

(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2020-517630

(P2020-517630A)

(43) 公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/18 Z N A	4 B O 6 4
<b>C07K 14/245 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/245	4 H O 4 5
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	
<b>C12P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C	
<b>G01N 33/569 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/569 L	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556820 (P2019-556820)  
 (86) (22) 出願日 平成30年4月23日 (2018. 4. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月13日 (2019. 12. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/060330  
 (87) 国際公開番号 W02018/197406  
 (87) 国際公開日 平成30年11月1日 (2018. 11. 1)  
 (31) 優先権主張番号 17168197.6  
 (32) 優先日 平成29年4月26日 (2017. 4. 26)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 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・  
 グレンツアーヘルストラッセ124  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 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】 可溶性および免疫反応性のフラビウイルスNS1ポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、分離された生体試料中のフラビウイルスに対する抗体を検出するのに適したポリペプチドであって、フラビウイルスNS1ウイングドメイン特異的アミノ酸配列を含み、前記フラビウイルスのNS1 ラダードメイン由来のアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、ポリペプチドに関する。一実施形態において、前記フラビウイルスは、ジカウイルス(ZIKV)、西ナイルウイルス(WNV)、デングウイルス1~4型(DENV1~4)、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)、黄熱病ウイルス(YFV)および日本脳炎ウイルス(JEV)からなる群から選択される。また、前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン特異的ポリペプチドを産生する方法、第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法、抗体を検出するための前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン特異的ポリペプチドの使用、ならびに、フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む前記フラビウイルス抗体を検出するための試薬キットも開示されている。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

分離された生体試料中のフラビウイルスに対する抗体を検出するのに適したポリペプチドであって、フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン特異的アミノ酸配列を含み、前記フラビウイルスの NS 1 ラダードメイン由来のアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、ポリペプチド。

## 【請求項 2】

前記フラビウイルスのさらなるアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

前記フラビウイルスが、ジカウイルス (ZIKV)、西 Nile ウイルス (WNV)、デングウイルス 1 ~ 4 型 (DENV 1 ~ 4)、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV)、黄熱病ウイルス (YFV)、日本脳炎ウイルス (JEV) からなる群から選択される、請求項 1 または 2 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

前記フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン特異的アミノ酸配列が、配列番号 1、2、5、7、9、11、13、15、17 および 19 からなる群から選択されるポリペプチドから本質的になる、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

前記ポリペプチドがシャペロンに融合している、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 6】

前記シャペロンが、SlyD、SlpA、FkpA および Skp からなる群から選択される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

配列番号 21 (ジカ)、28 (DENV 1)、29 (DENV 2)、30 (DENV 3) および 31 (DENV 4) からなる群から選択される、請求項 6 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 8】

可溶性および免疫反応性のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを産生する方法であって、

a) 請求項 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドをコードする、作動可能に連結された組換え DNA 分子を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養するステップと、

b) 前記フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを発現させるステップと、

c) 前記フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを精製するステップと

を含む、方法。

## 【請求項 9】

分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法であって、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の前記第 1 のフラビウイルス種のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドが前記抗フラビウイルス抗体の捕捉試薬および / または結合パートナーとして使用される、方法。

## 【請求項 10】

分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法であって、a) 請求項 1 から 7 のいずれかに記載の前記第 1 のフラビウイルス種のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドと体液試料を混合することにより免疫反応混合物を形成するステップと、

b) 前記フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドに対する体液試料中に存在する抗体を、前記フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドと免疫反応させて免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持するステップと、

10

20

30

40

50

c) 前記免疫反応生成物のいずれかの存在および/または濃度を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 1 1】

検出された抗体が I g G または I g M 抗体である、請求項 9 または 1 0 に記載の分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

【請求項 1 2】

前記第 1 のフラビウイルス種が Dengue virus 1 ~ 4 型である、請求項 9 から 1 1 のいずれかに記載の分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

【請求項 1 3】

抗フラビウイルス抗体を検出するためのインビトロ診断試験における、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドの使用。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを含む、抗フラビウイルス抗体を検出するための試薬キット。

【請求項 1 5】

個別の容器にまたは単一の容器ユニットの個別の区画に、少なくともアビジンまたはストレプトアビジンで被覆された微粒子、およびビオチンに共有結合された請求項 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを含む、請求項 1 4 に記載の試薬キット。

【請求項 1 6】

特異的結合パートナーとして ラダードメインの完全配列または部分配列を含むフラビウイルス NS 1 ポリペプチドを使用することによって、第 1 のフラビウイルスとは異なる少なくとも 1 つの第 2 のフラビウイルスに対する抗体を含有することが推定される分離された生体試料中の第 1 のフラビウイルスに対する抗体を検出する方法であって、非標識形態の前記フラビウイルスの NS 1 ラダードメインを含むポリペプチドを添加することによって、一実施形態においては、クエンチャーとして ラダードメインを含む前記ポリペプチドを添加することによって、前記第 1 のフラビウイルスとは異なる少なくとも 1 つの第 2 のフラビウイルスに対する交差反応性が除去される、方法。

【請求項 1 7】

抗フラビウイルス抗体を検出するためのイムノアッセイにおける干渉を低減する試薬としての、フラビウイルス NS 1 ラダードメインポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

世界保健機構によれば、フラビウイルス、例えばジカウイルス、デングウイルスなどによって伝播される熱帯病は、世界で蔓延し続けている (Olliaroら、PLOS Neglected Tropical Diseases Feb 1, 2018, 1 ~ 13)。フラビウイルスは、例えば、ジカウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、黄熱病ウイルスおよび日本脳炎ウイルスを含む、フラビウイルスファミリーの属である。フラビウイルスは、昆虫、蚊またはマダニなどの媒介節足動物、例えばエジプトおよびアジアの蚊の系統であるネッタイシマカ (Aedes aegypti) およびヒトスジシマカ (Aedes albopictus) によって感染され、したがって、アルボウイルス (節足動物媒介ウイルス) として分類される。

【0002】

他の点で健康な人へのフラビウイルスによる感染は、発熱、疲労、発疹、体の痛みなどの軽度の症状をもたらす得る。しかし、その人の一般的な健康状態および免疫状態によって、感染はまた、より重篤な、時には致死的な後遺症に至る場合がある。軽度の症状はある程度の類似性を共有するが、重篤な合併症は、それぞれのフラビウイルスに応じて極めて異なる。

10

20

30

40

50

## 【0003】

ジカウイルスは、妊婦から子宮内の胎児へと感染する可能性があり、胎児における重篤な脳形成異常および小頭症などの欠陥を引き起こすことが疑われている。小頭症（「小さな頭」のギリシャ語に由来する）は、新生児の脳が適切に発達しない症状であり、したがって、その頭部は通常よりもサイズが小さい。成人における感染は、いわゆるギランバレー症候群（末梢神経系を攻撃する免疫系により引き起こされる筋力低下）につながり得る。

## 【0004】

デングウイルスによる感染は、特に感染が適時に認識されず早急な支持療法が受けられない場合、出血熱などの医学的合併症および死亡を引き起こす可能性がある。現在までに、4つの型のデングウイルス（デングウイルス1～4）が知られており、1つの型のデング熱に感染しても、残りの型への免疫は得られない。通常、デング熱による二次感染は一次感染よりも重篤になり、ワクチン接種を受けた人、特に子供は、デング熱感染時に深刻な医学的合併症に直面することが多い。

## 【0005】

西ナイルウイルスによる感染は、脳炎（脳の炎症）または髄膜炎（脳および脊髄を囲む膜の炎症）に至る中枢神経系に影響し、ポリオに似た長期に及ぶ麻痺を引き起こし得る。

いくつかのフラビウイルス感染に対するワクチンは、ジカウイルスに対してだけでなく、デング熱、西ナイルウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、黄熱ウイルスおよび日本脳炎ウイルスに利用可能である。しかし、ワクチン接種は必ずしも有効であるとは限らず、例えば、二次的なデング熱感染のような場合、重篤な合併症を招き得る（概説については、CollinsおよびMetz、Clin Therap、2017 Vol. 39、8p. 1519～1536を参照）。感染後の効果的な医学的処置は不十分である。適時に支持療法を受けるためには、患者がフラビウイルスに感染したかどうか、特にどのような種類のフラビウイルスに感染したかを知ることが大事である。したがって、フラビウイルスによる、特にジカ、デング熱、西ナイルウイルスのいずれかによる患者の感染を確実に確認する、または除外するために、高感度で特異的な血清学的診断法を開発することが求められている。特に、高度に特異的なイムノアッセイが、複数のフラビウイルス感染の罹患率が高い地域において非常に必要とされている。もちろん、例えば、過去に他のフラビウイルス感染、例えばデング熱または黄熱病などに罹患し、その血清がデング熱および黄熱病ウイルスの主要免疫原に対するポリクローナル抗体によって特徴付けられる個体では最近のジカ感染を確実に診断することは非常に難しい仕事である。

## 【0006】

2016年以来、ジカウイルスNS1抗原に対する抗体を検出するいくつかのELISA系イムノアッセイが市販されている（例えば、Huzlyら、Euro Surveill. 2016; 21(16) pii=30203、1～4）。しかし、これらのアッセイは、関連するウイルス、例えばデングウイルス、および西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス（FSME）または日本脳炎ウイルスのようなフラビウイルス科に属する他のアルボウイルスに対してもともと生成された抗体と交差反応することが疑われている。この交差反応性は、偽陽性結果および患者の免疫状態の誤った解釈をもたらす可能性があり、ジカNS1（非構造抗原1）と他のフラビウイルス、例えば西ナイルウイルスおよびデングウイルスの相当物との構造相同性および配列相同性によるものと思われる（Hilgenfeld 27 Oct 2016、Embo J. 1～3）。2015/2016年のブラジルでのジカ流行について報告された発生率および罹患率のデータは、その時に使用されたイムノアッセイの限定された特異性のため過大視バイアスの欠点を有していたと考えられる。罹患率および発生率のデータを評価し流行発生の客観的リスクを評価するためには、明確な診断が必要条件として不可欠である。特異性の不十分な血清学的アッセイは流行の程度を過度に強調するため、当局だけでなく、動揺し不安のある個人によってもパニックに駆られた決断を招く。例えば、ブラジルにおける中絶の数は、真のまたは表向きのジカ流行に対する中間報告後に著しく増加したことが

10

20

30

40

50

報告されている。

【0007】

ELISA原理に基づく Dengue ウイルスおよび West Nile ウイルスの IgG および IgM イムノアッセイは市販されている。しかし、既知のイムノアッセイは、明らかに、一方では免疫反応性が高い（すなわち、フラビウイルス感染の免疫原として反応性が高く、免疫応答の過程で産生された免疫グロブリンの検出用の抗原として非常に適する）が、他方では、他のフラビウイルスに対してもともと生成された抗体と交差反応する傾向がある完全長 NS1 抗原を使用している。

【0008】

West Nile ウイルスおよび Dengue ウイルス由来の完全長グリコシル化 NS1 の結晶構造は高解像度で解明されており、異なるドメインとかなり複雑なタンパク質トポロジーが判明している (Akeyら、Science (2014; 343 (6173): 881~885)。最近、Zika ウイルス非構造タンパク質 1 (NS1) の C 末端断片 (アミノ酸残基 172 - 352) の結晶構造が公開され、head-to-head 型のダイマーが明らかになり、NS1 のオリゴマーの特徴が確認された (Songら、Nature Struct. Mol. Biol. 2016 (23) 5, 456~459)。さらに、完全長 Zika ウイルス NS1 の完全三次元構造が Brownら、Nature Struct. Mol. Biol. 2016 (23) 9, 865~868 により公開され、NS1 構造がさらに詳細に説明されている。したがって、NS1 は、そのオリゴマーの状態、そのグリコシル化パターンおよびシステイン残基のその豊富な量により、非常に複雑な複合タンパク質であることがわかる。さらに、特に Zika ウイルス、Dengue ウイルスおよび West Nile ウイルスを診断するための専用のフラビウイルス抗原に関する刊行物は少なく、個々のフラビウイルス抗原に特有であり、意図したウイルスと関連するフラビウイルスとを明快に識別することができる線状または立体構造の B 細胞エピトープに関する信頼性のある情報はこれまで利用することができなかった。

【0009】

国際特許出願 WO 2017 / 144173 および WO 2017 / 144173 は、352 アミノ酸の完全長 Zika NS1 抗原の変異体を開示し、いくつかの必須エピトープを列挙しており、NS1 抗原の C 末端部分の ラダードメインエピトープ (322 位から 326 位) が反応性にとって不可欠であると考えられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、本発明の根底にある問題は、特定のフラビウイルス、特に Zika ウイルス、Dengue ウイルスおよび West Nile ウイルスに対する抗体を検出する従来の利用可能なイムノアッセイでの限定された特異性である。この問題は、特許請求の範囲に明示した本発明によって解決される。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、分離された生体試料中のフラビウイルスに対する抗体を検出するのに適したポリペプチドであって、フラビウイルス NS1 ウィングドメイン特異的アミノ酸配列を含み、前記フラビウイルスの NS1 ラダードメイン由来のアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、ポリペプチドに関する。一実施形態において、前記フラビウイルスのさらなるアミノ酸配列は、前記ポリペプチド中に存在しない。一実施形態において、前記フラビウイルスは、Zika ウイルス (ZIKV)、West Nile ウイルス (WNV)、Dengue ウイルス 1~4 型 (DENV 1~4)、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV)、黄熱病ウイルス (YFV) および日本脳炎ウイルス (JEV) からなる群から選択される。本発明はまた、前記フラビウイルス NS1 ウィングドメイン特異的ポリペプチドを産生する方法、フラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法、特に少なくとも第 2 または複数のフラビウイルスに対する抗体の存在下で第 1 のフラビウイルス種を検出する方法、抗体を検出

するための前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン特異的ポリペプチドの使用、並びに、フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む前記フラビウイルス抗体を検出するための試薬キットに関する。

【0012】

開示したアミノ酸配列の説明：

成熟NS1タンパク質は、352個のアミノ酸残基(NS1、1-352)を含む。NS1タンパク質内で、ウイングドメインは151個のアミノ酸残基を含み、NS1アミノ酸領域30-180にわたる。したがって、ウイングドメイン位置(1-151)は、29アミノ酸位置を加えることによりNS1ナンバリングへと簡単に変わる。逆に、NS1アミノ酸位置は、29アミノ酸位置を差し引くことによりウイングドメインナンバリングへと簡単に変わる；aa1(ウイング) = aa30(NS1)、aa2(ウイング) = aa31(NS1)、aa3(ウイング) = aa32(NS1)など。同様に、ラダードメイン位置(1-162)は、NS1位置191-352がラダードメインに相当するので、190アミノ酸位置を加えることによりNS1ナンバリングへと簡単に変わる。

【0013】

配列番号1、179位のX = AまたはSまたはCを有するジカウイルスNS1ウイングドメインaa30-180

DRYKYHPDSP RRLAAAVKQA WEEGICGISS VSRMENIMWK SVEGELNAIL EENGVQLTVV VGSVKNPMMWR GPQ RLPVPVN ELPHGWKAWG KSYFVRAAKT NNSFVVDGDT LKECPLKHRA WNSFLVEDHG FGVFHTSVWL KVREDY SLEX D

配列番号2、C55、C143、C179Aを有するジカウイルスNS1ウイングドメインaa30-180

DRYKYHPDSP RRLAAAVKQA WEEGICGISS VSRMENIMWK SVEGELNAIL EENGVQLTVV VGSVKNPMMWR GPQ RLPVPVN ELPHGWKAWG KSYFVRAAKT NNSFVVDGDT LKECPLKHRA WNSFLVEDHG FGVFHTSVWL KVREDY SLEA D

配列番号3、ジカウイルスNS1の完全長aa1-352；またこの配列は、MR 766株、UniProt ID W8Q7Q3としても公開されている；完全長ジカ前駆体ポリタンパク質内の対応するナンバリングはaa795-1146である

DVGCSVDFSK RETRCGTGVF IYNDVEAWRD RYKYHPDSPR RLAAAVKQAW EEGICGISSV SRMENIMWKS VEDELNAIL EENGVQLTVV GSVKNPMMWRG PQRPLVPVNG LPHGWKAWGK SYFVRAAKTN NSFVVDGDTL KECPLKHRAW NSFLVEDHGF GVFHTSVWLK VREDYSLECD PAVIGTAVKG REAAHSDLGY WIESEKNDTW RLKRAHLIEM KTCEWPKSHT LWTGVEESD LIIPKSLAGP LSHHNTREGY RTQVKGPHWS EELEIRFEEC PGTKVHVEET CGTRGPSLRS TTASGRVIEE WCCRECTMPP LSFRAKDGCW YGMEIRPRKE PESNLVRSMV TA

配列番号4、ジカウイルスNS1 ラダードメインaa191-352

REAAHSDLGY WIESEKNDTW RLKRAHLIEM KTCEWPKSHT LWTGVEESD LIIPKSLAGP LSHHNTREGY RTQVKGPHWS EELEIRFEEC PGTKVHVEET CGTRGPSLRS TTASGRVIEE WCCRECTMPP LSFRAKDGCW YGMEIRPRKE PESNLVRSMV TA

配列番号5、UniProt ID P14336；ヨーロッパ亜型Neudoerfl株によるダニ媒介脳炎(FSME)ウイルスNS1ウイングドメインaa30-180；X = AまたはCまたはS

DNYAYYPETP GALASAIKET FEEGSCGVVP QNRLEMAMWR SSVTELNLAL AEGEANLTVV VDKFDPTDYR GGVPGLLKKG KDIKVSWKSW GHSMIWSIPE APRRFMVGTE GQSECPLERR KTGVTVAEF GVGLRTKVFL DFRQEPTHEX D

配列番号6：ダニ媒介脳炎(FSME)ウイルスNS1完全長aa1-352；またこの配列はヨーロッパ亜型Neudoerfl株、UniProt ID P14336として公開されている；完全長前駆体内の対応するナンバリングはaa777-1128である。

DVGCAVDTER MELRCGEGLV VWREVSEWYD NYAYYPETPG ALASAIKETF EEGSCGVVPQ NRLEMAMWRS SVTELNLALA EGEANLTVV DFKFDPTDYR GVPGLLKKGK DIKVSWKSWG

10

20

30

40

50

HSMIWSIPEA PRRFMVGTG QSECPLEERRK TGVFTVAEFG VGLRTRKVFLLD FRQEPHTECD  
 TGVMGAAVKN GMAIHTDQSL WMRSMKNDTG TYIVELLVTD LRNCNSWPASH TIDNADVVDSD  
 ELFLPASLAG PRSWYNRIPG YSEQVKGPKW YTPIRVIREE CPGTTVTINA KCDKRGASVR  
 STTESGKVIP EWCCRCTMP PVTFRGTDC WYAMEIRPVH DQGGLVRSMV VA

配列番号 7、 Dengue virus 1 type NS1 coding region aa30-180; X = A または C または S

EQYKFQADSP KRLSAAIGKA WEEGVCGRS ATRLENIMWK QISNELNHIL LENDMKFTVV VGDVAGILAQ GKK  
 MIRPQPM EHKYSWKSNG KAKIIGADVQ NTTFIIDGPN TPECPDDQRA WNIWEVEDYG FGIFTTNIWL KLRDSY  
 TQVXD

配列番号 8、 Dengue virus 1 type NS1 complete length aa1-352; またこの配列は UniProt ID W8FUV0 の下で公開されている; 完全長前駆体内の対応するナンバリングは aa776-1127 である。

DSGCVINWKG RELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLSAAIGKAW EEGVCGRSA  
 TRLENIMWKQ ISNELNHILL ENGMKFTVVV GEVNGILAQ KKMIRPQPM EHKYSWKSNGK  
 AKVIGADVQN TTFIIDGPN TPECPDDQRAW NIWEVEDYGF GIFTTNIWLK LRDSYTQVCD  
 HRLMSAAIKD SKAVHADMGY WIESEKNETW KLARASFIEV KTCIWPKSHT LWSNGVLESE  
 MIIPKIYGGP ISQHNYRPGY FTQTAGPWHL GKLELDFELC EGTTVVVDEH CGNRGPSLRT  
 TTVTGKIIHE WCCRSTLPP LRFKGEDGCW YGMEIRPVKE KEENLVKSMV SA

配列番号 9、 Dengue virus 2 type NS1 coding region aa30-180; X = A または C または S

EQYKFQPEP SKLASAIQKA HEEGICGRS VTRLENLMWK QITPELNHIL SENEVCLTIM TGDIKGIMQA GKR  
 SLRPQPT ELKYSWKTWG KAKMLSTESH NQTFLIDGPE TAECPTNRA WNSLEVEDYG FGVFTTNIWL KLKEKQ  
 DVFXD

配列番号 10、 Dengue virus 2 type NS1 complete length aa1-352; またこの配列は UniProt ID P29990 によるタイ/16881/1984 株として公開されており、完全長前駆体内の対応するナンバリングは aa776-1127 である。

DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPEP SKLASAIQKA HEEGICGRSV  
 TRLENLMWKQ ITPELNHILS ENEVCLTIMT GDIKGIMQAG KRSLRPQPT EHKYSWKTWGK  
 AKMLSTESHN QTFLIDGPET AECPTNRAW NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKEKQDVFC  
 SKLMSAAIKD NRAVHADMGY WIESALNDTW KIEKASFIEV KNCHWPKSHT LWSNGVLESE  
 MIIPKNLAGP VSQHNYRPGY HTQITGPWHL GKLEMDDFDC DGTTVVVTEH CGNRGPSLRT  
 TTASGKLITE WCCRSTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV TA

配列番号 11、 Dengue virus 3 type NS1 coding region aa30-180; X = A または C または S

EQYKFQADSP KRLATAIAGA WENGVCGRS TTRMENLLWK QIANELNYIL WENNIKLTVV VGDIIIGILEQ GKR  
 TLTPQPM ELKYSWKTWG KAKIVTAETQ NSSFIIDGPN TPECPNASRA WNWVEVEDYG FGVFTTNIWL KLREMY  
 SQLXD

配列番号 12、 Dengue virus 3 type NS1 complete length aa1-352; またこの配列は UniProt ID W8FRG8 の下で公開されている; 完全長前駆体内の対応するナンバリングは、 aa774-1125 である。

DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW ENGVCGRST  
 TRMENLLWRQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQ KRTLTPQPM EHKYSWKTWGK  
 AKIVTAETQN SSFIIDGPN TPECPNASRAW NWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD  
 HRLMSAAVKD ERAVHADMGY WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD  
 MIIPKSLAGP ISQHNYRPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT  
 TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV SA

配列番号 13、 Dengue virus 4 type NS1 coding region aa30-180; X = A または C または S

EQYKFQPEP ARLASAILNA HKDGVCGRS TTRLENIMWK QITNELNYVL WEGGHDLTVV AGDVKGVLTG GKR  
 ALTPPVN DLKYSWKTWG KAKIFTPEAR NSTFLIDGPD TSECPNERRA WNWFEVEDYG FGMFTTNIWM KFREGS

10

20

30

40

50

## SEVXD

配列番号 14、 Dengue virus 4 type NS1 full length aa1-352; またこの配列は、フィリピン/H241/1956株、UniProt ID Q58HT7としても公開されている; 完全長前駆体内の対応するナンバリングは、aa775-1126である。

DTGCAVSWSG KELKCGSGIF VIDNVHTWTE QYKFQPESPA RLASAILNAH EDGVCGIRST  
TRLENIMWKQ ITNELNYVLW EGGHDLTVVA GDVKGVLVSKG KRALAPPVND LKYSWKTWVGK  
AKIFTPEAKN STFLIDGPDT SECPNERRAW NFLEVEDYGF GMFTTNIWMK FREGSSEVCD  
HRLMSAAIKD QKAVHADMGY WIESSKNQTW QIEKASLIEV KTCLWPKTHT LWSNGVLESQ  
MLIPKAYAGP FSQHNRYRQGY ATQTVGPWHL GKLEIDFGEC PGTTVTIQED CDHRGPSLRT  
TTASGKLVTD WCCRSCMPP LRFGLGEDGCW YGMEIRPLSE KEENMVKSQV SA

10

配列番号 15、 West Nile virus NS1 wing domain aa30-180; X = A または C または S

DRYKFPETP QGLAKIIQKA HAEGVCGLRS VSRLEHQMWE AIKDELNTLL KENGVDLSVV VEKQNGMYKA APK  
RLAATTE KLEMGWKAAG KSIIFAPELA NNTFVIDGPE TEECPTANRA WNSMEVEDFG FGLTSTRMFL RIRETN  
TTEXD

配列番号 16、 West Nile virus NS1 full length aa1-352; またこの配列は UniProt ID P06935 の下で公開されている; 完全長前駆体内の対応するナンバリングは、aa788-1139である。

DTGCAIDIGR QELRCGSGVF IHNDVEAWMD RYKFPETPQ GLAKIIQKAH AEGVCGLRV  
SRLEHQMWEA IKDELNTLLK ENGVDLSVVV EKQNGMYKAA PKRLAATTEK LEMGWKAAGK  
SIIFAPELAN NTFVIDGPET EECPTANRAW NSMEVEDFGF GLTSTRMFLR IRETNTTECD  
SKIIGTAVKN NMAVHSDLSY WIESGLNDTW KLERAVLGEV KSCTWPETHT LWGDGVLESQ  
LIIPITLAGP RSNHNRRPGY KTQNGQPWDE GRVEIDFDYC PGTTVTISDS CEHRGPAART  
TTESGKLITD WCCRSCMPP LRFQTEGNCW YGMEIRPTRH DEKTLVQSRV NA

20

配列番号 17、 Yellow fever virus NS1 wing domain aa30-180; X = A または C または S

NKYSYPEDP VKLASIVKAS FEEGKCGLNS VDSLEHEMWR SRADEINAI F EENEVDISVV  
VQDPKNVYQR GTHPFSRIRD GLQYGWKTWG KNLVFSPPGRK NGSFIIIDGKS RKECPFSNRV  
WNSFQIEEFG TGVFTTRVYM DAVFEYTD X D

配列番号 18、 Yellow fever virus NS1 full length aa1-352; またこの配列は、17D ワクチン株、UniProt ID P03314 として公開されている; 完全長前駆体内の対応するナンバリングは、aa779-1130である。

DQGCANFGK RELKCGDGIF IFRSDDWLN KYSYPEDPV KLASIVKASF EEGKCGLNSV  
DSLEHEMWR RADEINAI F ENEVDISVVV QDPKNVYQRG THPFSRIRDG LQYGWKTWVGK  
NLVFSPPGRKN GSFIIIDGKSR KECPFSNRVW NSFQIEEFGT GVFTRVYMD AVFEYTD CD  
GSILGAAVNG KKSAHGSPF WMGSHEVNGT WMIHTLEALD YKECEWPLTH TIGTSVEESE  
MFMPRSIGGP VSSHNHIPPY KVQTNQPMWQ VPLEVKREAC PGTSVVIDGN CDGRGKSTRS  
TTDSGKVIPE WCCRSCMPP VSFHGS DGCW YPMEIRPRKT HESHLVRSWV TA

30

配列番号 19、 Japanese encephalitis virus NS1 wing domain aa30-180; X = A または C または S

DRYKYPETP RSLAKIVHKA HKEGVCVRS VTRLEHQMWE AVRDELNVLL KENAVDLSVV  
VNKPVGRYRS APKRLSMTQE KFEMGWKAAG KSILFAPELA NSTFVVDGPE TKECPDEHRA  
WNSMQIEDFG FGITSTRVWL KIREESTDEX D

40

配列番号 20、 Japanese encephalitis virus NS1 full length aa1-352; またこの配列は UniProt ID Q9YJ16 で公開されている; 完全長前駆体内の対応するナンバリングは、aa795-1146である。

DTGCAIDITR KEMRCGSGIF VHNDVEAWVD RYKYPETPR SLAKIVHKAH KEGVCVRSV  
TRLEHQMWEA VRDELNVLLK ENAVDLSVVV NKPVGRYRSA PKRLSMTQEK FEMGWKAAGK  
SILFAPELAN STFVVDGPET KECPDEHRAW NSMQIEDFGF GITSTRVWLK IREESTDECD  
GAIIGTAVKG HVAVHSDLSY WIESRYNDTW KLERAVFGEV KSCTWPETHT LWGDGVEESE

50

LIIPHTIAGP KSKHNRREGY KTQNGPWDE NGIVLDFDYC PGTKVTITED CGKRGPSVRT  
TTDSGKLITD WCCRSCSLPP LRFRTENGCW YGMEIRPVRH DEATLVRISQV DA

配列番号 2 1、タンデムの大腸菌 S 1 y D とジカウイルス NS 1 ウィングドメイン a a 3 0 - 1 8 0 の融合タンパク質

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV  
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFIMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD  
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHD DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG  
SGGGSGGGKV AKDLVVSLEY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG  
GGGSGGGSGG GSGGGDRYKY HPDSPRRLAA AVKQAWEEGI CGISSVSRME NIMWKSVEGE  
LNAILEENGV QLTVVVGSVK NPMWRGPQRL PVPVNELPHG WKAWGKSYFV RAAKTNNSFV  
VDGDTLKECP LKHRANSFL VEDHGFVGFH TSVWLKVRD YSLEADLEHH HHHH

10

配列番号 2 2、タンデムの大腸菌 S 1 y D とジカウイルス NS 1 ラダードメイン ( a a 1 9 1 - 3 5 2、M r 7 6 6 株 ) の融合タンパク質

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV  
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFIMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD  
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHD DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG  
SGGGSGGGKV AKDLVVSLEY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE  
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG  
GGGSGGGSGG GSGGGREAAH SDLGYWIESE KNDTWRLKRA HLIEMKTAEW PKSHTLWTDG  
VEESDLIPK SLAGPLSHH TREGYRTQVK GPWHSEELI RFEPCPGTKV YVEETCGTRG  
PSLRSTTASG RVIIEWCCRE CTMPPLSFRA KDGCVYGMEL RPRKEPESNL VRSMVTALEH  
HHHHH

20

配列番号 2 3、大腸菌 S 1 y D とジカウイルス NS 1 ラダードメイン ( a a 1 9 1 - 3 5 2、M r 7 6 6 株 ) の融合タンパク質

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV  
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFIMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD  
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHD DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG  
SGGGSGGGRE AAHSDLGYWI ESEKNDTWRL KRAHLIEMKT AEWPKSHTLW TDGVEESDLI  
IPKSLAGPLS HHNTREGYRT QVKGPHWSEE LEIRFEPCPG TKVYVEETCG TRGPSLRSTT  
ASGRVIEEWC CRECTMPPLS FRAKDGCVYGMEL RPRKEPE SNLVRSMVTA LEHHHHHH

30

配列番号 2 4、 Dengue ウイルス 1 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2

SKAVHADMGY WIESEKNETW KLARASFIEV KTAIWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKIYGGP ISQHNYRPGY FTQ  
TAGPWHL GKLELDFDLC EGTTVVVDEH CGNRGPSLRT TSVTGKIIHE WCCRSCSLPP LRFRTENGCW YGMEIR  
PVKE KEENLVKSMV SA

配列番号 2 5、 Dengue ウイルス 2 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2

NRAVHADMGY WIESALNDTW KIEKASFIEV KNAHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNLAGP VSQHNYRPGY HTQ  
IAGPWHL GKLEMDFDLC DGTTVVVTEDEH CGNRGPSLRT TTASGKLITE WCCRSCSLPP LRYRGEDEGCW YGMEIR  
PLKE KEENLVNSLV TA

40

配列番号 2 6、 Dengue ウイルス 3 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2

ERAVHADMGY WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTATWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP ISQHNYRPGY HTQ  
TAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT TTVSGKLIHE WCCRSCSLPP LRYMGEDGCW YGMEIR  
PINE KEENMVKSLV SA

配列番号 2 7、 Dengue ウイルス 4 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2

QKAVHADMGY WIESSKNQTW QIEKASLIEV KTALWPKTHT LWSNGVLESQ MLIPRSYAGP FSQHNYRQGY ATQ  
TAGPWHL GKLEIDFGEC PGTTVTIQED CDHRGPSLRT TTASGKLVQ WCCRSCSLPP LRFRTENGCW YGMEIR  
PLSE KEENMVKSQV TA

配列番号 2 8 ~ 3 5 の配列は電子配列表に示す。アミノ酸 X は、この位置にアラニン、

50

システインまたはセリンを入れることができることを示す ( X = A または C または S )。

【 0 0 1 4 】

配列番号 2 8、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 1 型 NS 1 ウィングドメイン a a 3 0 - 1 8 0 の融合タンパク質

配列番号 2 9、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 2 型 NS 1 ウィングドメイン a a 3 0 - 1 8 0 の融合タンパク質

配列番号 3 0、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 3 型 NS 1 ウィングドメイン a a 3 0 - 1 8 0 の融合タンパク質

配列番号 3 1、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 4 型 NS 1 ウィングドメイン a a 3 0 - 1 8 0 の融合タンパク質

配列番号 3 2、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 1 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2 の融合タンパク質

配列番号 3 3、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 2 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2 の融合タンパク質

配列番号 3 4、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 3 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2 の融合タンパク質

配列番号 3 5、タンデムの大腸菌 S l y D と Dengue ウイルス 4 型 NS 1 ラダードメイン a a 1 9 1 - 3 5 2 の融合タンパク質

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 5 】

フラビウイルス抗体、例えば、ジカウイルス、Dengue ウイルスおよび西ナイルウイルスに対する抗体を検出するための市販のイムノアッセイ ( I g G および I g M の両イムノアッセイ ) は、E L I S A 原理に基づいている。しかし、既知のイムノアッセイは、明らかに、一方では免疫反応性が高く、他方では、ジカ、Dengue および他のフラビウイルス、例えば西ナイルウイルス、黄熱ウイルスまたは他のフラビウイルスの NS 1 相同体に対して生成される抗体と高い免疫学的交差反応性を示す完全長 NS 1 抗原を使用する。さらに、その複雑な四次構造のため、二重抗原サンドイッチフォーマットで特異的 I g G を検出するイムノアッセイを設計する際に必要条件となる可溶性で安定なモノマー形態の NS 1 を提供することができない。これらの必要条件を満たし、自動化に適した高度に特異的なイムノアッセイを可能にする専用フラビウイルス NS 1 抗原は、先行技術では開示されていない。驚いたことに、フラビウイルス NS 1 抗原をそのウィングドメインに限定し、NS 1 抗原のいわゆる ラダードメイン配列を除去することにより、特定種のフラビウイルスに対する抗体を特異的に検出することができる可溶性で安定な NS 1 抗原変異体が得られる。

【 0 0 1 6 】

抗ジカウイルス抗体に陽性である試料を、ジカの NS 1 抗原の 2 つの異なる断片を用いて試験した場合、すなわち、いわゆる「ウィング」ドメイン抗原と、いわゆる「ラダー」ドメイン抗原を用いて試験した場合、両抗原が抗ジカ抗体を検出し得ることが明らかとなった。しかし、本発明者らは、ウィングドメイン抗原は Dengue 熱抗体陽性試料と交差反応しないが、ジカ NS 1 ラダードメイン抗原は Dengue 熱抗体陽性試料と交差反応し、偽陽性結果と誤った結論をもたらすことを見出した。抗ジカ陽性血清と関連アルボウイルスの NS 1 抗原を用いたさらなるブロッキング実験によって、ジカ NS 1 ウィングドメイン抗原シグナルはこれらの関連アルボウイルス NS 1 抗原によってほとんど消光されないが、ジカ NS 1 ラダードメインシグナルは有意に消光されることが決定的に示された。本発明者らは、ラダー抗原は、競合する関連アルボウイルス NS 1 抗原によって免疫グロブリンへの結合を顕著にブロックされると推論する。したがって、本発明者らは、ジカ NS 1 ウィングドメイン抗原が他のアルボウイルス NS 1 相同体との免疫学的交差反応性に影響を受けにくいことを明白にすることができた。結果として、ジカウイルス感染を Dengue ウイルス感染と識別する実施形態において、ジカ NS 1 ウィングドメインは、他の ( 最近または過去の ) アルボウイルス感染の存在下で、ジカウイルス感染を診断することがで

きる優れた特異性を有する抗ジカ抗体のイムノアッセイを可能にする。

【0017】

同様に、デングウイルス抗体検出について、本発明者らは、高収率で大腸菌において過剰発現され、精製および機能的可溶化後に免疫反応型にリフォールディングする、4つのデングウイルス血清型のすべてからNS1ウイングドメイン抗原を同定することができた。本発明者らは、DENV1~4の個々のデング熱ウイングドメインが、事前に特徴付けられたDENV陽性血清の市販のセットと非常に異なって反応するという証拠を見出した。結果から、4つの個別のデングウイルス血清型の免疫学的識別が、イムノアッセイにおいて抗原としてデング熱NS1ウイングドメインを使用することで実現することができることが示唆される。総括すると、NS1のラダードメインを欠損するデング熱NS1ウイングドメインは、特異的デング熱抗体検出に適した抗原である。

10

【0018】

西ナイルウイルスについての並行するアプローチにおいても、本発明者らは、西ナイルウイルスに対する抗体の特異的検出を可能にするNS1ウイングドメイン抗原を(大腸菌において)過剰産生し、精製し機能的にリフォールディングすることができた。

【0019】

本発明者らの実験結果に基づいて、NS1ラダードメインのアミノ酸配列を含有しないフラビウイルスNS1ウイングドメインは、使用されるNS1ウイングドメインアミノ酸配列に対応するフラビウイルスに対する抗体の特異的に検出するための優れた抗原として機能し、それにより他のフラビウイルスとを識別すると本発明者らは結論付けた。特に、この結論は、ジカ、デング熱および西ナイルウイルス抗体の特異的検出に適用可能である。

20

【0020】

したがって、本発明は、分離された生体試料中のフラビウイルスに対する抗体を検出するのに適したポリペプチドであって、フラビウイルスNS1ウイングドメイン特異的アミノ酸配列を含み、前記フラビウイルスのNS1ラダードメイン由来のアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、ポリペプチドに関する。一実施形態において、前記フラビウイルスのさらなるアミノ酸配列は、前記ポリペプチド中に存在しない。別の実施形態において、フラビウイルスは、ジカウイルス(ZIKV)、西ナイルウイルス(WNV)、デングウイルス1~4型(DENV1~4)、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)、黄熱病ウイルス(YFV)、日本脳炎ウイルス(JEV)からなる群から選択され、一実施形態において、フラビウイルスはデングウイルス1~4型である。

30

【0021】

一実施形態において、NS1ウイングドメイン特異的アミノ酸配列は、配列番号1、2、5、7、9、11、13、15、17および19からなる群から選択され、一実施形態においては、配列番号7、9、11、13および15からなる群から選択され、一実施形態においては、配列番号7、9、11、および13(デングウイルス1~4型のNS1ドメイン)からなる群から選択されるポリペプチドから本質的になる。

【0022】

用語「NS1」、「NS1抗原」、「NS1ポリペプチド」は同義的に使用され、ウイルス前駆体ポリタンパク質内の非構造的抗原no.1(NS1)を意味し、(別に明示されない限り)完全長抗原NS1に関する。このタンパク質の構造は、西ナイルウイルスおよびデングウイルス2について、Akeyら、前掲で開示されている。ジカNS1については、C末端ドメイン(アミノ酸残基172-352)の構造がSongら(前掲)によって開示されており、完全なNS1の三次元構造は、Brownら(前掲)によってさらに詳細に開示されている。ジカNS1配列は、352個のアミノ酸を含み、配列番号3に示されており、ダニ媒介性脳炎ウイルスNS1は配列番号5に示され、デングウイルス1型NS1は配列番号8に示され、デングウイルス2型NS1は配列番号10に示され、デングウイルス3型NS1は配列番号12に示され、デングウイルス4型NS1は配列番号14に示され、西ナイルウイルスNS1は配列番号16に示され、黄熱ウイルスNS1は

40

50

配列番号18に示され、日本熱ウイルスNS1は配列番号20に示されている。用語「NS1ウイング」または「NS1ウイングドメイン」、「NS1ウイングの変異体」または「NS1ウイング領域」とはNS1ポリペプチド内のドメインを意味し、したがって、NS1の部分配列である。ジカNS1ウイングドメインについては、これは配列番号1および2に例示され、さらなるフラビウウイルスのNS1ウイングドメインについては、配列番号5(TBEV)、配列番号7(DENV1)、配列番号9(DENV2)、配列番号11(DENV3)、配列番号13(DENV4)、配列番号15(WNV)、配列番号17(YEV)および配列番号19(JEV)に例示されている。また、用語「ポリペプチド(単数)」、「ポリペプチド(複数)」、「抗原(単数)」および「抗原(複数)」は、さらに明示のない限り、同義語として理解される。

10

#### 【0023】

同義語「ラダー」、「ラダードメイン」または「ラダーチップ抗原」または「ラダーチップ」、「ラダーチップドメイン」、「ラダーチップポリペプチド」、「ラダーチップ抗原」は、ウイングドメインに隣接するC末端に配置されているNS1ドメインを意味する。このドメインは、西ナイルウイルスおよびデングウイルス2について、Akeyら、前掲で開示されている。ジカウイルスについては、このNS1ドメインは、Songら、前掲、およびBrownら、前掲によって開示されている。ジカNS1ラダードメインについては、アミノ酸配列が配列番号4に例示されており、デングウイルス1~4型については、配列番号24~27に例示されている。他のフラビウウイルスのラダードメインは、各ウイルスに対応する完全長NS1配列のC末端部分(aa191-352)で確認することができる。

20

#### 【0024】

これらの定義は、本明細書内のすべてのアルボウイルスに適用することができる。フラビウウイルスファミリーに属する以下のアルボウイルスは、以下のように短縮され得る：西ナイルウイルス(西ナイル、WNV)、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEVまたはFSME)、デングウイルス1~4(デング熱、デング熱の4つのウイルス株：DENV1~4)、黄熱ウイルス(YFV)、日本脳炎ウイルス(JEV)。

#### 【0025】

本発明によれば、フラビウウイルスNS1ウイングドメイン特異的アミノ酸配列は、前記フラビウウイルスのNS1ラダードメイン由来のアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しないアミノ酸配列である。一実施形態において、前記フラビウウイルスのさらなるアミノ酸配列は、前記ポリペプチド中に存在しない。例えば、ジカNS1ウイングドメインポリペプチドはウイングドメイン配列のみを含み、一実施形態は配列番号1または2を含む。一実施形態においてはさらなるジカウイルスは存在せず、ジカウイルスNS1特異的アミノ酸配列はこの配列中には存在せず、一実施形態において、配列番号4は前記ポリペプチド配列中に存在しない。さらなる例において、DENV1NS1ウイングドメインは配列番号7を含むが、配列番号24(ラダー)は含まない。他の例は、配列番号25が存在しないDENV2NS1ウイング(配列番号9)であり；配列番号26が存在しないDENV3NS1ウイング(配列番号11)であり；配列番号27が存在しないDENV4NS1ウイング(配列番号13)であり；WNVラダードメインが存在しないWNVNS1ウイング(配列番号15)である。NS1ラダードメイン特異的配列の非存在、および一実施形態におけるさらなるフラビウウイルスNS1特異的配列またはさらなるフラビウウイルス特異的配列の非存在は、他のアルボウイルスに対して生成される抗体との交差反応性を低減または完全に回避する目的をサポートする。

30

40

#### 【0026】

しかし、フラビウウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドの変異体も同様に含まれる。これらの変異体は、開示されたアミノ酸配列の保存的置換または相同的置換(例えば、アラニンもしくはセリンによるシステインの置換、またはバリンによるイソロイシンの置換、またはその逆など)によって、当業者により容易に作製され得る。またこの文脈における用語「変異体」とは、前記タンパク質に実質的に同等のタンパク質またはタンバ

50

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。例えば、1～10個のアミノ酸、一実施形態においては1～5個のアミノ酸による、一末端または両末端でのC末端またはN末端トランケーションなどの修飾は、特許請求の範囲のフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原の範囲内である。特に、変異体は、最も一般的なタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列と比較してアミノ酸の交換、欠失、または挿入を示すアイソフォームであってもよい。一実施形態において、そのような実質的に同等のタンパク質は、タンパク質の最も一般的なアイソフォームに対して少なくとも80%、別の実施形態においては少なくとも85%または少なくとも90%、さらに別の実施形態においては少なくとも95%の配列相同性を有する。また用語「変異体」は、翻訳後修飾タンパク質、例えばグリコシル化タンパク質またはリン酸化タンパク質に関する。本発明によれば、変異体は、インビトロ診断イムノアッセイにおいて免疫反応性が変化しないか、または大部分が維持される限り、フラビウイルスNS1ウイングドメイン変異体として分類され、すなわち、変異体は、分離された試料中に存在する抗フラビウイルス抗体を依然として結合し検出することができるが、他のアルボウイルスに対して生成される抗体は検出されないか、検出の程度ははるかに低い。さらに、前記フラビウイルスポリペプチドの全体的三次元構造は不変のままであり、その結果、以前に（すなわち野生型で）存在し、抗体への結合にアクセス可能であったエピトープは依然として存在し、変異体にアクセス可能である。

10

20

30

40

50

**【0027】**

また「変異体」は、例えば、タンパク質または抗原への標識または担体部分の共有結合または非共有結合によって修飾されたタンパク質または抗原でもある。可能な標識は、放射性、蛍光性、化学発光性、電気化学発光性、酵素など、例えば、ジゴキシン、ジゴキシゲニンまたはビオチンなどである。これらの標識は、当業者には公知である。

**【0028】**

配列番号の形態で明示された、提供したポリペプチド配列情報が「（すなわち、前記配列）から本質的になる」という用語で記載されている場合、これは、配列が文字通り列挙されているように存在するが、抗体への免疫学的結合に関してこのポリペプチドの基本的特性に実質的に影響を及ぼさない変異体として存在することができることを意味する。この一例は、このペプチドのN末端および/またはC末端のごくわずかなアミノ酸の欠失または付加、ならびに同等のアミノ酸の交換、例えば、セリンに対するアラニン、バリンに対するイソロイシン、およびその逆であり得る。

**【0029】**

本発明のフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原は、可溶性、安定性、および免疫反応性であり、すなわち、それらは免疫学的アッセイで使用するための抗原として好適である。これは、本発明による抗原が、生理的緩衝液条件下で、例えば、界面活性剤を添加しない周囲温度のリン酸緩衝液系で可溶性であることを意味する。また抗原は、フラビウイルスNS1ウイングドメインに特異的な抗体、例えば、分離された試料、例えばヒト血清中に存在する抗ジカ抗体または抗デング熱抗体に結合または認識され、結合され得る。

**【0030】**

一実施形態において、非フラビウイルス特異的リンカーまたはペプチド融合アミノ酸配列のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドへの付加は、これらの配列が抗フラビウイルス抗体に特異的ではなく、インビトロ診断イムノアッセイを妨げないので可能である。

**【0031】**

一実施形態において、フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原は、シャペロンに融合していてもよい。用語「融合タンパク質」、「融合ポリペプチド」または「融合抗原」とは、フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドと、融合パートナーの役割を果たすシャペロン由来の少なくとも1つのタンパク質部分を含むタンパク質を意味する。

**【0032】**

シャペロンは、他のタンパク質のフォールディングおよび構造的完全性の維持をアシストする周知のフォールディングヘルパータンパク質である。フォールディングヘルパーの

例は、W O 0 3 / 0 0 0 8 7 7 に詳細に開示されている。本発明によれば、ペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロン、例えば F K B P ファミリーのシャペロンは、フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン抗原変異体への融合に使用することができる。融合パートナーとして適切な F K B P シャペロンの例は、F k p A、S l y D および S l p A である。フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン抗原の融合パートナーとして適切なさらなるシャペロンは S k p であって、F K B P ファミリーに属さない、大腸菌 ( E . c o l i ) のペリプラズム由来の三量体シャペロンである。シャペロンの完全配列を使用することは必ずしも必要ではない。必要とされる能力および機能を依然として保持するシャペロンの機能的断片 (いわゆる結合能力のあるモジュールまたはポリペプチド結合モチーフ) も使用することができる ( W O 9 8 / 1 3 4 9 6 を参照 ) 。

10

**【 0 0 3 3 】**

本発明のさらなる実施形態において、F K B P シャペロンの少なくとも1つまたは少なくとも2つのモジュール、例えば、大腸菌 S l y D、S l p A または F k p A は、フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン抗原を発現するための融合部分として使用される。シャペロン S k p は、同様に融合体パートナーとして使用され得る。2つの F K B P - シャペロンドメインの融合は、得られる融合ポリペプチドの溶解性に改善をもたらす。融合部分は、フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン抗原の N 末端もしくは C 末端、または両末端 (サンドイッチ様) に位置していてもよい。

**【 0 0 3 4 】**

一実施形態において、フラビウイルス NS 1 ウィングドメイン抗原は、オリゴマーシャペロンに融合している。オリゴマーシャペロンは、二量体、三量体、さらにはそれ以上の多量体を自然に形成するシャペロンであり、その結果、複数の単量体サブユニットが特定の非共有相互作用により十分に定義された機能的四次構造に構築される。それによって、共有結合で融合した抗原が同様に高エピトープ密度にされる。好ましいオリゴマーシャペロンは、F k p A および S k p である。多量体化抗原は、特に I g M 抗体の検出において有用であり、したがって感染直後の初期免疫応答の検出に有用である。

20

**【 0 0 3 5 】**

一実施形態において、フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドは、細菌 S l y D、S l p A、F k p A または S k p の、一実施形態においては、大腸菌 S l y D、S i p A、F k p A または S k p の1つ、2つまたはそれ以上のシャペロン分子に融合している。さらなる実施形態において、フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドは、配列番号 2 1 (ジカ)、2 8 ( D E N V 1 )、2 9 ( D E N V 2 )、3 0 ( D E N V 3 ) または 3 1 ( D E N V 4 ) からなる。

30

**【 0 0 3 6 】**

本発明の別の実施形態は、別のフラビウイルス由来の構造的に関連する抗原に対して生成される抗体と免疫学的に交差反応しないフラビウイルス NS 1 ウィングドメイン抗原である。一例において、ジカ NS 1 ウィングドメイン抗原は、配列番号 5 もしくは 6 のいずれかを含むダニ媒介脳炎ウイルス、および / または配列番号 7 ~ 1 4 のいずれかを含むデングウイルス 1 ~ 4、および / または配列番号 1 5 もしくは 1 6 のいずれかを含む西ナイルウイルス、および / または配列番号 1 7 もしくは 1 8 のいずれかを含む黄熱ウイルス、および / または配列番号 1 9 ~ 2 0 のいずれかを含む日本脳炎ウイルス由来の構造的に関連する抗原に対して生成される抗体と免疫学的に交差反応しないが、配列番号 3 に記載の完全長ジカウイルス NS 1 抗原に対して生成される抗体と免疫学的に反応する。さらなる実施形態において、前記ジカ NS 1 抗原は、ジカ特異的配列が配列番号 1 または 2 から本質的になるジカ NS 1 ウィングドメイン抗原であり、一実施形態において、配列番号 1 または 2 からなる。ジカ NS 1 によれば、別のフラビウイルス NS 1 抗原、例えば、デング熱 1 ~ 4 型の NS 1 は、別のフラビウイルスの構造的に関連する抗原に対して生成される抗体と免疫学的に交差反応せず、すなわち、デング熱の例においては、Z i k a、T B E V、W N V、Y E V および J E V の NS 1 ウィングドメインと免疫学的に交差反応しない。

40

50

## 【0037】

用語「免疫学的に交差反応しない」とは、望ましくない免疫学的反応性が大幅に低減されたか、または完全に消失したことを意味する。用語「免疫学的な交差反応性」とは、抗原の配列または構造の類似性に起因する免疫グロブリンと免疫原との望ましくない結合を説明するために造語され、免疫原に対して抗体が元来マウントされた。一実施形態において、ジカウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドは、完全長のジカウイルスNS1ポリペプチドと比較して、上記の相同のまたは関連のアルボウイルスNS1抗原に対して生成される抗体に対する、または抗体のサブセットに対する免疫学的な反応性が完全に消失または著しく低減されたことを示す。さらに別の実施形態において、ジカウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドは、デングウイルスに対して生成される抗体に対して、または抗体のサブセットに対して、一実施形態においてはデングウイルス1、2、3、4型に対して生成される抗体に対して大幅に低減された免疫学的交差反応性を示す。さらなる実施形態において、ジカウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドの免疫学的な交差反応性の大幅な低減はまた、黄熱ウイルスに対して生成される抗体または抗体のサブセットにも適用される。さらに別の実施形態において、デングウイルス1～4型ウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドは、ジカウイルスに対して生成される抗体に対して、または抗体のサブセットに対して大幅に低減された免疫学的な交差反応性を示す。

10

## 【0038】

また表現「免疫学的に交差反応しない」とは、抗体を検出するための二重抗原サンドイッチフォーマットでのイムノアッセイにおいて、試料抗体（すなわち、分析物抗体）が2つの特異的抗原によって結合されている状況を意味し、1つは固相に結合され、他方は標識を保持しており、試料抗体は両抗原の間に挟まれる。分析物抗体の存在下において、標識した抗原は、-生じる三成分免疫複合体内で-固相に加えられ、シグナルを生成する。この場合、フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチド、例えばジカNS1ウイングは標識されており、測定したシグナルは100%に設定される。並行実験または後続の実験において、同じアッセイは同じ（陽性）試料の別のアリコートで実施され、さらに、標識抗原と競合することが疑われるアミノ酸配列を有する非標識抗原が混合物に添加される。この場合、TBEV、DENV1-4、WNV、YFVまたはJEVのいずれかの完全長NS1ポリペプチドが加えられる。別の実施形態において、TBEV、DENV1-4、WNV、YFVまたはJEVのいずれかのNS1ウイングドメインのみからなる、またはそれのみを含むNS1ポリペプチドが加えられる。測定後に得られたシグナルが少なくとも約70%のシグナル回復で、一実施形態においては少なくとも80%のシグナル回復で、一実施形態においては少なくとも85%のシグナル回復で、一実施形態においては少なくとも90%のシグナル回復で維持される場合、フラビウイルス（この例においてはジカ）NS1ポリペプチドは、シグナルの消光を起こしにくい。それは加えた抗原に負かされないので、交差反応性物質に潜在的に抵抗する。例として、そのようなブロッキング実験は、実施例2（表2）で説明されている。

20

30

## 【0039】

一実施形態において、配列番号5もしくは6のいずれかを含むダニ媒介脳炎ウイルス、および/または配列番号7～14のいずれかを含むデングウイルス1～4、および/または配列番号15もしくは16のいずれかを含む西ナイルウイルス、および/または配列番号17もしくは18のいずれかを含む黄熱ウイルス、および/または配列番号19～20のいずれかを含む日本脳炎ウイルス由来のNS1完全長またはNS1ウイングドメインペプチドが上記のブロッキング実験で加えられる。

40

## 【0040】

別の実施形態において、ジカNS1ウイングドメインポリペプチドは、配列番号3に示した完全長NS1抗原に対して生成される抗体または抗体のサブセットと免疫学的に反応する。これは、上記アッセイのセットアップにおいて、ジカNS1ウイングドメインポリペプチドのシグナルが完全長ジカNS1ポリペプチドの添加時に完全に消光されるはずであることを意味する（100%）。

50

## 【0041】

ジカ関連ウイルスに対する免疫学的な交差反応性を決定する方法は実施例2にさらに記載されており、他のフラビウイルスとのブロッキング実験と同様の方法で導入することができる。

## 【0042】

フラビウイルスNS1ポリペプチド(ウイングドメインおよびラダードメインの両方)ならびに実施例2のブロッキング実験で適用されるポリペプチドは、当分野で既知の組換えDNA技術およびタンパク質精製技術によって作製および調製することができる。したがって、本発明の別の態様は、フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原、一実施形態においては配列番号1、2、21、5、7、9、11、13、15、17、19、28、29、30および31に記載の抗原、ならびにさらに上記で定義したその変異体をコードする組換えDNA分子である。

10

## 【0043】

用語「組換えDNA分子」とは、遺伝子工学技術または化学合成によるポリヌクレオチドの単離された断片の人為的操作によって達成されるDNA配列の2つの別の断片の組合せによって作製される分子を意味する。そのような際に、所望する機能のポリヌクレオチド断片を相互に連結して、所望する機能の組合せを生成することができる。原核生物または下等もしくは高等真核生物の宿主細胞におけるタンパク質発現に関する組換えDNA技術は、当技術分野では周知である。それらは、例えば、Sambrookら(1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual)によって開示されている。

20

## 【0044】

また本発明による組換えDNA分子は、フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原と融合部分との間、およびいくつかの融合部分の間に5~100個のアミノ酸残基のリンカーペプチドをコードする配列を含むこともできる。そのようなリンカー配列は、例えば、タンパク質分解切断部位を有し得る。

## 【0045】

本発明のさらなる態様は、本発明による作動可能に連結された組換えDNA分子、すなわちフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原、および任意選択でペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロン、例えばFKBPシャペロンをコードする組換えDNA分子を含む発現ベクターであり、ここで、FKBPシャペロンはFkpA、SlyDおよびSlpAから選択される。代替の実施形態において、組換えDNA分子は、フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原およびSkpを含む融合タンパク質をコードする。本発明による組換えDNAを含む発現ベクターは、無細胞翻訳系においてフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原を発現させるために使用することができ、または当技術分野において周知の方法に従ってフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原を発現するための宿主細胞の形質転換に使用することができる。したがって、本発明の別の態様は、本発明による発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。本発明の一実施形態において、組換えフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原は、大腸菌細胞において産生される。

30

## 【0046】

さらなる態様は、可溶性、安定性および免疫反応性のフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原を産生する方法である。前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原は、フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原およびシャペロンを含む融合タンパク質として産生することができる。好ましくは、SkpなどのシャペロンまたはFKBPシャペロンなどのペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロンが使用される。本発明のさらなる実施形態において、前記FKBPシャペロンは、SlyD、FkpAおよびSlpAからなる群から選択される。

40

## 【0047】

この方法は、

a) フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原をコードする遺伝子を含む上記発現ベク

50

ターで形質転換された宿主細胞を培養するステップと、  
b) 前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原をコードする遺伝子を発現させるステップと、  
c) 前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原を精製するステップとを含む。

**【0048】**

任意選択で、追加のステップd)として、フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原が当技術分野で周知のリフォールディング技術によって可溶性および免疫反応性の構造になるように機能的可溶化を実施する必要がある。

**【0049】**

さらに別の実施形態は、無細胞インビトロ翻訳系において可溶性、安定性および免疫反応性のフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原を産生する方法である。

本発明のさらなる態様は、分離されたヒト試料中の抗フラビウイルス抗体を検出する方法であって、本発明によるフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原が抗体の結合パートナーとして使用される、方法に関する。したがって、本発明は、分離された試料中のフラビウイルス、特に第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法であって、a) 本発明によるフラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原と体液試料を混合することにより免疫反応混合物を形成するステップと、b) 前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原に対する体液試料中に存在する抗体を、前記フラビウイルスNS1ウイングドメイン抗原と免疫反応させて免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持するステップと、c) 前記免疫反応生成物のいずれかの存在および/または濃度を検出するステップとを含む、方法を包含する。

**【0050】**

本明細書全体にわたる用語「第1のフラビウイルス」または「第1のフラビウイルス種」とは、ある種のフラビウイルスに特異的な抗体が少なくとも第2のまたは複数のフラビウイルス種に対する抗体の存在下で検出されることを意味する。多くの場合、患者試料には1種類のフラビウイルス抗体が含まれているだけでなく、過去に生成された可能性のある感染症由来の抗体も含まれている。例として、第1のフラビウイルス種がデングウイルスである場合、第2の種、例えばジカウイルスもしくは西ナイルウイルス、または両方(複数)のウイルスはイムノアッセイによって検出されない。

**【0051】**

一実施形態において、前記方法は、デングウイルス1~4型NS1ウイングドメイン抗原を、個々にまたは4つの全抗原型を試料抗体の結合パートナーとして適用する、抗デング熱抗体の検出に関する。一実施形態において、デング熱NS1ウイングドメイン抗原は、配列番号7、9、11、13、28、29、30および31からなる群から選択されるポリペプチドである。

**【0052】**

さらなる態様において、前記方法は、同じイムノアッセイでIgGおよびIgMサブクラスの、または両方のクラスのフラビウイルス抗体を検出するのに適している。一実施形態において、前記フラビウイルス抗体は、抗デングウイルス1~4型抗体である。

**【0053】**

抗体を検出するためのイムノアッセイは当技術分野において周知であり、そのようなアッセイを実施する方法および実際の適用および手順も同様である。本発明によるフラビウイルスNS1抗原は、使用される標識とは無関係に、また検出の様式とは無関係に、抗フラビウイルス抗体を検出するためのアッセイ(例えば、放射性同位体アッセイ、酵素免疫アッセイ、電気化学発光アッセイなど)、またはアッセイ原理(例えば、テストストリップアッセイ、サンドイッチアッセイ、間接試験コンセプトもしくは均質アッセイなど)を改善するために使用することができる。

**【0054】**

本発明の一実施形態において、イムノアッセイは、固相として微粒子を適用する粒子系

10

20

30

40

50



ピウイルス抗体は抗 Dengue 熱抗体であり、2つの異なるフラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原は同じ Dengue ウイルス型由来である。

【0060】

本発明による方法に適した生体親和性結合対の1つのタイプは、ハプテンおよび抗ハプテン抗体結合対である。ハプテンは、100~2000ダルトン、好ましくは150~1000ダルトンの分子量を有する有機分子である。そのような小分子は、それを担体分子に結合することにより免疫原性にすることが可能であり、抗ハプテン抗体は標準的な手順に従って生成することができる。ハプテンは、ステロール、胆汁酸、性ホルモン、コルチコイド、カルデノリド、カルデノリド-グリコシド、プファジエノリド、ステロイドサボゲニンおよびステロイドアルカロイド、カルデノリドおよびカルデノリド-グリコシドを含む群から選択され得る。これらの物質クラスの代表的なものは、ジゴキシゲニン、ジギトキシゲニン、ジトキシゲニン、ストロファンチジン、ジゴキシシン、ジギトキシシン、ジトキシシン、およびストロファンチンである。別の適切なハプテンは、例えばフルオレセインである。一実施形態において、生体親和性結合対は、ビオチンおよびアビジン/ストレプトアビジンまたはジゴキシシンおよび抗ジゴキシシンを含む。

10

【0061】

さらに別の実施形態において、第1の抗原はビオチンに結合され、相補的固相はアビジンまたはストレプトアビジンのいずれかで被覆される。第2の抗原には、この抗原分子に、単独でまたは他の分子との複合体で、特異的な検出能を付与する標識を有する。したがって、免疫反応混合物は、第1の抗原、試料抗体、および第2の抗原を含んで形成される。2つの抗原分子の間に挟まれた分析物抗体からなるこの三元複合体は、免疫複合体または免疫反応生成物と称する。第1の抗原が結合され得る固相は、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で添加される。この免疫反応混合物は、体液試料中の前記フラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原に対する抗フラビウイルス抗体が前記フラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原と免疫反応し、免疫反応生成物を形成するのに十分な期間維持される。次のステップは、液相が固相から単離される単離ステップである。最後に、前記免疫反応生成物のいずれかの存在は、固相もしくは液相またはその両方で検出される。

20

【0062】

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」の基本構造は本質的に同じである。また、二重抗原架橋アッセイにおいて、免疫学的に交差反応する、同じフラビウイルスに由来する類似しているが異なるフラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原を使用することも可能である。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が両方の抗原上に存在することである。本発明によれば、各フラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原に同一のまたは異なる融合体を使用することができ（例えば、固相側で Dengue ウイルス 1 型 NS1 ウィングドメイン抗原に融合した SlyD、および例えば検出側で Dengue ウイルス 1 型 NS1 ウィングドメイン抗原に融合した FkpA）、そのような変異体は非特異的結合の問題を顕著に軽減し、したがって偽陽性の結果のリスクを緩和する。

30

【0063】

さらなる実施形態は、Mクラスの抗フラビウイルス抗体（すなわち、イムノグロブリン）を検出する方法である（IgM検出）。この方法の実施形態において、試料中に存在する多価 IgM抗体がフラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原に特異的に結合するように、さらに上記で開示したフラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドが適用される。一実施形態において、フラビウイルス NS1 ウィングドメイン抗原は、抗原を化学的に架橋することにより、またはオリゴマー化分子、例えばオリゴマーシャペロンに、一実施形態においては、FkpAまたはSkpに抗原を融合することにより、多量体形態で提供される。別の実施形態において、フラビウイルス ウィングドメイン抗原は、個々の抗原を相互に隣接して直列に接続することにより、複合形態で存在する。またこれらの個々の抗原部分は、フラビウイルス特異的ではないリンカー分子によって単離され得

40

50

る。さらなる実施形態において、直列に連結された複数のフラビウイルス抗原は、例えば、オリゴマーシャペロンなどのオリゴマー化分子、例えばF k p AまたはS k pによってさらに多量体化することができる。さらに別の実施形態において、フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドは、各ポリペプチドが少なくとも二重の形態で存在する多量体形態で使用され、一実施形態において、それは3~10重で存在する。

#### 【0064】

フラビウイルス抗体のIgM検出方法のさらなる別の実施形態において、試料中に存在するIgMクラス抗体は、通常、IgM分子の特異性とは無関係にヒトIgM分子のFc部分に特異的に結合する結合パートナーまたは抗体もしくは抗体断片である、いわゆるμ捕獲成分によって固相に結合される。前記μ捕獲成分は、アビジンまたはストレプトアビジンとの生体親和性対の一部であるエフェクター群（例えばビオチン）を保有する。一実施形態において、他の生体親和性対、例えば、上記のジゴキシンおよび抗ジゴキシンまたはハプテンおよび抗ハプテンも使用することができる。一実施形態において、アビジンまたはストレプトアビジンで被覆された固相は、次いでμ捕獲成分を引き付けて結合する。フラビウイルス特異的抗体を特異的に検出するために、記載したようなフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを標識した形態で使用し、IgMクラスの抗フラビウイルス抗体を検出する。

10

#### 【0065】

別の実施形態は、抗フラビウイルス抗体を検出するための、インビトロ診断試験における、一実施形態においては上記で定義したイムノアッセイ法における、上記で詳述したフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドの使用である。

20

#### 【0066】

さらなる実施形態として、フラビウイルス抗体を検出するためのイムノアッセイ法の最大の合計時間は、1時間未満、すなわち60分未満であり、一実施形態においては30分未満、さらなる実施形態においては20分未満、一実施形態においては15~30分の間、一実施形態においては15~20分の間である。その時間には、アッセイの実施に必要な試料および試薬のピペティング、ならびにインキュベーション時間、任意選択の洗浄ステップ、検出ステップ、および結果の最終出力が含まれる。

#### 【0067】

本発明のさらなる主題は、上記で開示したフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含むフラビウイルスに対する抗体を検出するための試薬キットである。一実施形態において、試薬キットは、個別の容器または単一容器ユニットの個別の区画に、少なくともアビジンまたはストレプトアビジンで被覆された微粒子、および上記で詳述したフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む。別の実施形態において、前記微粒子は、上記でさらに記載したような他の生体親和性対、例えば、ジゴキシンと抗ジゴキシン、ハプテンと抗ハプテンの1つのパートナーで被覆される。一実施形態において、前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドは、ビオチンに共有結合される。一実施形態において、前記フラビウイルスNS1ウイングドメインは、他の生体親和性対、例えば、ジゴキシンと抗ジゴキシン、ハプテンと抗ハプテンの第2のパートナーに共有結合される。別の実施形態において、前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドは、検出可能な標識に、一実施形態においては電気化学発光複合体に共有結合される。さらなる実施形態において、化学発光標識、例えばアクリジニウムエステルまたは放射性化合物もしくは蛍光化合物または酵素を標識として適用することができる。さらに別の実施形態において、前記試薬キットは、個別の容器または単一容器ユニットの個別の区画に、少なくともアビジンまたはストレプトアビジンで被覆された微粒子、ビオチンに共有結合した第1のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチド、および検出可能な標識に、例えば電気化学発光ルテニウム錯体または電気化学発光イリジウム錯体に共有結合されている第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む。一実施形態において、第1のおよび第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドのペプチド配列は同一である。

30

40

50

## 【0068】

さらなる実施形態は、個別の容器または単一容器ユニットの個別の区画に、少なくともアビジンまたはストレプトアビジンで被覆された微粒子、およびビオチンに共有結合された $\mu$ 捕捉結合パートナーを含む、IgMクラスの抗フラビウイルス抗体を検出するための試薬キットである。さらなる実施形態において、前記IgM検出試薬キットは、検出可能な標識に、一実施形態においては電気化学発光複合体に共有結合されたフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む。

## 【0069】

用語の単一容器ユニットとは、Roche diagnosticsのElec Sys (登録商標)分析器シリーズのような多くの自動分析器で、特定の分析物の測定に必要とされる試薬が「試薬パック」の形態で提供され、すなわち、分析装置に取り付けられ、目的の分析物の測定に必要とされるすべての主要試薬を異なる区画に含む1つの容器ユニットとして提供される。

10

## 【0070】

さらに、上記で定義した試薬キットは、使用説明書とともに、対照および標準溶液、ならびに、当業者によって使用される一般的な添加物、緩衝液、塩、界面活性剤などを含む1つまたは複数の溶液の試薬を含む。

## 【0071】

さらに別の態様において、本発明は、少なくとも1つの他の、すなわち抗体検出の範囲のウイルスと同一でない少なくとも1つの第2のフラビウイルス(または第2のフラビウイルス種)に対する抗体を含有することが推定される、分離された生体試料中の第1のフラビウイルス(または第1のフラビウイルス種)に対する抗体を検出する方法に関する。例えば、分析物は、デングウイルス(「第1のフラビウイルス種」)に対する抗体である。この方法において、ラダードメインの完全配列または部分配列を含むデングウイルスNS1ポリペプチドが特異的結合パートナーとして、すなわちNS1ウイングドメインだけでなく完全NS1抗原として適用される。この実験のセットアップにおいて、特異的結合パートナーに高度に保存されたラダードメインペプチド配列が存在することから他の非デング熱フラビウイルスに対する交差反応性が予想される。この干渉を除くために、非デング熱起源の交差反応性抗体(少なくとも1つの第2のフラビウイルス種)が結合され消光されるように、(この例のデング熱の)前記第1のフラビウイルスのNS1ラダードメインからのみなるポリペプチドが非標識形態で加えられる。一実施形態において、ラダードメインはクエンチャーとして添加され、さらなる実施形態においては、前記ラダードメインポリペプチドは、配列番号24、25、26および17のうちの少なくとも1つから本質的になり、一実施形態においては配列番号24、25、26、および17の少なくとも1つからなる。

20

30

## 【0072】

通常、デングウイルス1~4型は、血清学によっては互いに区別されない。結果として、デング熱1~4は、1つの「フラビウイルス種」、すなわちデング熱と見なされる。

以下の実施形態もまた本発明の一部である。

## 【0073】

## 実施形態

1. 分離された生体試料中のフラビウイルスに対する抗体を検出するのに適したポリペプチドであって、フラビウイルスNS1ウイングドメイン特異的アミノ酸配列を含み、前記フラビウイルスのNS1ラダードメイン由来のアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、ポリペプチド。

40

## 【0074】

2. 前記フラビウイルスのさらなるアミノ酸配列が前記ポリペプチド中に存在しない、実施形態1に記載のポリペプチド。

3. 前記フラビウイルスが、ジカウイルス(ZIKV)、西ナイルウイルス(WNV)、デングウイルス1~4型(DENV1~4)、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)、

50

黄熱病ウイルス（YFV）および日本脳炎ウイルス（JEV）からなる群から選択される、実施形態 1 または 2 のいずれかに記載のポリペプチド。

【0075】

4. 前記フラビウイルス NS1 ウィングドメイン 特異的アミノ酸配列が、配列番号 1、2、5、7、9、11、13、15、17 および 19 からなる群から選択され、一実施形態において 7、9、11、13 および 15 からなる群から選択され、一実施形態において 7、9、11 および 13（デングウイルス 1～4 型の NS1 ドメイン）からなる群から選択されるポリペプチドから本質的になる、実施形態 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

【0076】

5. 前記ポリペプチドがシャペロンに融合している、実施形態 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

6. 前記シャペロンが、SlpA、FkpA および Skp からなる群から選択される、実施形態 1 から 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

【0077】

7. 配列番号 21（ジカ）、28（DENV1）、29（DENV2）、30（DENV3）および 31（DENV4）からなる群から選択される、実施形態 6 に記載のポリペプチド。

【0078】

8. 可溶性および免疫反応性のフラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドを産生する方法であって、

a) 実施形態 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドをコードする、作動可能に連結された組換え DNA 分子を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養するステップと、

b) 前記フラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドを発現させるステップと、

c) 前記フラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドを精製するステップとを含む、方法。

【0079】

9. 分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法であって、実施形態 1 から 7 のいずれかに記載の前記第 1 のフラビウイルス種のフラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドが前記抗フラビウイルス抗体の捕捉試薬および / または結合パートナーとして使用される、方法。

【0080】

10. 分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法であって、

a) 実施形態 1 から 7 のいずれかに記載の前記第 1 のフラビウイルス種のフラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドと体液試料を混合することにより免疫反応混合物を形成するステップと、

b) 前記フラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドに対する体液試料中に存在する抗体を、前記フラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチドと免疫反応させて免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持するステップと、

c) 前記免疫反応生成物のいずれかの存在および / または濃度を検出するステップとを含む、方法。

【0081】

11. 検出された抗体が IgG 抗体である、実施形態 9 または 10 のいずれかに記載の分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

12. 実施形態 9 から 11 に記載の分離された試料中の第 1 のフラビウイルス種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、

a) 固相に直接または間接的に結合することができる実施形態 1 から 7 のいずれかに記載の第 1 のフラビウイルス種の第 1 のフラビウイルス NS1 ウィングドメインポリペプチド

10

20

30

40

50

であって、生体親和性結合対の一部であるエフェクター基を有する第1のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドと、実施形態1から7のいずれかに記載の前記第1のフラビウイルス種の第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドであって、検出可能な標識を有する第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドとを、前記試料に添加するステップであって、ここで、前記第1および第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドが、前記抗フラビウイルス抗体に特異的に結合する、ステップと、

b) 前記第1のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチド、前記試料抗体、および前記第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む免疫反応混合物を形成するステップであって、ここで、前記生体親和性結合対の対応するエフェクター基を有する固相が、免疫反応混合物を形成する前、間または後で添加される、ステップと、

c) 体液試料中の前記第1および第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドに対するフラビウイルス抗体を、前記第1および第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドと免疫反応させて免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持するステップと、

d) 液相を固相から単離するステップと、

e) 固相もしくは液相またはその両方における前記免疫反応生成物のいずれかの存在を検出するステップと

を含む二重抗原サンドイッチフォーマットで実施される、方法。

#### 【0082】

13. 前記第1のフラビウイルス種とは異なるフラビウイルス種に対する抗体が検出されない、実施形態9から12のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

#### 【0083】

14. 第1のフラビウイルス種がデングウイルスであり、一実施形態においてはそれぞれの個々のデングウイルス1~4型であり、一実施形態においてはデングウイルス型1~4型のすべてである、実施形態9から13のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

#### 【0084】

15. 前記第1のフラビウイルス種が西ナイルウイルス(WNV)である、実施形態9から13のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

16. 前記第1のフラビウイルス種がダニ媒介脳炎ウイルス(TBEV)である、実施形態9から13のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

#### 【0085】

17. 前記第1のフラビウイルス種が黄熱ウイルス(YFV)である、実施形態9から13のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

18. 前記第1のフラビウイルス種が日本脳炎ウイルス(JEV)である、実施形態9から13のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

#### 【0086】

19. 前記第1のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドがビオチン部分を有し、前記第2のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドが電気化学発光部分で標識され、一実施形態においてはルテニウムまたはイリジウム錯体で標識されている、実施形態12から18のいずれかに記載の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

#### 【0087】

20. 検出された抗体がIgM抗体である、実施形態9から10のいずれかに記載の分離された試料中の第1のフラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

21. 前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドが多量体形態で使用さ

10

20

30

40

50

れ、一実施形態において前記ポリペプチドが少なくとも二重の形態で、一実施形態においては3～10重で存在する、実施形態20に記載のIgMクラスの第1フラビウイルス種に特異的な抗体を検出する方法。

【0088】

22. 前記の検出された抗体がIgM抗体であり、前記IgM抗体がμ捕捉結合パートナーによって固相上で捕捉される、実施形態9から10のいずれかに記載の方法。

23. 実施形態20から22のいずれかに記載の分離された試料中の第1のフラビウイルス種に特異的なIgM抗体を検出する方法であって、前記免疫反応が、

a) 固相に直接または間接的に結合することができるμ捕獲結合パートナーであって、生体親和性結合対の一部であるエフェクター基を有するμ捕獲結合パートナーと、実施形態1から6のいずれかに記載のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドであって、検出可能な標識を有するフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドとを、前記試料に添加するステップであって、

ここで、前記μ捕捉結合パートナーがヒトIgM抗体のFc部分に特異的に結合し、前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドが前記抗フラビウイルス抗体に特異的に結合する、ステップと、

b) 前記μ捕獲結合パートナー、前記試料抗体、および前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドを含む免疫反応混合物を形成するステップであって、ここで、前記生体親和性結合対の対応するエフェクター基を有する固相が、免疫反応混合物を形成する前、間または後で添加される、ステップと、

c) 体液試料中の前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドに対するIgM抗体を、前記フラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドと免疫反応させて免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を維持するステップと、

d) 液相を固相から単離するステップと、

e) 固相もしくは液相またはその両方における前記免疫反応生成物のいずれかの存在を検出するステップと

を含む、μ捕獲フォーマットで実施される、方法。

【0089】

24. ラダードメイン由来のフラビウイルスNS1ポリペプチドを使用しない、一実施形態においては配列番号4、24、25、26、27のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを使用しない、実施形態9から23のいずれかに記載の方法。

【0090】

25. 抗フラビウイルス抗体を検出するためのインビトロ診断試験における、実施形態1から7のいずれかに記載のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドの使用。

【0091】

26. 実施形態8から23のいずれかによる抗フラビウイルス抗体を検出するためのインビトロ診断試験における、実施形態1から7のいずれかに記載のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドの使用。

【0092】

27. 前記フラビウイルスが、ジカウイルス(ZIKV)、西ナイルウイルス(WNV)、デングウイルス1～4型(DENV1～4)、ダニ媒介脳炎ウイルス(TBEV)、黄熱ウイルス(YFV)、日本脳炎ウイルス(JEV)からなる群から選択され、一実施形態においてデングウイルス1～4型(DENV1～4)および西ナイルウイルス(WNV)からなる群から選択され、一実施形態において前記フラビウイルスがデングウイルス1～4型(DENV1～4)である、実施形態25から26のいずれかに記載のフラビウイルスNS1ウイングドメインポリペプチドの使用。

【0093】

28. 前記NS1ウイングドメイン特異的なアミノ酸配列が、配列番号1、2、5、7、9、11、13、15、17および19からなる群から選択され、一実施形態において配

10

20

30

40

50

列番号 7、9、11、13 および 15 からなる群から選択され、一実施形態において配列番号 7、9、11、および 13 ( Dengue 熱ウイルス 1 ~ 4 型の NS 1 ドメイン ) からなる群から選択されるポリペプチドからなる、実施形態 27 に記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドの使用。

【 0 0 9 4 】

29 . 実施形態 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを含み、一実施形態において試薬キットの使用説明書を含む、抗フラビウイルス抗体を検出するための試薬キット。

【 0 0 9 5 】

30 . 個別の容器にまたは単一の容器ユニットの個別の区画に、少なくともアビジンまたはストレプトアビジンで被覆された微粒子、およびビオチンに共有結合された実施形態 1 から 7 のいずれかに記載のフラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドを含む、実施形態 29 に記載の試薬キット。

10

【 0 0 9 6 】

31 . 個別の容器にまたは単一の容器ユニットの個別の区画に、少なくともハプテン / 抗ハプテンなどの生体親和性対の一つのパートナーで被覆された微粒子、および実施形態 1 から 7 のいずれかに記載のポリペプチドを含み、ここで前記生体親和性対がハプテン / 抗ハプテンであり、一実施形態においてジゴキシン / 抗ジゴキシンである、実施形態 30 による試薬キット。

【 0 0 9 7 】

32 . 検出可能な標識を有する実施形態 1 から 7 のいずれかに記載の第 2 のポリペプチドをさらに含む、実施形態 29 に記載の試薬キット。

20

33 . 個別の容器にまたは単一の容器ユニットの個別の区画に、少なくともアビジンまたはストレプトアビジンで被覆された微粒子、およびビオチンに共有結合された  $\mu$  捕捉結合パートナーを含む、実施形態 29 に記載の試薬キット。

【 0 0 9 8 】

34 . 前記フラビウイルス NS 1 ウィングドメインポリペプチドが検出可能な標識を有する、実施形態 29 に記載の試薬キット。

35 . 特異的結合パートナーとして ラダードメインの完全配列または部分配列を含むフラビウイルス NS 1 ポリペプチドを使用することによって、第 1 のフラビウイルスとは異なる少なくとも 1 つの第 2 のフラビウイルスに対する抗体を含有することが推定される分離された生体試料中の第 1 のフラビウイルスに対する抗体を検出する方法であって、非標識形態の前記フラビウイルスの NS 1 ラダードメインを含むポリペプチドを添加することによって、一実施形態においては、クエンチャーとして ラダードメインを含む前記ポリペプチドを添加することによって、前記第 1 のフラビウイルスとは異なる少なくとも 1 つの第 2 のフラビウイルスに対する交差反応性が除去される、方法。

30

【 0 0 9 9 】

36 . 抗フラビウイルス抗体を検出するためのイムノアッセイにおける干渉を低減する試薬としての、フラビウイルス NS 1 ラダードメインポリペプチドの使用。

37 . 前記 ラダードメインポリペプチドが配列番号 4、24、25、26 および 27 からなる群から選択される、実施形態 36 に記載の使用。

40

【 0 1 0 0 】

本発明を実施例によりさらに説明する。

実施例 1 : ジカ I g G イムノアッセイにおける異なるジカ NS 1 抗原変異体の免疫学的反応性 ( すなわち抗原性 )

NS 1 抗原および変異体は、WO 2014054990 A 1 に、または Scholz ら、J . Mol . Biol . ( 2005 ) 345、1229 ~ 1241 により開示されているように、本質的にクローン化、発現、精製および標識された。精製および可溶化された遺伝子産物は、続いてビオチンまたは電気化学発光ルテニウム標識に結合させた。

50

## 【0101】

ジカNS1抗原のポリペプチド融合変異体の免疫学的反応性（すなわち抗原性）は、自動化E l e c s y s（登録商標）2010およびc o b a s e 411分析器（R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H）で評価した。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。測定は、二重抗原サンドイッチフォーマットで行った。

## 【0102】

E l e c s y s（登録商標）2010およびc o b a s e 411のシグナル検出は、電気化学発光に基づく。ピオチンコンジュゲート（すなわち捕獲抗原）はストレプトアビジン被覆磁気ビーズ表面に固定化されるが、検出抗原はシグナル部分として複合体化ルテニウムカチオン（酸化還元状態2+および3+のスイッチング）を担持する。特異的免疫グロブリン分析物の存在下において、発色性ルテニウム錯体は固相に架橋され、白金電極での励起の後に620nmの光を発する。シグナル出力は相対的な光単位である。典型的には、アッセイの合計時間は18分である。

10

## 【0103】

組換えジカNS1抗原融合ポリペプチドは、二重抗原サンドイッチ（D A G S）イムノアッセイフォーマットで評価した。この目的のため、組換えジカNS1抗原をそれぞれピオチンおよびルテニウムコンジュゲート対として使用し、ヒト血清中の抗ジカNS1抗体を検出した。

## 【0104】

NS1は、ジカウイルスの免疫優性抗原の1つであり、NS1抗原の可溶性変異体は、本特許出願で開示されているように、ジカウイルス感染を検出するための非常に貴重なツールである。すべての測定において、化学重合した非標識のS l y D - S l y Dを抗干渉物質として反応バッファー中に大過剰量（約8 μ g / m l）で補充して、シャペロン融合およびリンカーユニットを介した免疫交差反応を回避した。

20

## 【0105】

特に、この研究では、2つのジカNS1変異体、すなわちジカNS1「ウイング」ドメイン（配列番号1および2を参照）、ならびにジカNS1「ラダー」ドメイン（配列番号4を参照）を詳細に調べた。抗ジカNS1 I g G分子を検出するため、S l y D - S l y D - ジカNS1 - ピオチンおよびS l y D - S l y D - ジカNS1 - ルテニウムをR 1（試薬バッファー1）およびR 2（試薬バッファー2）でそれぞれ使用した。R 1およびR 2中の抗原コンジュゲートの濃度は、それぞれ500 n g / m lであった。

30

## 【0106】

ジカおよびデング熱のI g G抗体の両方に陰性であるヒト血清試料、ジカI g G抗体に陽性であるヒト血清試料、およびデング熱I g G抗体に陽性であるヒト血清試料を、H u z l yら、前掲に開示されたようにして市販の最先端免疫測定法（マイクロタイタープレートにコーティングされた組換えNS1抗原を適用する間接E L I S A、酵素標識抗ヒトI g Gコンジュゲートを添加することによるジカウイルスに対する試料抗体の検出）と比較し、ジカNS1組換え抗原（「ウイング」および「ラダー」）の両方で試験した。

## 【0107】

この実験において、上記のヒト試料を、前述のD A G Sイムノアッセイのセットアップを使用して評価した。

40

回避不可能な系固有のシグナルは約500カウントである。ジカI g G抗体およびデング熱I g G抗体が陰性であるヒト血清試料の低いバックグラウンドシグナルは、それぞれの抗原ルテニウムコンジュゲートの高い溶解性および一般に良性の物理化学特性を示している。疎水性、または一般に言われている「粘着性」の抗原 - ルテニウムコンジュゲートは、ビーズ表面と相互に作用し、それによりバックグラウンドシグナルが増加する傾向にある。表1から、本発明者らは、ジカNS1「ウイング」の物理化学的特性が優れていると推論することができる（第1列）。これは、同様にジカNS1「ラダー」にも該当する（データ第2列）。ジカNS1「ウイング」（配列番号21）がD A G Sフォーマット

50

でビオチン化形態およびルテニル化形態で抗原対として使用される場合、またはジカNS1「ラダー」(配列番号22)がDAGSフォーマットのビオチン化形態およびルテニル化形態の抗原対として使用される場合、両抗原対は、陰性ヒト血清で約600~900カウントのシグナルバックグラウンドを生じ、抗原コンジュゲートの良好な溶解特性を明白に示す。しかし、一見したところ、ジカNS1「ウイング」およびジカNS1「ラダー」は抗ジカ抗体を検出するそれらの能力は等しいが、表1に示したように、抗 Dengue 熱抗体との交差反応性では著しく異なることが明らかになった。ジカIgG陽性試料で詳しく見てみた場合、本発明者らは、ジカNS1「ウイング」およびジカNS1「ラダー」の両方が、すべてのジカIgG試料を陽性として(>2000カウント)検出することを見出した。重要なことには、ジカNS1「ウイング」は Dengue 熱IgG陽性試料と交差反応しないが、それはすべての Dengue 熱IgG試料がジカNS1ウイング抗原で陰性であると確認される(<2000カウント)からである。好対照において、ジカNS1「ラダー」は、20の Dengue 熱IgG試料のうち9つの試料を反応性として検出し(>2000カウント)検出し、これは程度の顕著な交差反応性を示す。ジカIgGおよび Dengue 熱IgGの陽性試料と非常に類似した反応性パターンが、Huzlyら(Euro Surveil. 2016; 21(16)、pii=30203、1~4)によって開示された市販のジカIgGアッセイで観察されるが、市販のジカIgGアッセイは、 Dengue 熱IgG陽性試料と顕著な免疫学的交差反応性を有する(すなわち、市販のジカIgGアッセイはかなり多数の偽陽性ジカ結果をもたらす)という難点を有する。結論として、ジカNS1抗原(ジカNS1「ウイング」およびジカNS1「ラダー」)の操作された両変異体は、顕著な物理化学的特性と抗原特性を有する。しかし、ジカNS1「ウイング」抗原は、ジカIgG抗体に対する優れた特異性を示すとともに、 Dengue 熱陽性血清との免疫学的交差反応性を著しく低下させるという点で、ラダードメインより優れている。

10

20

**【0108】**

したがって、操作された組換えジカNS1「ウイング」ドメインは、Huzlyら、前掲によって開示されているような市販の最新のジカIgGイムノアッセイ(これは完全長NS1に基づくと推測される)と比較して、ジカ抗体の特異的定量的ための優れたNS1変異体を構成する。

**【0109】**

表1は、ジカNS1「ラダー」および市販の最新のジカIgGアッセイと比較した場合のジカNS1「ウイング」の優れた特異性(すなわち、抗 Dengue 熱抗体との交差反応性の顕著な低下)を示す。

30

**【0110】**

【表 1 - 1】

試料 ID	試料の種類	ジカ NS1「ウイニング」アッセイ		ジカ NS1「βラダー」アッセイ		市販のジカ IgG アッセイ	ジカ NS1「ウイニング」アッセイ	ジカ NS1「βラダー」アッセイ	市販のジカ IgG アッセイ
		カウント数	シグナル動態*	カウント数	シグナル動態*				
BD03	陰性 1	562	0.33	957	0.36	0.147	NR	NR	NR
BD09	陰性 2	549	0.33	975	0.37	0.018	NR	NR	NR
BD15	陰性 3	577	0.34	854	0.32	0.466	NR	NR	NR
BD22	陰性 4	559	0.33	874	0.33	0.056	NR	NR	NR
BD23	陰性 5	557	0.33	879	0.33	0.034	NR	NR	NR
BD24	陰性 6	567	0.34	869	0.33	0.050	NR	NR	NR
BD29	陰性 7	564	0.33	844	0.32	0.058	NR	NR	NR
BD34	陰性 8	575	0.34	971	0.37	0.028	NR	NR	NR
BD36	陰性 9	546	0.32	799	0.30	0.010	NR	NR	NR
BD37	陰性 10	558	0.33	823	0.31	0.054	NR	NR	NR
ARSZ16052	ジカ IgG	28556	16.95	80129	30.19	4.66	反応性	反応性	反応性
ARSZ16244	ジカ IgG	19906	11.82	10274	3.87	3.65	反応性	反応性	反応性
16CDV61200	ジカ IgG	9157	5.44	113815	42.89	5.73	反応性	反応性	反応性
ARSZ16245	ジカ IgG	17990	10.68	22353	8.42	4.89	反応性	反応性	反応性
16CDV61275	ジカ IgG	36305	21.56	241699	91.07	8.42	反応性	反応性	反応性
ARSZ16271	ジカ IgG	27026	16.05	117869	44.41	7.46	反応性	反応性	反応性
ARSZ16264	ジカ IgG	7260	4.31	45774	17.25	4.63	反応性	反応性	反応性
ARSZ16178	ジカ IgG	27957	16.60	241364	90.95	6.12	反応性	反応性	反応性
ARSZ16013	ジカ IgG	9658	5.73	178153	67.13	6.49	反応性	反応性	反応性
ARSZ16062	ジカ IgG	21206	12.59	269333	101.49	7.66	反応性	反応性	反応性
8DEN0016	デング熱 IgG	555	0.33	604	0.23	0.050	NR	NR	NR
8DEN0008	デング熱 IgG	558	0.33	616	0.23	0.213	NR	NR	NR
8DEN0040	デング熱 IgG	560	0.33	574	0.22	0.089	NR	NR	NR
8DEN0015	デング熱 IgG	564	0.33	596	0.22	0.066	NR	NR	NR

表1

【 0 1 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

8DEN0017	デング熱 IgG	564	0.33	588	0.22	-0.019	NR	NR	NR
8DEN0045	デング熱 IgG	568	0.34	584	0.22	0.112	NR	NR	NR
D117	デング熱 IgG	569	0.34	616	0.23	0.283	NR	NR	NR
8DEN0024	デング熱 IgG	570	0.34	612	0.23	0.070	NR	NR	NR
8DEN0023	デング熱 IgG	572	0.34	675	0.25	0.054	NR	NR	NR
8DEN0041	デング熱 IgG	572	0.34	742	0.28	0.147	NR	NR	NR
D092	デング熱 IgG	566	0.34	4366	1.65	2.48	NR	NR	NR
D096	デング熱 IgG	567	0.34	4500	1.70	2.08	NR	反応性	反応性
D009	デング熱 IgG	574	0.34	19740	7.44	2.42	NR	反応性	反応性
D094	デング熱 IgG	577	0.34	2591	0.98	2.43	NR	反応性	反応性
D109	デング熱 IgG	583	0.35	9702	3.66	1.71	NR	反応性	反応性
D099	デング熱 IgG	585	0.35	3186	1.20	2.52	NR	反応性	反応性
D102	デング熱 IgG	585	0.35	13330	5.02	1.30	NR	反応性	反応性
8DEN0029	デング熱 IgG	587	0.35	38740	14.60	3.62	NR	反応性	反応性
8DEN0013	デング熱 IgG	595	0.35	37980	14.31	3.46	NR	反応性	反応性
8DEN0007	デング熱 IgG	601	0.36	11840	4.46	3.06	NR	反応性	反応性

\*シグナル動態=試料カウント数/(平均陰性試料のカウント数)x3)

NR=非反応性

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

実施例 2 : ジカ NS 1 「ラダー」抗原と比較したジカ NS 1 「ウイング」抗原の超特異性を確認するためのブロッキング実験

ジカ NS 1 抗原のポリペプチド融合変異体の免疫学的反応性(すなわち抗原性)を、実施例 1 に記載したように自動化 E l e c s y s (登録商標) 2 0 1 0 および c o b a s e 4 1 1 アナライザー ( R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H ) で評価した。

#### 【 0 1 1 3 】

ジカ I g G 抗体に陽性の 3 つのヒト血清試料を、操作したジカ NS 1 組換え抗原(「ウイング」および「ラダー」)の両方で試験した。並行して、ジカ I g G 抗体に陽性のこれらのヒト血清試料は、個々に、T B E V (ダニ媒介脳炎ウイルス、F S M E、配列番号 6)、または D E N V 1 ~ 4 の 1 つの抗原(デングウイルス 1 ~ 4、配列番号 8、1 0、1 2、1 4)、または W N V (西ナイルウイルス、配列番号 1 6)、または Y F V (黄熱ウイルス、配列番号 1 8)、または J E V (日本脳炎ウイルス、配列番号 2 0)、または Z I K V (ジカウイルス、配列番号 3)のいずれかの完全長フラビウイルス NS 1 抗原調製物でスパイクされた(表 2 a および表 2 b)。

10

#### 【 0 1 1 4 】

この実験において、上記のヒト試料(スパイクおよび非スパイク)を前述の D A G S イムノアッセイのセットアップで評価した。

試料は、ブロッキング実験に必要とされる反応性レベル(力価)に予備希釈した。ブロッキング実験用に調製したフラビウイルス NS - 1 調製物の濃度および試料中の抗体の量が明確なブロッキング結果を得るために合理的な濃度比内であることが必要とされるので、このステップが必要であった。次いで、予備希釈したヒト抗ジカ I g G 陽性試料反応性を、T B E V、または D E N V 1 - 4、または W N V、または Y F V、または J E V または Z I K V のいずれかの完全長フラビウイルス NS - 1 でスパイクした場合の同じ試料で得られたシグナルと比較した。T B E V、D E N V 1 ~ 4、W N V、Y F V、J E V および Z I K V の異なる完全長フラビウイルス NS - 1 調製物による競合によってシグナル減少の程度を計算した。ブロッキングのシグナル減少の程度は、完全長ジカ NS 1 で達成される最大ブロッキングに標準化されたが、これは予想通り、両アッセイで(ジカ NS 1 「ウイング」またはジカ NS 1 「ラダー」のいずれを使用することに関係なく)シグナルの最も強い消光を示す。競合する能力の程度は、すべての他の完全長フラビウイルス NS 1 調製物(T B E V、D E N V 1 ~ 4、W N V、Y F V、J E V)について計算した。ジカ NS 1 「ウイング」抗原に基づくアッセイのシグナルは、非ジカ NS 1 抗原によって消光が弱くなるだけであるが、ジカ NS 1 「ラダー」抗原に基づくアッセイのシグナルは、T B E V、D E N V 1 ~ 4、および J E V によって顕著に低減されることは一目したところ明白である。この発見は、NS 1 ウイングドメインと NS 1 ラダードメインがアルボウイルス NS 1 相同体の中でそれらの構造の独自性が大きく異なることを強く力説するように示している。明らかに、非ジカ NS 1 抗原のウイング部分は、抗ジカ分析物抗体への結合について、操作されたジカウイング抗原と効率的に競合され得ない。反対に、非ジカ NS 1 抗原のラダー部分は、抗ジカ分析物抗体への結合について、操作されたジカラダー抗原と完全に効率的に競合され得る。

20

30

40

#### 【 0 1 1 5 】

結論として、これは、ジカ NS 1 「ウイング」抗原に基づくアッセイが、他のアルボウイルス(T B E V、D E N V 1 ~ 4、W N V、Y F V、J E V)のフラビウイルス NS - 1 調製物と交差反応し得ない(または交差反応性の傾向がない)抗ジカ I g G 抗体をほぼ検出することも証明しているので、この実験は実施例 1 と完全に一致している。反対に、ジカ NS 1 「ラダー」抗原に基づくアッセイは、T B E V、D E N V 1 ~ 4 および J E V と一部で交差反応し得る(あるいは交差反応性の傾向がある)抗ジカ抗体に結合する(すなわち、それらは T B E V、D E N V 1 ~ 4 および J E V NS - 1 調製物によってブロックされ得る)。言い換えれば、ジカ NS 1 抗原のラダードメインは、関連アルボウイルスのラダードメインと有意な構造とおよび配列相同を共有することにより、抗原と

50

して使用した場合に、イムノアッセイで偽陽性の結果がもたらされると思われる。反対に、ジカNS1抗原のウイングドメインはかなり特有であると考えられ、また他のアルボウイルス由来のそのNS相当物と構造的な相同性をほとんど共有しないようである。

【0116】

本発明者らのデータは、この原理がジカウイルス感染と他のフラビウイルス感染を区別するだけでなく、他のフラビウイルス感染を相互に区別することにも当てはまることを示す。本発明者らは、NS1抗原のウイングドメインに対する抗体の特異的な検出が、複数のフラビウイルス感染のバックグラウンドであってもフラビウイルス感染を明確に区別するための優れた手段であると結論づける。本発明者らは、我々の所見が現在の血清学を大幅に改善し、フラビウイルス分野での罹患率および発生率データに関するより適切な見解を得る可能性を有するものと推論する。

10

【0117】

要約すると、ジカNS1「ウイング」抗原は、ジカIgGに対する優れた超性能の特異性を示し、他のアルボウイルス（ここではフラビウイルスのファミリー）由来のNS1相同体に対して生成される抗体との免疫学的交差反応性を受けにくく、したがって、抗ジカIgG抗体の特異的試験により一層好適である。

【0118】

【表2】

表2a

20

	SSジカNS1- ウイング	SジカNS1- βラダー	SSジカNS1- ウイング	SジカNS1- βラダー	SSジカNS1- ウイング	SジカNS1- βラダー
<b>試料 16CDV61275</b>	カウント数	カウント数	ブロッキング [%]	ブロッキング [%]	ジカに標準化	ジカに標準化
1:10予備希釈	3108	3432			ブロッキング[%]	ブロッキング[%]
ZIKVNS1でスパイク	1225	947	76.3	92.0	100.0	100.0
TBEVNS1でスパイク	3064	3387	1.73	1.62	2.3	1.8
DenV1NS1でスパイク	2946	1511	6.38	69.1	8.4	75.2
DenV2NS1でスパイク	3042	3349	2.60	2.99	3.4	3.2
DenV3NS1でスパイク	3014	1587	3.70	66.4	4.9	72.2
DenV4NS1でスパイク	3045	2734	2.48	25.1	3.3	27.3
<b>試料 16CDV61278</b>	カウント数	カウント数	ブロッキング [%]	ブロッキング [%]	ジカに標準化	ジカに標準化
1:20予備希釈	2989	2887			ブロッキング[%]	ブロッキング[%]
ZIKVNS1でスパイク	759	1457	91.7	69.4	100.0	100.0
TBEVNS1でスパイク	2914	2911	3.10	-1.07	3.4	-1.5
DenV1NS1でスパイク	2858	1115	5.41	79.3	5.9	114.3
DenV2NS1でスパイク	2749	1423	9.91	65.5	10.8	94.4
DenV3NS1でスパイク	2783	1695	8.51	53.4	9.3	76.9
DenV4NS1でスパイク	2880	2829	4.50	2.60	4.9	3.7
<b>試料 16CDV61197</b>	カウント数	カウント数	ブロッキング [%]	ブロッキング [%]	ジカに標準化	ジカに標準化
1:10予備希釈	2925	3089			ブロッキング[%]	ブロッキング[%]
ZIKVNS1でスパイク	1127	1720	76.1	62.8	100.0	100.0
TBEVNS1でスパイク	2897	3045	1.19	1.81	1.6	2.9
DenV1NS1でスパイク	2648	2073	11.7	41.7	15.4	66.4
DenV2NS1でスパイク	2682	2013	10.3	44.2	13.5	70.4
DenV3NS1でスパイク	2666	1911	11.0	48.4	14.4	77.0
DenV4NS1でスパイク	2904	2320	0.891	31.6	1.2	50.3

30

40

【0119】

【表 3】

表2b

	SS-ジカ-NS1- ウイング	S-ジカ-NS1- βラダー	SS-ジカ-NS1- ウイング	S-ジカ-NS1- βラダー	SS-ジカ-NS1- ウイング	S-ジカ-NS1- βラダー
試料 16CDV61275	カウント数	カウント数	ブロッキング [%]	ブロッキング [%]	ジカに標準化	ジカに標準化
1:10 予備希釈	3280	3486			ブロッキング[%]	ブロッキング[%]
ZIKVNS1 でスパイク	920	825	86.7	94.2	100.0	100.0
WNVNS1 でスパイク	2596	2154	25.1	47.1	29.0	50.1
YFVNS1 でスパイク	3154	3257	4.63	8.10	5.3	8.6
JEVNS1 でスパイク	3095	3198	6.80	10.2	7.8	10.8
試料 16CDV61278	カウント数	カウント数	ブロッキング [%]	ブロッキング [%]	ジカに標準化	ジカに標準化
120 予備希釈	2920	3314			ブロッキング[%]	ブロッキング[%]
ZIKVNS1 でスパイク	1098	1601	77.1	64.5	100.0	100.0
WNVNS1 でスパイク	2711	2477	8.85	31.5	11.5	48.9
YFVNS1 でスパイク	2651	3093	11.4	8.33	14.8	12.9
JEVNS1 でスパイク	2885	2835	1.48	18.0	1.9	28.0
試料 16CDV61197	カウント数	カウント数	ブロッキング [%]	ブロッキング [%]	ジカに標準化	ジカに標準化
1:10 予備希釈	2745	2989			ブロッキング[%]	ブロッキング[%]
ZIKVNS1 でスパイク	1403	1528	61.3	62.7	100.0	100.0
WNVNS1 でスパイク	2626	2551	5.44	18.8	8.9	30.0
YFVNS1 でスパイク	2664	2844	3.70	6.23	6.0	9.9
JEVNS1 でスパイク	2549	2704	8.96	12.2	14.6	19.5

## 【 0 1 2 0 】

頭文字の説明：

Z I K V = ジカウイルス

D E N V 1 = デングウイルス 1 型

D E N V 2 = デングウイルス 2 型

D E N V 3 = デングウイルス 3 型

D E N V 4 = デングウイルス 4 型

W N V = 西ナイルウイルス

J E V = 日本脳炎ウイルス

Y F V = 黄熱ウイルス

T B E V = ダニ媒介脳炎ウイルス (= F S M E ウイルス)

実施例 3：デング熱 I g G イムノアッセイにおけるデング熱 NS 1 抗原変異体の免疫反応性

デング熱 NS 1 抗原および変異体のクローニング、発現、精製および標識は、本質的には実施例 1 のように実施した。デング熱 NS 1 抗原のポリペプチド融合変異体の免疫学的

10

20

30

40

50

反応性（すなわち抗原性）は、自動化cobas e 601分析器（Roche Diagnostics GmbH）で評価した。Elexsys（登録商標）は、Rocheグループの登録商標である。測定は、実施例1でも記載した二重抗原サンドイッチフォーマットで実施した。

【0121】

組換え Dengue NS1 抗原融合ポリペプチドは、二重抗原サンドイッチ（DAGS）イムノアッセイフォーマットで評価した。この目的のため、組換え Dengue NS1 抗原は、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使用し、ヒト血清中の抗 Dengue NS1 抗体を検出した。

【0122】

すべての測定において、化学重合した非標識 SlyD - SlyD を抗干渉物質として反応バッファー中に大過剰量（約 8 μg/ml）で補充して、シャペロン融合ユニットを介した免疫学的交差反応を回避した。

【0123】

特に、2つの Dengue NS1 変異体、すなわち Dengue NS1 「ウイング」ドメイン（DENV 1 ~ 4 に対応する配列番号 7、9、11 および 13 を参照）、および Dengue NS1 「ラダー」ドメイン（DENV 1 ~ 4 に対応する配列番号 24 ~ 27 を参照）をこの研究で試験した。抗 Dengue NS1 IgG 分子を検出するために、SlyD - SlyD - Dengue NS1 - ビオチンと SlyD - SlyD - Dengue NS1 - ルテニウムを、それぞれ R1（試薬バッファー1）および R2（試薬バッファー2）で使用した。R1 および R2 中の抗原コンジュゲートの濃度は、それぞれ、各々 500 ng/ml であった。4つのすべての Dengue 熱血清型の抗原を含む調製物では、R1 および R2 中の抗原コンジュゲートの濃度もまたそれぞれ 500 ng/ml であった（合計で 2 μg/ml）。対照および参照として、ジカ NS1 ウイングドメインを抗原として含む実施例1のジカ IgG アッセイを使用した。

【0124】

ジカ IgG 抗体および Dengue 熱 IgG 抗体の両方に陰性のヒト血清試料、Dengue 熱 IgG 抗体に陽性のヒト血清試料、ならびにジカ IgG 抗体に陽性のヒト血清試料を、「ウイング」については4つのすべての Dengue 熱血清型に由来し、「ラダー」については DENV 2 に由来する Dengue 熱 NS1 組換え抗原で試験した。

【0125】

この実験において、上記のヒト試料を、上述の DAGS イムノアッセイのセットアップを使用して評価した。表3に結果を示す。

4つのすべての Dengue ウイルス血清型の NS1 ウイングドメインが大腸菌で過剰発現され得ること、またこれらの組換え抗原が高収率で得られ得ることを明らかにすることができた。抗原は、精製後にリフォールディングさせ、可溶性の天然様で免疫反応性の立体構造にすることができる。免疫蛍光アッセイにより Dengue 熱陽性と予備試験された血清が、本発明者らのアッセイのセットアップで陽性と正確に同定されたことを示すことができた。DENV 1 ~ 4 ウイングドメインおよび DENV 2 ラダードメインは、実際、推測上 Dengue 熱陽性の血清と反応する。しかし、DENV 1 ~ 4 の個々の Dengue 熱ウイングドメインが事前に特徴付けられた市販の Dengue 熱陽性血清とは異なる反応を示すという証拠を本発明者らは発見した。その結果は、Dengue ウイルス血清型の免疫学的識別が、イムノアッセイにおける抗原としての Dengue 熱 NS1 ウイングドメインに基づいて可能であり得ることを示唆しているようである。

【0126】

さらに、特異的抗原としてジカ NS1 ウイングドメインを使用する実施例1のジカ IgG アッセイは、事前に特徴付けられた Dengue 熱抗体陽性血清の市販のセットといかなる交差反応も示さず、ジカ NS1 ウイングドメインの優れた特異性を今一度強調している。最も興味深いことには、ジカ陽性血清は、ジカ NS1 ウイングドメインと排他的に反応するが、Dengue 熱ウイングドメイン抗原とはいずれとも交差反応しない。言いかえると、デン

10

20

30

40

50

グ熱ウイングドメインは、複数のフラビウイルス感染の高罹患率を示す集団における高度に特異的な抗原としても見込みがある。これは、ブラジルまたはタイなどでの休暇から戻った疑わしい中央ヨーロッパ人のデング熱感染を確実に検出することの1つである。高罹患率地域での以前の黄熱病感染および/またはジカ感染などの医学的バックグラウンドを有する患者のデング熱感染を確実に検出することとは完全に異なるものである。したがって、フラビウイルスイムノアッセイの特異性が最も重要であるのは、特に複数のフラビウイルス感染の罹患率が高い新興国である。本発明者らの結果は、フラビウイルスNS1ウイングドメインが、イムノアッセイにおける結合パートナーとして適用されるフルフラビウイルスウイングドメインに対する抗体を特異的に検出するための優れたツールであることを示している。

【0127】

【表 4】

表3

試料ID	事前の特徴付け	ジカ NSI ウィング		DENV1 NSI ウィング		DENV2 NSI ウィング		DENV2 NSI βラダー		DENV3 NSI ウィング		DENV4 NSI ウィング	
		カウント数	シグナル強度	カウント数	シグナル強度	カウント数	シグナル強度	カウント数	シグナル強度	カウント数	シグナル強度	カウント数	シグナル強度
ジカ_Call	ZKV陰性	796	098	3488	099	642	095	nd	nd	3566	112	1627	107
ジカ_Call	ZKV陽性	1653	2139	4646	132	779	116	nd	nd	8252	259	4411	289
ジカ_Call	ZKV陰性	788	097	3512	100	651	097	nd	nd	3555	112	1630	107
ジカ_Call	ZKV陽性	1178	1448	5279	150	863	128	nd	nd	9229	290	4003	267
Z965300	ZKVDnV陰性	782	096	3405	098	663	097	470	082	2986	094	1508	099
Z205300	ZKVDnV陰性	825	102	3474	099	689	098	472	083	3415	107	1515	099
Z2053400	ZKVDnV陰性	801	099	3666	104	722	107	599	106	3301	104	1527	100
Z965400	ZKVDnV陰性	840	103	3504	100	662	098	740	130	3044	096	1547	101
パネル_メンバ-01	DENVHDENV2	1071	132	12959	3678	2659	3939	2145	3710	95757	29436	10418	684
パネル_メンバ-02	陰性	797	098	3405	103	699	095	469	082	3488	109	1614	106
パネル_メンバ-03	DENVHDENV2	1063	131	12889	3879	2799	3532	2389	4103	87602	27494	9778	642
パネル_メンバ-04	DENVHDENV2	791	097	9812	279	2263	4343	5726	10150	6980	219	27612	1812
パネル_メンバ-05	DENVHDENV2	804	099	8027	240	21884	3248	52546	9219	6223	195	21911	1438
パネル_メンバ-06	DENV2HDENV3	824	101	7540	214	17869	2667	49717	8722	5819	183	18810	1234
パネル_メンバ-07	DENVHDENV2	816	100	6937	197	14886	2209	46787	8208	5299	166	15917	1045
パネル_メンバ-08	陰性	821	101	3404	097	685	094	455	080	3429	108	1603	105
パネル_メンバ-09	DENVHDENV2	821	101	6322	180	12743	1891	44023	7723	5346	168	14006	919
パネル_メンバ-10	DENV2HDENV3	844	104	5928	166	10759	1597	41559	7291	4876	153	11956	785

パネルメンバ-01で記したデング熱陽性ヒト血清は、ZeptoMatrixから購入した(カタログ番号KZMC028);これらの市販血清の事前の特徴付けは免疫蛍光試験に基づく;nd:未決定;ジカ\_CallおよびCall2:実施例1のジカIgGアッセイの陰性および陽性の対照。

【配列表】

2020517630000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/060330
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/18 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) A61K C07K 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, CHEM ABS Data, Sequence Search		
<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	D. HUZLY ET AL: "High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses", EUROSURVEILLANCE, vol. 21, no. 16, 30203, 21 April 2016 (2016-04-21), pages 1-4, XP055359330, cited in the application the whole document ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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
11 June 2018		26/06/2018
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  Le Cornec, Nadine

4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/060330

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>K. STEINHAGEN ET AL: "Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with Dengue virus antibodies. a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016", EURO SURVEILLANCE, vol. 21, no. 50, 15 December 2016 (2016-12-15), pages 1-16, XP002774072, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426 page 1, left-hand column page 14, right-hand column, paragraph 2 - page 15, left-hand column</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>WONG SUSAN J ET AL: "A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis.", EBIO MEDICINE FEB 2017, vol. 16, 10 January 2017 (2017-01-10), pages 136-140, XP002774073, ISSN: 2352-3964 page 139, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>BROWN W CLAY ET AL: "Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure", NATURE STRUCTURAL &amp; MOLECULAR BIOLOGY, vol. 23, no. 9, September 2016 (2016-09), pages 865-867, XP002774074, the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>HILGENFELD ROLF: "Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces", EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 35, no. 24, 27 October 2016 (2016-10-27), pages 2631-2633, XP002774075, DOI: 10.15252/embj.201695871URL page 2631 page 2632; figure 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/060330

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHOLZ C ET AL: "Functional Solubilization of Aggregation-prone HIV Envelope Proteins by Covalent Fusion with Chaperone Modules", JOURNAL OF MOLECULAR BIO, vol. 345, no. 5, 4 February 2005 (2005-02-04), pages 1229-1241, XP004731715, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2004.10.091 cited in the application the whole document	5,6
A	XU XIAOYING ET AL: "Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure", EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 35, no. 20, 17 October 2016 (2016-10-17), pages 2170-2178, XP002774076, page 2175; figure 5 page 2176, left-hand column, paragraph 1	1-17
A	MARCUS PANNING: "Zika Virus Serology: More Diagnostic Targets, more reliable answers?", EBIO MEDICINE, vol. 16, 1 February 2017 (2017-02-01), pages 12-13, XP002774077, DOI: 10.1016/J.EBIOM.2017.01.045 the whole document	1-17
A	BRYAN D. COX ET AL: "Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention", ANTIVIRAL CHEMISTRY AND CHEMOTHERAPY, vol. 24, no. 3-4, 2015, pages 118-126, XP002774078, DOI: 10.1177/2040206616653873 page 119, left-hand column - page 119, right-hand column, paragraph 1; figure 1 page 121, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1; figure 3	1-17
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/060330

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>K. STETTLER ET AL: "Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection", SCIENCE, vol. 353, no. 6301, 19 August 2016 (2016-08-19), pages 823-826, XP055352097, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aaf8505 the whole document -&amp; K. STETTLER ET AL: "Supplementary Material for Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zikavirus infection", SCIENCE, 14 July 2016 (2016-07-14), pages 1-34+5PP, XP002774079, DOI: 10.1126/science.aad8728 the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>AKEY DAVID L ET AL: "Flavivirus NS1 crystal Structures Reveal a Surface for membrane Association and regions of interaction with the Immune System", NIH Public Access Author Manuscript  21 February 2014 (2014-02-21), pages 1-10, XP002781794, DOI: 10.1126/science.1247749 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic les/PMC4263348/pdf/nihms647006.pdf [retrieved on 2018-06-11] page 2 page 4, paragraph 2 Published in final edited form as: Science. 2014 February 21; 343(6173): 881-885. doi:10.1126/science.1247749.</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>M. RASGOTI ET AL: "Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein", VIROLOGY JOURNAL, vol. 13, 131, 29 July 2016 (2016-07-29), pages 1-10, XP002781795, DOI: 10.1186/s12985-016-0590-7 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/060330
---

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>DAVID L. AKEY ET AL: "Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection", BIOESSAYS, vol. 37, no. 5, May 2015 (2015-05), pages 489-494, XP002781799, DOI: 10.1002/bies.201400182 page 491, paragraph 3 page 493; figure 1 -----</p>	1-17
A	<p>SCATURRO PIETRO ET AL: "Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins", PLOS PATHOGENS, vol. 11, no. 11, 12 November 2015 (2015-11-12), pages 1-32, XP002781801, DOI: 10.1371/journal.ppat.1005277 the whole document -----</p>	1-17

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	N
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N	15/40	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z

(81)指定国・地域 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, JO, 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

- (72)発明者 ファーツ, エルケ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 リーデル, アレクサンダー  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ショルトツ, クリスティアン  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ミュンヒ, ペーター  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 タバレス, グロリア  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 グレック, マリオ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 リュブケ, ジルケ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ベンツ, ユリアーネ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンバルト 2, ロシュ ダイアグノスティックス  
ゲーエムベーハー

Fターム(参考) 4B064 AG32 CA19 CC24 DA15

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA11 DA86 EA53

FA74

专利名称(译)	可溶性和免疫反应性黄病毒ns1多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020517630A</a>	公开(公告)日	2020-06-18
申请号	JP2019556820	申请日	2018-04-23
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ファーツエルケ リーデルアレクサンダー ショルツクリスティアン ミュンヒペーター タバレスグロリア		
发明人	ファーツ,エルケ リーデル,アレクサンダー ショルツ,クリスティアン ミュンヒ,ペーター タバレス,グロリア グレック,マリオ リュブケ,ジルケ ベンツ,ユリアーネ		
IPC分类号	C07K14/18 C07K14/245 C07K19/00 C12P21/02 G01N33/569 G01N33/53 C12N15/40 C12N15/31 C12N15/62 C12N15/63		
CPC分类号	A61K39/12 C07K14/005 C12N2770/24134 G01N33/56983 G01N2333/185 G01N2469/20 C07K14/1825 C07K2319/33 C12N7/00 C12N2770/24031 C12N2770/24122 C12N2770/24131 G01N2800/26		
FI分类号	C07K14/18.ZNA C07K14/245 C07K19/00 C12P21/02.C G01N33/569.L G01N33/53.N C12N15/40 C12N15/31 C12N15/62.Z C12N15/63.Z		
F-TERM分类号	4B064/AG32 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA15 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	山本修 宮前徹 中西 基晴		
优先权	2017168197 2017-04-26 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明是适于在分离的生物样品中检测黄病毒抗体的多肽,其包含黄病毒NS1翼结构域特异性氨基酸序列,其中来自所述黄病毒的NS1β阶梯结构域的氨基酸。它涉及在所述多肽中不存在该序列的多肽。在一个实施方案中,黄病毒是寨卡病毒(ZIKV),西尼罗河病毒(WNV),1-4型登革热病毒(DENV1-4),tick传脑炎病毒(TBEV),黄热病毒(YFV)和 选自日本脑炎病毒(JEV)。另外,黄病毒NS1翼域特异性多肽的黄病毒NS1翼域特异性多肽的生产方法,检测对第一黄病毒种特异的抗体的方法是用于检测抗体的方法。还公开了用于检测包含黄病毒NS1翼域多肽的所述黄病毒抗体的用途和试剂盒。

(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2020-517630 (P2020-517630A) (43) 公表日 令和2年6月18日 (2020.6.18)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考) 4B064 4H045
C07K 14/18 (2006.01)	C07K 14/18 ZNA	
C07K 14/245 (2006.01)	C07K 14/245	
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	
G01N 33/569 (2006.01)	G01N 33/569 L	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (89) 翻訳文提出日 (88) 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・地域又は機関	特願2019-556820 (P2019-556820) 平成30年4月23日 (2018.4.23) 令和1年12月13日 (2019.12.13) PCT/EP2018/060330 W02018/197406 平成30年11月1日 (2018.11.1) 17168197.6 平成29年4月26日 (2017.4.26) 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 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ハーゼル・ 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 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】 可溶性および免疫反応性のフラビウイルスNS1ポリペプチド		

