体の検出のための、上記トリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物は、先行の段落のポリペプチドの製造方法によっても得ることができる。さらなる態様において、当該方法は、シャーガス病診断にとって最も関連するサブクラスとしてIgGおよびIgMを含む、全ての可溶性の免疫グロブリンのサブクラスのT・クルージ抗体の検出に好適な方法である。

10

【0052】

抗体の検出のためのイムノアッセイは、全ての当業者に周知であり、そのようなアッセイおよび実用的応用および手順を行う方法も周知である。本発明によるT・クルージ特異的抗原の組成物は、使用される標識、ならびに検出の様式（例えば、放射性同位体アッセイ、酵素イムノアッセイ、電気化学ルミネセンスアッセイなど）またはアッセイ原理（例えば、試験片アッセイ、サンドイッチアッセイ、間接的試験概念、またはホモジニアスアッセイなど）に依存しない、抗T・クルージ特異的抗体の検出のためのアッセイを向上させるために使用することができる。専門家に既知の全ての生体液体が、抗T・クルージ抗体の検出のための試料として使用することができる。通常使用される試料は、血液、血清、血漿、尿、または唾液などの体液である。

20

【0053】

本発明のさらなる態様は、単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに対して特異的な抗体を検出する方法であって、

a) 体液試料を、上記において定義されるトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と、または上記において説明する方法によって得られるトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と混和することによって免疫反応混和物を形成するステップ、

b) ポリペプチド試料の上記組成物に対する、体液試料中に存在する抗体を、トリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と免疫反応させて、免疫反応生成物を形成させるのに十分な期間、免疫反応混和物を維持するステップ、および

30

c) いかなる免疫反応生成物についてもその存在および/または濃度を検出するステップ、

を含む方法である。

【0054】

ある実施形態において、単離された試料においてトリパノソーマ・クルージに対して特異的な抗体を検出するための上記方法は、二重抗原サンドイッチ(DAGS)形式において実施される。そのようなアッセイでは、少なくとも2種の異なる所定の抗原の分子をその2つ(IgG、IgA、IgE)または10(IgM)の抗原結合部位に結合させる抗体の能力が必要とされ、ならびにその能力を利用する。上記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、本質的に同じであり、そのため、当該試料の抗体は、2つの特異的抗原の間に橋かけを形成する。したがって、1つの抗体が両方の抗原に結合することができるように、両方の抗原は、同一であるかまたは免疫学的に交差反応性であるかのどちらかでなければならない。そのようなアッセイを実施するための必須要件は、関連するエピトープ(複数可)が両方の抗原に存在することである。2種の抗原の一方は、固相に結合し得、他方は検出可能な標識を有する。

40

【0055】

本発明によれば、DAGSアッセイ手順は、

a) 単離された試料に、固相に直接的または間接的に結合することができ、かつそれぞ

50

れが、バイオアフィン結合対の一部であるエフェクター基を有する第1のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物と、それぞれが検出可能な標識を有する第2のトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物とを加えるステップであって、第1および第2のトリパノソーマ・クルージポリペプチドが、上記抗トリパノソーマ・クルージ抗体に特異的に結合する、ステップ、

b) 第1のトリパノソーマ・クルージポリペプチド、試料抗体、および第2のトリパノソーマ・クルージポリペプチドを含む免疫反応混和物を形成するステップであって、上記バイオアフィン結合対における対応するエフェクター基を有する固相が、免疫反応混和物を形成する前、形成中、または形成後に加えられる、ステップ、

c) 体液試料中の第1および第2のトリパノソーマ・クルージポリペプチドに対するトリパノソーマ・クルージ抗体を、第1および第2のトリパノソーマ・クルージポリペプチドと免疫反応させて、免疫反応生成物を形成させるのに十分な期間、免疫反応混和物を維持するステップ、

d) 固相から液相を分離するステップ、

e) 固相もしくは液相またはその両方において、いかなる免疫反応生成物についてもその存在を検出するステップ、  
を含む。

#### 【0056】

ある実施形態において、上記第1のトリパノソーマ・クルージポリペプチドは、バイオアフィン結合対ビオチン/ストレプトアビジンの一部としてビオチン部分を有し、上記第2のトリパノソーマ・クルージポリペプチドは、電気化学ルミネセンス性のルテニウム錯体によって標識されている。

#### 【0057】

本発明の別の実施形態は、抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のためのインビトロ診断試験における、ポリペプチド1F8、JL7、ならびにクルジバイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含むトリパノソーマ・クルージポリペプチドの組成物の使用である。ある実施形態において、抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のためのインビトロ診断試験での使用のための当該組成物は、3種のT・クルージポリペプチド1F8、JL7、およびクルジバインからなる。トリパノソーマ・クルージポリペプチドの当該組成物は、上記においてより詳細に説明されるポリペプチドの製造方法によっても得ることができる。

#### 【0058】

本発明のさらなる別の態様は、ポリペプチド1F8、JL7、ならびにクルジバイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含む、抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のための試薬キットである。ある実施形態において、抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のための当該試薬キット中に存在するポリペプチドは、ポリペプチド1F8、JL7、およびクルジバインからなる。当該キットは、抗トリパノソーマ・クルージ抗体の検出のためのインビトロ診断試験にとって有用であり、さらに、別々のバイアル瓶での対照および標準溶液、ならびに一般的な添加剤、緩衝液、塩、洗浄薬などを伴う1つまたは複数の溶液形態もしくは凍結形態での追加の試薬、ならびに当業者に既知の使用のための取扱説明書も含み得る。当該キットに対しても、トリパノソーマ・クルージポリペプチドの当該組成物は、上記においてより詳細に説明されるポリペプチドの製造方法によっても得ることができる。

#### 【0059】

本発明のさらに別の実施形態において、発明者らは、T・クルージ抗原1F8の反応性がカルシウムイオンの存在に依存していることを示すことができた。実施例8/表7(図8)において説明されるように、1F8がT・クルージ抗原組成物の一部である場合、カルシウムイオンの添加は、免疫学的反応性における明確な利得を生じる。さらに、カルシウム結合タンパク質である1F8抗原がT・クルージ抗原組成物において使用される場合、アッセイ緩衝液へのカルシウムイオンを添加することによって、試料材料としての血漿

10

20

30

40

50

の回復効果（すなわち、血漿採取管での抗凝血物質、例えば、クエン酸塩、EDTA、またはヘパリンなど、の $Ca^{2+}$ 錯体形成効果）を減少させることができる。したがって、本発明は、ポリペプチド1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含む、単離された生体試料におけるトリパノソーマ・クルージに対する抗体の検出に好適なポリペプチドの組成物であって、カルシウムイオンを1リットルあたり0.001~100ミリモル、ある実施形態では1リットルあたり0.1~10ミリモル、別の実施形態では1リットルあたり0.5~5ミリモル、別の実施形態では1リットルあたり1~5ミリモル、さらなる別の実施形態では1リットルあたり5ミリモルの濃度において含有する、組成物にも関する。カルシウムは、例えば、塩化カルシウムなどのような、水可溶性塩の形態において加えられ得る。上記において詳述したカルシウムイオンの添加は、単離された生体試料におけるトリパノソーマ・クルージに対する抗体の検出に好適な3種のポリペプチドの組成物に対しても適用され、この場合、当該ポリペプチドは、1F8、JL7、およびクルジパインである。ある実施形態において、ポリペプチド1F8は配列番号1を含み、ポリペプチドJL7は配列番号2を含み、ポリペプチドクルジパインは配列番号3を含む。さらなる別の実施形態において、当該ポリペプチドの1F8、JL7、およびクルジパインは、それぞれ、配列番号1、2、および3からなる。

10

#### 【0060】

カルシウムイオンの添加および定義された濃度範囲も、ポリペプチド1F8、JL7、ならびにクルジパイン、KMP-11、およびPAR2からなる群より選択されるポリペプチドのうち少なくとも1つを含む、上記においてより詳細に説明したキットに対する、ならびに1F8、JL7、およびクルジパインからなる3種のT・クルージ-特異的ポリペプチドを伴うキットに対する実施形態である。当該キットは、前述において定義した濃度範囲、ある実施形態では1リットルあたり0.1~10ミリモルの範囲、においてカルシウムイオンを含有し得る。

20

#### 【0061】

本発明はさらに、実施例のセクションによって説明される。特に、当該実施例は、少なくとも3種の異なる抗原の新規の組成物、ある実施形態では3種の抗原からなる新規の組成物、として適用される場合にT・クルージ特異的抗体を検出するためのイムノアッセイにおいて特異度および感度に関して優れた結果を示す、T・クルージ特異的ポリペプチドの変異型を本発明者らが開発し作製したことを説明する。

30

#### 【実施例1】

#### 【0062】

シャペロン融合を有するトリパノソーマ・クルージ抗原のクローニングおよび精製

接頭語「E c S S」を伴って表1に表される、T・クルージ抗原をコードする合成遺伝子は、Eurofins MWG Operon（エーバースベルク、ドイツ）から購入した。Novagen（マディソン、ウィスコンシン、米国）のpET24a発現プラスミドに基づいて、以下のクローニングステップを実施した。当該ベクターをNdeIおよびXhoIで消化し、縦列SlyDおよびそれぞれのT・クルージ抗原を含む半合成カセットを挿入した。結果として得られるプラスミドのインサートを配列決定し、所望の融合タンパク質をコードすることを見出した。結果として融合タンパク質を生じる、T・クルージポリペプチド（配列番号1~5）および大腸菌SlyDシャペロン部分（配列番号6）のアミノ酸配列が、本発明の配列プロトコルに示されている。2つのSlyDユニット（縦列SlyD）を、それぞれのT・クルージポリペプチドのN末端に融合させる。全ての遺伝子組み換えT・クルージ融合ポリペプチド変異型は、Ni-NTA-補助精製およびリフォールディングを容易にするために、C末端ヘキサヒスチジンタグ（配列番号8）を有した。配列番号を表1にまとめる。

40

#### 【0063】

全てのT・クルージシャペロン融合抗原を、特定のポリペプチド鎖におけるシステイン残基の存在に関係なく、同じプロトコルに従って、精製し、リフォールディングさせた。

50

発現プラスミドを宿す大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、カナマイシン (30 µg/ml) を伴う LB 培地において 1 OD<sub>600</sub> まで培養し、37 の培養温度において、1 mM の最終濃度までイソプロピル - D - チオガラクトシド (IPTG) を加えることによって、サイトゾル過剰発現を誘発させた。誘発の 4 時間後、遠心分離 (5000 × g で 20 分間) によって細胞を収穫し、冷凍して、-20 で保存した。細胞溶解物に対しては、緩衝液 50 ml 中における 25 mM の pH 8.5 のリン酸ナトリウム、6 mM の MgCl<sub>2</sub>、10 U/ml の Benzonase (登録商標)、1 タブレットの Complete (登録商標)、および 1 タブレットの Complete (登録商標) EDTA - フリー (プロテアーゼ阻害剤カクテル) に凍結ペレットを再懸濁させ、結果として得られる懸濁液を高圧ホモジナイゼーションによって溶解させた。粗溶解物に、7 M の GuHCl (塩酸グアニジン)、50 mM のリン酸ナトリウム、5 mM のイミダゾールとなるようにこれらを補い、1 時間攪拌した。遠心分離後、当該上澄みを、緩衝液 A (50 mM の pH 8.5 のリン酸ナトリウム、7.0 M の GuHCl、5 mM のイミダゾール) で事前に平衡化させた Ni - NTA (ニッケル - ニトリロトリアセテート) カラム上に適用した。特に、SS - C - クルジパインに対して、時期尚早の二硫化物の橋かけおよび二硫化物のシャッフリングを防ぐために、金属キレートカラムに適合する還元剤として 5 mM の TCEP を当該洗浄緩衝液に含ませた。洗浄ステップ後、マトリックス結合タンパク質の配座リフォールディングを誘発するために、カオトロピック緩衝液 A を、緩衝液 50 ml 中における 50 mM の pH 8.5 のリン酸ナトリウム、100 mM の塩化ナトリウム、10 mM のイミダゾール、5 mM の TCEP、1 タブレットの Complete (登録商標) EDTA - フリー (プロテアーゼ阻害剤カクテル) によって置き換えた。続いて、緩衝液 50 ml 中における 50 mM の pH 8.5 のリン酸ナトリウム、100 mM の塩化ナトリウム、10 mM のイミダゾール、1 タブレットの Complete (登録商標) EDTA - フリーで洗浄することによって、酸化フォールディング (すなわち、システイン残基の酸化橋かけ) を誘発させた。二価の Ni<sup>2+</sup> イオンの高い有効濃度に起因して、マトリックス結合融合タンパク質内でのジスルフィド橋かけの形成は、非常に速いプロセスである。溶離の前に、汚染タンパク質を除去するためにイミダゾール濃度を 40 mM まで上げた。次いで、50 mM の pH 8.5 のリン酸ナトリウム、100 mM の塩化ナトリウム中における 250 mM の濃度のイミダゾールを適用することによって、天然融合タンパク質を溶離させた。タンパク質含有分画の純度を SDS - PAGE により評価し、プールした。最終的に、当該タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィにかけて、タンパク質含有分画をプールして濃縮した。

#### 【実施例 2】

##### 【0064】

シャペロン融合を用いないトリパノソマ・クルージ抗原のクローニングおよび精製

表 1 に一覧される、T・クルージ抗原をコードする合成遺伝子は、Eurofins MWG Operon (エーパースベルク、ドイツ) から購入した。Novagen (マディソン、ウィスコンシン、米国) の pET24a 発現プラスミドに基づいて、以下のクローニングステップを実施した。T・クルージ抗原の 1F8、JL7、KMP - 11、または C - クルジパインの場合、ベクターをそれぞれ NdeI または BamHI によって消化し、XhoI およびそれぞれの T・クルージ抗原 (配列番号 1 ~ 4) を含むカセットを挿入した。結果として得られるプラスミドのインサートを配列決定し、所望のタンパク質をコードすることを見出した。結果として得られるタンパク質のアミノ酸配列は、本発明の配列プロトコルに示されている。

##### 【0065】

全ての遺伝子組み換え T・クルージポリペプチド変異型は、Ni - NTA - 補助精製およびリフォールディングを容易にするために、C 末端ヘキサヒスチジンタグを有していた。配列番号を表 1 にまとめる。シャペロン融合を有しない全ての T・クルージ抗原を、以下のプロトコルに従って精製した。発現プラスミドを宿す大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、カナマイシン (30 µg/ml) を伴う LB 培地において、1 OD<sub>600</sub> まで培養し

、37の培養温度において、1mMの最終濃度までイソプロピル - D - チオガラクトシド (IPTG) を加えることによって、サイトゾル過剰発現を誘発させた。誘発の4時間後、遠心分離 (5000 x g で20分間) によって細胞を収穫し、冷凍して、-20で保存した。細胞溶解物に対しては、緩衝液50ml中における25mMのpH8.5のリン酸ナトリウム、6mMのMgCl<sub>2</sub>、10U/mlのBenzonase (登録商標)、1タブレットのComplete (登録商標)、および1タブレットのComplete (登録商標) EDTA - フリー (プロテアーゼ阻害剤カクテル) に凍結ペレットを再懸濁させ、結果として得られる懸濁液を高圧ホモジナイゼーションによって溶解させた。粗溶解物に、50mMのリン酸ナトリウム、10mMのイミダゾールとなるようにこれらを補った。遠心分離後、当該上澄みを、緩衝液A (50mMのpH8.5のリン酸ナトリウム、100mMの塩化ナトリウム、10mMのイミダゾール) で事前に平衡化させたNi-NTA (ニッケル - ニトリロトリアセテート) カラム上に適用した。溶離の前に、汚染タンパク質を除去するためにイミダゾール濃度を40mMまで上げた。次いで、250mMの濃度のイミダゾールを適用することによって、当該タンパク質を溶離させた。最終的に、当該タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィにかけて、タンパク質含有分画をプールして濃縮した。表1において、接頭語としてのEcSSまたはSSは、T.クルージポリペプチドにN末端融合させた縦列SlyD部分を示している。

10

【0066】

【表1】

表1:実施例1および2により得られるT.クルージ抗原

20

T.クルージ抗原	シャーガス抗原を含む配列番号
<i>EcSS-IF8</i> (Cys)	1
<i>EcSS-IF8</i> (Ala で置き換えた Cys 残基)	1
<i>EcSS-JL7</i>	2
<i>EcSS-C</i> クルジパイン	3
<i>EcSS-KMP11</i>	4
<i>EcSS-C</i> PAR2	5
IF8	1
JL7	2
C-クルジパイン	3
KMP-11	4

30

40

【実施例3】

【0067】

T.クルージ抗原へのビオチンおよびルテニウム部分のカップリング

遺伝子組み換えタンパク質のリジン - アミノ基を、約10mg/mlのタンパク質濃度において、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によって修飾した。標識/タンパク質のモル比は、それぞれのタンパク質に応じて、3:1から30:1まで変えた。反応緩衝液は、50mMのリン酸カリウム (pH8.5)、150mMのKCl、0.5mMのEDTAであった。当該反応を室温において30分間実施し、緩衝されたL - リシンを10mMの最終濃度まで加えることによって当該

50

反応を止めた。当該カップリング反応後、粗タンパク質コンジュゲートをゲルろ過カラム (Superdex 200 HI Load) を通すことによって未反応の遊離標識を除去した。

【実施例 4】

【0068】

免疫診断試験における遺伝子組み換え T<sub>1</sub> クルージ抗原の免疫学的反応性の評価：ヒト血清における抗 T<sub>1</sub> クルージ抗体の検出

異なるタンパク質の免疫学的反応性を、自動化された cobas (登録商標) e601 アナライザ (Roche Diagnostics GmbH) において評価した。測定は、二重抗原サンドイッチ形式において実施した。それにより、ビオチン-コンジュゲート (すなわち、捕捉抗原) が、ストレプトアビジンをコーティングした磁性ビーズの表面に固定され、その一方で、当該検出抗原は、シグナリング部分として、錯体化されたルテニウムカチオンを有する。cobas (登録商標) e601 におけるシグナル検出は、電気化学ルミネセンスに基づいている。

【0069】

特異的免疫グロブリン分析物の存在下で、当該発色性ルテニウム錯体は、固相に橋かけ結合し、白金電極での励起後に 620 nm において発光する。シグナル出力は、光の任意単位による。測定は、いくつかの供給元から購入した、抗 T<sub>1</sub> クルージ陽性および陰性のヒト血清およびヒト血漿試料において実施した。全ての試料は、3種の市販のシャーガス病アッセイ (Abbott Laboratories からの Architect Chagas、Biookit S.A. からの bioelisa Chagas、NovaTec からの NovaLisa Chagas IgG ELISA) により、それぞれの製造元の取扱説明書に従って試験した。

【0070】

Architect Chagas アッセイは、いくつかの多重エピトープ融合ポリペプチドを使用し、それらは、それぞれが抗原 PEP-2、TcD、TcE、TcLo1.2、TcR27、FCaBP (= 1F8)、TcR39、FRA (= JL7)、SAPA、および MAP を含有するいくつかの遺伝子組み換え T<sub>1</sub> クルージポリペプチドを含み、結果として 10 の異なる抗原を生じる。bioelisa Chagas は、遺伝子組み換え抗原である PEP-2、TcD、TcE、および TcLo1.2 を使用する。NovaLisa Chagas IgG ELISA は、多重エピトープ融合ポリペプチド TcF を使用し、これは、抗原 PEP-2、TcD、TcE、および TcLo1.2 を含む。T<sub>1</sub> クルージ抗原の命名において、同一のまたは非常に類似した抗原が、しばしば、例えば FCaBP = 1F8 または PEP-2 は、B13 および Ag2 および TcR39 と同義であるなど、いくつかの同義語を有していることに留意されたい。レビューについては、Silveira ら Trends in Parasitol. 2001, Vol. 17 No. 6 または Marcipar ら, Current Topics in Trop. Med 16 March 2012, p. 273-398 を参照されたい。

【0071】

本発明による遺伝子組み換え T<sub>1</sub> クルージ抗原変異型を、二重抗原サンドイッチ (DAGS) イムノアッセイ形式において対毎に評価した。例えば、SS-1F8-ビオチンコンジュゲートを、50 mM の MES (pH 6.5)、150 mM の NaCl、0.1% のポリドカノール、0.2% のウシアルブミン、0.01% の N-メチルイソチアゾロン、0.1% のオキシ-ピリオンを含有するアッセイ緩衝液において、それぞれ 800 ng/ml の濃度において、SS-1F8-ルテニウム錯体コンジュゲートと共に評価した。全ての測定において、化学的に重合された、標識されていない EcSlyD-EcSlyD (SS) を、シャペロン融合ユニットによる免疫学的交差反応を避けるための干渉防止物質として、反応緩衝液中において大過剰 (20 µg/ml) で使用した。抗 T<sub>1</sub> クルージ陰性ヒト血清を対照として使用した。使用した試料体積は 49 µl であった。

10

20

30

40

50

## 【0072】

表2(図1aおよび1b)に、T・クルージ抗原シャペロン融合変異型の免疫学的活性(上述の配列リストおよび配列の概要を参照されたい)を示す。最初の5つの試料は、正常なヒト血清であり、以下の試料は、証明済みのT・クルージ-抗体陽性試料である。シャーガス病陽性試験体と陰性試験体を十分に区別するために、説明したシャーガス抗原の評価のための実用的カットオフは、5つの正常なヒト血清の平均の6倍として任意に選択した。陽性であると判断された全ての結果は、太字において記述されている。

## 【0073】

T・クルージ抗原変異型の反応性が個々の患者の血清に強く依存することは明白である。本発明による全ての抗原変異型は、かなりの抗原性を示している。

10

表3(図2)は、3種の市販のシャーガス病アッセイ(Architect Chagas、bioelisa Chagas、およびNovalisa Chagas IgG ELISA;成分抗原は上記を参照のこと)で試験した試験体の結果を示している。全ての試料は、過半数を超えるアプローチによってシャーガス病陽性であると特定される。これは、3つのアッセイのうち2つが陽性の結果を示し、3番目のアッセイが陰性の結果を示す場合、アッセイの結果の過半数(2:1)が陽性であることから、当該試料は陽性と判断されることを意味する。陽性であると判断された個々の結果の全てが、太字において印刷されている。

## 【0074】

表3から分かるように、本発明に記載される全ての遺伝子組み換え抗原と反応する試験体はいくつかしか存在しない。EcSS-C-クルジパインは、表3(図2)における調査した全てのシャーガス病陽性試料と反応することができる唯一の抗原であったが、ヒト血清におけるシャーガス病抗体の信頼性高い検出は、複数の特異的抗原を含む組成物を必要とする。

20

## 【実施例5】

## 【0075】

遺伝子組み換えT・クルージ抗原混合物の特異度

前に言及した遺伝子組み換えシャーガス病抗原の特異度(すなわち、真の陰性率)を評価するために、異なる抗原の混合物によって2つのプロトタイプキットを作製した。キット例1は、EcSS-1F8、EcSS-JL7、およびEcSS-C-クルジパインで作製した。キット例2は、さらにEcSS-KMP-11を含んでいた。

30

## 【0076】

T・クルージ抗原のポリペプチド変異型のビオチンおよびルテニウムコンジュゲートを、それぞれ、100ng/mlの濃度において適用した。全ての測定において、化学的に重合された、標識されていない干渉防止試薬EcSlyD-EcSlyD(SS)を、反応緩衝液中において大過剰(20μg/ml)で使用した。使用した試料体積は30μlであった。

## 【0077】

## 【表 2】

表4:

市販の抗シャーガス病アッセイと比較した遺伝子組み換えT.クルージ抗原混合物の特異度

		キット例1	キット例2	Architect Chagas	bioelisa Chagas
		EcSS-1F8 EcSS-JL7 EcSS-C-クルジパイン	EcSS-1F8 EcSS-JL7 EcSS-C-クルジパイン EcSS-KMP11		
試験体	番号	番号 反応性 / 特異度	番号 反応性 / 特異度	特異度	特異度
血液ドナー	n = 494	1* / 99.80%	1* / 99.80%	99.92% - 99.98%**	97.4% - 99.5%**

\* 正常なヒト血清の平均の6倍以上

\*\* パッケージ挿入

10

## 【0078】

バイエルン赤十字からの494の血液ドナー（正常な試料）について両方のキット例によって試験し、その結果を上記の表4にまとめる。

494のうちの一つのみが、本発明の両方のキット例と反応した。この試料をさらに、非反応性の知見と共に、NovaTecのNovaLISA Chagas IgG ELISAによって調査した。結果として得られる99.80%の特異度は、他の市販の抗シャーガス病アッセイと一致する。

## 【実施例6】

## 【0079】

遺伝子組み換えT.クルージ抗原混合物の感度

実施例5において説明した2つのキット例の感度（すなわち、真の陽性率）を、ヒト血清マトリックスにおいて、シャーガス病抗体（TcIおよびTcII、TcI = T.クルージ遺伝子型I；TcII = T.クルージ遺伝子型II）に対する2つの異なるWHO標準の線形希釈系列の測定によって、2つの市販のシャーガス病アッセイ（BioKit S.A.のbioelisa Chagas、Ortho-Clinical DiagnosticsのOrtho T. cruzi ELISA Test System）と比較した（表5、図3）。陽性であると判断された全ての結果が、太字において印刷されている。

## 【0080】

希釈感度実験において、本発明のキット例1とキット例2の間に有意な差は存在しない。しかしながら、両方のキット例は、4から6の線形希釈段階において、比較相手のアッセイであるbioelisa Chagas、Ortho T. cruzi ELISA、またはArchitect Chagasよりも感度が高い。bioelisa ChagasおよびArchitect Chagasの成分であるT.クルージ抗原は、実施例4において説明されている。Ortho T. cruzi ELISAは、T.クルージ細胞溶解物に基づいており、遺伝子組み換え抗原を含有しない。

## 【0081】

本発明によって達成される希釈感度の向上により、非常に低い抗体濃度でも、当該抗体の存在を信頼性高く検出することができる。

## 【実施例7】

## 【0082】

シャペロン融合の有無における遺伝子組み換えT.クルージ抗原の免疫学的反応性の比較

20

30

40

50

シャペロン融合を伴う遺伝子組み換え T・クルージ抗原の免疫学的反応性を、前の実施例において示した。本発明による T・クルージ抗原の免疫学的反応性が、融合パートナーの存在に依存しないことを示すために、実施例 2 において説明したようなシャペロン融合を伴わない遺伝子組み換え T・クルージ抗原を、その免疫学的反応性に関しても評価した。表 6 (図 4) に測定の結果をまとめる。

#### 【0083】

T・クルージ抗原のポリペプチド変異型のビオチンおよびルテニウムコンジュゲートを、それぞれ、100 ng/ml の濃度において適用した。全ての測定において、化学的に重合された、標識されていない干渉防止試薬 EcSlyD - EcSlyD (SS) を、反応緩衝液中において大過剰 (20 µg/ml) で使用した。使用した試料体積は 30 µl であった。

10

#### 【0084】

表 6 (図 4) の測定データから結論付けることができるように、シャペロン融合パートナーを伴わない T・クルージ抗原変異型も、著しい抗原性を示す。観測される信号における差は、アクセス可能なリジン残基 (SlyD - 融合の有無における) の数の違いの結果としての標識率の違いによって説明することができる。異なる部位が標識され、これにより、エピトープが妨げられる程度に違いが生じ得るといふ、別の解釈もあり得る。さらに、シャペロン融合を伴わない抗原のモル濃度は、上記融合パートナーを含有するそれらのカウンターパートより高い。まとめると、T・クルージ抗体の検出のための T・クルージポリペプチドの適性は、シャペロン融合パートナーに依存しない。T・クルージ - 特異的抗体を検出するためには、T・クルージ特異的ポリペプチド抗原配列のみが必要である。

20

#### 【実施例 8】

#### 【0085】

遺伝子組み換え T・クルージ抗原 1F8 の免疫学的反応性に対するカルシウムイオンの影響

遺伝子組み換え T・クルージ抗原 1F8 は、TC24、TC28、または FCaBP (鞭毛カルシウム結合タンパク質) とも呼ばれ、トリパノソーマ・クルージの既知のカルシウム結合タンパク質であるが、これの免疫学的反応性に対するカルシウムイオンの影響を調査するために、実施例 4 において説明したアッセイ緩衝液に、1 mM の濃度において塩化カルシウムを補った。EcSS - 1F8 のビオチンおよびルテニウムコンジュゲートを、それぞれ、200 ng/ml の濃度において適用した。全ての測定において、化学的に重合された、標識されていない干渉防止試薬 EcSlyD - EcSlyD (SS) を、反応緩衝液中において大過剰 (20 µg/ml) で使用した。使用した試料体積は 30 µl であった。

30

#### 【0086】

表 7 (図 5) のシャーガス病に感染した患者の血清のほとんどは、アッセイ緩衝液へのカルシウムイオンの添加により、T・クルージ - 1F8 抗原の免疫学的反応性において明白な利得を示した。いくつかのシャーガス病陽性血清では、信号は倍になり得た。観察される信号の違いは、表 2 (図 1 a および 1 b) にも示されるような、個々の患者の免疫応答における異種パターンによって説明することができる。

40

#### 【0087】

カルシウムイオンの添加による T・クルージ 1F8 抗原の免疫学的反応性における利得は、3 種のポリペプチド 1F8、JL7、およびクルジバインからなる本発明によるポリペプチド組成物を適用した場合にも観察することができた (データは示されていない)。

【図1a】

	Architect Chagas	bioeLisa Chagas	NovoLisa Chagas	EcSS-1F8(Cys)	EcSS-1F8	EcSS-JL7	EcSS-C-クルシグイン	EcSS-KMP11	EcSS-PAR2	
	陽性≧10 陰性<0.8 不定≧0.8~<1.0	陽性≧10 陰性<0.9 不定≧0.9~<1.0	陽性≧11 陰性<0.9 不定≧0.9~<1.1							
	S/CO	S/CO	S/CO	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	
正常な材料										
SN1437	0.02	0.11	0.42	1'100	598	586	605	7'507	601	
SN1438	0.02	0.07	0.15	937	577	551	644	6'203	584	
SN1439	0.02	0.29	0.32	1'002	607	562	591	6'598	604	
SN1440-088	0.03	0.04	0.33	1'437	643	576	608	6'930	640	
SN1440-102	0.05	0.11	0.24	1'170	639	575	628	6'442	638	
				実用的 カットオフ	6'775	3'677	3'420	3'691	40'416	3'680
シャーガス病 検体材料										
SN1440-001	4.96	2.27	2.56	48'452	32'476	18'211	15'602	52'237	22'798	
SN1440-005	4.16	1.64	1.58	32'774	22'035	13'004	11'317	39'248	16'766	
SN1440-036	7.08	3.30	3.22	455'586	223'396	184'707	387'941	9'643	92'195	
SN1440-039	1.13	2.42	2.53	6'109	2'986	12'829	49'203	11'545	22'237	
SN1440-039	4.62	4.53	5.21	34'465	15'808	14'904	3'604	22'370	57'326	
SN1440-041	2.02	2.57	3.35	187'967	91'906	13'919	286'061	17'275	82'381	
SN1440-041	7.42	3.92	3.97	221'327	104'871	264'421	868'701	842'535	238'532	
SN1440-042	7.51	4.17	4.99	166'298	84'692	120'914	30'859	1'343'355	371'312	
SN1440-043	3.26	6.85	5.11	20'1414	191'169	5'842	1'037'504	50'420	83'717	
SN1440-049	1.32	2.08	1.52	21'360	13'867	2'730	20'324	14'305	21'620	
SN1440-049	8.7	5.20	4.86	12'246	7'456	210'951	2'853	84'879	11'269	
SN1440-051	5.22	6.09	5.08	63'886	30'861	3'027	130'665	14'502	608	
SN1440-052	8.91	5.64	5.42	232'445	123'076	583'624	258'818	168'487	308'825	
SN1440-053	7.86	2.02	2.98	80'405	34'279	124'462	222'631	304'850	92'454	
SN1440-058	3.46	2.01	2.8	146'099	73'718	19'383	18'024	16'241	296'171	
SN1440-059	6.75	5.13	5.14	40'400	21'232	66'038	203'497	169'886	179'644	
SN1440-060	5.76	1.65	2.78	167'119	11'388	31'486	96'694	29'301	2'607	
SN1440-062	1.49	1.16	2.11	3'578	2'328	2'583	16'907	12'208	1'803	
SN1440-064	3.79	1.49	1.52	2'233	989	18'166	12'972	33'850	975	
SN1440-065	3.03	1.22	3.31	113'580	80'128	829	289'628	12'144	119'128	
SN1440-066	4.19	1.79	3.09	157'875	84'471	48'032	1'253	34'867	9'027	
SN1440-067	4.32	5.74	4.80	79'616	35'069	17'370	497'711	11'059	7'382	
SN1440-068	5.22	6.26	4.86	123'768	64'836	635	35'426	7'773	104'216	
SN1440-069	5.8	4.70	4.51	42'234	23'078	86'162	26'123	35'856	7'029	

表2

【図1b】

	Architect Chagas	bioeLisa Chagas	NovoLisa Chagas	EcSS-1F8(Cys)	EcSS-1F8	EcSS-JL7	EcSS-C-クルシグイン	EcSS-KMP11	EcSS-PAR2	
	陽性≧10 陰性<0.8 不定≧0.8~<1.0	陽性≧10 陰性<0.9 不定≧0.9~<1.0	陽性≧11 陰性<0.9 不定≧0.9~<1.1							
	S/CO	S/CO	S/CO	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	
正常な材料										
SN1437	0.02	0.11	0.42	1'100	598	586	605	7'507	601	
SN1438	0.02	0.07	0.15	937	577	551	644	6'203	584	
SN1439	0.02	0.29	0.32	1'002	607	562	591	6'598	604	
SN1440-088	0.03	0.04	0.33	1'437	643	576	608	6'930	640	
SN1440-102	0.05	0.11	0.24	1'170	639	575	628	6'442	638	
				実用的 カットオフ	6'775	3'677	3'420	3'691	40'416	3'680
シャーガス病 検体材料										
SN1440-070	6.89	4.14	3.41	542'123	245'999	78'177	356'510	196'657	586'269	
SN1440-072	4.17	3.96	4.36	600'257	338'935	650	891'092	226'707	25'817	
SN1440-074	9.09	6.14	5.47	461'166	216'916	206'137	148'809	69'560	13'960	
SN1440-074	5.32	3.78	5.02	209'170	96'274	135'626	166'648	243'190	2626	
SN1440-075	4.25	2.24	3.07	318'706	201'624	7'207	32'371	7'172	55'879	
SN1440-076	9.34	5.51	4.82	84'348	59'501	448'436	925'497	362'008	2054	
SN1440-077	4.34	5.76	4.85	89'024	209'093	48'470	80'687	22'338	410'143	
SN1440-078	5.93	5.88	4.54	21'333	11'102	120'347	126'359	113'643	4'441	
SN1440-080	3.93	1.82	2.89	1'920	1'941	9'977	51'020	20'660	115'783	
SN1440-085	7.76	4.07	3.55	954'122	577'147	530'003	1'021'833	364'572	669	
SN1440-087	5.71	2.70	2.58	44'798	24'397	156'646	20'148	25'807	38'762	
SN1440-089	3.98	4.13	4.25	37'204	19'339	24'319	50'081	9'369	146'658	
SN1440-091	6.27	4.57	4.91	565'712	318'075	331'548	62'090	216'308	134'700	
SN1440-171	6.93	3.85	3.14	70'934	83'636	40'374	31'682	109'165	44'993	
SN1440-172	12.61	36.3	5.00	1073'130	664'930	1063'226	659'470	2'404'438	447'883	
SN1440-173	9.24	3.75	3.17	158'715	116'429	423'787	1'119'086	174'794	140'232	
SN1440-174	11.52	6.71	5.42	289'328	222'671	921'379	602'961	220'573	510'137	
SN1440-175	10.37	32.7	5.07	471'975	251'789	1'288'757	16'928	266'355	472'750	
SN1443-13	4.87	6.80	4.87	41'118	32'117	106'547	396'684	28'986	208'175	
SN1443-15	9.79	5.42	5.23	119'995	72'342	208'293	64'733	65'607	370'844	
SN1443-19	9.9	7.02	4.51	1'139'104	359'908	481'323	789'054	1'704'619	475'661	
SN1443-20	12.47	6.95	4.62	467'874	363'163	1'139'980	776'675	559'915	307'306	
SN1443-21	4.83	5.00	4.31	36'905	21'242	26'240	229'614	76'334	6'222	
SN1443-22	5.36	2.47	1.27	3'761	3'635	121'237	107'58	15'633	15'053	
SN1443-30	10.89	6.50	4.36	335'876	320'732	455'520	1'822	233'973	307'551	
SN1443-31	12.08	5.16	4.38	327'437	294'885	1'279'326	642	306'518	474'449	

表2の続き

【図2】

	Architect Chagas	bioeLisa CHAGAS	NovoLisa Chagas	EcSS-1F8(Cys)	EcSS-1F8	EcSS-JL7	EcSS-C-クルシグイン	EcSS-KMP11	EcSS-PAR2	
	陽性≧10 陰性<0.8 不定≧0.8~<1.0	陽性≧10 陰性<0.9 不定≧0.9~<1.0	陽性≧11 陰性<0.9 不定≧0.9~<1.1							
	S/CO	S/CO	S/CO	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	カウント	
正常な材料										
SN1437	0.02	0.11	0.42	1'100	598	586	605	7'507	601	
SN1438	0.02	0.07	0.15	937	577	551	644	6'203	584	
SN1439	0.02	0.29	0.32	1'002	607	562	591	6'598	604	
SN1440-088	0.03	0.04	0.33	1'437	643	576	608	6'930	640	
SN1440-102	0.05	0.11	0.24	1'170	639	575	628	6'442	638	
				実用的 カットオフ	6'775	3'677	3'420	3'691	40'416	3'680
シャーガス病 検体材料										
SN1440-126	4.19	1.17	0.882	7'673	7'016	194'856	40'074	28'827	2'496	
SN1440-127	3.73	0.509	1.51	103'139	47'608	22'868	129'597	235'616	52'202	
SN1440-141	1.41	0.872	1.15	93'066	40'417	7'435	8'526	7'846	2'977	
SN1440-146	0.45	1.12	1.30	6'543	2'918	760	16'980	8'226	2'638	
SN1440-153	3.46	0.900	1.54	58'036	36'487	2'262	34'729	5'414	42'774	
SN1440-187	1.12	1.08	0.999	2'470	2'964	5'030	39'342	5'159	33'478	
SN1440-109	6.73	0.872	1.51	86'146	35'494	135'402	497'388	96'028	29'400	
SN1440-109	4.86	0.619	1.25	38'860	26'302	98'519	58'265	95'121	53'883	
SN1440-139	3.32	0.832	1.33	19'117	7'826	963	36'074	11'775	3'073	
SN1443-12	0.87	4.12	4.54	17'691	16'913	2'889	102'131	15'226	2'401	
SN1443-18	4.09	1.35	0.867	12'682	14'769	67'320	8'629	79'426	1'481	

表3

【図3】

	bioeLisa CHAGAS	ORTHO Tクルージ ELISA試験 システム	Architect Chagas	キット例1		キット例2	
				カウント	S/CO	カウント	S/CO
実用的カットオフ							
				6'878		6'956	
ヒト血漿における一次国際標準シャーガス(Ti)抗体 O9/186							
未希釈	2.51	4.22	6.81	1'366'931	198.72	1'349'192	193.90
1:2	1.93	3.08	5.3	1'024'432	148.94	970'755	139.51
1:4	1.11	2.01	4.05	597'796	86.91	576'487	82.85
1:8	0.60	1.09	2.69	318'461	46.30	303'328	43.59
1:16	0.30	0.61	1.35	166'318	24.18	159'465	22.92
1:32	0.21	0.32	0.7	84'865	12.34	82'844	11.91
1:64	0.11	0.16	0.32	43'845	6.37	42'689	

【 図 4 】

	EcSS-1F8 カウント	EcSS-JL7 カウント	EcSS-C カルシウム カウント	EcSS- KMP11 カウント	1F8 カウント	JL7 カウント	C- カルシウム カウント	KMP11 カウント
正常な試料								
NS1	774	755	770	734	810	699	895	791
NS2	787	727	780	695	863	700	837	762
NS3	771	728	776	706	801	692	919	788
NS4	793	743	767	717	884	693	935	787
NS5	766	710	790	740	859	683	821	773
シヤ-ガス検出性試料								
SN1440-012	12'343	274'446	962	6'356	13'421	308'750	2'839	878
SN1440-015	754'601	1'832'145	73'017	906'011	1'092'871	8'535'719	14'145	27'035
SN1440-019	3'834	28'765	3'751	737	4'588	33'768	2'172	850
SN1440-021	322'975	2'027'719	96'809	177'678	466'754	2'606'324	15'183	8'211
SN1440-028	2'903	855	2'065	2'464	4'035	870	1'468	882
SN1440-052	285'780	2'581'290	30'334	292'415	456'103	3'131'565	16'191	7'749
SN1440-059	67'769	517'248	77'374	564'540	109'072	554'033	17'482	8'182
SN1440-094	343'717	1'906'041	70'667	516'112	646'033	2'396'405	19'608	10'128

表6

【 図 5 】

	EcSS-1F8 0 mM CaCl <sub>2</sub> カウント	EcSS-1F8 1 mM CaCl <sub>2</sub> カウント	回復率 %
正常な試料			
C143907	510	534	105
C143908	508	576	113
C143909	522	523	100
C143910	508	535	105
C143911	506	536	106
C143912	516	529	103
C143913	520	518	100
C143914	524	524	100
C143915	523	534	102
C143916	524	536	102
C143917	532	517	97
C143918	512	531	104
C143919	530	535	101
C143920	510	533	105
C143921	511	529	104
C143922	536	554	103
シヤ-ガス検出性試料			
SN1440-167	495'347	583'774	118
SN1440-168	69'328	152'274	220
SN1440-169	146'857	254'499	173
SN1440-170	55'065	78'873	143
SN1440-171	80'354	114'591	143
SN1440-172	467'189	449'061	96
SN1440-173	156'964	175'805	112
SN1440-174	219'415	432'535	197
SN1440-175	368'215	418'037	114
SN1440-176	97'114	157'364	162
SN1440-177	523'141	627'085	120
SN1440-178	479'703	534'115	111
SN1440-179	157'954	238'243	151
SN1440-180	293'502	407'658	139
SN1440-181	357'961	467'273	131
SN1440-182	412'148	513'367	125
SN1440-183	387'962	509'267	131
SN1440-184	83'522	178'316	213
SN1440-185	25'025	45'663	182
SN1440-186	95'164	114'718	121
SN1440-187	2'032	4'432	218
SN1440-188	9'027	17'939	199
SN1440-189	105'216	132'977	126
SN1440-190	145'852	200'161	137
SN1440-191	231'928	318'487	137
SN1440-192	11'881	24'312	205
SN1440-193	23'647	24'356	103
SN1440-194	163'562	250'796	153

表7

【 配 列 表 】

2017534055000001 . app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075691
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UMEZAWA E S ET AL: "An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of Trypanosoma cruzi recombinant antigens", TRANSFUSION, AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, BETHESDA, MD, US, vol. 43, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 91-97, XP002358664, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1046/J.1537-2995.2003.00279.X the whole document abstract ----- -/--	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 January 2016		28/01/2016
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
		Jenkins, Gareth

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075691
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EUFROSINA S. UMEZAWA ET AL: "Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 5, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 1554-1560, XP055177716, ISSN: 0095-1137 the whole document last paragraph of discussion -----</p>	1-10
A	<p>EP 0 976 763 A1 (INNOGENETICS NV [BE]) 2 February 2000 (2000-02-02) the whole document claims 1,2 -----</p>	1-10
A	<p>M.G. CHIARAMONTE ET AL: "Polymerase chain reaction reveals Trypanosoma cruzi infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients", ACTA TROPICA, vol. 72, no. 3, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 295-308, XP055177718, ISSN: 0001-706X, DOI: 10.1016/S0001-706X(99)00005-4 the whole document abstract -----</p>	1-10
A	<p>Iván S Marcipar ET AL: "Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins", Current topics in tropical medicine, 16 March 2012 (2012-03-16), pages 273-298, XP055177720, ISBN: 978-9-53-510274-8 Retrieved from the Internet: URL:http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/32501.pdf [retrieved on 2015-03-19] the whole document page 287 -----</p>	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/075691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0976763	A1	02-02-2000	
		AR 023634 A1	04-09-2002
		BR 9903250 A	09-05-2000
		EP 0976763 A1	02-02-2000
		US 6458922 B1	01-10-2002
		US 2003108960 A1	12-06-2003
-----			

## 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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

(72) 発明者 ショルツ, クリスティアン

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・シュトラッセ 3 5 アー

(72) 発明者 ウプマイヤー, バーバラ

ドイツ国 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ, エーガーレンダーシュトラッセ 1 2 ツェー

(72) 発明者 ツァルト, トラルフ

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, マイシュトラッセ 1 0

(72) 発明者 ムエンフ, ペーター

ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ポーンホルツヴェーク 6

(72) 発明者 レスラー, ディーター

ドイツ国 8 5 6 1 4 キルヒセーオン, リンデンシュトラッセ 5 1

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA50 DA86 EA52 FA72 FA74

GA26

专利名称(译)	用于检测恰加斯病的抗原组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017534055A</a>	公开(公告)日	2017-11-16
申请号	JP2017523282	申请日	2015-11-04
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	シヨルツクリスティアン ウプマイヤーバーバラ ツアルントラルフ ムエンフペーター レスラーディーター		
发明人	シヨルツ,クリスティアン ウプマイヤー,バーバラ ツアルント,トラルフ ムエンフ,ペーター レスラー,ディーター		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C07K14/44		
CPC分类号	G01N33/56905 G01N2333/44 G01N2469/20 A61K39/005 C07K14/44 G01N33/564 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/569.A G01N33/53.N G01N33/543.501.A C07K14/44.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA50 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	山本修 宮前徹 中西 基晴		
优先权	2014192004 2014-11-06 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 本发明是适合于在分离的生物样品中检测抗克鲁斯锥虫 ( T. cruzi ) 的抗体的多肽的组合物, 所述生物样品由三种多肽1F8, JL7和cludipain组成。关于产生适用于使用该多肽组合物检测克氏锥虫抗体的可溶性免疫反应性多肽组合物方法也是本发明的一部分。此外, 本发明涉及在分离的样品中检测特异于克氏锥虫的抗体的方法, 该方法包括使用所述克氏锥虫多肽以及所述克氏锥虫的组合物。它还涉及包含该多肽的组成的试剂盒。[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2017-534055 (P2017-534055A) (P2017-534055A) (2017. 11. 16)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考) 4H045
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569 A	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 501A	
C07K 14/44 (2006.01)	C07K 14/44 ZNA	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2017-523282 (P2017-523282) 平成27年11月4日 (2015. 11. 4) 平成29年5月26日 (2017. 5. 26) PCT/EP2015/075691 W02016/071392 平成28年5月12日 (2016. 5. 12) 14192004. 1 平成26年11月6日 (2014. 11. 6) 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 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ハーゼル・ グレンツァーヘルストラッセ124 (74) 代理人 弁理士 小野 新次郎 100140109 (74) 代理人 弁理士 山本 修 100118902 (74) 代理人 弁理士 宮前 徹 100106208 (74) 代理人 弁理士 中西 基晴 100120112
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 シャーガス病の検出のための抗原組合物