

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ジカウイルスに対する抗体と強く反応し、かつそれらに特異的である単離されたペプチドのコレクションであって、配列番号 1 ~ 13 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列又はそれらの組み合わせを含む、単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 2】

前記ペプチドが、約 6 アミノ酸 ~ 12 アミノ酸の長さの範囲である、請求項 1 に記載の単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 3】

前記単離されたペプチドの 1 以上が、リガンド、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、酵素、若しくは金属ナノ粒子若しくはナノシェルにコンジュゲートされるか又はビオチン化される、請求項 1 に記載の単離ペプチドのコレクション。

【請求項 4】

前記単離されたペプチドの 1 以上が、固体支持体上に固定される、請求項 1 に記載の単離ペプチドのコレクション。

【請求項 5】

ジカウイルスに対する抗体と強く反応し、かつそれらに特異的である単離されたペプチドのコレクションであって、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含む、単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 6】

前記ペプチドが、約 6 アミノ酸 ~ 12 アミノ酸の長さの範囲である、請求項 5 に記載の単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 7】

前記単離されたペプチドの 1 以上が、リガンド、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、酵素、若しくは金属ナノ粒子若しくはナノシェルにコンジュゲートされるか又はビオチン化される、請求項 5 に記載の単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 8】

前記単離されたペプチドの 1 以上が、固体支持体上に固定される、請求項 5 に記載の単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 9】

アミノ酸配列の配列番号 14 ~ 22 を含むペプチドを含む、請求項 5 に記載の単離されたペプチドのコレクション。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の単離されたペプチドのコレクションを含むペプチドマイクロアレイ。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の単離されたペプチドのコレクションを含むペプチドマイクロアレイ。

【請求項 12】

請求項 9 に記載の単離されたペプチドのコレクションを含むペプチドマイクロアレイ。

【請求項 13】

ペプチドマイクロアレイであって、前記ペプチドが、アミノ酸配列の配列番号 1 を含むペプチド；又はアミノ酸配列の配列番号 2 ~ 13 を含むペプチドからなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列の配列番号 1 を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はアミノ酸配列の配列番号 2 ~ 13 を含むペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 つのペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセットを含む、ペプチドマイクロアレイ。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

配列番号 1 ~ 13 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むジカウイルスに対する抗体と強く反応し、かつそれらに特異的である単離されたペプチド。

【請求項 15】

アミノ酸配列の配列番号 1 を含むジカウイルスに対する抗体と強く反応し、かつそれらに特異的である単離されたペプチド。

【請求項 16】

試料中のジカウイルスに対する抗体の血清学的検出のための方法であって、

- a . 前記ペプチド (複数可) への前記抗体 (複数可) の結合を可能にするのに十分な条件下で、請求項 1 に記載のペプチドのコレクションと前記試料を接触させること ; 及び
- b . 前記コレクション中の前記 1 以上のペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出すること

を含み、前記複合体の形成が、ジカ抗原のエピトープに対する抗体が前記試料中に存在するという指標である、方法。

【請求項 17】

前記試料が、対象からのものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象が、ヒトの女性である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記対象が、妊娠しているか又は妊娠しようとしている、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が、ジカウイルスワクチン又は免疫調節剤を投与されたことがある試験対象である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象が、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で血清反応陽性の結果を有した、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記試料が、鼻咽頭吸引液、血液、脳脊髄液、唾液、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、心嚢液、及び腹水からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記試料が、血清、血漿又は尿である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記試料が、医薬品及び治療薬の開発のために使用される細胞、細胞培養物、細胞培地並びに組成物からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 25】

前記ペプチドのコレクションが、固体支持体に固定される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 26】

前記検出する工程が、ELISA アッセイを行うことを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

試料中のジカウイルスに対する抗体の血清学的検出のための方法であって、

- a . 前記ペプチド (複数可) への前記抗体 (複数可) の結合を可能にするのに十分な条件下で、請求項 5 に記載のペプチドのコレクションと前記試料を接触させること ; 及び
- b . 前記コレクション中の前記 1 以上のペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出すること

を含み、前記複合体の形成が、ジカ抗原のエピトープに対する抗体が前記試料中に存在するという指標である、方法。

【請求項 28】

前記試料が、対象からのものである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記対象が、ヒトの女性である、請求項 28 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 30】
前記対象が、妊娠しているか又は妊娠しようとしている、請求項 29 に記載の方法。
- 【請求項 31】
前記対象が、ジカウイルスワクチン又は免疫調節剤を投与されたことがある試験対象である、請求項 28 に記載の方法。
- 【請求項 32】
前記対象が、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) で血清反応陽性の結果を有した、請求項 28 に記載の方法。
- 【請求項 33】
前記試料が、鼻咽頭吸引液、血液、脳脊髄液、唾液、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、心嚢液、及び腹水からなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。 10
- 【請求項 34】
前記試料が、血清、血漿又は尿である、請求項 33 に記載の方法。
- 【請求項 35】
前記試料が、医薬品及び治療薬の開発のために使用される細胞、細胞培養物、細胞培地並びに組成物からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 36】
前記ペプチドのコレクションが、固体支持体に固定される、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 37】
前記検出する工程が、E L I S A アッセイを行うことを含む、請求項 27 に記載の方法 20
- 【請求項 38】
前記ペプチドのコレクションが、アミノ酸配列の配列番号 14 ~ 22 を含むペプチドを含む、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 39】
試料中のジカウイルスに対する抗体の血清学的検出のための方法であって、
a . 前記ペプチド (複数可) への前記抗体 (複数可) の結合を可能にするのに十分な条件下で、請求項 13 に記載のペプチドマイクロアレイと前記試料を接触させること；及び
b . 前記コレクション中の前記 1 以上のペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成を検出すること 30
を含み、前記複合体の形成が、ジカ抗原のエピトープに対する抗体が前記試料中に存在するという指標である、方法。
- 【請求項 40】
前記試料が、対象からのものである、請求項 39 に記載の方法。
- 【請求項 41】
前記対象が、ヒトの女性である、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 42】
前記対象が、妊娠しているか又は妊娠しようとしている、請求項 41 に記載の方法。
- 【請求項 43】
前記対象が、ジカウイルスワクチン又は免疫調節剤を投与されたことがある試験対象である、請求項 40 に記載の方法。 40
- 【請求項 44】
前記対象が、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) で血清反応陽性の結果を有した、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 45】
前記試料が、鼻咽頭吸引液、血液、脳脊髄液、唾液、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、心嚢液、及び腹水からなる群から選択される、請求項 40 に記載の方法。
- 【請求項 46】
前記試料が、血清、血漿又は尿である、請求項 45 に記載の方法。
- 【請求項 47】 50

前記試料が、医薬品及び治療薬の開発のために使用される細胞、細胞培養物、細胞培地並びに組成物からなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 48】

前記ペプチドのコレクションが、固体支持体に固定される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 49】

前記検出する工程が、E L I S A アッセイを行うことを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 50】

請求項 1 に記載の単離されたペプチドのコレクションを含むキット。

【請求項 51】

希釈剤及び緩衝液、標識コンジュゲート、特異的に結合した抗原又は抗体の検出のための他の試薬、他のシグナル発生試薬、コーティング試薬、捕捉試薬、洗浄試薬、及び使用のための説明書をさらに含む、請求項 50 に記載のキット。

【請求項 52】

請求項 5 に記載の単離されたペプチドのコレクションを含むキット。

【請求項 53】

希釈剤及び緩衝液、標識コンジュゲート、特異的に結合した抗原又は抗体の検出のための他の試薬、他のシグナル発生試薬、コーティング試薬、捕捉試薬、洗浄試薬、及び使用のための説明書からなる群から選択される 1 以上の追加の成分をさらに含む、請求項 52 に記載のキット。

【請求項 54】

請求項 13 に記載のペプチドマイクロアレイを含むキット。

【請求項 55】

希釈剤及び緩衝液、標識コンジュゲート、特異的に結合した抗原又は抗体の検出のための他の試薬、他のシグナル発生試薬、コーティング試薬、捕捉試薬、洗浄試薬、及び使用のための説明書からなる群から選択される 1 以上の追加の成分をさらに含む、請求項 54 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府支援の陳述

本発明は、N I H 認可番号 U 1 9 A I 1 0 9 7 6 1 の下で政府の支援を受けて行った。そのため、米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、ハイスループット血清学を用いるウイルスへの暴露の検出、特に、ジカウイルス (Z I K V) への曝露の検出の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

ジカウイルス (Z I K V) は、アフリカ、アジア、及びアメリカを含むいくつかの主要な大陸に影響を及ぼす蚊媒介性新興ウイルスであり、世界保健機関 (W H O) によって世界的な緊急事態とみなされている。Z I K V 感染症は、小頭症、頭蓋内石灰化、及び胎児脳破壊などが相次いで起こる重度の胎児脳の異常並びに眼の異常の原因として関連しているので、妊娠中の女性にとってリスクが高い (R a s m u s s e n ら、2016)。また、Z I K V 感染症は、おそらくギラン・バレー症候群のリスクの増大を誘発する (B r o u t e t ら、2016)。

【0004】

都市及び郊外の環境において、Z I K V は、ヒト - 蚊 - ヒトの伝染サイクルで伝染する。蚊の伝染に加えて、Z I K V が妊娠中に母親から胎児に伝染され得るという証拠が示されている。さらに、パートナーへの性的伝染も報告されている。最後に、輸血を介する Z

10

20

30

40

50

IKVの伝染は報告されていないが、この経路を介する他の関連するフラビウウイルスの伝染を考慮すると、それが生じる可能性はある。

【0005】

ジカウイルスは、デング熱ウイルス(DENV)と密接に関連するフラビウウイルスである。ZIKV診断は、臨床症状及び疫学的関連に基づく場合が多い。ジカウイルス及びデング熱ウイルス、並びに他のウイルス、すなわち、西ナイルウイルス(フラビウウイルス)及びチクングニアウイルス(アルファウイルス)感染症も、同様の臨床症状を示すことから、鑑別診断が難しい。ジカウイルス遺伝子産物の検出のための分子アッセイは、活性のある感染の診断に有用であるが、急性感染がクリアされた後に子宮での子供の発達に影響を及ぼす可能性がある歴史的感染症について洞察することはできない。現在の血清学的アッセイにおけるZIKVとDENV間の交差反応性は、感染症の有病率及び疾患との関連を調査する臨床診断並びに努力を混乱させる。実際、米国疾病管理予防センターは、現在のZIKV ELISAで血清陽性と判明した全ての試料をブランク減少中和試験(PRNT)で検証することを勧めている。PRNTは、高価で、労働集約的であり、生きているウイルスを必要とするので、PRNTは、臨床微生物検査室で実施することが困難である。

10

【0006】

また、ZIKV用のワクチンは、研究の最前線にある。これらのワクチンが開発されているので、そのようなワクチンの有効性を試験するための迅速で信頼性の高いアッセイが必要とされている。

20

【0007】

したがって、ZIKV曝露の診断のための、高感度で、特異的で、かつ安価なハイスループット血清学的アッセイが必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、特定のウイルスへの曝露及び特定のウイルスによる感染を検出するための組成物、方法、装置、及びキットを提供する。具体的には、本発明は、ウイルスへの曝露及びウイルスによる感染の迅速で、差別的な血清学的検出を可能にする。特に、本発明は、ジカウイルス(ZIKV)への曝露及びジカウイルス(ZIKV)による感染の迅速な血清学的検出を可能にする。

30

【0009】

ZIKVへの曝露、及びZIKVによる感染の検出のための組成物、方法、装置、及びキットは、単離された及び単離されない特異的ペプチドを含み、それはZIKVと強く反応し、ZIKVに特異的であり、すなわち、ZIKVに対する抗体の反応性で特異的なエピトープである。

【0010】

1つのそのようなペプチドは、ZIKVのNS2B領域で特定された。それは、回復期血清試料中のZIKVに90%超特異的である。このペプチドは、アミノ酸配列：DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を有する。

40

【0011】

したがって、本発明の一実施形態はペプチドであり、それはZIKV抗体と反応し、ZIKV抗体に対して特異的であり、アミノ酸配列：DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである(配列番号1))を含む。

【0012】

回復期血清試料中のZIKV抗体と50%超特異的である12種の他のペプチドも、ZIKVプロテオームで特定された。

【0013】

したがって、本発明のさらなる実施形態は、表2に記載のZIKV抗体と反応し、ZIKV抗体に特異的である12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択され

50

るペプチドである。

【0014】

本発明のさらなる実施形態は、アミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A (式中、XはV又はIである) (配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14~22)のコレクション又はセットである。これらのコレクション又はセットは、6個のアミノ酸長、7個のアミノ酸長、8個のアミノ酸長、9個のアミノ酸長、10個のアミノ酸長、11個のアミノ酸長、及び最高で12個のアミノ酸長を含むか若しくはそれらからなるペプチドを含むか、又はそれらからなり得る。

【0015】

本発明のさらなる実施形態は、表2に記載のZ I K V抗体と反応し、Z I K V抗体に特異的である12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択される1以上のペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション又はセットである。これらのコレクション又はセットは、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、及び最高で12アミノ酸長を含むか若しくはそれらからなるペプチドを含むか、又はそれらからなり得る。

【0016】

一実施形態において、ペプチドのコレクション又はセットは、Z I K V抗体と反応し、Z I K V抗体に特異的である13種のペプチド(配列番号1~13)の全ての全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むか又はそれらからなるペプチドの全てを含む。

【0017】

これらの様々なペプチドのコレクション又はセットは、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、及び最高で12アミノ酸長又はそれより多くを含むか若しくはそれらからなるペプチドを含むか、又はそれらからなり得る。

【0018】

本発明で使用するペプチドの数は、2ペプチド~数千、2ペプチド~数万、2ペプチド~数十万の範囲であり得る。

【0019】

別の態様において、本発明は、本発明の2以上のペプチドを含む組成物を提供する。

【0020】

別の態様において、本発明は、本発明のペプチドをコードする配列を含む核酸を提供する。加えて、本発明は、そのような核酸を含むベクター、及びそのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。特定の実施形態において、ベクターは、シャトルベクターである。他の実施形態において、ベクターは、発現ベクター(例えば、細菌又は真核生物の発現ベクター)である。特定の実施形態において、宿主細胞は細菌細胞である。他の実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。

【0021】

非限定的な例において、Z I K Vに対する抗体は任意の数の免疫検出技術を用いて検出されてよく、それらはウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、側方流動、ディップスティックタイプのアッセイ若しくはSNAP試験、様々な種類の多重抗体検出技術、又は目的の抗体を検出するのに適切なそのようなアッセイの任意の改変型を含むが、これらに限定されない。Z I K Vに対する患者の抗体は、IgG又はIgA、又は他の免疫グロブリンのクラス若しくはサブタイプであり得る。

【0022】

一実施形態において、免疫検出技術は、プログラム可能なペプチドアレイの形態である。

【0023】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、固体支持体上に取り付けられるか、又は固定される。一実施形態において、本発明のペプチドは、金属ナノ層を介して固体支持

10

20

30

40

50

体に取り付けられる。特定の実施形態において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、金属ナノ粒子又はナノシェル、又はラテックスビーズ）、側方流動免疫アッセイ装置（例えば、多孔質膜）内の流路、プロット（例えば、ウエスタンプロット、スロットプロット、又はドットプロット）、分析ローター又は遠心ローター内の流路、又は管若しくはウェル（例えば、ELISAアッセイ又はマイクロアレイに適するプレート中の）である。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、単離された（例えば、合成の及び/又は精製された）ペプチドである。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、リガンドにコンジュゲートされる。例えば、特定の実施形態において、ペプチドはビオチン化される。他の実施形態において、ペプチドは、ストレプトアビジン、アビジン、又はニュートラアビジンにコンジュゲートされる。他の実施形態において、ペプチドは、担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、又は免疫グロブリンのFcドメイン）にコンジュゲートされる。

10

20

30

40

50

【0024】

本発明の特定の一実施形態は、ペプチドを含むペプチドマイクロアレイであり、ペプチドはZIKV抗体と反応し、ZIKV抗体に特異的である。いくつかの実施形態において、ペプチドマイクロアレイは、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（式中、XはV又はIである）（配列番号1）を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド（配列番号2～13）からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（式中、XはV又はIである）（配列番号1）を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド（すなわち、配列番号14～22）のコレクション若しくはセット；表2に記載の12種のペプチドからなる群から選択される1以上のペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド（すなわち、配列番号2～13）のコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む。

【0025】

別の態様において、本発明は装置を提供する。特定の実施形態において、装置は、免疫アッセイを行うのに有用である。例えば、特定の実施形態において、装置は、側方流動免疫アッセイ装置である。他の実施形態において、装置は、分析ローター又は遠心ローターである。他の実施形態において、装置は、管又は、例えば、ELISAアッセイ又はマイクロアレイに適するプレート中のウェルである。さらに他の実施形態において、装置は、電気化学センサー、光センサー、又は光電子センサーである。

【0026】

特定の実施形態において、装置は、本発明の少なくとも1つのペプチドを含む。他の実施形態において、装置は、本明細書に記載の本発明のペプチドのコレクション又はセットを含む。特定の実施形態において、ペプチドは、装置に取り付けられるか、又は固定される。

【0027】

別の態様において、本発明は、ジカ抗原のエピトープに対する抗体を試料中で検出する方法を提供する。特定の実施形態において、本方法は、本発明の1以上のペプチドと試料を接触させること、及び上記ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出することを含み、上記複合体の形成は、ジカ抗原のエピトープに対する抗体が上記試料中に存在するという指標である。特定の実施形態において、本方法は、本発明の異なるペプチドのコレクション又はセットと試料を接触させることを含む。特定の実施形態において、本方法は、本発明のペプチドの全てのコレクション又はセットと試料を接触させることを含む。

【0028】

本発明のさらなる実施形態は、ZIKVへの暴露及び/又はZIKVによる感染の血清学的検出のための方法であって、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（式中、XはV又はIである）（配列番号1）を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド（配列番号2～13）からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（式中、XはV又はIである）（配列番号

1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14~22)のコレクション若しくはセット;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット;又はそれらの組み合わせを含むZIKV抗体と反応し、ZIKV抗体に特異的なペプチド又は複数のペプチドの使用を含む、方法である。

【0029】

本発明のさらなる実施形態において、試料中のZIKVへの暴露及び/又はZIKVによる感染の血清学的検出のための方法は、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択されるペプチド;又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14~22)のコレクション若しくはセット;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット;又はそれらの組み合わせを含むZIKV抗体と反応し、ZIKV抗体に特異的であるペプチド又は複数のペプチドと試料を接触させること、並びに試料中の抗ZIKV抗体とペプチド若しくは複数のペプチドの間の結合を検出すること、を含む。

10

【0030】

特定の実施形態において、コレクション若しくはセット中のペプチド又は各ペプチドは、単離された(例えば、合成の及び/又は精製された)ペプチドである。特定の実施形態において、ペプチド又はペプチドのコレクション若しくはセットは、固体支持体に取り付けられるか、又は固体支持体上に固定される。一実施形態において、ペプチド又はペプチドのコレクション若しくはセットは、金属(例えば、金)ナノ層を介して固体支持体に取り付けられる。特定の実施形態において、固体支持体は、ビーズ又は複数のビーズ(例えば、コロイド粒子、金属ナノ粒子又はナノシェル、又はラテックスビーズ)、側方流動免疫アッセイ装置(例えば、多孔質膜)内の流路、分析ローター又は遠心ローター内の流路、プロット(例えば、ウエスタンプロット、スロットプロット、又はドットプロット)、又は管若しくはウェル(例えば、ELISAアッセイ又はマイクロアレイに適するプレート中の)である。特定の実施形態において、固体支持体は、金属、ガラス、セルロース系材料(例えば、ニトロセルロース)、又はポリマー(例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、又はポリスルホン)を含む。

20

30

【0031】

本発明のさらなる実施形態は、ZIKVへの暴露及び/又はZIKVによる感染の血清学的検出のための方法であって、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択されるペプチド;又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14~22)のコレクション若しくはセット;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット;又はそれらの組み合わせを含むZIKV抗体と反応し、ZIKV抗体に特異的であるペプチドを含むペプチドマイクロアレイの使用を含む、方法である。

40

【0032】

本発明のさらなる実施形態において、試料中のZIKVへの曝露及び/又はZIKVによる感染の血清学的検出のための方法は、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択されるペプチド;又はア

50

ミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A (式中、X は V 又は I である) (配列番号 1) を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド (すなわち、配列番号 1 4 ~ 2 2) のコレクション若しくはセット ; 又は表 2 に記載の 1 2 種のペプチド (配列番号 2 ~ 1 3) からなる群から選択される少なくとも 1 つのペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット ; 又はそれらの組み合わせを含む Z I K V 抗体と反応し、Z I K V 抗体に特異的であるペプチドを含むペプチドマイクロアレイと試料を接触させること、並びに試料中の抗 Z I K V 抗体とマイクロアレイ中のペプチド又は複数のペプチドの間の結合を検出すること、を含む。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態において、検出する工程は、E L I S A アッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出する工程は、側方流動免疫アッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出する工程は、凝集アッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出する工程は、分析ローター又は遠心ローターで試料を回転させることを含む。他の実施形態において、検出する工程は、ウエスタンブロット、スロットブロット、又はドットブロットを用いて試料を分析することを含む。さらに他の実施形態において、検出する工程は、電気化学センサー、光センサー、又は光電子センサーを用いて試料を分析することを含む。特定の実施形態において、検出する工程は、波長シフトアッセイを行うことを含む。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列の配列番号 1 ~ 1 3 からなる。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態において、アミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A (式中、X は V 又は I である) (配列番号 1) を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセットは、アミノ酸配列の配列番号 1 4 ~ 2 2 を含むか又はそれらからなる 1 2 m e r のペプチドを含む。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、Z I K V への暴露及び / 又は Z I K V による感染の血清学的検出のためのシステム並びにキットを含む。

【 0 0 3 7 】

本発明を説明する目的のために、図面には本発明の特定の実施形態が示される。しかしながら、本発明は、図面に示された実施形態の正確な配置及び手段に限定されない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 8 】

【 図 1 A 】 免疫反応性ペプチド (配列番号 1) が N S 2 B 領域中のジカウイルスに特異的かつ特徴的な免疫反応性エピトープであり、アミノ酸配列 D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A (配列番号 1) を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたペプチド (配列番号 1 4 ~ 2 2) のセットも、ジカウイルスに特異的かつ特徴的であることを示す棒グラフである。各試料についての各バーは、配列番号 1 4 ~ 2 2 を表す。

【 図 1 B 】 免疫反応性ペプチド (配列番号 1) が N S 2 B 領域中のジカウイルスに特異的かつ特徴的な免疫反応性エピトープであり、N S 2 b エピトープのバリンからイソロイシンへの変異が反応性、特異性又は特徴的な特性に対して影響を及ぼさないことを示す棒グラフである。アミノ酸配列 D I T W E K D A E I T G N S P R L D V A (配列番号 1) を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたペプチド (配列番号 1 4 ~ 2 2) のセットも、ジカウイルスに特異的かつ特徴的である。各試料についての各バーは、配列番号 1 4 ~ 2 2 を表す。

【 図 2 】 市販の E L I S A アッセイと本発明のペプチド (配列番号 1) を用いる E L I S A アッセイの比較の結果を示すグラフである。グラフは、市販の E L I S A (右側のバー) 及び本発明のペプチド (配列番号 1) を用いる E L I S A アッセイ (左側のバー) によ

10

20

30

40

50

って検出された既知のジカ陽性血清の割合を示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

定義

本発明の文脈及び各用語が使用される特定の文脈内の本明細書で使用される用語は、一般に、当技術分野におけるそれらの通常の意味を有する。特定の用語は、本発明の方法及びその使用方法を説明する際に実施者に追加の指針を提供するために、以下又は本明細書の他の箇所で説明される。さらに、同じことを複数の方法で言うことができることを理解されたい。それ故に、別の言語及び同義語は、本明細書で説明される用語のいずれか1以上のために使用され得、用語が本明細書中で詳述又は説明されるか否かに特別な意味は置かれられない。特定の用語の同義語が提供される。1以上の同義語の列挙は、他の同義語の使用を排除するものではない。本明細書で説明される任意の用語の例を含めて、本明細書の他の箇所での例の使用は、単なる例示であり、本発明の範囲及び意味又は任意の例示的な用語を決して限定するものではない。同様に、本発明は、その好ましい実施形態に限定されない。

10

【0040】

本明細書で使用する用語「試料」は、抗体、特に、ZIKVに対する抗体を含有する又は含有することが推定される任意の物質を意味する。試料は、天然又は合成起源のものであり得、当業者に公知の任意の手段によって取得できる。試料は、血漿、血清、全血、脊髄液、精液、羊水、リンパ液、滑液、尿、涙、血球、器官、及び組織を含むが、これらに限定されない、対象から単離された組織又は体液の試料であり得る。試料は、研究試料、臨床試料、又は環境試料であり得る。試料はまた、輸血又は治療に使用される血液生成物であり得る。試料はまた、合成のものであり得、馴化培地、組換え細胞、及び細胞成分を含むがこれらに限定されないインビトロ細胞培養成分を含むが、これらに限定されない。

20

【0041】

本明細書で使用する用語「対象」は、マウス、ラット、イヌ、モルモット、フェレット、ウサギ及び霊長類などの哺乳動物を含むが、これらに限定されない任意の生物を意味する。好ましい実施形態において、対象は、ヒト、ペット又は家畜動物である。

【0042】

本出願で使用される用語「患者」は、ヒト対象を意味する。

30

【0043】

本明細書で使用する用語「検出」、「検出する」、及び「検出すること」などは、本明細書では、その存在 (presence) 又は存在 (existence) を見出す手段を意味する。

【0044】

本明細書で使用する用語「特定」、「特定する」、及び「特定すること」などは、対象からの試料中の特定のウイルス又は複数のウイルスへの曝露を認識することを意味する。

【0045】

用語「ペプチド」は、2以上のアミノ酸の任意の配列を含む。本明細書に具体的に列挙されるペプチド配列は、左側にアミノ末端及び右側にカルボキシ末端で書かれている。

40

【0046】

用語「アミノ酸」は、D型又はL型の天然アミノ酸 (例えば、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Hyl、Hyp、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、及びVal)、並びに非天然アミノ酸 (例えば、ホスホセリン、ホスホスレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタミン酸、馬尿酸、オクタヒドロインドール-2-カルボン酸、スタチン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、ペニシラミン、オルニチン、シトルリン、 β -メチルアラニン、パラ-ベンゾイルフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパルギルグリシン、サルコシン、及びtert-ブチルグリシン) の残基を含む。この用語はまた、従来のアミノ保護基 (例えば、アセチ

50

ルオキシカルボニル又はベンジルオキシカルボニル)を有する天然及び非天然アミノ酸、並びにカルボキシ末端が保護される(例えば、(C₁~C₆)アルキル、フェニル又はベンジルエステル又はアミドなどで)天然及び非天然アミノ酸を含む。

【0047】

「抗原」(抗体作製からの)又は「免疫原」は、抗体の作製を促進し免疫応答を引き起こすことができる物質である。それらはまた、診断又は患者の選択又は特徴付けの目的のために使用できる。

【0048】

抗体(免疫グロブリン(Ig)としても知られる)は、脊椎動物の血液又は他の体液に見られるグロブリンタンパク質であり、細菌及びウイルスなどの異物を特定し中和するために免疫系によって使用される。これらは典型的には、各々2つの大きな重鎖及び2つの小さな軽鎖を有する基本的な構造単位で作られて、例えば、1つの単位を有するモノマー、2つの単位を有するダイマー又は5つの単位を有するペントマーを形成する。抗体は、B細胞によって生成される。いくつかの異なる種類の抗体重鎖、及びいくつかの異なる種類の抗体が存在し、抗体はそれらが有する重鎖に基づいて異なるアイソタイプにグループ化される。5つの異なる抗体アイソタイプが哺乳類で知られており、それらは異なる役割を果たし、それらが出会うそれぞれ異なる種類の異物に対する適切な免疫応答を指示するのを助ける。

10

【0049】

全ての抗体の一般的な構造は非常に類似しているが、タンパク質の先端の小領域は非常に可変であり、わずかに異なる先端構造を有する何百万の抗体が存在することを可能にする。この領域は、超可変領域として知られている。これらの変異体のそれぞれは、抗原として知られる異なる標的に結合できる。抗体のこの巨大な多様性は、免疫系が抗原の同じように広い多様性を認識するのを可能にする。抗体によって認識される抗原の部分は、「エピトープ」と呼ばれる。これらのエピトープは、誘導適合と呼ばれる高度に特異的な相互作用でそれらの抗体と結合し、これは、抗体が生物を構成する何百万もの異なる分子の中で適合抗原(複数可)中のそれらの特異的エピトープのみを特定し及び結合するのを可能にする。抗体による抗原の認識は、免疫系の他の部分による攻撃のために抗原をタグ付けする。抗体はまた、例えば、病原体が感染症を引き起こすのに必要とする病原体の一部に結合することによって、標的を直接中和することができる。抗体の生成は、体液性免疫系の主な機能である。

20

30

【0050】

本明細書で使用する用語「単離された」などは、参照材料が通常見出される天然の環境で見出される成分を、材料が含まないことを意味する。特に、単離された生物材料は、細胞成分を含まない。単離されたペプチド又はタンパク質は、他のタンパク質又は核酸、又はその両方と結合し得、それらと細胞内で結合するか、又はそれが膜結合タンパク質である場合は細胞膜と結合する。単離された材料は、精製されてよいが、その必要はない。

【0051】

本明細書で使用する用語「実質的に精製された」は、細胞物質(タンパク質、脂質、炭水化物、核酸)、培地、化学的前駆体、ペプチドの合成に使用される化学物質、又はそれらの組み合わせを実質的に含まない、ペプチドなどの分子を指す。実質的に精製されたペプチドは、細胞性物質、培地、他のポリペプチド、化学物質前駆体、及び/又はペプチドの合成に使用される化学物質の約40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、又は1%以下を有する。したがって、ペプチドなどの、実質的に純粋な分子は、関心のある分子の乾燥重量で、少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%であり得る。

40

【0052】

用語「約」又は「およそ」は、当業者によって決定される特定の値の許容誤差範囲内を意味し、それは値が測定又は決定される方法、すなわち、測定システムの限界、すなわち、医薬製剤などの特定の目的に要求される精度の程度に部分的に依存する。例えば、「約

50

」は、当技術分野における実施あたり1以内又は1超の標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所定の値の最高20%、好ましくは最高で10%、より好ましくは最高で5%、及びより好ましくは最高で1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に生物システム又はプロセスに関して、この用語は、値の好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内の桁内を意味し得る。特定の値が明細書及び特許請求の範囲に記載されている場合、特に断りのない限り、特定の値の許容誤差範囲内を意味する用語「約」が想定されるべきである。

【0053】

本発明は、対象の病原体の曝露歴をプロファイリングするための新しい血清学的アッセイプラットフォームを確立することにより、ZIKVの鑑別診断及び管理を強化する。

10

【0054】

ポリメラーゼ連鎖反応及びハイスループットスクリーニングなどの技術における進歩が、過去20年間で感度、特異性及び幅を劇的に改善した分子診断とは対照的に、血清学的方法は、ほとんど変わらないままであった。この遅れは、感染症の分布及び頻度の確立、薬剤の発見と疾患の関連の重要性の試験、及び病原体の発見における努力の集中における血清学の役割を考慮すると、重大である。本明細書に記載されるのは、特にZIKVの診断血清検査の第1の高感度で、公平で、高度に多重化されたプラットフォームである。このペプチドアレイベースのプラットフォームは、感染症による急性及び慢性疾患の疫学並びに病因を調査するための、並びにワクチン及び免疫調節薬に対する体液性応答を監視するための新たな戦略を可能にする。それは、側方流動免疫アッセイを含む確立された安価な代替プラットフォームで使用できる重要な有益ペプチドの迅速な選択のためのスクリーニングツールとしても機能する。そのような適用は、感染性疾患のレトロスペクティブな鑑別診断を可能にすること（原因物質の遺伝的足跡がもはや存在しない場合）、アウトブレイクの調査及び監視を容易にすることにより、臨床医学と公衆衛生の両方に実用的な有用性を有する。

20

【0055】

これは、患者がもはや急性感染の証拠、例えば、ウイルス核酸を有しないが、胎児に影響を与えるか又は別の病気、例えば、ギラン・バレー症候群の原因である可能性があるZIKV感染症を過去に有したことがあるようなZIKVによる感染において特に有用である。

30

【0056】

本発明は、1残基シフトされる12merのペプチド（例えば、残基1~12、2~13、3~14）のスライディングウィンドウでウイルスプロテオームをタイル表示する戦略を使用して開発されたアッセイである。目標は、ジカに特異的かつ感受性があるペプチドを取得することであった。そのようなペプチドは、ZIKV感染の確認された病歴を有する患者における抗体の検出に特異的で、かつ約85%感受性である、ジカウイルスのNS2B領域から得られた。同じタイリング戦略は、NS1及びエンベロープタンパク質を含むZIKVプロテオームの他の領域に対応するより短いペプチド（6、7、8、9又は10個のアミノ酸長）を合成するために使用できる。

【0057】

ZIKV抗体に特異的で感受性のある単離ペプチド（ZIKV反応性ペプチド）

本発明は、患者試料中のZIKVに対する抗体と強く反応し、それらに感受性である単離ペプチドを含む。これらのペプチドは、ZIKVに対する抗体の存在についてスクリーニングするための、かつ対象がZIKVによる感染及び/又はZIKVへの曝露を有したことがあるかどうかを決定するための、現在知られているか若しくは後に開発される、任意の種類血清学的アッセイ又はプラットフォームで使用できる。これらのペプチドはまた、ワクチン及び免疫調節薬に対する体液性応答について試験し監視するためにも使用でき、したがってZIKVの治療及び予防薬の開発に有用である。

40

【0058】

本発明の一実施形態は、登録番号ZIKV__AY632535__AAV34151の1

50

426～1434でのZIKVのNS2B領域において特定され、1426-DITWEKDAEVTGNSPRLDVA-1434のアミノ酸配列(配列番号1)を有する単離ペプチドである。このペプチドは、実験例に示されるように特定され、ジカ回復期血清試料と90%超特異的である。

【0059】

さらに、いくつかのジカウイルスは、アミノ酸1439でのバリンがイソロイシンである変異、すなわち、1426-DITWEKDAEITGNSPRLDVA-1434(配列番号1)を有する。この変異を有するペプチドは、以下に示すように試験され、変異はペプチドアレイ又はELISAの結果に影響を与えなかった(図1を参照されたい)。したがって、本明細書に記載されるように特定された単離ペプチドは、10位にバリン又はイソロイシンのいずれかを有してよく、反応性及び特異性は依然として同じである。

10

【0060】

本発明のさらなる実施形態は、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション又はセットを含む。このコレクションは、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、及び最大12アミノ酸長であるペプチドを含有してよい。

【0061】

一実施形態において、セット又はコレクション内の各ペプチドは、12アミノ酸長である。ペプチドのコレクションは、以下のアミノ酸配列：

20

DITWEKDAEXTG 式中、XはV又はIである(配列番号14)；
 ITWEKDAEXTGN 式中、XはV又はIである(配列番号15)；
 TWEKDAEXTGNS 式中、XはV又はIである(配列番号16)；
 WEKDAEXTGNSP 式中、XはV又はIである(配列番号17)；
 EKDAEXTGNSPR 式中、XはV又はIである(配列番号18)；
 KDAEXTGNSPRL 式中、XはV又はIである(配列番号19)；
 DAEXTGNSPRLD 式中、XはV又はIである(配列番号20)；
 AEXTGNSPRLDV 式中、XはV又はIである(配列番号21)；及び
 EXTGNSPRLDVA 式中、XはV又はIである(配列番号22)；
 を有するペプチドを含む。

30

【0062】

本発明はまた、ジカ回復期血清試料と50%超特異的である12種の追加の単離ペプチドを含む。

【0063】

これらの追加の単離ペプチドは、表2に列挙され、配列番号2～13を含む。

【0064】

本発明の他の実施形態は、これらの12種のペプチドの1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個又は全12個の全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むか若しくはそれらからなる単離ペプチドのコレクション又はセットを含む。これらのコレクション又はセットは、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、及び最高で12アミノ酸長を含むか又はそれらからなる単離ペプチドを含むか、又はそれらからなり得る。

40

【0065】

抗体が5～9アミノ酸長の範囲の直鎖状ペプチド配列に結合し、かつ標的が追加のアミノ酸に隣接する場合に最も効率的に結合することを示す研究に基づき、12個のアミノ酸のペプチドが好ましい(Buusら、2012)。しかしながら、12アミノ酸長未満、及び12アミノ酸長超を含有するペプチドを使用できる。13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、最高で25アミノ酸長、最高で30アミノ酸長、最高で35アミノ酸長、最高で40アミノ酸長、及び最高で50アミノ酸長のペプチドを使用できる。

50

【0066】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、合成化学によって生成される（すなわち、「合成ペプチド」）。他の実施形態において、本発明のペプチドは、生物学的に生成される。本発明の単離ペプチドは、例えば、キットの一部として、水中に、緩衝液中に、又は再構成用の乾燥形態で存在し得る。本発明の単離ペプチドは、薬学的に許容される塩の形態であり得る。本発明のペプチドと塩を形成できる適切な酸及び塩基は、当業者に周知であり、無機及び有機の酸並びに無機及び有機の塩基を含む。

【0067】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは改変される。本発明のペプチドは、熱及び/又は界面活性剤（例えば、SDS）での変性などの様々な技術によって改変され得る。あるいは、本発明のペプチドは、1以上のさらなる部分との結合によって改変され得る。結合は、共有結合又は非共有結合であり得、例えば、リジン又はシステインなどの末端アミノ酸リンカー、化学的カップリング剤、又はペプチド結合を介するものであり得る。追加の部分は、例えば、リガンド、リガンド受容体、融合パートナー、検出標識、酵素、又はペプチドを固定化する基質であり得る。

10

【0068】

本発明のペプチドは、ビオチン（例えば、システイン又はリジン残基を介して）、脂質分子（例えば、システイン残基を介して）、又は担体タンパク質（例えば、システイン又はリジン残基を介する、例えば、血清アルブミン、免疫グロブリンFcドメイン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH））などのリガンドにコンジュゲートされてよい。ビオチンなどのリガンドへの接着は、アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンポリマー、又はニュートラアビジン（neutravidin）などのリガンド受容体を有するペプチドを結合するのに有用であり得る。アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンポリマー、又はニュートラアビジンは、次に、シグナル伝達部分（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）若しくはアルカリホスファターゼ（ALP）などの酵素、若しくは金属ナノ粒子若しくはナノシェル（例えば、金コロイド）などの可視化できる他の部分又は蛍光部分）、又は固体基板（例えば、ニトロセルロース膜）に連結され得る。あるいは、本発明のペプチドは、アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンポリマー、又はニュートラアビジンなどのリガンド受容体に融合又は連結されてよく、それによってビオチン及び任意の部分（例えば、シグナル伝達部分）などの対応するリガンド又はそれに接着される固体基板とのペプチドの結合を促進する。他のリガンド-受容体の対の例は、当技術分野で周知であり、同様に使用できる。

20

30

【0069】

本発明のペプチドは、精製を改善するため、宿主細胞においてペプチドの発現を増強するため、検出を支援するため、及びペプチドを安定化させるために使用できる融合パートナー（例えば、ペプチド又は他の部分）に融合されてよい。融合パートナーに適する化合物の例は、担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリンFcドメイン、KLH）、及び酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、 α -ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）を含む。融合は、ペプチド結合によって達成できる。例えば、本発明のペプチド及び融合パートナーは、融合タンパク質であり得、インフレイムで直接融合され得るか、又はペプチドリッカーを含んでよい。

40

【0070】

加えて、本発明のペプチドは、様々な既知の化学基又は分子のいずれかを含むように改変され得る。そのような改変は、グリコシル化、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、ポリエチレングリコールへの共有結合（例えば、PEG化）、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒ

50

ドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、ユビキチン化、脂肪酸での修飾、及びアルギニル化などのアミノ酸からタンパク質への転移RNA媒介性付加を含むが、これらに限定されない。アミノ酸の類似体（非天然アミノ酸を含む）及び置換された連結を有するペプチドも含まれる。本明細書に記載の配列のいずれかからなる本発明のペプチドは、記載の改変のいずれかによって改変され得る。そのようなペプチドは、依然として、アミノ酸を「含む」か、又はそれ「からなる」。

【0071】

上述したような改変は、当業者に周知であり、科学文献に非常に詳細に記載されている。

10

【0072】

ZIKV反応性ペプチドをコードする配列を含む核酸

別の態様において、本発明は、本発明のペプチドをコードする配列を含む核酸を提供する。本発明の核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。核酸は、RNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学的に合成されたRNA若しくはDNA、又はそれらの組み合わせであり得る。核酸は、タンパク質、脂質及び他のポリヌクレオチドなどの他の成分を含まないように精製できる。例えば、核酸は、50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%精製できる。本発明の核酸は、本明細書に記載のペプチドをコードする。特定の実施形態において、核酸は、配列番号1~24の配列を有するペプチドをコードする。本発明の核酸は、リンカー、シグナル配列、TMR輸送停止配列、膜貫通ドメイン、又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジントグ、及びブドウ球菌のプロテインAなどのタンパク質精製に有用なリガンドをコードする配列などの他のヌクレオチド配列を含んでよい。

20

【0073】

発現制御配列に作動可能に連結されたポリヌクレオチドを調製し、宿主細胞中でそれらを発現させる方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第4,366,246号を参照されたい。ポリヌクレオチドの転写及び/又は翻訳を指示する1以上の発現制御エレメントに隣接又は近接して配置される場合に、本発明の核酸は作動可能に連結される。

【0074】

したがって、例えば、本発明のペプチドは、従来の遺伝子工学的手法に従って、組換えにより生成できる。本発明の組換えペプチドを生成するために、ペプチドをコードする核酸が適切な発現系に挿入される。一般的に、選択されたペプチドをコードするポリヌクレオチド配列がペプチドの発現を可能にする発現制御配列に作動可能に連結される組換え分子又はベクターが、構築される。多くの種類の適切な発現ベクターは、当技術分野で知られており、例えば、細菌、ウイルス、酵母、真菌、昆虫又は哺乳動物発現系を含有するベクターを含む。そのような発現ベクターを取得し、使用方法は周知である。本発明の組成物又は方法に使用される様々な分子生物学技術におけるガイダンスについては、例えば、Sambrookら、分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory manual), 最新版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Millerら、遺伝子工学(Genetic Engineering), 8: 277-298 (Plenum Press, 最新版), Wuら、遺伝子バイオテクノロジーの方法(Methods in Gene Biotechnology) (CRC Press, New York, N.Y., 最新版)、分子生物学の方法の組換え遺伝子発現プロトコル(Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology)、62巻、(Tuan編集、Humana Press, Totowa, N.J., 最新版)、及び分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology), (Ausabelら、編集) John Wiley & Sons, N

30

40

50

Y (最新版)、及びそれらの中で引用される参考文献を参照されたい。

【0075】

したがって、本発明はまた、本発明の核酸を含むベクター、及びそのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。特定の実施形態において、ベクターはシャトルベクターである。他の実施形態において、ベクターは発現ベクター（例えば、細菌ベクター又は真核生物発現ベクター）である。特定の実施形態において、宿主細胞は細菌細胞である。他の実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。

【0076】

ZIKV反応性ペプチドを使用するためのプラットフォーム、アッセイ及び装置

本発明のペプチド又は複数のペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するための多数の異なる従来のアッセイがある。例えば、検出する工程は、ELISAアッセイを行うこと、免疫蛍光アッセイを行うこと、側方流動免疫アッセイを行うこと、凝集アッセイを行うこと、波長シフトアッセイを行うこと、ウェスタンブロット、スロットブロット、若しくはドットブロットを行うこと、分析ローター若しくは遠心ローターにおいて試料を分析すること、又は電気化学センサー、光センサー、若しくは光電子センサーで試料を分析すること、を含んでよい。これらの異なるアッセイは、本明細書に記載されており、かつ/又は当業者に周知である。

10

【0077】

したがって、本発明のペプチドは、ELISA、ルミネックス、ウェスタンブロットアッセイ、及びスポットペプチドアレイ、並びに後に開発されるそれらのプラットフォームを含むが、これらに限定されない抗体検出のための任意のアッセイ、フォーマット又はプラットフォームで使用できる。

20

【0078】

本発明の特定の実施形態において、アッセイは、試料中の抗体（複数可）を固定化すること；本発明のペプチドを添加すること；及び、例えば、標識されているペプチドによって、又は標識結合パートナー（例えば、ストレプトアビジンHRP若しくはストレプトアビジン金コロイド複合体）又はペプチドを特異的に認識する標識抗体などの標識物質を添加することによって、ペプチドに結合した抗体の割合を検出すること、を含む。

【0079】

他の実施形態において、アッセイは、本発明のペプチドを固定化すること；抗体を含有する試料を添加すること；及び、例えば、標識（例えば、金属ナノ粒子若しくは金属ナノシェル、蛍光標識、又は酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ））に直接又は間接的にコンジュゲートされた本発明の別のペプチドを添加することによって、又は結合パートナー若しくは試料抗体を特異的に認識する標識抗体（例えば、抗ヒトIgG抗体、又は抗ヒトIgM抗体）などの標識物質を添加することによって、ペプチドに結合した抗体の量を検出すること、を含む。

30

【0080】

他の実施形態において、アッセイは、本発明のペプチドを固定化すること；抗体を含有する試料を添加すること；及び、例えば、試料抗体（例えば、抗ヒトIgG抗体、又は抗ヒトIgM抗体）を特異的に認識する第一の結合パートナーを添加すること、及びさらに、標識され上記第1の結合パートナーを認識する第2の結合パートナーを添加することによって、ペプチドに結合した抗体の量を検出すること、を含む。

40

【0081】

さらに他の実施形態において、アッセイは、反応体が固定化されることなく、ペプチドと抗体含有試料を反応させること、その後、例えば、標識されているペプチドによって、又は標識結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン-HRP若しくはストレプトアビジン金コロイド複合体）又はペプチドを特異的に認識する標識抗体などの標識物質を添加することによって、抗体とペプチドの複合体の量を検出すること、を含む。

【0082】

本発明のペプチドの固定化は、共有結合又は非共有結合のいずれかであり得、非共有結

50

合固定化は、非特異的（例えば、マイクロタイターウェル中のポリスチレン表面への非特異的結合）であり得る。固体若しくは半固体の担体、支持体若しくは表面への特異的又は半特異的な結合は、固体若しくは半固体の担体、支持体若しくは表面へのその共有結合又は非共有結合を可能にする部分を有し、それと結合されるペプチドによって達成できる。例えば、この部分は、担体、支持体又は表面に接着される成分に対する親和性を有してよい。この場合、部分は、例えば、ペプチドのアミノ酸基に結合されるビオチン又はビオチニル基又はその類似体であり得、成分は、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、又はその類似体である。

【0083】

適切な担体、支持体、及び表面は、金属ナノ層、ビーズ（例えば、磁性ビーズ、コロイド粒子又は金属ナノ粒子又はナノシェル、例えば、金コロイド、又はシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、若しくはP D V Fを含む粒子又はナノ粒子）、スチレン-ジビニルベンゼン、ヒドロキシル化スチレン-ジビニルベンゼンなどの共重合体のラテックス、ポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、カーボンブラックのビーズ、非活性化又はポリスチレン又はポリ塩化ビニル活性化ガラス、エポキシ活性化多孔質磁性ガラス、ゼラチン又は多糖粒子又は他のタンパク質粒子、赤血球、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体又はそのような抗体のF a b断片を含むが、これらに限定されない。

10

【0084】

特異的抗体の検出のための抗原を用いる免疫アッセイのためのプロトコルは、当技術分野で周知である。例えば、従来サンドイッチアッセイを使用でき、又は従来競合的アッセイフォーマットを使用できる。

20

【0085】

特異的結合アッセイを行うための装置、特に、免疫アッセイは、公知であり、本発明の方法における使用のために容易に適合させることができる。固相アッセイ装置は、マイクロタイタープレート、フロースルーアッセイ装置（例えば、側方流動免疫アッセイ装置）、ディップスティック、及び免疫キャピラリー又は免疫クロマトグラフの免疫アッセイ装置を含む。

【0086】

本発明の実施形態において、固体若しくは半固体の表面又は担体は、マイクロタイターウェルの底又は壁、フィルタの表面又は膜（例えば、ニトロセルロース膜又はP V D F（ポリフッ化ビニリデン）膜）、中空系、ビーズクロマトグラフィー媒体（例えば、アガロース若しくはポリアクリルアミドゲル）、磁気ビーズ、繊維性セルロースマトリックス、H P L Cマトリックス、F P L Cマトリックス、それに結合されるペプチドを有する分子が、液相中に溶解又は分散される場合にフィルタによって保持できるような大きさの分子を有する物質、ミセルを形成するか又はミセルの形成に関与できミセルを伴うことなく液相を変更又は交換できる物質、水溶性ポリマー、又は任意の他の適切な担体、支持体若しくは表面である。

30

【0087】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、検出を可能にする適切な標識を備えている。単独で又は他の組成物若しくは化合物と共に、検出可能なシグナルを提供できる従来標識が、使用され得る。適切な標識は、酵素（例えば、H R P、 α -ガラクトシダーゼ、又はアルカリホスファターゼ）、蛍光標識、放射性標識、着色ラテックス粒子、及び金属コンジュゲート標識（例えば、金属ナノ層、金属ナノ粒子コンジュゲート標識又は金属ナノシェルコンジュゲート標識）を含むが、これらに限定されない。適切な金属ナノ粒子又は金属ナノシェル標識は、金粒子、銀粒子、銅粒子、白金粒子、カドミウム粒子、複合粒子、金中空球体、金コーティングシリカナノシェル、及びシリカコーティング金シェルを含むが、これらに限定されない。検出可能な層に適する金属ナノ層は、金、銀、銅、及び白金などのカドミウム、亜鉛、水銀、並びに貴金属で構成されるナノ層を含む。

40

50

【0088】

適切な検出方法は、比色アッセイを用いる、直接的又は間接的にタグ付けされた薬剤の検出（例えば、HRP又は β -ガラクトシダーゼ活性の検出）、光学顕微鏡、共焦点顕微鏡を含む免疫蛍光顕微鏡を用いる視覚的検査、又はフローサイトメトリー（FACS）、オートラジオグラフィー（例えば、放射性標識剤の検出のため）、電子顕微鏡、免疫染色、若しくは細胞内分画などによる検出を含むが、これらに限定されない。一実施形態において、放射性元素（例えば、放射性アミノ酸）は、ペプチド鎖に直接組み込まれる。別の実施形態において、蛍光標識は、ビオチン/アビジン相互作用、又はフルオレセインコンジュゲート抗体などとの結合を介してペプチドと結合される。一実施形態において、抗体のための検出可能な特異的結合パートナーは、混合物に添加される。例えば、結合パートナーは、第1の抗体に結合する検出可能な二次抗体又は他の結合剤（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインL、又はそれらの組み合わせ）であり得る。この二次抗体又は他の結合剤は、例えば、放射性、酵素、蛍光、発光、金属ナノ粒子又は金属ナノシェル（例えば、金コロイド）、又はアビジン/ビオチンシステムなどの他の検出可能な標識を用いて標識できる。別の実施形態において、結合パートナーは本発明のペプチドであり、それは西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ又は他のシグナル伝達部分などの酵素に直接的又は間接的にコンジュゲートできる。そのような実施形態において、検出可能なシグナルは、発色基質、蛍光発生基質、又は化学発光基質などの、検出可能なシグナルを生じる酵素の基質を添加することにより生成される。

10

【0089】

本発明のいくつかの実施形態において、検出手順は、色変化について抗体-ペプチド複合体を視覚的に検査すること、又は物理化学的变化について抗体-ペプチド複合体を検査することを含む。物理化学的变化は、酸化反応又は他の化学反応で生じ得る。それらは、分光光度計などを用いて、目測で検出され得る。

20

【0090】

1つのアッセイフォーマットは、側方流動免疫アッセイフォーマットである。ヒト又は動物の免疫グロブリンに対する抗体は、グラスファイバーパッド（試料適用パッド又はコンジュゲートパッド）上で乾燥され配置されるシグナルジェネレータ又はレポーター（例えば、金コロイド）で標識できる。診断用ペプチドは、ニトロセルロース又はPVDf（ポリフッ化ビニリデン）膜などの膜上に固定される。試料を試料添加パッドに添加すると（又はコンジュゲートパッドを通して流すと）、それは標識レポーターを溶解し、これが次いで、試料中の全ての抗体に結合する。得られた複合体は次いで、毛管作用によって次の膜（診断用ペプチド含有PVDf又はニトロセルロース）に輸送される。診断用ペプチドに対する抗体が存在する場合、それらは、膜上に露出された診断用ペプチドに結合し、それによりシグナル（例えば、見ることができるか又は視覚化できるバンド）を生じる。標識抗体又は第2の標識抗体に特異的なさらなる抗体を、対照シグナルを生成するために使用できる。

30

【0091】

側方流動免疫アッセイの別のフォーマットは、リガンド（例えば、ビオチン）にコンジュゲートされ標識されたリガンド受容体（例えば、ストレプトアビジン金コロイド）と複合体形成した本発明のペプチド又は組成物を含む。標識ペプチド複合体は、試料添加パッド又はコンジュゲートパッド上に配置できる。本発明の抗ヒトIgG/IgM抗体又は抗動物IgG/IgM抗体は、試験場所でPVDfのニトロセルロースなどの膜に固定される。試料が試料添加パッドに添加されると、試料中の抗体は標識されたペプチド複合体と反応し、その結果、本発明のペプチドに結合する抗体が間接的に標識されるようになる。試料中の抗体は次いで、毛管作用によって次の膜（診断用ペプチドを含有するPVDf又はニトロセルロース）に輸送され、固定された抗ヒトIgG/IgM抗体又は抗動物IgG/IgM抗体に結合する。試料抗体のいずれかが本発明の標識ペプチドに結合した場合、ペプチドと結合した標識は、試験場所で見えるか又は視覚化できる。

40

【0092】

50

血液生成物又は他の生理学的又は生物学的流体のスクリーニング用の別のアッセイは、酵素結合免疫吸着検定法、すなわち、E L I S Aである。典型的にE L I S Aでは、本発明の単離ペプチド又はペプチドのコレクション若しくはセットは、直接又は捕捉マトリックス（例えば、抗体）を介してマイクロタイターウェルの表面に吸着される。表面上に残っている非特異的タンパク質結合部位は次いで、ウシ血清アルブミン（B S A）、熱不活化正常ヤギ血清（N G S）、又はB L O T T O（防腐剤、塩、及び消泡剤も含有する脱脂粉乳の緩衝溶液）などの適切な薬剤でブロックされる。ウェルを次いで、特異的抗体を含有することが疑われる生体試料とインキュベートする。試料は、そのまま適用されるか、又はより頻繁には、B S A、N G S、又はB L O T T Oなどのタンパク質を少量（0.1～5.0重量%）含有する緩衝液中で通常、希釈できる。特異的結合が生じるのを可能にするのに十分な長さの時間インキュベートした後、ウェルを洗浄して未結合タンパク質を除去し、次いで、標準的な手順によって酵素又は他の標識にコンジュゲートされた最適濃度の適切な抗免疫グロブリン抗体とインキュベートし、ブロック緩衝液に溶解する。標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ（A L P）、及びグルコースオキシダーゼを含む、様々な酵素から選択できる。再び特異的結合が生じるのに十分な時間おき、次いでウェルを再び洗浄して未結合コンジュゲートを除去し、酵素に適する基質を添加する。発色させ、ウェルの内容物の光学密度を目視又は機器（適切な波長での測定）によって決定する。E L I S Aアッセイを行うための条件は、当技術分野で周知である。

10

【0093】

20

E L I S Aの別の実施形態において、本発明のペプチド又はペプチドのコレクション若しくはセットは、96ウェルE L I S Aプレートなどの表面上に固定される。試料を次いで添加し、アッセイを上記のように進める。

【0094】

さらに他の実施形態において、本発明のペプチド又はペプチドのコレクション若しくはセットを、ニトロセルロース紙上に電気プロット又はドットプロットする。続いて、生物学的流体（例えば、血清又は血漿）などの試料を、プロットされた抗原とインキュベートし、生物学的流体中の抗体を抗原（複数可）に結合させる。結合抗体を次いで、例えば、標準的な免疫酵素法によって、又は二次抗体若しくは他の抗体結合剤若しくはそれらの組み合わせに結合された金属ナノ粒子又はナノシェルを用いる可視化により検出できる。

30

【0095】

任意の数の従来のタンパク質アッセイフォーマット、特に、免疫アッセイフォーマットは、対象中のジカ抗体の検出のために、本発明の単離ペプチド並びに本発明のペプチドのコレクション及びセットを利用するように設計され得ることが当業者によって理解されるべきである。したがって本発明は、特定のアッセイフォーマットの選択によって制限されず、当業者に公知であるアッセイフォーマットを包含すると考えられる。これまでのほとんどの血清学的検査は、一重E L I S A、補体結合又は中和アッセイを用いて行われている。より最近では、同時に最高100個の抗原標的（すなわち、1つの病原体に対して100個の個々の病原体、100個の個々の抗原標的、又はそれらのいくつかのバリエーション）に対処できるルミネックスベースのシステムが採用されている（A n d e r s o n 40
ら、2011）。さらに、大腸菌、出芽酵母、バキュロウイルス、又は無細胞共役転写-翻訳系においてインビトロで発現された組換えタンパク質をスポットしたアレイが確立されている（V i g i lら、2010）。

【0096】

本発明の1つの目標は、Z I K V抗体検出のプロセスを自動化し、それを安価で迅速かつ正確にすること、並びに特定の病原体に対する体液性応答を厳密に特徴付けることよりも暴露そのものを検出することである。

【0097】

これらの要件を満たす1つのアッセイは、プログラム可能なペプチドアレイである。

【0098】

50

Z I K V に対する体液性免疫応答を測定でき、したがって Z I K V への曝露（又はワクチン中のその遺伝子産物）の検出を可能にするプログラム可能なアレイを作成及び検証するための 1 つの方法は、以下の：1）バイオインフォマティクス法を使用してウイルスペプチドを選択する；2）Z I K V の抗原に暴露されたヒト及び他の動物からの血清を使用して感度及び特異性についてアレイ上に印刷されたそれらのペプチドを試験する；3）エピトープ予測のために典型的に用いられるアルゴリズムの性能を調べる；4）アッセイの結果を使用して、より小さくより容易なプラットフォームで展開できるより小さくあまり包括的でないペプチドライブラリーを開発する；5）アッセイプロトコルを最適化及び検証する；並びに 6）アッセイ分析を自動化するためのソフトウェアを開発する、工程を含む。

10

【0099】

これらの工程を使用して、本発明のペプチドを作製した。

【0100】

ペプチドアレイ容量は、ガラススライドごとに複数のアレイを印刷するために利用できる（1、3、8、又は 12 種のアレイの構成を印刷できる）。

【0101】

したがって、本発明の一実施形態は、Z I K V 抗体と反応し、Z I K V 抗体に特異的なペプチドを含むペプチドマイクロアレイである。いくつかの実施形態において、ペプチドマイクロアレイは、アミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A（式中、X は V 又は I である）（配列番号 1）を含むペプチド；又は表 2 に記載の 12 種のペプチド（配列番号 2 ~ 13）からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A（式中、X は V 又は I である）（配列番号 1）を含むペプチドの全域で 1 残基シフトされたペプチド（すなわち、配列番号 14 ~ 22）のコレクション若しくはセット；又は表 2 に記載の 12 種のペプチド（配列番号 2 ~ 13）からなる群から選択される少なくとも 1 つのペプチド全域で 1 残基シフトされたペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む。

20

【0102】

本発明のさらなる実施形態は、アミノ酸配列（配列番号 14 ~ 22）を含むペプチドのコレクション又はセットを含むペプチドマイクロアレイである。

【0103】

いくつかの実施形態において、ペプチドアレイは、配列番号 1 ~ 13 のアミノ酸配列を含むか又はそれらからなるペプチドの全ての全域で 1 残基シフトされたアミノ酸配列を含む、ペプチドのセット又はコレクションを含む。

30

【0104】

Z I K V への曝露の血清学的検出のための方法及びシステム

本発明は、単離された及び単離されない本発明の様々なペプチド並びにペプチドマイクロアレイを利用して、任意の試料中の Z I K V の抗原、すなわち、Z I K V に対する抗体への曝露を検出するための方法並びにシステムを含む。

【0105】

適切な方法は典型的に、抗体を含有する可能性が高い体液又は組織の試料を受け取る又は取得すること（例えば、患者から）；特異的なペプチド - 抗体複合体の形成（例えば、抗体へのペプチドの特異的結合）に有効な条件下で、本発明のペプチド又は複数のペプチドとアッセイされる試料を接触させること（例えば、インキュベートする又は反応させる）；並びに抗体 - ペプチドの反応の存在について接触（反応）試料をアッセイすること（例えば、抗体 - ペプチド複合体の量を決定する）、を含む。上昇した量の抗体 - ペプチド複合体の存在は、対象がジカウイルスに曝露され、かつ感染したことを示す。ジカ抗原に対する抗体に「特異的に結合する」、その改変形態を含むペプチドは、抗体の検出を可能にする量で、かつ十分な時間の間、抗体と相互作用するか、又はそれとの物理的結合を形成するか若しくは物理的結合を受ける。

40

【0106】

50

それらが特異的に反応するように、ペプチド及び抗体を反応させるための条件は、当業者に周知である。例えば、免疫学における最新プロトコル(Current Protocols in Immunology (Coliganら、編集、John Wiley & Sons, Inc))を参照されたい。

【0107】

本発明のペプチド又は複数のペプチド及び試料抗体が、適切な媒体中で反応できるようになると、アッセイを行って抗体-ペプチド反応の有無を決定する。本明細書で論じたアッセイのいずれかを使用できる。

【0108】

本発明の方法及びシステムは、研究及び臨床設定においてZIKVの抗原に対する暴露を検出するために使用され得る。

10

【0109】

本方法で使用するための1つの試料は、生体試料である。生体試料は、鼻咽頭吸引液、血液、脳脊髄液、唾液、血清、血漿、尿、痰、気管支洗浄液、心嚢液、又は腹水、又は糞便などの固体を含むが、これらに限定されない対象の組織から又は対象の体液から取得され得る。好ましい生体試料は、血清、血漿及び尿である。対象は、ウシ、イヌ、ヒト、サル、マウス、ブタ、又はラットを含むが、これらに限定されない任意の動物、特に、脊椎動物、より具体的には、哺乳動物であり得る。一実施形態において、対象はヒトである。

【0110】

試料はまた、医薬品及び治療薬として使用するための、又は医薬品及び治療薬の開発のための細胞、細胞培養物、細胞培地、並びに組成物などの、研究試料、臨床試料、又は環境試料であり得る。

20

【0111】

追加の適用は、血液生成物のスクリーニング(例えば、感染性物質についての血液生成物のスクリーニング)の検出、生体防御、食品の安全性、環境汚染、法医学、及び遺伝的比較の研究を含むが、これらに限定されない。本発明はまた、医薬品及び治療薬の開発のために使用される細胞、細胞培養物、細胞培地並びに他の組成物においてウイルス抗体を検出するための方法並びにシステムを提供する。

【0112】

対象は、ZIKVの抗原に曝露されたことがあるか、ZIKVの抗原に曝露されている疑いがあるか、又はZIKVの抗原に曝露されたと考えられ得る。一実施形態において、対象は女性であり、さらなる実施形態において、女性対象は、妊娠しているか、又は妊娠しようとしていてよい。一実施形態において、対象は、ZIKV ELISAによって血清反応陽性であることが見出され得る。

30

【0113】

一実施形態において、対象は、ZIKVワクチン又は免疫調節剤を投与されたことがある、試験対象であり得る。

【0114】

本明細書に記載のシステム及び方法は、ZIKVに対する体液性免疫応答の検出及び測定を支持する。

40

【0115】

本発明の一実施形態は、任意の試料中で、ZIKVの抗原、すなわち、ZIKVに対する抗体への暴露を検出するためのシステムを提供する。システムは少なくとも1つのサブシステムを含み、サブシステムは本発明のペプチド若しくは複数のペプチド又は本発明のペプチドのコレクション若しくはセットを含み、それらはZIKV抗体と反応性があり、かつZIKV抗体に特異的であり、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド;又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2~13)からなる群から選択されるペプチド;又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわ

50

ち、配列番号14～22)のコレクション若しくはセット；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む。システムはまた、試料の調製；ペプチド(複数可)と試料中の任意のZIKV抗体の結合；未結合試料の洗浄；並びに結合抗体又は複数の抗体の可視化及び/又は定量化、の目的のために追加のサブシステムを含んでよい。

【0116】

本発明のさらなる実施形態は、任意の試料中で、ZIKVの抗原、すなわち、ZIKVに対する抗体への暴露の検出のためのシステムを提供する。システムは少なくとも1つのサブシステムを含み、サブシステムは本発明のペプチド若しくは複数のペプチド又は本発明のペプチドのコレクション若しくはセットを含むペプチドマイクロアレイを含み、それらはZIKV抗体と反応性があり、かつZIKV抗体に特異的でありアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14～22)のコレクション若しくはセット；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む。システムはまた、試料の調製；ペプチド(複数可)と試料中の任意のZIKV抗体の結合；未結合試料の洗浄；並びに結合抗体又は複数の抗体の可視化及び/又は定量化、の目的のために追加のサブシステムを含んでよい。

【0117】

本発明は、任意の試料中で、ZIKVの抗原、すなわち、ZIKVに対する抗体への暴露を検出するための方法を提供し、方法は試料中のZIKVに対する抗体とペプチドが結合するのに十分な条件下で、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14～22)のコレクション若しくはセット；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む、ZIKV抗体と反応性があり、かつZIKV抗体に特異的である、本発明のペプチド若しくは複数のペプチド又は本発明のペプチドのコレクション若しくはセットと試料を接触させる工程；及びペプチドに対する任意の結合抗体又は複数の抗体を可視化及び/又は定量化する工程、を含む。本方法は必要に応じて、未結合の試料を洗浄する工程を含んでよい。

【0118】

本発明は、任意の試料中で、ZIKVの抗原、すなわち、ZIKVに対する抗体への暴露を検出するための方法を提供し、方法は試料中のZIKVに対する抗体とペプチドが結合するのに十分な条件下で、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、XはV又はIである)(配列番号1)を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド(すなわち、配列番号14～22)のコレクション若しくはセット；又は表2に記載の12種のペプチド(配列番号2～13)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれら

10

20

30

40

50

の組み合わせを含む、ZIKV抗体と反応性があり、かつZIKV抗体に特異的である、本発明のペプチド若しくは複数のペプチド又は本発明のペプチドのコレクション若しくはセットを含むペプチドマイクロアレイと試料を接触させる工程；及びペプチドに対する任意の結合抗体又は複数の抗体を可視化及び/又は定量化する工程、を含む。本方法は、必要に応じて、未結合の試料を洗浄する工程を含んでよい。

【0119】

本明細書で論じるか、又は当技術分野で公知の任意の検出方法は、結合抗体を可視化及び/又は定量化するために使用できる。

【0120】

本発明の一実施形態において、システム及び方法で使用するためのペプチドは、アミノ酸配列の配列番号14～22を含むか、若しくはそれらからなるペプチドのコレクション又はセットを含む。

10

【0121】

本発明の一実施形態において、システム及び方法で使用するためのペプチドマイクロアレイは、アミノ酸配列の配列番号14～22を含むか又はそれらからなるペプチドのコレクションを含む。

【0122】

キット

本発明はまた、本発明の方法を実施するための試薬及びキットを含む。これらの試薬及びキットは異なり得る。

20

【0123】

キットの1種の試薬は本発明のペプチド若しくは複数のペプチド又は本発明のペプチドのコレクション若しくはセットであり、それらはZIKV抗体と反応性があり、かつZIKV抗体に特異的であり、アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（式中、XはV又はIである）（配列番号1）を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド（配列番号2～13）からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（式中、XはV又はIである）（配列番号1）を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド（すなわち、配列番号14～22）のコレクション若しくはセット；又は表2に記載の12種のペプチド（配列番号2～13）からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む。

30

【0124】

特定の実施形態において、ペプチドは、固体支持体に取り付けられるか、又は固体支持体上に固定される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、金属ナノ層（例えば、カドミウム、亜鉛、水銀、金、銀、銅、又は白金のナノ層）を介して固体支持体上に取り付けられるか、又は固体支持体上に固定される。特定の実施形態において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子又は金属ナノ粒子又はナノシェル）、側方流動免疫アッセイ装置の流路、分析ローター又は遠心ローター内の流路、管又はウェル（例えば、プレート中の）、又はセンサー（例えば、電気化学センサー、光センサー、又は光電子センサー）である。

40

【0125】

特定の種類のアッセイ用の試薬も、本発明のキット中に提供できる。したがって、キットは、ビーズ（例えば、凝集アッセイ又は側方流動アッセイに適する）の集団、又はプレート（例えば、ELISAアッセイに適するプレート）を含んでよい。他の実施形態において、キットは、側方流動免疫アッセイ装置、分析ローター又は遠心ローター、ウエスタンブロット、ドットブロット、スロットブロット、又は電気化学センサー、光センサー、又は光電子センサーなどの装置を含む。

【0126】

特定の一実施形態において、キットは本発明のペプチド若しくは複数のペプチド又は本

50

発明のペプチドのコレクション若しくはセットを含むペプチドマイクロアレイを含み、それらは Z I K V 抗体と反応性があり、かつ Z I K V 抗体に特異的であり、アミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A (式中、XはV又はIである) (配列番号1) を含むペプチド；又は表2に記載の12種のペプチド (配列番号2~13) からなる群から選択されるペプチド；又はアミノ酸配列 D I T W E K D A E X T G N S P R L D V A (式中、XはV又はIである) (配列番号1) を含むペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチド (すなわち、配列番号14~22) のコレクション若しくはセット；又は表2に記載の12種のペプチド (配列番号2~13) からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドの全域で1残基シフトされたアミノ酸配列を含むペプチドのコレクション若しくはセット；又はそれらの組み合わせを含む。

10

【0127】

加えて、キットは、様々な希釈剤及び緩衝液、特異的に結合した抗原若しくは抗体の検出のための標識コンジュゲート又は他の薬剤 (例えば、標識試薬)、並びに酵素基質、補因子及び色素原などの他のシグナル発生試薬を含んでよい。いくつかの実施形態において、キットは、標識試薬として、検出可能な標識 (例えば、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、金属ナノ層、フルオロフォア、着色ラテックス粒子、又は酵素) にコンジュゲートされた抗ヒト I g G / I g M 抗体を含む。他の実施形態において、キットは、標識試薬として、検出可能な標識 (例えば、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、金属ナノ層、フルオロフォア、着色ラテックス粒子、又は酵素) にコンジュゲートされたプロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G 融合タンパク質、プロテイン L、又はそれらの組み合わせを含む。

さらに他の実施形態において、キットの標識試薬は、検出可能な標識 (例えば、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、金属ナノ層、フルオロフォア、着色ラテックス粒子、又は酵素) にコンジュゲートされた本発明のペプチドの第2コレクション又はセットである。ペプチドの第2コレクション又はセットは、ペプチドのコレクション又はセットと同じであるか、又は異なり得、必要に応じて固体支持体に取り付けられるか、又は固体支持体上に固定され得る。

20

【0128】

キットの他の構成要素は、当業者が容易に決定できる。そのような構成要素は、コーティング試薬、本発明のペプチドに特異的なポリクローナル捕捉抗体若しくはモノクローナル捕捉抗体、又は基準としてのこれらの抗原の精製若しくは半精製された抽出物、モノクローナル抗体検出抗体、検出可能な標識にコンジュゲートされた抗マウス抗体、抗イヌ抗体、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、若しくは抗ヒト抗体のうちの2種以上のカクテル、比色比較用の指標の図表、使い捨て手袋、汚染除去説明書、アプリケーションスティック若しくは容器、試料準備カップ及びペプチド-抗体複合体の形成を可能にする反応媒体を構成するのに適切な緩衝液又は他の試薬を含み得る。

30

【0129】

そのようなキットは、ジカウイルスによる感染を診断するための臨床検査に、便利で効率的な方法を提供する。したがって、特定の実施形態において、キットはさらに説明書を含む。

40

【0130】

実施例

本発明は、本発明の好ましい実施形態をより完全に説明するために提示される以下の非限定的な実施例を参照することによってより良く理解され得る。これらは、決して、本発明の広い範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【0131】

実施例1 - Z I K V 及び追加のウイルスからの 12mer のペプチドの作製

ジカ (Z I K V)、チクングニア (C H I K V)、デング熱タイプ1~4 (D E N V 1~4)、西ナイル (W N V)、黄熱病 (Y F V)、及びオロブーシェ (O R O V) のウイルスの全プロテオームを表すために、12mer のペプチドを選択した (表1)。

【0132】

50

【表 1】

表 1 - 選択された 12mer のペプチド

	配列の数	ペプチド (1 つによ るオフセット)	特有のペプチド
ZIKV	178	120,438	10,284
CHIKV	573	670,061	17,378
DENV(1~4)	1,161	796,173	74,108
WNV	1,438	3,620,608	34,247
YFV	218	230,915	13,440
OROV	390	121,835	16,041
			165,498

10

【0133】

12マーの使用は、3つの考慮事項：1) 線状エピトープの抗体認識における主要決定要因及び文脈決定要因、2) プラットフォームの制約、並びに3) スポットペプチドアレイを用いる実験で得られた予備データ、を反映する。

【0134】

線状エピトープの抗体認識における主要決定要因及び文脈決定要因：

20

血清抗体は、5~9個の範囲のアミノ酸の線状ペプチド配列を結合し (Buusら、2012年)、標的に追加のアミノ酸が隣接している場合に最も効率的に結合する。

【0135】

プラットフォームの制約：

プラットフォームの現在の生成バージョンは、5~18個のアミノ酸のペプチドを最高で300万個収容する。合成の忠実度は、12マーについて99%を超え；この長さを超えるとコストは劇的に増加し忠実度は大幅に低下する。

【0136】

予備データ：

スポットされた12merのペプチドを用いて行った実験は、インフルエンザ、はしか、おたふく風邪及び風疹の予防接種を最近受けた人々が、スポットアレイ上の同族ペプチドによって検出できる血清抗体を有したことを裏付けた (Robinsonら、2002)。したがって、12マーのペプチドは、血清抗体によって認識される単一の線状エピトープを示し得る。

30

【0137】

ZIKV、CHIKV、DENV 1~4、WNV、YFV及びOROVのゲノム配列を、GenBankを含む公共データベースから抽出した。コード配列を用いて、1アミノ酸のオフセット及び11アミノ酸のオーバーラップを有する個々のウイルスのプロテオームをタイル表示する12アミノ酸のペプチドの組を設計した。

【0138】

パイロシーケンシングのために使用されるRoche NimbleGen (NG) プラットフォーム及びDNAを、ペプチドアレイプラットフォームのためにも使用できる。

40

【0139】

ペプチドのNGプラットフォームの使用のための理論的根拠は、以下の通りであった：1) NGアレイは、スライド当たり1~24個の範囲の別々のアレイの様々な構成で印刷でき、したがって、異なる試料又はプロトコルを、低コストで制御データを同時に提供するように試験できる；2) NGアレイは、75mm x 25mm (3インチ x 1インチ) のガラススライド上に印刷され、これは、標準的なスキャナの使用を可能にし、病理学及び微生物学研究室ですでに使用されているロボットを用いる自動化された臨床応用への移行を容易にする；かつ3) NGプラットフォームは、業界で最高の機能密度を提供する。印

50

刷プロセスは、本来の位置でペプチド合成を可能にするように適合されている。レーザー及び集束ミラーは、光活性化及び1ミクロンほどの小さな表面積中でのヌクレオチド又はアミノ酸のいずれかの正確な堆積を可能にする。

【0140】

特有のペプチド配列(165, 498+ランダム対照ペプチド)を、製造業者の説明書を用いてRoche-NimbleGenアレイ上に印刷した。アレイを、スライドあたり12個のサブアレイで印刷し、各々172, 000特徴の容量を有した。

【0141】

実施例2 - ZIKV抗体に特異的で感受性のあるペプチドの特定

免疫血清を、以下の3つの供給元：(1)米国ニューヨーク市保健精神衛生局；(2)ニカラグアの保健省；及び(3)Fundacaoオズヴァウド・クルスからの、ZIKV、DENV 1~4、及びCHIKVの自然感染の病歴を有するヒトから取得した。

10

【0142】

免疫血清を、ペプチドとインキュベートし、洗浄し、次いで蛍光標識二次抗体とインキュベートした。シグナルのスクリーン後に、生データを、対応するペプチドの情報(すなわち、位置、配列)を含有するヒートマップに変換した。

【0143】

図1Aは、単一のアルボウイルスアレイ上で試験した7種のヒト血清を示す。試料1~4は、ニカラグアからのDENVウイルス陽性血清であり、試料5は、健常対照からのものであり、試料6及び7は、ニカラグアからのZIKVウイルス陽性血清であった。試料を、ジカRNAが患者で検出された後の少なくとも3週間の時点で採取した。強い免疫反応性エピトープ(配列番号1)(426~1434、NS2B-DITWEKDAEVTGNSPRLDVA、登録番号ZIKV__AAV34151)の重複及び連続アミノ酸配列(配列番号14~22)を有するペプチドを、棒グラフで表し(各試料について、配列番号14~22の各ペプチドの1つ)、図1Aの右側に示す。

20

【0144】

試験を、NS2bエピトープにおけるイソロイシン変異を有するペプチドを用いて行った場合、反応性、特異性又は差別的な特徴に何の影響も見られなかった。再び、7種のヒト血清を、単一アルボウイルスアレイ上で試験した。試料1~4は、ニカラグアからのDENVウイルス陽性血清であり、試料5は、健常対照からのものであり、試料6及び7は、ニカラグアからのZIKVウイルス陽性血清であった。試料を、ジカRNAが患者で検出された後少なくとも3週間の時点で採取した。強い免疫反応性エピトープ(配列番号1)(1430~1438、NS2B-DITWEKDAEITGNSPRLDVA、登録番号ZIKV__AMD61711)の重複及び連続アミノ酸配列(配列番号14~22)を有するペプチドを、棒グラフで表し(各試料について、配列番号14~22の各ペプチドの1つ)、図1Bの右側に示す。

30

【0145】

アミノ酸配列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(式中、Xはバリン又はイソロイシンである)(配列番号1)を有するZIKVのNS2B領域において特定されたこの強い反応性のある特異的ペプチドは、ジカ回復期血清試料の90%超において反応性であった(図1)。

40

【0146】

12種の他のエピトープを、ジカ回復期血清試料の50%超において反応性を有するジカウイルスプロテオームで特定した(表2)。

【0147】

【表 2】

表 2 - Z I K V の追加の反応性エピトープペプチド

特定	アミノ酸配列
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AF372422_AAK91609; 31-42	31-SGMIVNDENRAKVEVTPNSPRAE-42 (配列番号 2)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 447-452	447-DEDRAKVEVTPNSPRAE-452 (配列番号 3)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 1499-1501	1499-SGALWDVPAPKEVK-1501 (配列番号 4)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 1668-1672	1668-REEETPVECFEPSMLK-1672 (配列番号 5)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 1856-1871	1856-KTVWFVPSVRNGNEIAACLTKAGKRVI-1871 (配列番号 6)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 1955-1963	1955-RGRIGRNPKNKPGDEYMYGGG-1963 (配列番号 7)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 2256-2269	2256-AVGLLGLITANELGWLERTKNDIAH-2269 (配列番号 8)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 2547-2549	2547-GITEVCREEARRAL-2549 (配列番号 9)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 2761-2767	2761-DGPRRPVKYEEDVNLGSG-2767 (配列番号 10)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 2923-2940	2924-AALGAIFEEKEWKTAVEAVNDPRFWAL-2940 (配列番号 11)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 3347-3353	3347-PVTKWTDIPYLGKREDLW-3353 (配列番号 12)
フ ラ ビ ウ イ ル ス _ZIKV_AY632535_AAV34151; 2923-2940	3368-LIGHRPTTWAENIKDTVMVRRRIIGD-3383 (配列番号 13)

10

20

30

【0148】

実施例 3 - Z I K A N S 2 B ペプチドの E L I S A

Z I K V に強い反応性があり特異的であるペプチドアレイを用いた特異的ペプチドの選択に基づいて、ペプチド D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A (配列番号 1) に対するペプチド E L I S A を作製した。

【0149】

材料及び方法

N 末端若しくは C 末端上にビオチン又は K L H を有するペプチド D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A (配列番号 1)、例えば、A G D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A L D { L y s (ビオチン / K L H) } (配列番号 23) を合成した。E L I S A の感度を高めるために、N 末端若しくは C 末端上にビオチン標識又は K L H を有する D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A (配列番号 1) の 2 X コンカテマーも作製し、例えば、コンカテマーペプチド配列は A G D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A L D E A G D I T W E K D A E V T G N S P R L D V A L D { L y s (ビオチン) / K L H } (配列番号 24) であった。

40

【0150】

E L I S A に使用したペプチド (E L I S A のために、リンカー又はスパーサーアミノ酸として下線を引いたアミノ酸を含めた)

50

【化1】

1. ZIKA C TERM LONG P3

AGDITWEKDAEVTGNSPRRLDVALD {Lys (ビオチン)} (配列番号23)

2. ZIKA C TERM LONG 2XP3

AGDITWEKDAEVTGNSPRRLDVALDEAGDITWEKDAEVTGNSPRRLDVALD {Lys (ビオチン)} (配列番号24)

【0151】

ジカNS2BペプチドELISAプロトコル:

事前吸着させたウサギ抗ヒトIgG H&L (抗ビオチン)を、密封された状態で96ウェルELISAプレート上にコーティングし、37℃で一晩インキュベートした。次に、プレートをPBS-Tweenで3回洗浄し、200μl/ウェルのブロッキング溶液を各ウェルに添加し、蓋をして室温で1時間インキュベートした。その後、プレートを再度PBS-Tweenで3回洗浄した。次の工程で、ジカ C TERM LONG P3又は2XP3をブロッキング溶液で希釈し、100μl/ウェルを添加し、蓋をして90分間37℃でインキュベートした。プレートを、PBS-Tweenで3回洗浄した。一次抗体 (血清、血漿、CSF又は尿)をブロッキング溶液で希釈し、200μl/ウェルを添加し、適切であれば、連続希釈した。希釈した検体を含む抗ビオチン捕捉抗体及び結合したジカペプチドでコーティングされたプレートを、37℃で90分間インキュベートした。PBS-Tweenで3回洗浄した後、ヤギ抗ヒトIgG HRPコンジュゲートを1:5000希釈 (100μl/ウェル)で使用し、37℃で90分間インキュベートし、その後、PBS-Tweenで3回洗浄した。最後に、発色基質 (Ultra TMB)及び停止溶液を添加し、プレートを450nmで、プレートリーダー上で読み取った。

10

20

【0152】

ニカラガア、ブラジル、ペルトリコ、米国立衛生研究所及びニューヨーク市保健精神衛生局 (NYCDOHMH)からの共同研究者を通じて、ZIKV、DENV 1~4及びCHIKVでの自然感染の病歴を有するヒト (帰国旅行者)からの血清をアッセイで使用した。

30

【0153】

結果

ペプチドアレイのスクリーニングは、確認されたZIKV感染症を有する個体からの血清と80%超の感度を有したジカのNS2b (DITWEKDAEVTGNSPRLDVA (配列番号1)における特異的ペプチド配列の発見を可能にした。バイオインフォマテック分析は、このペプチドがデング熱ウイルスのNS2bと有意な相同性を有しないことを確認した。その有用性は、捕捉抗体を介するマトリックスへの取り付けを容易にするための、アミノ末端又はカルボキシ末端でのビオチン標識した可溶性ペプチドの合成に基づくELISAで確認された。最適化により、ZIKVについて95.3%の感度及び94.5%の特異性を有するジカ NS2b - ペプチドELISAの設計が可能になった。

40

【0154】

また、NS2b - ペプチドELISA及び市販のELISA (Euroimmun)の性能を、ジカ患者からの急性期及び回復期の血清を用いて比較した。両方の血清で、NS2b - ペプチドELISAは、市販のNS1 ELISAよりも高い感度を有した (図2)。

【0155】

参考文献

Anderson et al. J. Immunol. Methods 2011; 366: 79 - 88.

Broutet et al. N. Engl. J. Med. 2016 Apr

50

r 21; 374 (16) : 1506 - 9 .

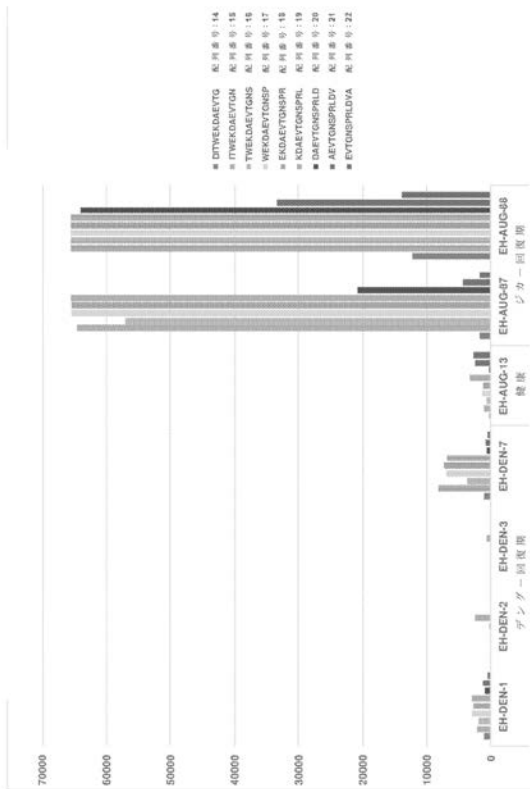
Buus et al. Mol. Cell Proteomics 2012; 11: 1790 - 800 .

Rasmussen et al. N. Engl. J. Med. 2016 May 19; 374 (20) : 1981 - 7 .

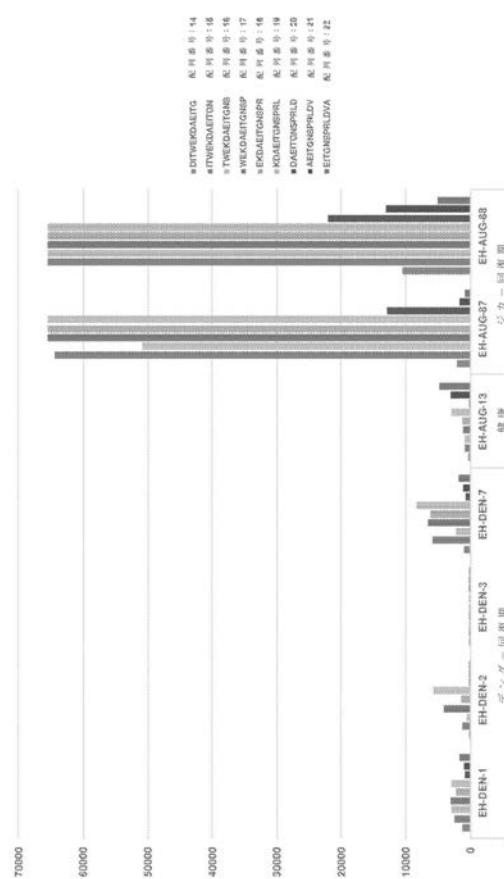
Robinson et al. Nat. Med. 2002; 8: 295 - 301 .

Vigil et al. Future Microbiol. 2010; 5: 241 - 51 . PMC2841399

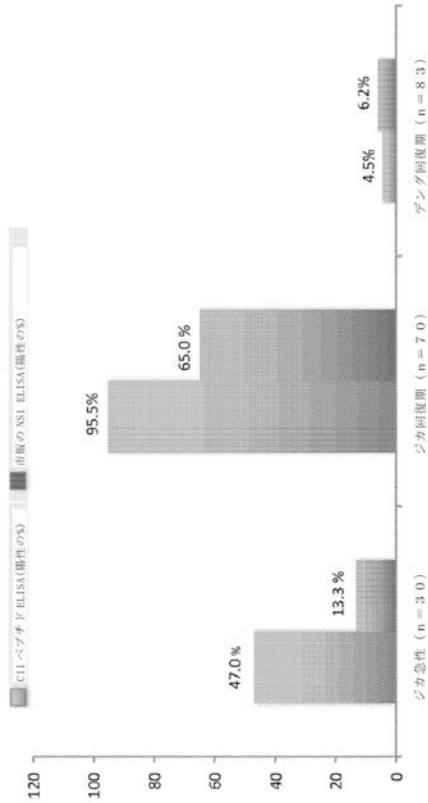
【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 2 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 令和1年8月22日 (2019.8.22)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2020503279000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/64167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - G01N 33/53, 33/547, 33/569, 33/58; A61K 39/12; C07K 16/08, 16/10, 16/38, 14/08 (2018.01) CPC - G01N 33/53, 33/547, 33/569, 33/56983, 33/58; A61K 39/12; C07K 16/08, 16/10, 16/1081, 16/38, 14/08, 14/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(ABBINK, P et al.) Protective Efficacy of Multiple Vaccine Platforms Against Zika Virus Challenge in Rhesus Monkeys. <i>Science</i> . 09 September 2016, Vol. 353, No. 6304, pages 1129-1132; abstract; page 2, 1st paragraph; page 2, 3rd paragraph; page 3, 4th paragraph; page 4, 1st paragraph; supplemental page 2, 2nd paragraph; supplemental page 3, 3rd paragraph; supplemental page 3, 4th paragraph; supplemental page 4, 1st paragraph; DOI: 10.1126/science.aah6157	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
Y	(PHOO, WW et al.) Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. <i>Nature</i> . 15 November 2016, Vol. 7, No. 13410, pages 1-8; page 2, 1st column, 1st paragraph; page 2, 1st column, 2nd paragraph; page 3, 1st column, 1st paragraph; Figure 1; supplementary figure 1; DOI: 10.1038/ncomms13410	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
Y	US 7,785,799 B2 (BARRETT, A et al.) 31 August 2010; column 3, lines 49-53; column 5, lines 32-33, 42; column 19, lines 52-53	2-3, 6-7, 50-55
A	(DAR, H et al.) Prediction of promiscuous T-cell epitopes in the Zika virus polyprotein: An in silico approach. <i>Asian Pacific Journal of Tropical Medicine</i> . 26 July 2016, Vol. 9, No. 9; pages 844-850; DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.07.004	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
A	(XU, X et al.) Identifying Candidate Targets of Immune Responses In Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. <i>PLoS Currents</i> . 15 November 2016, Edition 1; DOI: 10.1371/currents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
<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 26 February 2018 (26.02.2018)	Date of mailing of the international search report 06 APR 2018	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane THURMS PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/64167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	(MOHR, EL et al.) Differentiating Zika and Dengue virus infections with a linear peptide array. American Society of Tropical Medicine & Hygiene. Poster Presentation [online]. 5 November 2017 [Retrieved on 12 February 2018]. Retrieved from the Internet: <URL: https://zika.labkey.com/wiki/OConnor/download.view?entityId=3a020e26-ac7c-1035-9030-0dc06b4aa65a&name=EmmaMohr_ASTMH_2017.pdf >; entire document	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
P, X	(STEINHAGEN, K 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. Eurosurveillance. 15 December 2016, Vol. 21, No. 50; pages 1-16; DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
E, X	WO 2017/031353 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 23 February 2017; entire document	1-8, 10-11, 13-37, 39-55
E, X	WO 2017/140905 A1 (CUREVAC AG et al.) 24 August 2017; entire document	1-8, 10-11, 13-37, 39-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/64167

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-55; and SEQ ID NO: 1 (peptide) are directed toward peptides, methods, and kits for detecting the exposure to and infection by Zika virus.

-Please See Supplemental Page-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8, 10-11, 13-37, 39-55; SEQ ID NO: 1

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/64167

-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

The peptides, methods, and kits will be searched to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (peptide). Applicant is invited to elect additional peptide sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional peptide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5-8, 10 (in-part), 11 (in-part), 13 (in-part), 14 (in-part), 15, 16 (in-part), 17 (in-part), 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 23 (in-part), 24 (in-part), 25 (in-part), 26 (in-part), 27-37, 39 (in-part), 40 (in-part), 41 (in-part), 42 (in-part), 43 (in-part), 44 (in-part), 45 (in-part), 46 (in-part), 47 (in-part), 48 (in-part), 49 (in-part), 50 (in-part), 51 (in-part), 52 (in-part), 53 (in-part), 54 (in-part), and 55 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ NO: 1 (peptide). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a peptide encompassing SEQ ID NO: 2 (peptide).

No technical features are shared between the peptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a collection of isolated peptides which are strongly reactive with, and specific for antibodies to Zika virus, wherein the peptides comprise amino acid sequences shifted one residue across at least one peptide; a collection of isolated peptides that are strongly reactive with, and specific for antibodies to Zika virus, wherein the peptides comprise amino acid sequences shifted one residue across the peptide; a peptide microarray comprising the collection of isolated peptides; a peptide microarray comprising: the peptide; or a collection or set of peptides; an isolated peptide which is strongly reactive with, and specific for antibodies to Zika virus; an isolated peptide which is strongly reactive with, and specific for antibodies to Zika virus; a method for the serological detection of an antibody to Zika virus in a sample, comprising: a. contacting the sample with the collection of peptides, under conditions sufficient to allow the binding of the antibody(ies) to the peptide(s); and b. detecting formation of an antibody-peptide complex comprising said one or more peptides in the collection, wherein formation of the complex is indicative of an antibody to an epitope of a Zika antigen being present in the sample; a kit comprising the collection of isolated peptides; a kit comprising the peptide microarray; these shared technical features are previously disclosed by the publication entitled 'Protective Efficacy of Multiple Vaccine Platforms Against Zika Virus Challenge in Rhesus Monkeys' by Abbink, et al. (hereinafter 'Abbink') in view of US 7,785,799 B2 to Barrett, et al. (hereinafter 'Barrett').

Abbink discloses a collection of isolated peptides which are strongly reactive with, and specific for antibodies to Zika virus (a collection of isolated peptides which are strongly reactive with, and specific for antibodies to Zika virus; page 3, fourth paragraph; supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph), wherein the peptides comprise amino acid sequences shifted one residue across at least one peptide comprising an amino acid sequence (153 overlapping 15 amino acid ZIKV Env peptides (wherein the peptides comprise amino acid sequences shifted one residue across at least one peptide comprising an amino acid sequence); supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph); a peptide microarray comprising the collection of isolated peptides (peptide microarray comprising the collection of isolated peptides; page 3, fourth paragraph; supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph); a peptide microarray (page 3, fourth paragraph; supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph) comprising: the peptide; or a collection or set of peptides (page 3, fourth paragraph; supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph); an isolated peptide which is strongly reactive with (page 3, fourth paragraph; supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph), and specific for antibodies to Zika virus (page 3, fourth paragraph; supplemental page 3, third paragraph – supplemental page 4, first paragraph); a method for the serological detection of an antibody to Zika virus in a sample (a method for the serological detection of an antibody to Zika virus in a sample; page 3, fourth paragraph; supplemental page 4, first paragraph), comprising: a. contacting the sample with the collection of peptides (comprising: a. contacting the sample with the collection of peptides; page 3, fourth paragraph; supplemental page 4, first paragraph), under conditions sufficient to allow the binding of the antibody(ies) to the peptide(s) (under conditions sufficient to allow the binding of the antibody(ies) to the peptide(s); page 3, fourth paragraph; supplemental page 4, first paragraph); and b. detecting formation of an antibody-peptide complex comprising said one or more peptides in the collection (and b. detecting formation of an antibody-peptide complex comprising said one or more peptides in the collection; page 3, fourth paragraph; supplemental page 4, first paragraph; Figure S7), wherein formation of the complex is indicative of an antibody to an epitope of a Zika antigen being present in the sample (wherein formation of the complex is indicative of an antibody to an epitope of a Zika antigen being present in the sample; page 3, fourth paragraph; supplemental page 4, first paragraph; Figure S7).

Abbink does not disclose a kit.

Barrett discloses a kit comprising isolated peptides and a kit comprising the peptide microarray (kit may include antigens and supports in which the antigens are affixed such as microarray; column 5, lines 32-42, 61 – column 6, line 5; column 29, lines 45-47; claim 8) for detecting a flavivirus (abstract).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Abbink, to include a kit, as taught by Barrett, in order to provide a superior method for serological detection of Zika virus infection, at point of care, in a subject in need thereof.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Abbink and Barrett references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	17/00	(2006.01)	C 0 7 K	17/00
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00
				A

(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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 リプキン, ウォルター, イアン

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 2 5, ニューヨーク, 4 5 ウェスト 1 0 5 番 ストリート

(72)発明者 ミシュラ, ニスチャイ

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 3 2, 6 1 5 ダブリュー 1 6 4 番 ストリート, アパートメント # 2 ビー

(72)発明者 ブリーゼ, トーマス

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 6 0 7, ホワイト プレインズ, 8 0 3 ポンドサイドドライブ

(72)発明者 カシウラ, アドリアン

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 2 5, ニューヨーク, 4 5 ウェスト 1 0 5 番 ストリート

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA08 BB15 CC08 FA01 GB10

4H045 AA11 BA16 BA17 BA18 CA01 DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	寨卡病毒感染的血清学检测		
公开(公告)号	JP2020503279A	公开(公告)日	2020-01-30
申请号	JP2019529835	申请日	2017-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	哥伦比亚大学在纽约市的受托人		
发明人	リプキン,ウォルター,イアン ミシュラ,ニスチャイ ブリーゼ,トーマス カシウラ,アドリアン		
IPC分类号	C07K14/18 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 G01N33/569 C07K17/00 C12M1/00		
CPC分类号	A61K35/76 C07K14/005 C07K16/06 C07K16/1081 C07K2317/21 C07K2317/34 C12N2770/24122 G01N33/56983 G01N2333/185		
FI分类号	C07K14/18 G01N33/53.N G01N37/00.102 G01N33/543.501.A G01N33/569.L C07K17/00 C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB15 4B029/CC08 4B029/FA01 4B029/GB10 4H045/AA11 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/428845 2016-12-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测特定病毒的暴露和感染的组合物，方法和试剂盒。特别地，本发明允许快速，差异血清学检测病毒的暴露和感染。特别地，本发明允许快速血清学检测寨卡病毒（ZIKV）暴露和被寨卡病毒（ZIKV）感染。[选型图]图1A

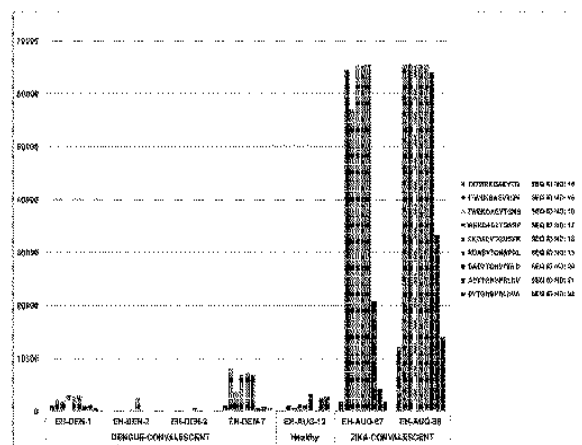


Figure 1A