

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6325553号
(P6325553)

(45) 発行日 平成30年5月16日(2018.5.16)

(24) 登録日 平成30年4月20日(2018.4.20)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A U
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/531	A
CO 7 K 14/705 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z
請求項の数 13 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-536934 (P2015-536934)	(73) 特許権者	505452771
(86) (22) 出願日	平成25年10月11日(2013.10.11)		アバクシス、 インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2016-500815 (P2016-500815A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成28年1月14日(2016.1.14)		587 ユニオンシティー ウィップル
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/064536		ロード 3240
(87) 国際公開番号	W02014/059274	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成26年4月17日(2014.4.17)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成28年9月5日(2016.9.5)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/712,578		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成24年10月11日(2012.10.11)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エールリヒア抗体の検出のためのペプチド、デバイス、および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

3つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団であって、前記集団内の各ペプチドが以下を含む、単離ペプチドの集団：

(i)
S-X₂-K-E-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-
X₂₅-X₂₆-G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E-X₃₉-A-E-T-R-X₄₄-T-F-G-L-X₄₉-K-Q-Y-D-G-A-X₅₆-I-
X₅₈-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 72)

の配列であって、

式中、X₂が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₅が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀が、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁が、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂が、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₃が、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂が、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₃が、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄が、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆が、S

、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} が、任意のアミノ酸であり、 X_{44} が、任意のアミノ酸であり、 X_{49} が、任意のアミノ酸であり、 X_{56} が、任意のアミノ酸であり、且つ X_{58} が、任意のアミノ酸である、前記配列、

(i i)

S-X₂-K-E-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-

X₂₅-X₂₆-G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E-X₃₉-A-X₄₁-T-R-X₄₄-T-F-G-X₄₈-X₄₉-K-Q-Y-D-G-A-

X₅₆-I-X₅₈-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 3)

の配列であって、

式中、 X_2 が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} が、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} が、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} が、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} が、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} が、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} が、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} が、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} が、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} が、任意のアミノ酸であり、 X_{41} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{44} が、任意のアミノ酸であり、 X_{48} が、VおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} が、任意のアミノ酸であり、 X_{56} が、任意のアミノ酸であり、且つ X_{58} が、任意のアミノ酸である、前記配列、または

(i i i)

F-S-A-K-E-E-X₇-A-E-T-R-X₁₂-T-F-G-L-X₁₇-K-Q-Y-D-G-A-X₂₄-

I-X₂₆-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 71)

の配列であって、

式中、 X_7 が、任意のアミノ酸であり、 X_{12} が、任意のアミノ酸であり、 X_{17} が、任意のアミノ酸であり、 X_{24} が、任意のアミノ酸であり、且つ X_{26} が、任意のアミノ酸である、前記配列。

【請求項 2】

(i) 配列番号 3 または 72 の X_{39} が、K である；

(ii) 配列番号 3 または 72 の X_{44} が、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、且つ X_{49} が、E および D からなる群から選択されるアミノ酸である；または

(iii) 配列番号 3 または 72 の X_{56} が、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、且つ X_{58} が、E および T からなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団。

【請求項 3】

各単離ペプチドが、天然OMP-1配列であるかまたは非OMP-1エールリヒア抗原である付加的N末端またはC末端ペプチド配列を含む、請求項1に記載の単離ペプチドの集団。

【請求項 4】

前記単離ペプチドのうちの1つ以上が、

(i) リガンドに共役されているか、またはビオチン化されている；または

(ii) 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、または金属ナノ粒子もしくはナノシェルに共役されている、

請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団。

10

20

30

40

50

【請求項 5】

任意に金属ナノ層を介して固体支持体に固定化されている、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団。

【請求項 6】

前記固体支持体が、複数のビーズ、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路、マイクロタイタープレート内のウェル、またはローター内の流路である、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団。

【請求項 7】

エールリヒア種からの 1 つ以上の抗原ペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団。

10

【請求項 8】

(i) 配列番号 7 1 の X_7 が、K である；

(ii) 配列番号 7 1 の X_{1-2} が、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、且つ配列番号 7 1 の X_{1-7} が、E および D からなる群から選択されるアミノ酸である；または

(iii) 配列番号 7 1 の X_{2-4} が、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、且つ配列番号 7 1 の X_{2-6} が、E および T からなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団。

【請求項 9】

試料中のエールリヒア抗原のエピトープに対する抗体を検出するための方法であって、試料を、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団と接触させることと、

20

前記集団内の 1 つ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とを含み、

前記複合体の形成が、エールリヒア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ことを示す、方法。

【請求項 10】

前記エールリヒア抗原が、エールリヒア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*)、エールリヒア・エウイング (*Ehrlichia ewingii*)、エールリヒア・カニス (*Ehrlichia canis*)、またはエールリヒア・ムリス (*Ehrlichia muris*) 種に由来する、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

対象における単球および / または顆粒球エールリヒア症を検査するための方法であって、

前記対象からの試料を、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団と接触させることと、

前記集団内の 1 つ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とを含み、

前記複合体の形成が、前記対象が前記単球および / または顆粒球エールリヒア症を有することを示す、方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団と、前記集団内の 1 つ以上のペプチドのエピトープを認識する抗体に結合することができる標識試薬とを含む、キット。

40

【請求項 13】

非ヒト対象における単球および / または顆粒球エールリヒア症を診断するための方法であって、

前記対象からの試料を、請求項 1 に記載の単離ペプチドの集団と接触させることと、

前記集団内の 1 つ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とを含み、

前記複合体の形成が、前記対象が前記単球および / または顆粒球エールリヒア症を有することを示す、方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年10月11日に出願された米国仮出願第61/712,578号の利益を主張し、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書とともに電子的に提出されたテキストファイルの内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。配列表のコンピューター可読形式コピー（ファイル名：A B A X _ 0 4 0 _ 0 1 W O _ S e q L i s t _ S T 2 5 . t x t、記録日2013年10月10日、ファイルサイズ62キロバイト）。

10

【背景技術】

【0003】

エールリヒア (*Ehrlichia*) 細菌は、哺乳類宿主内で循環リンパ球に感染する偏性細胞内病原体である。エールリヒア・カニス (*Ehrlichia canis*) およびエールリヒア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*) は、イヌおよびヒトに感染する同じ亜属群のメンバーであり、それぞれイヌ単球エールリヒア症 (CME) およびヒト単球エールリヒア症 (HME) を引き起こす。エールリヒア・エウイング (*Ehrlichia ewingii*) として知られるエールリヒアの別種は、顆粒球に対する指向性を有し、顆粒球エールリヒア症を引き起こす。イヌの疾患は、発熱、てんかん、協調不全、倦怠感、出血症状、リンパ節症、体重減少、および汎血球減少症によって特徴付けられる。ヒトにおいて、疾患は、発熱、頭痛、筋肉痛、および白血球減少によって特徴付けられる。早期検出および治療は、イヌおよびヒトエールリヒア症の両方を治療するために重要である。

20

【0004】

間接免疫蛍光アッセイ (IFA) および酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は、これらの疾患の診断において典型的に使用されている。これらのアッセイは、対象の血液、血漿、もしくは血清からの抗エールリヒア抗体の、感染細胞、細胞溶解物、または部分的に精製された全エールリヒアタンパク質への結合を測定するか、または他の方法で検出する。しかしながら、抗エールリヒア抗体またはその断片を検出するための現在知られているアッセイは、これらの試験において使用されるエールリヒア抗原 (複数可) の不純性質に直接関連する感度および特異度の問題に起因して、有用性が厳しく制限される。つまり、現在知られているアッセイは、多くの全エールリヒア抗原または種に特異的でない抗原の混合物を使用する。

30

【0005】

したがって、当該技術分野において、エールリヒア抗原を検出するためのさらなるアッセイ、ならびに単球エールリヒア症および顆粒球エールリヒア症の血清診断の必要性が存続する。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、エールリヒア外膜タンパク質1 (OMP-1) タンパク質の断片中の特定の配列変異体が、さまざまなエールリヒア種に対する抗体反応の強固な検出を提供するという発見に基づいている。したがって、本発明は、エールリヒア抗原に結合する抗体の検出、ならびに単球および/または顆粒球エールリヒア症の診断に有用な組成物、デバイス、方法、およびキットを提供する。

40

【0007】

一態様において、本発明は、エールリヒア抗原を認識する抗体に結合することができるペプチドを提供する。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、

S-X₂-K-E-D-K-Q-T-T-X₁₀-X₁₁-I-W-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-P-X₂₄-X₂₅-X₂₆-

X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-C (配列番号1)

の配列、またはその断片を含み、式中、X₂は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₇は、H、N、S、またはAを除く任意のアミノ酸であり、X₂₈は、A、S、またはPを除く任意のアミノ酸であり、X₂₉は、D、P、N、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₀は、A、E、D、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₁は、D、N、V、またはHを除く任意のアミノ酸であり、X₃₂は、FまたはTを除く任意のアミノ酸であり、X₃₃は、N、F、またはIを除く任意のアミノ酸であり、X₃₄は、N、T、またはDを除く任意のアミノ酸であり、X₃₅は、K、V、またはPを除く任意のアミノ酸であり、X₃₆は、G、P、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₇は、Y、N、またはTを除く任意のアミノ酸であり、X₃₈は、S、Y、またはIを除く任意のアミノ酸であり、X₃₉は、FまたはSを除く任意のアミノ酸である。

10

20

【0008】

いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、

S-X₂-K-E-D-

K-Q-T-T-T-X₁₁-I-W-G-L-K-Q-X₁₈-W-D-G-X₂₂-P-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-

X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-C (配列番号83)

の配列、またはその断片を含み、式中、X₂は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆は、SおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₇は、H、N、S、またはAを除く任意のアミノ酸であり、X₂₈は、A、S、またはPを除く任意のアミノ酸であり、X₂₉は、D、P、N、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₀は、A、E、D、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₁は、D、N、V、またはRを除く任意のアミノ酸であり、X₃₂は、FまたはTを除く任意のアミノ酸であり、X₃₃は、N、F、またはIを除く任意のアミノ酸であり、X₃₄は、N、T、またはDを除く任意のアミノ酸であり、X₃₅は、K、V、またはPを除く任意のアミノ酸であり、X₃₆は、G、P、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₇は、Y、N、またはTを除く任意のアミノ酸であり、X₃₈は、S、Y、またはIを除く任意のアミノ酸であり、X₃₉は、FまたはSを除く任意のアミノ酸である。

30

40

【0009】

他の実施形態において、本発明のペプチドは、

S-X₂-K-E-

X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-G-G-G-G-G-N-

F-S-A-K-E-E-X₃₉-A-X₄₁-T-R-X₄₄-T-F-G-X₄₈-X₄₉-K-Q-Y-D-G-A-X₅₆-I-X₅₈-E-N-Q-V-Q-N-

K-F-T-I-S-N-C (配列番号3)

の配列、またはその断片を含み、式中、X₂は、AおよびVからなる群から選択されるア

50

ミノ酸であり、 X_5 は、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S、および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} は、任意のアミノ酸であり、 X_{41} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{44} は、任意のアミノ酸であり、 X_{48} は、V および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} は、任意のアミノ酸であり、 X_{56} は、任意のアミノ酸であり、 X_{58} は、任意のアミノ酸である。

【0010】

関連実施形態において、本発明のペプチドは、
S- X_2 -K-E-

X_5 -K-Q- X_8 -T- X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} -G-L-K-Q- X_{18} -W- X_{20} -G- X_{22} - X_{23} - X_{24} - X_{25} - X_{26} -G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E-K- X_{40} -A-D-T-R- X_{45} -T-F-G-L- X_{50} -K-Q-T-D-G-A- X_{57} -I- X_{59} -E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 85)

の配列、またはその断片を含み、式中、 X_2 は、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 は、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S、および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{40} は、任意のアミノ酸であり、 X_{45} は、任意のアミノ酸であり、 X_{50} は、任意のアミノ酸であり、 X_{57} は、任意のアミノ酸であり、 X_{59} は、任意のアミノ酸である。

【0011】

さらに他の実施形態において、本発明のペプチドは、
S- X_2 -K-

E- X_5 -K-Q- X_8 -T- X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} -G-L-K-Q- X_{18} -W- X_{20} -G- X_{22} - X_{23} - X_{24} - X_{25} - X_{26} -G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E- X_{39} -A-E-T-R- X_{44} -T-F-G-L- X_{49} -K-Q-Y-D-G-A- X_{56} -I- X_{58} -E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 72)

の配列、またはその断片を含み、式中、 X_2 は、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 は、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、D および N からなる群

から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} は、任意のアミノ酸であり、 X_{44} は、任意のアミノ酸であり、 X_{49} は、任意のアミノ酸であり、 X_{56} は、任意のアミノ酸であり、 X_{58} は、任意のアミノ酸である。

【0012】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号3または配列番号72の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_{39} はKである。他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号3または配列番号72の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_{44} は、KおよびRからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸である。さらに他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号3または配列番号72の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_{56} は、KおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{58} は、EおよびTからなる群から選択されるアミノ酸である。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号3、または配列番号72の断片を含む。かかる断片は、配列番号1からの少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、もしくは35個の連続したアミノ酸、または配列番号3もしくは配列番号72からの少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、もしくは40個の連続したアミノ酸を含み得る。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号5、配列番号6、配列番号71、配列番号84、または配列番号86の配列を含み得るか、またはそれからなり得る。

20

【0014】

特定の実施形態において、本明細書に記載の本発明のペプチドは、付加的N末端ペプチド配列をさらに含み得る。付加的N末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができ、天然配列または非天然配列のいずれかであり得る。他の実施形態において、本明細書に記載の本発明のペプチドは、付加的C末端配列をさらに含み得る。付加的C末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができ、天然配列または非天然配列のいずれかであり得る。いくつかの実施形態において、非天然配列は、非OMP-1エールリヒア抗原（例えば、エールリヒアp38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3）を含む。

30

【0015】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、少なくとも25個、30個、35個、40個、45個、50個、またはそれ以上のアミノ酸を含む。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、単離（例えば、合成および/または精製）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、リガンドに共役されている。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ている。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、またはニュートラアビジンに共役されている。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）、または免疫グロブリンFc領域）に共役されている。さらに他の実施形態において、ペプチドは、 dendリマーに共役されている、および/または多抗原性ペプチド系（MAPS）の一部である。

40

【0016】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。一実施形態において、本発明のペプチドは、金属ナノ層を

50

介して固体支持体に付着している。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、金属ナノ粒子もしくはナノシェル、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路（例えば、多孔質膜）、プロット（ウェスタンプロット、スロットプロット、もしくはドットプロット）、分析用もしくは遠心分離用ローター内の流路、または管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート内）である。

【0017】

別の態様において、本発明は、本発明の2つ以上のペプチドを含む組成物を提供する。例えば、特定の実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号1の配列を含む。いくつかの実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号3の配列を含む。他の実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号72の配列を含む。さらに他の実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号7の配列を含む。さらに他の実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号70の配列を含む。いくつかの実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号83の配列を含む。他の実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号85の配列を含む。特定の実施形態において、この組成物は、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物または集団を含み、各ペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号72、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86の配列を含む。

【0018】

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、かかる核酸を含むベクター、およびかかる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、発現ベクターである（例えば、細菌または真核発現ベクター）。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。

【0019】

別の態様において、本発明は、デバイスを提供する。特定の実施形態において、デバイスは、イムノアッセイを行うために有用である。例えば、特定の実施形態において、デバイスは、ラテラルフローイムノアッセイデバイスである。他の実施形態において、デバイスは、分析用または遠心分離用ローターである。他の実施形態において、デバイスは、例えば、ELISAアッセイに好適なプレート内の管またはウェルである。さらに他の実施形態において、デバイスは、電気化学、光学、または光電子工学センサーである。

【0020】

特定の実施形態において、デバイスは、本発明のペプチドを含む。他の実施形態において、デバイスは、本発明の異なるペプチドの混合物を含む。例えば、特定の実施形態において、デバイスは、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドを含む。特定の実施形態において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、配列番号84、配列番号85、または配列番号86の配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドは、デバイスに付着しているか、またはその表面に固定化されている。

【0021】

別の態様において、本発明は、試料中のエールリヒア抗原のエピトープに対する抗体を

10

20

30

40

50

検出する方法を提供する。特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明のペプチドと接触させることと、該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、該複合体の形成は、該試料における、エールリヒア抗原のエピトープに対する抗体の存在を示す。特定の実施形態において、エールリヒア抗原は、感染性エールリヒア種、例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、またはエールリヒア・ムリスに由来する。特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の異なるペプチドの混合物または集団（すなわち、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物）と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、これらの方法は、試料中の複数のエールリヒア種（例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、およびエールリヒア・ムリス）からの抗原に対する抗体の検出を同時に提供する。

10

【0022】

特定の実施形態において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。特定の実施形態において、ペプチドまたはペプチドの混合物もしくは集団は、固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。一実施形態において、ペプチドまたはペプチドの混合物もしくは集団は、金属（例えば、金）ナノ層を介して固体支持体に付着している。特定の実施形態において、この固体支持体は、ビーズまたは複数のビーズ（例えば、コロイド粒子、金属ナノ粒子もしくはナノシェル、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路（例えば多孔質膜）、分析用もしくは遠心分離用ローター内の流路、プロット（ウェスタンプロット、スロットプロット、もしくはドットプロット）、または管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート内）である。特定の実施形態において、この固体支持体は、金属、ガラス、セルロース系物質（例えば、ニトロセルロース）、またはポリマー（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、ポリスルホン等）を含む。特定の実施形態において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物もしくは集団は、 dendrimer に付着している、および/または MAPS 系に組み込まれている。特定の他の実施形態において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物もしくは集団は、BSA に付着している。

20

【0023】

特定の実施形態において、検出するステップは、ELISAアッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出するステップは、ラテラルフローイムノアッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出するステップは、凝集アッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出するステップは、試料を分析用または遠心分離用ローター内で回転させることを含む。他の実施形態において、検出するステップは、ウェスタンプロット、スロットプロット、またはドットプロットを使用して、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、検出するステップは、電気化学センサー、光学センサー、または光電子工学センサーを用いて、試料を分析することを含む。特定の実施形態において、検出するステップは、波長シフトアッセイを行うことを含む。

30

【0024】

特定の実施形態において、試料は、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、粘膜、または唾液のような体液である。他の実施形態において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。特定の実施形態において、試料は、野生動物に由来する（例えば、シカまたは齧歯類、例えば、マウス、シマリス、リス等）。他の実施形態において、試料は、実験動物に由来する（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等）。他の実施形態において、試料は、家畜または野生動物に由来する（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）。さらに他の実施形態において、試料は、ヒトに由来する。

40

【0025】

別の態様において、本発明は、対象における単球および/または顆粒球エールリヒア症を診断する方法を提供する。特定の実施形態において、これらの方法は、対象からの試料を本発明のペプチドと接触させることと、該ペプチドを含む抗体 - ペプチド複合体の形成

50

を検出することを含み、該複合体の形成は、対象が単球および/または顆粒球エールリヒア症を有することを示す。特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の異なるペプチドの混合物または集団（すなわち、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドの混合物）と接触させることを含む。

【0026】

なおも別の態様において、本発明はキットを提供する。特定の実施形態において、キットは、本発明のペプチドを含む。特定の実施形態において、キットは、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なるペプチドを含む。ペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、配列番号84、配列番号85、または配列番号86の配列を含むことができる。特定の実施形態において、ペプチドは、任意に金属ナノ層を介して固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。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、金属ナノ粒子もしくはナノシェル、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路、分析用もしくは遠心分離用ローター内の流路、または管もしくはウェル（例えばプレート内）である。特定の実施形態において、1つまたは複数のペプチドは、デンドリマーに付着している、および/またはMAPS系に組み込まれている。特定の他の実施形態において、ペプチドまたは、異なるペプチドの混合物は、BSAに付着している。

10

【0027】

特定の実施形態において、キットは、ビーズの集団またはプレート（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート）をさらに含む。他の実施形態において、キットは、ラテラルフローイムノアッセイデバイス、分析用もしくは遠心分離用ローター、ウェスタンブロット、ドットブロット、スロットブロット、電気化学センサー、光学センサー、または光電子工学センサーのようなデバイスをさらに含む。特定の実施形態において、ビーズの集団、プレート、またはデバイスは、イムノアッセイを行うために有用である。例えば、特定の実施形態において、ビーズの集団、プレート、またはデバイスは、試料からの抗体および本発明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に有用である。特定の実施形態において、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、ビーズ、プレート、またはデバイスに付着しているか、またはその表面に固定化されている。

20

【0028】

特定の実施形態において、キットは指示書をさらに含む。例えば、特定の実施形態において、キットは、エールリヒア抗原に対する抗体を検出するためまたは単球および/もしくは顆粒球エールリヒア症を診断するために本発明のペプチドを使用する方法を示す、指示書を含む。特定の実施形態において、キットは、1つ以上のエールリヒア抗原に対する抗体を検出するためまたは単球および/もしくは顆粒球エールリヒア症を診断するためにビーズの集団、プレート、またはデバイス（例えば、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物を含む）を使用する方法を示す、指示書を含む。

30

【0029】

[本発明1001]

3つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団であって、前記集団内の各ペプチドが以下を含む、単離ペプチドの集団：

40

(i)
S-X₂-K-E-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-
X₂₅-X₂₆-G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E-X₃₉-A-E-T-R-X₄₄-T-F-G-L-X₄₉-K-Q-Y-D-G-A-X₅₆-I-
X₅₈-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号72)

の配列もしくはその断片であって、

式中、X₂が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₅が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀が、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X

50

X_{11} が、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} が、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} が、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} が、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} が、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} が、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} が、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} が、任意のアミノ酸であり、 X_{44} が、任意のアミノ酸であり、 X_{49} が、任意のアミノ酸であり、 X_{56} が、任意のアミノ酸であり、 X_{58} が、任意のアミノ酸である、前記配列もしくはその断片、または

10

(i i)
S-X₂-K-E-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-
X₂₅-X₂₆-G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E-X₃₉-A-X₄₁-T-R-X₄₄-T-F-G-X₄₈-X₄₉-K-Q-Y-D-G-A-
X₅₆-I-X₅₈-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号3)

の配列もしくはその断片であって、

式中、 X_2 が、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} が、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} が、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} が、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} が、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} が、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} が、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} が、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} が、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} が、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} が、任意のアミノ酸であり、 X_{41} が、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{44} が、任意のアミノ酸であり、 X_{48} が、VおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} が、任意のアミノ酸であり、 X_{56} が、任意のアミノ酸であり、 X_{58} が、任意のアミノ酸である、前記配列もしくはその断片

20

30

[本発明1002]

X_{39} が、Kである、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1003]

X_{44} が、KおよびRからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸である、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1004]

X_{56} が、KおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{58} が、EおよびTからなる群から選択されるアミノ酸である、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1005]

前記断片が、配列番号3または配列番号72からの少なくとも20個、25個、30個、35個、または40個の連続したアミノ酸を含む、本発明1001の単離ペプチドの集団。

40

[本発明1006]

前記断片が、配列番号3または配列番号72のアミノ酸33~71を含む、本発明1005の単離ペプチドの集団。

[本発明1007]

各単離ペプチドが、天然OMP-1配列であるかまたは非OMP-1エールリヒア抗原である付加的N末端ペプチド配列を含む、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1008]

各単離ペプチドが、天然OMP-1配列であるかまたは非OMP-1エールリヒア抗原で

50

ある付加的C末端ペプチド配列を含む、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1009]

各単離ペプチドが、少なくとも70個、75個、80個、または85個のアミノ酸を含む、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1010]

前記単離ペプチドのうちの1つ以上が、リガンドに共役されているか、またはビオチン化されている、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1011]

前記単離ペプチドのうちの1つ以上が、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、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)、酵素、または金属ナノ粒子もしくはナノシェルに共役されている、本発明1001の単離ペプチドの集団。

10

[本発明1012]

任意に金属ナノ層を介して固体支持体に固定化されている、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1013]

前記固体支持体が、複数のピース、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路、マイクロタイタープレート内のウェル、またはローター内の流路である、本発明1001の単離ペプチドの集団。

[本発明1014]

エールリヒア種からの1つ以上の抗原ペプチドをさらに含む、本発明1001の単離ペプチドの集団。

20

[本発明1015]

前記1つ以上の抗原ペプチドが、
F-S-A-K-E-E-X₇-A-E-T-R-X₁₂-T-F-G-L-X₁₇-K-Q-Y-D-G-A-X₂₄-
I-X₂₆-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 71)

の配列またはその断片を有し、式中、X₇が、任意のアミノ酸であり、X₁₂が、任意のアミノ酸であり、X₁₇が、任意のアミノ酸であり、X₂₄が、任意のアミノ酸であり、X₂₆が、任意のアミノ酸である、本発明1014の単離ペプチドの集団。

[本発明1016]

配列番号71のX₇が、Kである、本発明1015の単離ペプチドの集団。

30

[本発明1017]

配列番号71のX₁₂が、KおよびRからなる群から選択されるアミノ酸であり、配列番号71のX₁₇が、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸である、本発明1015の単離ペプチドの集団。

[本発明1018]

配列番号71のX₂₄が、KおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、配列番号71のX₂₆が、EおよびTからなる群から選択されるアミノ酸である、本発明1015の単離ペプチドの集団。

[本発明1019]

試料中のエールリヒア抗原のエピトープに対する抗体を検出するための方法であって、
試料を、本発明1001の単離ペプチドの集団と接触させることと、
前記集団内の1つ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と
を含み、

40

前記複合体の形成が、エールリヒア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ことを示す、方法。

[本発明1020]

前記エールリヒア抗原が、エールリヒア・シャフェンシス(Ehrlichia chaffeensis)、エールリヒア・エウイング(Ehrlichia ewingii)、エールリヒア・カニス(Ehrlichia canis)、またはエールリヒア

50

・ムリス (Ehrlichia muris) 種に由来する、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記単離ペプチドの集団が、任意に金属ナノ層を介して固体支持体に固定化されている、本発明1019の方法。

[本発明1022]

前記固体支持体が、複数のビーズ、ラテラルフローアッセイデバイス内の流路、マイクロタイプレート内のウェル、またはローター内の流路である、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記検出するステップが、(i) ELISAアッセイを行うこと、(ii) ラテラルフローアッセイを行うこと、(iii) 凝集アッセイを行うこと、(iv) ウェスタンブロット、スロットブロット、もしくはドットブロットを行うこと、(v) 波長シフトアッセイを行うこと、または(vi) 試料を分析用または遠心分離用ローターに供することを含む、本発明1019の方法。

10

[本発明1024]

前記試料が、ヒト、イヌ、またはネコ対象に由来する、本発明1019の方法。

[本発明1025]

前記試料が、血液、血清、血漿、脳脊髄液、組織抽出物、尿、または唾液試料である、本発明1019の方法。

[本発明1026]

複数の抗体 - ペプチド複合体の形成が検出され、かつ前記複合体の形成が、複数のエールリヒア種からのエールリヒア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ことを示す、本発明1019の方法。

20

[本発明1027]

対象における単球および/または顆粒球エールリヒア症を診断するための方法であって、

前記対象からの試料を、本発明1001の単離ペプチドの集団と接触させることと、

前記集団内の1つ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とを含み、

前記複合体の形成が、対象が前記単球および/または顆粒球エールリヒア症を有することを示す、方法。

30

[本発明1028]

本発明1001の単離ペプチドの集団と、前記集団内の1つ以上のペプチドのエピトープを認識する抗体に結合することができる標識試薬とを含む、キット。

[本発明1029]

前記単離ペプチドの集団が、任意に金属ナノ層を介して固体支持体に付着しているかまたはその表面に固定化されている、本発明1028のキット。

[本発明1030]

前記固体支持体が、複数のビーズ、管もしくはウェル、ラテラルフローアッセイデバイス、または分析用もしくは遠心分離用ローターである、本発明1028のキット。

[本発明1031]

前記標識試薬が、検出可能な標識に共役された抗ヒト、抗イヌ、もしくは抗ネコ Ig G 抗体または抗ヒト、抗イヌ、もしくは抗ネコ Ig M 抗体である、本発明1028のキット。

40

[本発明1032]

前記検出可能な標識が、酵素、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、または着色ラテックス粒子である、本発明1031のキット。

[本発明1033]

前記標識試薬が、検出可能な標識に共役された、プロテイン A、プロテイン G、および/またはプロテイン A / G 融合タンパク質である、本発明1028のキット。

[本発明1034]

前記検出可能な標識が、酵素、金属ナノ粒子、金属ナノシェル、金属ナノ層、フルオロ

50

フォア、または着色ラテックス粒子である、本発明1033のキット。

本発明の付加的態様および実施形態は、続く詳細な説明から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】エールリヒア抗原に対する抗体を検出するために使用することができる、二重抗原サンドイッチアッセイの図である。この実施形態において、本発明のペプチドは、試験部位において好適な基体（例えば、ニトロセルロース膜、ELISAプレートのウェル）に固定化されている。試験試料中のエールリヒア抗原に対する抗体は、本発明の固定化ペプチドによって結合されている。適切なエールリヒア抗原に対する試験試料抗体は、次に、試験部位において固定化されたペプチドの第1の組に結合された抗体の存在を検出する、検出可能な標識（例えば、金属ナノ粒子またはナノシェル（例えば、コロイド金）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP）、フルオロフォア、着色ラテックス粒子）に共役された本発明のペプチドの第2の組に結合する。特定の実施形態において、検出シグナルを増幅するために、検出可能な標識（例えば、金属ナノ粒子またはナノシェル（例えば、コロイド金）、HRP、ALP、フルオロフォア、着色ラテックス粒子）に共役されたプロテインAおよび/またはプロテインG分子を、試験部位に適用することができ、それらは、本発明の固定化ペプチドによって捕捉されたエールリヒア抗原に対する任意の抗体のFc領域に結合する。

10

【図2】エールリヒア抗原に対する抗体を検出するために使用することができる、一種の間接サンドイッチアッセイの図である。この実施形態において、抗ヒトIgG/IgM、抗イヌIgG/IgM、または抗ネコIgG/IgM抗体は、試験部位において好適な基体（例えば、ニトロセルロース膜、ELISAプレートのウェル）に固定化されている。試験試料中のエールリヒア抗原に対する抗体は、固定化抗体によって結合されている。次に、適切なエールリヒア抗原に対する試験試料抗体は、検出可能な標識（例えば、金属ナノ粒子またはナノシェル（例えば、コロイド金）、HRP、ALP、フルオロフォア、着色ラテックス粒子）に共役された本発明のペプチドに結合する。

20

【図3】エールリヒア抗原に対する抗体を検出するために使用することができる、別種の間接サンドイッチアッセイの図である。この実施形態において、本発明のペプチドは、試験試料中の抗エールリヒア抗体を捕捉するために、基体（例えば、ニトロセルロース膜、ELISAプレートのウェル）に固定化され得る。検出可能な標識（例えば、金属ナノ粒子またはナノシェル（例えば、コロイド金）、HRP、ALP、フルオロフォア、着色ラテックス粒子）に共役された抗ヒトIgG/IgM、抗イヌIgG/IgM、または抗ネコIgG/IgM抗体を使用して、試験部位において固定化ペプチドに結合された抗体の存在を検出することができる。

30

【図4】エールリヒア抗原に対する抗体を検出するために使用することができる、イムノアッセイデバイスの図である。イムノアッセイデバイスのこの実施形態において、本発明のペプチドは、試験部位において好適な基体（例えば、ニトロセルロース膜、ELISAプレートのウェル）に固定化されている。試験試料中の抗エールリヒア抗体は、本発明の固定化ペプチドによって結合されている。検出可能な標識（例えば、金属ナノ粒子もしくはナノシェル（例えば、コロイド金）、HRP、ALP、フルオロフォア、着色ラテックス粒子）に共役された、プロテインA、プロテインG、またはプロテインA/G融合タンパク質が系に添加され、捕捉された抗エールリヒア抗体のFc部分に結合し、それによって陽性シグナルを産生する。この実施形態において、デバイスは、検出可能な標識に共役されたプロテインA、検出可能な標識に共役されたプロテインG、および/または検出可能な標識に共役されたプロテインA/G融合を認識する結合パートナーが固定化されている、制御部位をさらに含むことができる。かかる結合パートナーは、抗プロテインA、抗プロテインG、マウスIgG、および/または他の同様のIgG分子を含み得るが、これらに限定されない。

40

【図5】エールリヒア抗原に対する抗体を検出するために使用することができる、ラテラルフローアッセイデバイスの一例を表す。本発明のペプチドは、担体タンパク質（例えば

50

、ウシ血清アルブミン)に連結され、得られたBSA-ペプチド共役体は、試験部位(T)においてニトロセルロース(NC)膜の表面に固定化されている。同じBSA-ペプチド共役体は、検出可能な標識(例えば、コロイド金)に共役され、試験部位の上流に位置付けられた共役パッドに沈着する。金共役プロテインAおよび金共役プロテインG(すなわち、増幅体)は、捕捉された抗エールリヒア抗体のFc部分に結合することによって、シグナルを強化するように共役パッドに添加される。このデバイスは、金共役プロテインAおよび/または金共役プロテインGを認識する結合パートナーが固定化されている、制御部位(C)をさらに含む。

【発明を実施するための形態】

【0031】

10

詳細な説明

本明細書において使用されるとき、以下の用語は、以下の意味を有するものとする。

【0032】

本明細書において使用されるとき、「抗原」という用語は、抗体によって認識されることができる分子を指す。抗原は、例えば、ペプチドまたはその修飾形態であり得る。抗原は、1つ以上のエピトープを含み得る。

【0033】

本明細書において使用されるとき、「エピトープ」という用語は、抗体によって特異的に認識される抗原の一部である。エピトープは、例えば、ペプチド(例えば、本発明のペプチド)を含み得るか、またはそれからなり得る。エピトープは、線状エピトープ、連続エピトープ、または立体構造エピトープであり得る。特定の実施形態において、エピトープは、非隣接領域を含んでよい。

20

【0034】

「OMP-1タンパク質」という用語は、エールリヒアの外膜タンパク質1パラログのうちいずれかを指し、エールリヒア・カニスP-30、エールリヒア・カニスP30-1、エールリヒア・シャフェンシスP28、エールリヒア・シャフェンシスOMP-1C、エールリヒア・シャフェンシスOMP-1D、エールリヒア・シャフェンシスOMP-1E、およびエールリヒア・シャフェンシスOMP-1Fを含むが、これらに限定されない。

【0035】

30

「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において同義的に使用され、一本鎖または二本鎖に関わらず、DNA、RNA、cDNA、ならびにその化学修飾を包含する。

【0036】

本明細書において使用される一文字のアミノ酸の省略形は、当該技術分野におけるそれらの標準的な意味を有し、本明細書に記載される全てのペプチド配列は、慣習に従って、N末端から左、C末端から右に書かれる。

【0037】

追加の用語は、必要に応じて、続く詳細な説明において定義されるものとする。

【0038】

40

組成物およびデバイス

本発明は、エールリヒアOMP-1タンパク質の断片中の特定の配列変異体が、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、およびエールリヒア・ムリスを含むさまざまなエールリヒア種に対する抗体反応の強固な検出を提供するという発見に部分的に基づいている。したがって、一態様において、本発明は、エールリヒア抗原を認識する抗体に結合することができるペプチドを提供する。

【0039】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、

S-X₂-K-E-D-K-Q-T-T-X₁₀-X₁₁-I-W-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-P-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-
X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-C (配列番号1)

の配列、またはその断片を含み、さらに指定がない限り、本明細書全体にわたって使用される配列番号1は、以下の特徴を有する：X₂は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₇は、H、N、S、またはAを除く任意のアミノ酸であり、X₂₈は、A、S、またはPを除く任意のアミノ酸であり、X₂₉は、D、P、N、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₀は、A、E、D、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₁は、D、N、V、またはHを除く任意のアミノ酸であり、X₃₂は、FまたはTを除く任意のアミノ酸であり、X₃₃は、N、F、またはIを除く任意のアミノ酸であり、X₃₄は、N、T、またはDを除く任意のアミノ酸であり、X₃₅は、K、V、またはPを除く任意のアミノ酸であり、X₃₆は、G、P、またはSを除く任意のアミノ酸であり、X₃₇は、Y、N、またはTを除く任意のアミノ酸であり、X₃₈は、S、Y、またはIを除く任意のアミノ酸であり、X₃₉は、FまたはSを除く任意のアミノ酸である。

10

20

【0040】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1の配列を含み、式中、X₂はVであり、X₁₀はTである。いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1の配列を含み、式中、X₁₀はTであり、X₂₆は、SおよびNからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1の配列を含み、式中、X₂₄はAであり、X₂₅は、TおよびPからなる群から選択され、X₂₆は、SおよびNからなる群から選択される。さらに他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1の配列を含み、式中、X₂₆は、SおよびNからなる群から選択され、X₃₁は、D、N、V、R、またはHを除く任意のアミノ酸である。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1の配列を含み、式中、X₂₇~X₃₉は、Q-R-K-N-E-P-S-E-T-N-P-G-Q (配列番号74)、

30

M-V-E-F-E-E-L-Q-R-N-W-H-P (配列番号75), M-L-E-V-S-W-L-I-D-

F-M-A-P (配列番号76), および Q-D-E-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P (配列番号77)

からなる群から選択される配列を有する。

【0041】

関連実施形態において、本発明のペプチドは、
S-X₂-K-E-

40

D-K-Q-T-T-T-X₁₁-I-W-G-L-K-Q-X₁₈-W-D-G-X₂₂-P-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-
X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-C (配列番号83)

の配列、またはその断片を含み、式中、X₂は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆は、SおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₇は、H、N、S、またはAを除く任意のアミノ酸であり、X₂₈は、A、S、またはPを除く任意のアミノ酸で

50

あり、 X_{29} は、D、P、N、またはSを除く任意のアミノ酸であり、 X_{30} は、A、E、D、またはSを除く任意のアミノ酸であり、 X_{31} は、D、N、V、またはRを除く任意のアミノ酸であり、 X_{32} は、FまたはTを除く任意のアミノ酸であり、 X_{33} は、N、F、またはIを除く任意のアミノ酸であり、 X_{34} は、N、T、またはDを除く任意のアミノ酸であり、 X_{35} は、K、V、またはPを除く任意のアミノ酸であり、 X_{36} は、G、P、またはSを除く任意のアミノ酸であり、 X_{37} は、Y、N、またはTを除く任意のアミノ酸であり、 X_{38} は、S、Y、またはIを除く任意のアミノ酸であり、 X_{39} は、FまたはSを除く任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号83の配列を含み、式中、 $X_{27} \sim X_{39}$ は、

10

M-V-E-F-E-E-L-Q-R-N-W-H-P (配列番号75), M-L-E-V-S-W-L-I-D-

F-M-A-P (配列番号76), および Q-D-E-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P (配列番号77)

からなる群から選択される配列を有する。

【0042】

本発明の特定の他の実施形態において、本発明のペプチドは、

S- X_2 -K-E- X_5 -K-Q- X_8 -T- X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} -G-L-K-Q- X_{18} -W- X_{20} -G- X_{22} - X_{23} - X_{24} -

X_{25} - X_{26} -G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E- X_{39} -A- X_{41} -T-R- X_{44} -T-F-G- X_{48} - X_{49} -K-Q-Y-D-G-A-

X_{56} -I- X_{58} -E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号3)

20

の配列、またはその断片を含み、式中、 X_2 は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} は、任意のアミノ酸であり、 X_{41} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{44} は、任意のアミノ酸であり、 X_{48} は、VおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} は、任意のアミノ酸であり、 X_{56} は、任意のアミノ酸であり、 X_{58} は、任意のアミノ酸である。

30

【0043】

さらに他の実施形態において、本発明のペプチドは、

S- X_2 -K-

E- X_5 -K-Q- X_8 -T- X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} -G-L-K-Q- X_{18} -W- X_{20} -G- X_{22} - X_{23} - X_{24} - X_{25} - X_{26} -G-G-G-G-G-

40

N-F-S-A-K-E-E-K- X_{40} -A-D-T-R- X_{45} -T-F-G-L- X_{50} -K-Q-T-D-G-A- X_{57} -I- X_{59} -E-N-Q-V-Q-N-

K-F-T-I-S-N-C (配列番号85)

の配列、またはその断片を含み、式中、 X_2 は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ

50

酸であり、 X_{22} は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S、および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{40} は、任意のアミノ酸であり、 X_{45} は、任意のアミノ酸であり、 X_{50} は、任意のアミノ酸であり、 X_{57} は、任意のアミノ酸であり、 X_{59} は、任意のアミノ酸である。

【0044】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、
S-X₂-K-

10

E-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-G-G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E-X₃₉-A-E-T-R-X₄₄-T-F-G-L-X₄₉-K-Q-Y-D-G-A-X₅₆-I-X₅₈-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 72)

の配列、またはその断片を含み、式中、 X_2 は、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_5 は、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{18} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、A、S、および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、および K からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{39} は、任意のアミノ酸であり、 X_{44} は、任意のアミノ酸であり、 X_{49} は、任意のアミノ酸であり、 X_{56} は、任意のアミノ酸であり、 X_{58} は、任意のアミノ酸である。特定の一実施形態において、配列番号 72 の配列を含むペプチドは、複数の種（例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、およびエールリヒア・ムリス）からのエールリヒア抗原に対する抗体の検出を同時に可能にする。

20

30

【0045】

いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号 3 または配列番号 72 の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_{39} は K である。他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号 3 または配列番号 72 の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_{44} は、K および R からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{49} は、E および D からなる群から選択されるアミノ酸である。さらに他の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号 3 または配列番号 72 の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_{56} は、K および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{58} は、E および T からなる群から選択されるアミノ酸である。

40

【0046】

本発明の別の態様において、本発明のペプチドは、
S-V-K-X₄-D-K-Q-X₈-T-X₁₀-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-A-X₂₅-X₂₆-
Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 7)

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_4 は、E および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_8 は、P および S からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{10} は、A および S からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{20} は、E および Q からなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{22} は、P および T からなる群から選択され

50

るアミノ酸であり、 X_{23} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、SおよびNからなる群から選択されるアミノ酸である。

【0047】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、
 S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-
 Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 8); S-V-K-E-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-
 S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 9); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-S-V-L-
 W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 10); S- 10
 V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-
 G-G-C (配列番号 11); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-S-
 Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 12); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-
 R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 13); S-V-K-
 E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-
 C (配列番号 14); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-N-Q-V-
 E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 15); S-V-K-E-D-K-Q-S-T-S-V-L-W-G-I-R-Q- 20
 N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 16); S-V-K-E-D-K-
 Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列
 番号 17); S-V-K-E-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-
 W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 18); S-V-K-E-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-
 Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 19); S-V-K-E-D-K-Q-S-
 T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号
 20); S-V-K-E-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-N-Q-V-E-V-E-W-Q- 30
 Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 21); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-
 S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 22); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-S-V-
 L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 23);
 S-V-K-E-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-
 W-G-G-C (配列番号 24); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-
 S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 25); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-
 I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 26); S-V-K- 40
 E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-
 C (配列番号 27); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-V-A-T-S-Q-V-

E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 28); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 29); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 30); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 31); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 32); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 33); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-T-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 34); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 35); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 36); S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 37); または S-V-K-E-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-V-A-P-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 38)

10

20

の配列を含むか、またはそれからなる。

【 0 0 4 8 】

他の実施形態において、本発明のペプチドは、
 S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 39); S-V-K-N-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 40); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 41); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 42); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 43); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 44); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 45); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 46); S-V-K-N-D-K-Q-S-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 47); S-V-K-N-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 48); S-V-K-N-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 49); S-V-K-N-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 50); S-V-K-N-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 51);

30

40

S-V-K-N-D-K-Q-S-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-P-N-Q-V-E-V-E-
W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 52); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-
E-G-P-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 53); S-V-K-N-D-K-Q-P-
T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号
54); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-
Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 55); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-S-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-
S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 56); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-S-V-
L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 57);
S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-T-S-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-
W-G-G-C (配列番号 58); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-V-A-T-
S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 59); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-
G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 60); S-V-
K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-P-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-
G-C (配列番号 61); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-V-A-T-S-Q-
V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 62); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-
Q-N-W-Q-G-T-S-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 63); S-V-K-N-
D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-T-S-A-T-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C
(配列番号 64); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-E-G-T-S-A-T-N-Q-V-E-
V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 65); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-
W-Q-G-P-V-A-T-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 66); S-V-K-N-D-K-
Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-P-S-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列
番号 67); S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-W-Q-G-P-V-A-T-N-Q-V-E-V-E-
W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 68); または S-V-K-N-D-K-Q-P-T-A-V-L-W-G-I-R-Q-N-
W-E-G-P-V-A-P-N-Q-V-E-V-E-W-Q-Q-R-G-W-G-G-C (配列番号 69)

の配列を含むか、またはそれからなる。

【 0 0 4 9 】

本発明の特定の一実施形態において、本発明のペプチドは、
S-X₂-K-D-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-X₁₆-Q-X₁₈-X₁₉-X₂₀-

G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-X₂₇-X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-C (配列番号 70)
の配列を含むか、またはそれからなり、式中、X₂は、AおよびVからなる群から選択さ
れるアミノ酸であり、X₅は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、X
₈は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀は、S、V、および
Aからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁は、GおよびAからなる群から選択
されるアミノ酸であり、X₁₂は、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり
、X₁₃は、Y、F、およびWからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₆は、K
およびRからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈は、DおよびNからなる群か
ら選択されるアミノ酸であり、X₁₉は、WおよびFからなる群から選択されるアミノ酸
であり、X₂₀は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂は、T
およびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₃は、A、S、およびTからな
る群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄は、AおよびIからなる群から選択されるア

10

20

30

40

50

ミノ酸であり、 X_{25} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 $X_{27} \sim X_{39}$ のそれぞれは、任意のアミノ酸である。特定の実施形態において、 $X_{27} \sim X_{39}$ は、Q-R-K-N-E-P-S-E-T-N-P-G-Q (配列番号74)、

M-V-E-F-E-E-L-Q-R-N-W-H-P (配列番号75)、M-L-E-V-S-W-L-I-D-F-M-A-P (配列番号76)、Q-D-E-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P (配列番号77)、Q-R-K-N-D-P-S-E-T-S-P-G-Q (配列番号78)、M-A-P-F-H-E-L-D-V-N-N-H-P (配列番号79)、S-L-N-V-S-F-L-I-D-P-M-A-P (配列番号80)、およびQ-D-S-N-L-Y-S-S-I-F-F-V-P (配列番号81)

10

からなる群から選択される配列を有する。

【0050】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85、および付加的N末端ペプチド配列(例えば、N末端伸長)を含む。付加的N末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。特定の実施形態において、N末端ペプチド配列は、約5~約10、約10~約15、約15~約20、約20~約25、約25~約30、約30~約40、または約40~約50のアミノ酸の長さを有する。一実施形態において、N末端ペプチド配列は、1つ以上の連結残基

20

であり得る(例えば、1つ以上のグリシン、システイン、またはセリン残基)。例えば、特定の実施形態において、本明細書に記載の配列のうちのいずれかにおけるカルボキシル末端システイン残基は、代わりにアミノ末端に位置することができる。したがって、いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、

C-S- X_3 -K-E-D-K-Q-T-T- X_{11} - X_{12} -I-W-G-L-K-Q- X_{19} -W- X_{21} -G- X_{23} -P- X_{25} - X_{26} - X_{27} - X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{31} - X_{32} - X_{33} - X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} - X_{40} (配列番号2)

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_3 は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{19} は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{21} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{27} は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{28} は、H、N、S、またはAを除く任意のアミノ酸であり、 X_{29} は、A、S、またはPを除く任意のアミノ酸であり、 X_{30} は、D、P、N、またはSを除く任意のアミノ酸であり、 X_{31} は、A、E、D、またはSを除く任意のアミノ酸であり、 X_{32} は、D、N、V、またはHを除く任意のアミノ酸であり、 X_{33} は、FまたはTを除く任意のアミノ酸であり、 X_{34} は、N、F、またはIを除く任意のアミノ酸であり、 X_{35} は、N、T、またはDを除く任意のアミノ酸であり、 X_{36} は、K、V、またはPを除く任意のアミノ酸であり、 X_{37} は、G、P、またはSを除く任意のアミノ酸であり、 X_{38} は、Y、N、またはTを除く任意のアミノ酸であり、 X_{39} は、S、Y、またはIを除く任意のアミノ酸であり、 X_{40} は、FまたはSを除く任意のアミノ酸である。さらに他の実施形態において、本発明のペプチドは、

30

C-S- X_3 -K-E- X_6 -K-Q- X_9 -T- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} -G-L-K-Q- X_{19} -W- X_{21} -G- X_{23} -

X_{24} - X_{25} - X_{26} - X_{27} -G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E- X_{40} -A- X_{42} -T-R- X_{45} -T-F-G- X_{49} - X_{50} -K-Q-Y-D-G-A- X_{57} -I- X_{59} -E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (配列番号4)

40

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_3 は、AおよびVからなる群から選択さ

50

れるアミノ酸であり、 X_6 は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_9 は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{14} は、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{19} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{21} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{27} は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{40} は、任意のアミノ酸であり、 X_{42} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{45} は、任意のアミノ酸であり、 X_{49} は、VおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{50} は、任意のアミノ酸であり、 X_{57} は、任意のアミノ酸であり、 X_{59} は、任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、

C-S- X_3 -K-E- X_6 -K-Q- X_9 -T- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} -G-L-K-Q- X_{19} -W- X_{21} -G- X_{23} - X_{24} -

X_{25} - X_{26} - X_{27} -G-G-G-G-N-F-S-A-K-E-E- X_{40} -A-E-T-R- X_{45} -T-F-G-L- X_{50} -K-Q-Y-D-G-A-

X_{57} -I- X_{59} -E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号73)

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、 X_3 は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_6 は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_9 は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{11} は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{12} は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{13} は、LおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{14} は、YおよびFからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{19} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{21} は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{23} は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{24} は、A、S、およびTからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{25} は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{26} は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{27} は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸であり、 X_{40} は、任意のアミノ酸であり、 X_{45} は、任意のアミノ酸であり、 X_{50} は、任意のアミノ酸であり、 X_{57} は、任意のアミノ酸であり、 X_{59} は、任意のアミノ酸である。

【0051】

付加的N末端ペプチド配列は、天然配列であり得る。本明細書において使用される時、「天然」配列は、天然に存在するエールリヒアOMP-1配列からのペプチド配列、またはその変異体である。特定の実施形態において、ペプチド配列は、天然に存在するエールリヒアOMP-1配列の断片である。ペプチド配列は、例えば、OMP-1の保存領域または非保存領域に由来し得る。ペプチド配列は、例えば、免疫優勢エピトープのようなエピトープ、または宿主(例えば、ヒト、イヌ等)免疫系によって認識可能な任意の他のエピトープを含むことができる。OMP-1タンパク質およびそのペプチドは、例えば、米国特許第6,544,517号、同第6,893,640号、同第6,923,963号、同第7,063,846号、および同第7,407,770号、米国特許出願第2004/026533号および同第2009/007536号、ならびに欧州特許第1026949号に記載されており、それらの内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0052】

変異体ポリペプチドは、配列番号1~73および83~86に示されるペプチドと少なくとも約80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であり、それらも本発明のポリペプチドである。配列同一性のパーセントは、当該技術分野において認識さ

10

20

30

40

50

れている意味を有し、2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の同一性を測定する方法は多くある。例えば、Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988)、Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993)、Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994)、von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987)、および Gribbskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991)を参照されたい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを整列するための方法は、GCGプログラムパッケージ (Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12: 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul et al., J Molec. Biol. 215: 403 (1990))、ならびにスミスおよびウォーターマンの局所相同性アルゴリズムを使用する Bestfit プログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) (Adv. App. Math., 2: 482 - 489 (1981)) を含むコンピュータープログラムにおいて体系化される。例えば、-12のギャップオープンペナルティおよび-2のギャップ伸長ペナルティを用いるアフィンギャップ検索とともに、FASTAアルゴリズムを用いるコンピュータープログラムALIGNを使用することができる。

【0053】

配列アラインメントプログラムのうちのいずれかを使用して、特定の配列が例えば、参照配列と約95%同一であるかどうかを決定する場合、パラメータは、同一性の割合が参照ポリヌクレオチドの全長にわたって計算され、かつ参照ポリヌクレオチド内のヌクレオチド総数の最大5%の同一性のギャップが許容されるように、設定される。

【0054】

ペプチド配列の変異体は、配列の既知の特性に部分的に基づいて、当業者によって容易に選択され得る。例えば、変異体ペプチドは、アミノ酸置換 (例えば、保存アミノ酸置換) および/または欠失 (例えば、小さな単一アミノ酸欠失、または2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、もしくはそれ以上の連続したアミノ酸を包含する欠失) を含み得る。故に、特定の実施形態において、天然ペプチド配列の変異体は、(i) 1つ以上 (例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上) の保存アミノ酸置換、(ii) 1つ以上 (例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上) のアミノ酸の欠失、または (iii) それらの組み合わせによって、天然に存在する配列とは異なるものである。欠失アミノ酸は、連続または非連続であり得る。保存アミノ酸置換は、それらの側鎖および化学特性において関連するアミノ酸のファミリー内で起こるものである。これらは、例えば、(1) 酸性アミノ酸: アスパラギン酸、グルタミン酸; (2) 塩基性アミノ酸: リジン、アルギニン、ヒスチジン; (3) 非極性アミノ酸: アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン; (4) 非電荷極性アミノ酸: グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン; (5) 脂肪族アミノ酸: グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン (セリンおよびトレオニンは、任意に脂肪族ヒドロキシルとして別個に分類される); (6) 芳香族アミノ酸: フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン; (7) アミドアミノ酸: アスパラギン、グルタミン; ならびに (9) 硫黄含有アミノ酸: システインおよびメチオニンを含む。例えば、Biochemi

stry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, W H Freeman and Co.: 1981を参照されたい。変異体ペプチドが好適であることを確認するための方法は、慣習的であり、ルーチンである。

【0055】

ペプチド配列の変異体は、以前に定義されたペプチド配列上の変化を包含する。例えば、既知のエピトープを含む前述のペプチド配列は、一端または両端において（例えば、約1～3個のアミノ酸だけ）延長または短縮され得、および/または1個、2個、3個、4個、またはそれ以上のアミノ酸は、保存アミノ酸等によって置換され得る。さらに、タンパク質の領域が、関心対象のエピトープを含有すると特定された場合、研究者は、活性を最適化するために、関心対象の領域を（例えば、いずれかの方向に約5個のアミノ酸だけ）元の粗領域の終点から「シフト」することができる。

10

【0056】

特定の実施形態において、付加的N末端ペプチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列を有する別のペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。故に、いくつかの実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列を有する配列の多量体であり得る。他の実施形態において、N末端ペプチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列のN末端に天然に隣接している天然のOMP-1ペプチド配列である。他の実施形態において、ペプチドは、任意に1つ以上の連結アミノ酸を介した、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列の融合を含むことができる。例えば、一実施形態において、ペプチドは、任意に1つ以上の連結アミノ酸（例えば、グリシン、セリン、またはシステイン残基）を介して配列番号3または配列番号85に連結した、配列番号1の配列を含むことができる。別の実施形態において、ペプチドは、任意に1つ以上の連結アミノ酸（例えば、グリシン、セリン、またはシステイン残基）を介して配列番号3または配列番号85に連結した、配列番号7の配列を含むことができる。別の実施形態において、ペプチドは、任意に1つ以上の連結アミノ酸（例えば、グリシン、セリン、またはシステイン残基）を介して配列番号3または配列番号85に連結した、配列番号83の配列を含むことができる。さらに別の実施形態において、ペプチドは、任意に1つ以上の連結アミノ酸（例えば、グリシン、セリン、またはシステイン残基）を介して配列番号72に連結した、配列番号1、配列番号7、または配列番号83の配列を含むことができる。なおも別の実施形態において、ペプチドは、任意に1つ以上の連結アミノ酸（例えば、グリシン、セリン、またはシステイン残基）を介して配列番号71に連結した、配列番号1、配列番号7、または配列番号83の配列を含むことができる。

20

30

【0057】

特定の実施形態において、付加的N末端ペプチド配列は、非天然配列である。本明細書において使用されるとき、「非天然」配列は、エールリヒアタンパク質に由来するかまたはそれ以外の、天然のOMP-1ペプチド配列ではない任意のタンパク質配列である。特定の実施形態において、付加的N末端ペプチド配列は、エールリヒア表面抗原のエピトープを含む。特定の実施形態において、付加的N末端ペプチド配列は、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3のようなエールリヒア抗原のエピトープを含む。エールリヒア抗原に対応するタンパク質およびペプチド配列について説明されている。例えば、米国特許第6,306,402号、同第6,355,777号、同第7,204,992号、および同第7,407,770号、ならびに国際公開第WO2006/138509号を参照されたい（それらの内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）。他の微生物から得られるポリペプチドまたはペプチドを使用することもできる。

40

【0058】

50

特定の実施形態において、付加的N末端ペプチド配列は、配列の組み合わせである。例えば、付加的N末端ペプチド配列は、天然配列、非天然配列、またはかかる配列の任意の組み合わせを含むことができる（例えば、2つ以上の天然配列、2つ以上の非天然配列、または1つ以上の非天然配列と組み合わせた1つ以上の天然配列）。

【0059】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85によって定義された配列を含み、付加的C末端配列をさらに含む。付加的C末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。特定の実施形態において、付加的C末端ペプチド配列は、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、約25～約30、約30～約40、または約40～約50のアミノ酸の長さを有する。付加的C末端ペプチド配列は、天然OMP-1配列であり得る。特定の実施形態において、C末端ペプチド配列は、天然に存在するエールリヒアOMP-1配列の断片である。ペプチド配列は、例えば、OMP-1の保存領域または非保存領域に由来し得る。ペプチド配列は、例えば、免疫優勢エピトープのようなエピトープ、または宿主（例えば、ヒト、イヌ等）免疫系によって認識可能な任意の他のエピトープを含むことができる。特定の実施形態において、付加的C末端ペプチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列を有する別のペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。例えば、特定の実施形態において、本発明のペプチドは、それぞれが配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列を有する配列の多量体であり得る。他の実施形態において、天然配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列のC末端に天然に隣接しているOMP-1配列である。

【0060】

特定の実施形態において、付加的C末端ペプチド配列は、非天然配列である。特定の実施形態において、付加的C末端ペプチド配列は、OMP-1以外のエールリヒア表面抗原のエピトープを含む。特定の実施形態において、付加的C末端ペプチド配列は、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3のようなエールリヒア抗原のエピトープを含む。他の微生物から得られるポリペプチドまたはペプチドを使用することもできる。

【0061】

特定の実施形態において、付加的C末端ペプチド配列は、配列の組み合わせである。例えば、付加的C末端ペプチド配列は、天然配列、非天然配列、またはかかる配列の任意の組み合わせを含むことができる（例えば、2つ以上の天然配列、2つ以上の非天然配列、または1つ以上の非天然配列と組み合わせた1つ以上の天然配列）。

【0062】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85によって定義された配列を含み、付加的N末端配列および付加的C末端配列をさらに含む。付加的N末端およびC末端ペプチド配列は、上記のとおりであり得る。本発明のペプチドは、全長OMP-1タンパク質からなる訳ではない。しかしながら、特定の実施形態において、本発明のペプチドは、全長OMP-1タンパク質を含むことができる。他の実施形態において、本発明のペプチドは、全長OMP-1タンパク質を含まない。

【0063】

付加的N末端および/またはC末端ペプチド配列を含む本発明のペプチドは、エールリヒア感染を感染後早期に（例えば、感染の発症後1～2週間以内に）診断するために設計され得る。例えば、特定の実施形態において、付加的N末端および/またはC末端ペプチド配列は、エールリヒア感染の早期段階と関連付けられた抗原またはエピトープを含む。

【 0 0 6 4 】

上記配列に加えて、付加的N末端およびC末端配列は、イムノアッセイ（例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローイムノアッセイ、凝集アッセイ等）において、検出のために本発明のペプチドをより良く提示するように設計された柔軟な配列を含み得るか、またはそれからなり得る。かかる柔軟な配列は、当業者によって容易に特定され得る。

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、25個以上（例えば、26個、27個、28個、29個、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、30個以上（例えば、31個、32個、33個、34個、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、35個以上（例えば、36個、37個、38個、39個、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、40個以上（例えば、41個、42個、43個、44個、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、45個以上（例えば、46個、47個、48個、49個、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、50個以上（例えば、51個、52個、53個、54個、またはそれ以上）のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、またはそれ以上のアミノ酸残基を含むか、またはそれからなる。

【 0 0 6 6 】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、本明細書に記載のペプチド配列のエピトープを含む。例えば、特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1～73および83～86からなる群から選択された配列のエピトープを含む。

【 0 0 6 7 】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、本明細書に記載のペプチド配列の断片を含む。例えば、特定の実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1～73および83～86からなる群から選択された配列の断片を含む。断片は、例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または44のアミノ酸長であり得る。断片は、連続であり得るか、または1つ以上の欠失（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失）を含み得る。例えば、一実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号1の断片を含む。かかる断片は、配列番号1から少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、または35個の連続アミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態において、断片は、配列番号1のアミノ酸1～26を含む。故に、一実施形態において、本発明のペプチドは、

S-X₂-K-E-D-K-Q-T-T-X₁₀-X₁₁-I-W-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-P-X₂₄-X₂₅-

X₂₆ (配列番号 84)

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、X₂は、AおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀は、TおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁は、GおよびAからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈は、EおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀は、DおよびNからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂は、SおよびVからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄は、AおよびIからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅は、TおよびPからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆は、S、N、およびKからなる群から選択されるアミノ酸である。

【 0 0 6 8 】

特定の一実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号 3 または配列番号 7 2 の断片を含む。かかる断片は、配列番号 3 または配列番号 7 2 から少なくとも 1 0 個、1 5 個、2 0 個、2 5 個、3 0 個、3 5 個、または 4 0 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、特定の実施形態において、かかる断片は、配列番号 3 または配列番号 7 2 のアミノ酸 1 ~ 2 6 を含み得る。故に、一実施形態において、本発明のペプチドは、
S-X₂-K-E-X₅-K-Q-X₈-T-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-L-K-Q-X₁₈-W-X₂₀-G-X₂₂-X₂₃-X₂₄-

X₂₅-X₂₆ (配列番号 86)

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、X₂ は、A および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₅ は、E および D からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₈ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₀ は、T および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₁ は、G および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂ は、L および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₃ は、Y および F からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₀ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₂ は、S および V からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₃ は、A、S、および T からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₄ は、A および I からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₅ は、T および P からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆ は、S、N、および K からなる群から選択されるアミノ酸である。他の実施形態において、断片は、配列番号 3 または配列番号 7 2 のアミノ酸 3 3 ~ 7 1 を含み得る。故に、一実施形態において、本発明のペプチドは、

F-S-A-K-E-E-X₇-A-X₉-T-R-

X₁₂-T-F-G-X₁₆-X₁₇-K-Q-Y-D-G-A-X₂₄-I-X₂₆-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号 5)

の配列を含むか、またはそれからなり、式中、X₇ は、任意のアミノ酸であり、X₉ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₂ は、任意のアミノ酸であり、X₁₆ は、V および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₇ は、任意のアミノ酸であり、X₂₄ は、任意のアミノ酸であり、X₂₆ は、任意のアミノ酸である。別の実施形態において、本発明のペプチドは、

C-F-S-A-K-E-E-X₈-A-X₁₀-

T-R-X₁₃-T-F-G-X₁₇-X₁₈-K-Q-Y-D-G-A-X₂₅-I-X₂₇-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N (配列番号 6)

の配列を含み、式中、X₈ は、任意のアミノ酸であり、X₁₀ は、D および N からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₃ は、任意のアミノ酸であり、X₁₇ は、V および A からなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₈ は、任意のアミノ酸であり、X₂₅ は、任意のアミノ酸であり、X₂₇ は、任意のアミノ酸である。さらに別の実施形態において、本発明のペプチドは、

F-S-A-K-E-E-X₇-A-

E-T-R-X₁₂-T-F-G-L-X₁₇-K-Q-Y-D-G-A-X₂₄-I-X₂₆-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号

71)

の配列を含み、式中、X₇ は、任意のアミノ酸であり、X₁₂ は、任意のアミノ酸であり、X₁₇ は、任意のアミノ酸であり、X₂₄ は、任意のアミノ酸であり、X₂₆ は、任意のアミノ酸である。

【 0 0 6 9 】

特定の実施形態において、断片は、米国特許第 6, 3 0 6, 4 0 2 号、同第 6, 3 5 5, 7 7 7 号、同第 7, 2 0 4, 9 9 2 号、もしくは同第 7, 4 0 7, 7 7 0 号、または国際公開第 W O 2 0 0 6 / 1 3 8 5 0 9 号に記載の配列を含む。特定の実施形態において、断片は、米国特許第 6, 3 0 6, 4 0 2 号、同第 6, 3 5 5, 7 7 7 号、同第 7, 2 0 4

10

20

30

40

50

、992号、および同第7,407,770号、ならびに国際公開第WO2006/138509号のうちの1つ以上に記載の配列からなる訳ではない。本明細書に記載のペプチド配列の断片を含む本発明のペプチドは、付加的N末端ペプチド配列、付加的C末端ペプチド配列、またはそれらの組み合わせをさらに含むことができる。付加的N末端およびC末端ペプチド配列は、上記のとおりであり得る。

【0070】

付加的N末端またはC末端ペプチド配列を含む本発明のペプチドは、ペプチド（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、もしくは配列番号85のペプチド、またはその断片）を、付加的N末端またはC末端ペプチド配列と接続するリンカーをさらに含むことができる。リンカーは、例えば、ペプチド
10
スペーサーであり得る。かかるスペーサーは、例えば、約1個～5個（例えば、約3個）のアミノ酸残基、好ましくは、非電荷アミノ酸、例えば、グリシンまたはアラニンのような脂肪族残基からなり得る。一実施形態において、スペーサーは、トリプレットグリシンスペーサーである。別の実施形態において、スペーサーは、トリプレットアラニンスペーサーである。なおも別の実施形態において、スペーサーは、グリシン残基およびアラニン残基の両方を含む。代替として、リンカーは、化学（すなわち、非ペプチド）リンカーであり得る。

【0071】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、合成化学によって産生される（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（す
20
なわち、リボソームのような細胞機構によって）産生される。特定の実施形態において、本発明のペプチドは単離される。本明細書において使用されるとき、「単離」ペプチドは、合成的または生物学的のいずれかで産生され、次にペプチドを産生するために使用された化学物質および/または細胞機構から少なくとも部分的に精製されたペプチドである。特定の実施形態において、本発明の単離ペプチドは、実質的に精製される。本明細書において使用されるとき、「実質的に精製された」という用語は、細胞物質（タンパク質、脂質、炭水化物、核酸等）、培養培地、化学前駆体、ペプチドの合成に使用される化学物質、またはそれらの組み合わせを実質的に含まないペプチドのような分子を指す。実質的に精製されたペプチドは、約40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%未満、またはそれ以下の細胞物質、培養培地、他のポリペプチド、化学前駆体、
30
および/またはペプチドの合成に使用される化学物質を有する。したがって、ペプチドのような実質的に純粋な分子は、乾燥重量で少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の関心対象の分子であり得る。本発明の単離ペプチドは、水中、緩衝液中、または、例えばキットの一部として、再構成を待つ乾燥形態であり得る。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。本発明のペプチドで塩を形成することができる好適な酸および塩基は、当業者に周知であり、無機および有機の酸および塩基を含む。

【0072】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、親和性精製される。例えば、特定の実施形態において、本発明のペプチドは、それらが抗エールリヒア抗体（例えば、OMP-
40
1タンパク質および任意の他のエールリヒア抗原に対する抗体）に結合する能力によって、ペプチド-抗体複合体が形成するようにかかる抗体を本発明のペプチドと接触させ、ペプチド-抗体複合体を洗浄して不純物を除去し、次にペプチドを抗体から溶離することによって、精製される。抗体は、例えば、固体支持体に付着してあり得る。親和性精製の方法は、当業者に周知であり、ルーチンである。

【0073】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは修飾される。本発明のペプチドは、多様な技術によって、例えば、熱および/または洗剤（例えば、SDS）での変性によって修飾され得る。代替として、本発明のペプチドは、1つ以上のさらなる部分との結合によって修飾され得る。結合は、共有結合性または非共有結合性であり得、例えば、リジンもし
50

くはシステインのような末端アミノ酸リンカー、化学カップリング剤、またはペプチド結合を介し得る。付加的部分は、例えば、リガンド、リガンド受容体、融合パートナー、検出可能な標識、酵素、またはペプチドを固定化する基体であり得る。

【0074】

本発明のペプチドは、リガンド、例えば、ビオチン（例えば、システインもしく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）、または担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリンFc領域、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、例えば、システインもしくはリジン残基を介して）に共役され得る。ビオチンのようなリガンドへの付着は、ペプチドを、アビジン、ストレプトアビジン、ポリマーストレプトアビジン（例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれる、米国公
10
開第2010/0081125号、および同第2010/0267166号を参照）、またはニュートラアビジンのようなリガンド受容体と結合させるために有用であり得る。アビジン、ストレプトアビジン、ポリマーストレプトアビジン、またはニュートラアビジンは次に、シグナル伝達部分（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）もしくはアルカリホスファターゼ（ALP）のような酵素、または金属ナノ粒子もしくはナノシェルのような可視化され得る他の部分（例えば、コロイド金）または蛍光部分）、あるいは固体基体（例えば、Immobilon（商標）またはニトロセルロース膜）に連結され得る。代替として、本発明のペプチドは、アビジン、ストレプトアビジン、ポリマー
20
ストレプトアビジン、またはニュートラアビジンのようなリガンド受容体に融合または結合され得、それによって対応するリガンド、例えば、ビオチンおよび任意の部分（例えば、シグナル伝達部分）またはそこに付着している固体基体とのペプチドの結合を促進する。他のリガンド-受容体対の例は、当該技術分野において周知であり、同様に使用することができる。

【0075】

本発明のペプチドは、精製を改善する、宿主細胞中のペプチドの発現を強化する、検出を補助する、ペプチドを安定化する等のために使用することができる融合パートナー（例えば、ペプチドまたは他の部分）に融合され得る。融合パートナーに好適な化合物の例としては、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領域、KLH）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（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）、ヒスチジント
30
グ等が挙げられる。融合は、例えば、ペプチド結合によって達成され得る。例えば、本発明のペプチドおよ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、または付加的N末端およびC末端ペプチド配列の文脈において上述のとおり、ペプチドリンカーを含み得る。特定の実施形態において、本発明のペプチドの混合物は、デンドリマーによって、例えば、MAPS構造内にあるように連結され得る。

【0076】

加えて、本発明のペプチドは、多様な既知の化学基または分子のうちのいずれかを含むように修飾され得る。かかる修飾としては、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、半部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質また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、周期化、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、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、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、タンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、例えば、アルギニル化等が挙げられるが、これらに限定されない。置換連結を持つアミノ酸（非天然アミノ酸を含む）およびペプチドの類似体も含まれる。本明細書に論じられる配列のうちのいずれかからなる本発明のペプチドは、論じられる修飾のうちのいずれかによって修飾され得る。かかるペプチドは、依然としてアミノ酸「からなる」。

10

20

30

40

50

【0077】

上記のような修飾は、当業者に周知であり、科学文献において極めて詳細に説明されている。いくつかの特に一般的な修飾、グリコシル化、脂質付着、硫酸化、グルタミン酸残基の -カルボキシル化、ヒドロキシル化、およびADP-リボシル化は、例えば、多くの基本的なテキスト、例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) に説明されている。この表題に関して、Wold, F., Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983)、Seifter et al. (1990) Meth. Enzymol. 182: 626 - 646、およびRattan et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48 - 62のような多くの詳細なレビューが入手可能である。

10

【0078】

特定の実施形態において、本発明のペプチドは、固体または半固体支持体のような基体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。付着は、共有結合性または非共有結合性であり得、かつ、共有結合または非共有結合を可能にするペプチドと結合した部分によって、例えば、担体、支持体、または表面に付着した構成要素に対して高い親和性を有する部分によって、促進され得る。例えば、ペプチドを、ビオチンのようなリガンドと結合させることができ、かつ、表面と結合した構成要素は、アビジンのような対応するリガンド受容体であり得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、ペプチドの基体への付着を促進する融合パートナー、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)と結合し得る。他の実施形態において、本発明のペプチドは、金属ナノ層を介して基体に付着しているかまたはその表面に固定化されている。一実施形態において、金属ナノ層は、カドミウム、亜鉛、水銀、または貴金属、例えば、金、銀、銅、および白金で構成される。ペプチドまたはペプチドの混合物は、イムノアッセイ中、抗体を含有する試料の添加前または添加後のいずれかに基体に付着され得るか、またはその表面に固定化され得る。

20

【0079】

特定の実施形態において、基体は、コロイド粒子(例えば、金、銀、白金、銅、カドミウム、金属組成物、他の軟金属、コアシェル構造粒子、もしくは中空金ナノ球)あるいは他の種類の粒子(例えば、磁気ビーズまたはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、もしくはPVDfを含む粒子またはナノ粒子)のようなビーズである。かかる粒子は、標識(例えば、比色分析、化学発光、または蛍光標識)を含むことができ、イムノアッセイ中にペプチドの位置を可視化するために有用であり得る。特定の実施形態において、本発明のペプチドの末端システインを使用して、ペプチドを、金、銀、白金、銅、カドミウム、金属組成物、もしくは他の軟金属、または金属ナノシェル(例えば、金中空球、金コーティングシリカナノシェル、およびシリカコーティング金シェル)から作製されたナノ粒子に直接結合する。

30

【0080】

特定の実施形態において、基体は、ドットプロットまたはラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路である。例えば、ペプチドは、多孔質膜、例えば、PVDf膜(例えば、Immobilon(商標)膜)、ニトロセルロース膜、ポリエチレン膜、ナイロン膜、または同様の種類の膜に付着し得るか、またはその表面に固定化され得る。

40

【0081】

特定の実施形態において、基体は、分析用または遠心分離用ローター内の流路である。他の実施形態において、基体は、管またはウェル、例えば、ELISAアッセイにおける使用に好適なプレート(例えば、マイクロタイタープレート)内のウェルである。かかる基体は、ガラス、セルロース系物質、熱可塑性ポリマー、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、もしくはポリエステル、粒子物質からなる焼結構造(例えば、ガラスもしくはは

50

様々な熱可塑性ポリマー)、またはニトロセルロース、ナイロン、ポリスルホン等からなる注型膜フィルムを含むことができる。基体は、多孔質ポリエチレンとして一般に知られているポリエチレン、例えば、Chromex Corporation (Albuquerque, NM) からの 0.2 ~ 15 ミクロンの多孔質ポリエチレンの焼結された微粒子であり得る。これらの基体物質の全ては、好適な形状、例えば、フィルム、シート、もしくはプレートで使用され得るか、またはそれらは、紙、ガラス、プラスチックフィルム、もしくは布地のような適切な不活性担体の表面にコーティングされ得るか、または結合もしくは積層され得る。ペプチドを固相の表面に固定化するための好適な方法としては、イオン性、疎水性、共有結合性相互作用等が挙げられる。

【0082】

したがって、別の態様において、本発明はデバイスを提供する。特定の実施形態において、デバイスは、イムノアッセイを行うために有用である。例えば、特定の実施形態において、デバイスは、ラテラルフローイムノアッセイデバイスである。いくつかの実施形態において、デバイスは、ペプチドまたはペプチドの集団が付着している複数のピースで構成されたスライドである。他の実施形態において、デバイスは、分析用または遠心分離用ローターである。他の実施形態において、デバイスは、ドットプロット、スロットプロット、またはウェスタンプロットである。他の実施形態において、デバイスは、例えば、ELISA アッセイに好適なプレート内の管またはウェルである。さらに他の実施形態において、デバイスは、電気化学センサー、光学センサー、または光電子工学センサーである。

【0083】

特定の実施形態において、デバイスは、本発明のペプチドまたはペプチドの集団を含む。他の実施形態において、デバイスは、本発明の異なるペプチドの混合物を含む。例えば、特定の実施形態において、デバイスは、本発明の 2 つ、3 つ、4 つ、またはそれ以上の異なるペプチドを含む。特定の実施形態において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 70、配列番号 72、配列番号 83、配列番号 85 の配列、またはその断片を含む。他の実施形態において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 72 の配列、またはその断片を含む。特定の実施形態において、ペプチドの混合物または集団は、任意に金属ナノ層を介してデバイスに付着しているか、またはその表面に固定化されている。デバイスは、試料中の複数の種 (例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、およびエールリヒア・ムリス) からのエールリヒア抗原に対する抗体を同時に検出するように使用され得る。一実施形態において、デバイスは、3 つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を含み、この集団内の各ペプチドは、配列番号 72 の配列を含む。関連実施形態において、単離ペプチドの集団は、配列番号 3 および/または配列番号 71 の配列を含むペプチドをさらに含む。別の実施形態において、デバイスは、3 つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を含み、この集団内の各ペプチドは、配列番号 3 の配列を含む。別の実施形態において、デバイスは、3 つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を含み、この集団内の各ペプチドは、配列番号 1 の配列を含む。さらに別の実施形態において、デバイスは、3 つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を含み、この集団内の各ペプチドは、配列番号 71 の配列を含む。他の実施形態において、デバイスは、3 つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を含み、この集団内の各ペプチドは、配列番号 7、配列番号 70、配列番号 83、または配列番号 85 の配列を含む。

【0084】

別の態様において、本発明は、本発明の 1 つ以上のペプチドを含む組成物を提供する。例えば、特定の実施形態において、本発明は、配列番号 1 の配列を含むペプチドを含む組成物、またはその混合物を提供する。特定の実施形態において、この組成物は、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、40 個、50 個、60 個、70 個、80 個、90 個、100 個、150 個、200 個、2

10

20

30

40

50

500個、300個、400個、500個、またはそれ以上のペプチド（例えば、配列番号1によって定義される全ての可能なペプチド）の混合物を含む。故に、本発明は、3つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を提供し、この集団内の各ペプチドは、配列番号1の配列を含む。特定の実施形態において、集団または混合物内のペプチドは、N末端および/もしくはC末端付加を含み、ならびに/または本明細書に記載のとおり（例えば、1つ以上のさらなる部分との結合によって）修飾される。特定の実施形態において、ペプチドは、同じN末端および/またはC末端付加を含む。他の実施形態において、ペプチドは、異なるN末端および/またはC末端付加を含む。

【0085】

さらに他の実施形態において、本発明は、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、配列番号85の配列を含むペプチドを含む組成物、またはその混合物を提供する。特定の実施形態において、この組成物は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、150個、200個、250個、300個、400個、500個、またはそれ以上のペプチド（例えば、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85によって定義される全ての可能なペプチド）の混合物を含む。故に、本発明は、3つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を提供し、この集団内の各ペプチドは、配列番号3の配列を含む。別の実施形態において、本発明は、3つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を提供し、この集団内の各ペプチドは、配列番号72の配列を含む。他の実施形態において、本発明は、3つ以上の異なるペプチドを含む単離ペプチドの集団を提供し、この集団内の各ペプチドは、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号83、または配列番号85の配列を含む。集団または混合物内のペプチドは、N末端および/もしくはC末端付加を含み得、ならびに/または本明細書に記載のとおり（例えば、1つ以上のさらなる部分との結合によって）修飾される。

【0086】

特定の実施形態において、組成物は、本発明の1つ以上のペプチド（もしくはペプチドの1つ以上の集団）、ならびに、1つ以上の付加的ペプチド、例えば、エールリヒアペプチドもしくは抗原、1つ以上の感染性エールリヒア種からのペプチドもしくは抗原、または単球および/もしくは顆粒球エールリヒア症の1つ以上の原因物質からのペプチドもしくは抗原を含む。エールリヒアペプチドまたは抗原は、任意のエールリヒア表面ペプチドもしくは抗原、または本明細書に記載の任意のペプチドもしくは抗原であり得る（例えば、OMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、もしくはHGE-3タンパク質の任意のペプチドもしくは抗原、またはその任意の断片もしくはエピトープ）。組み合わせは、個別のペプチドもしくはポリペプチドのカクテル（単純混合物）を含み得るか、融合ペプチドもしくはポリペプチド（例えば、多量体ペプチド）の形態であり得るか、またはペプチドは、デンドリマーによって（例えば、MAPS構造内にあるように）、任意に連結残基（例えば、リジンもしくはシステイン残基）を介して連結され得る。例えば、特定の実施形態において、組成物は、1つ以上の本発明のペプチド（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85の配列を有するペプチド）および

F-S-A-
K-E-E-X₇-A-E-T-R-X₁₂-T-F-G-L-X₁₇-K-Q-Y-D-G-A-X₂₄-I-X₂₆-E-N-Q-V-Q-N-K-F-T-I-S-N-C (配列番号71)

の配列またはその断片を有する1つ以上の抗原性エールリヒアペプチドを含み、式中、X₇は、任意のアミノ酸であり、X₁₂は、任意のアミノ酸であり、X₁₇は、任意のアミノ酸であり、X₂₄は、任意のアミノ酸であり、X₂₆は、任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、X₇は、Kである。他の実施形態において、X₁₂は、Kおよび

10

20

30

40

50

びRからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₁₇は、EおよびDからなる群から選択されるアミノ酸である。さらに他の実施形態において、X₂₄は、KおよびQからなる群から選択されるアミノ酸であり、X₂₆は、EおよびTからなる群から選択されるアミノ酸である。

【0087】

特定の実施形態において、ペプチドの混合物または集団は、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドを含む。さらに他の実施形態において、ペプチドの混合物または集団は、配列番号1の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドを含む。一実施形態において、ペプチドの混合物または集団は、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチドを含む。別の実施形態において、ペプチドの混合物または集団は、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドを含む。特定の一実施形態において、ペプチドの混合物または集団は、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチド、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドを含む。かかる混合物は、試料中の複数の種（例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、およびエールリヒア・ムリス）からのエールリヒア抗原に対する抗体の検出を同時に可能にする。

【0088】

本発明のペプチドは、そのN末端またはC末端において、別の好適なペプチドに融合され得る。本発明のペプチドの2つ以上のコピーは、互いに連結され得るか、単独であり得るか、または1つ以上の付加的ペプチドと併せて連結され得る。融合ペプチドまたはポリペプチドと非融合ペプチドまたはポリペプチドとの組み合わせを使用することができる。一実施形態において、付加的ペプチド（複数可）は、エールリヒアペプチドもしくは抗原からのB細胞および/またはT細胞エピトープ、感染性エールリヒア種からのペプチドもしくは抗原、または単球および/もしくは顆粒球エールリヒア症の原因物質からのペプチドもしくは抗原を含有する。

【0089】

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。本発明の核酸が含むのは微生物のゲノム全体よりも少なく、かつこれは一本鎖また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もしくはDNA、また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、および他のポリヌクレオチドのような他の構成要素を含まないように精製され得る。例えば、核酸は、50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%精製され得る。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1~73および83~86の配列を有するペプチド、またはその組み合わせをコードする。本発明の核酸は、他のヌクレオチド配列、例えば、リンカーをコードする配列、シグナル配列、TMR輸送停止配列、膜貫通領域、またはタンパク質精製に有用なリガンド、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、およびブドウ球菌プロテインAを含み得る。

【0090】

本発明の核酸は、単離され得る。「単離」核酸は、それが天然に結合している5'および3' 隣接ゲノム配列の一方または両方と直接連続していないものである。単離核酸は、天然に存在するゲノム内で組み換えDNA分子に直接隣接することが天然に見出される核酸配列が除去されるか、または不在であるならば、例えば、任意の長さの組み換えDNA分子であり得る。単離核酸は、天然に存在しない核酸分子も含む。本発明の核酸は、免疫原性ペプチドをコードする断片も含み得る。本発明の核酸は、全長ポリペプチド、ペプチド断片、および変異体または融合ペプチドをコードすることができる。

【0091】

本発明の核酸は、例えば、感染した個体からの血液、血清、唾液、または組織のような

10

20

30

40

50

生体試料中に存在する核酸配列から少なくとも部分的に単離され得る。核酸は、例えば、自動合成器を使用して、研究室で合成することもできる。PCRのような増幅方法を使用して、ポリペプチドをコードするゲノムDNAまたはcDNAのいずれかから少なくとも部分的に核酸を増幅することができる。

【0092】

本発明の核酸は、天然に存在するポリペプチドのコード配列を含むことができるか、または天然に存在しない改変配列をコードすることができる。所望される場合、核酸は、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、または宿主細胞中の本発明のポリヌクレオチドの発現を駆動する他の調節要素を含む発現制御要素を含む発現ベクターに、クローン化され得る。発現ベクターは、例えば、pBR322、pUC、もしくはColE1のようなプラスミド、またはアデノウイルス2型ベクターもしくは5型ベクターのようなアデノウイルスベクターであり得る。任意に、シンドビスウイルス、シミアンウイルス40、ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ならびにサイトメガロウイルスおよびレトロウイルスベクター、例えば、マウス肉腫ウイルス、マウス乳腺腫瘍ウイルス、モロニーマウス白血病ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスを含むが、これらに限定されない、他のベクターを使用することができる。MCおよびMC1のようなミニ染色体、バクテリオファージ、ファージミド、酵母人工染色体、細菌人工染色体、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、コスミド(ファージ コス部位が挿入されたプラスミド)、およびレプリコン(細胞においてそれら自体の制御下で複製することができる遺伝要素)を使用することもできる。

【0093】

発現制御配列に操作可能に連結されたポリヌクレオチドを調製し、それらを宿主細胞内で発現するための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、米国特許第4,366,246号を参照されたい。本発明の核酸は、ポリヌクレオチドの転写および/または翻訳を指示する1つ以上の発現制御要素に隣接してまたはその近位に位置付けられるとき、操作可能に連結されている。

【0094】

故に、例えば、本発明のペプチドは、従来の遺伝子工学技術に従って組み換えで産生され得る。本発明の組み換えペプチドを産生するために、ペプチドをコードする核酸は、好適な発現系に挿入される。一般に、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操作可能に連結される、組み換え分子またはベクターが構築される。例えば、細菌、ウイルス、酵母、真菌、昆虫、または哺乳類発現系を含有するベクターを含む、多種の適切な発現ベクターが、当該技術分野において既知である。かかる発現ベクターを入手し、使用するための方法は周知である。本発明の組成物または方法に使用されるこの分子生物学的技術およびその他におけるガイダンスについては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 現行版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298 (Plenum Press, 現行版)、Wu et al., Methods in Gene Biotechnology (CRC Press, New York, N.Y., 現行版)、Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 現行版)、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., Eds.,) John Wiley & Sons, NY (現行版)、およびそこに引用される参考文献を参照されたい。

【0095】

したがって、本発明は、本発明の核酸を含むベクター、およびかかるベクターを含む宿主細胞も提供する。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

10

20

30

40

50

の実施形態において、ベクターは、発現ベクターである（例えば、細菌または真核発現ベクター）。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。

【0096】

この方法による本発明の形質導入の組み換え核酸またはベクターに好適な宿主細胞または細胞株は、細菌細胞を含む。例えば、大腸菌（例えば、HB101、MC1061）の様々な株は、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。枯草菌（バチルス・サブティリス）、シュドモナス、ストレプトミセス、および他の桿菌等をこの方法で用いることもできる。代替として、本発明のペプチドは、従来の手順を使用して、酵母、昆虫、哺乳類、または他の細胞型において発現され得る。無細胞インビトロ合成および/または酵素媒介の合成機構が使用されてもよい。

10

【0097】

本発明は、例えば、電気穿孔のような従来的手段によって、本発明のポリヌクレオチドを含有する少なくとも1つの発現ベクターを持つ宿主細胞を、発現制御配列（例えば、転写調節配列）の制御下で、形質導入または形質転換することを伴う、組み換えペプチドまたはポリペプチドを産生するための方法も提供する。次に、形質導入または形質転換された宿主細胞は、ペプチドまたはポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養される。発現ペプチドまたはポリペプチドは、細胞から（または細胞外で発現された場合は培養培地から）、HPLC、FPLC等を使用する液体クロマトグラフィー（例えば、順相もしくは逆相）、親和性クロマトグラフィー（例えば、無機リガンドもしくはモノクローナル抗体を用いる）、サイズ排除クロマトグラフィー、固定化金属キレートクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む、当業者に既知の適切な手段によって、回収、単離、および任意に精製される。当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、最適な単離および精製技術を選択することができる。当業者は、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、キャピラリー電気泳動、カラムクロマトグラフィー（例えば、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、アミノ末端アミノ酸分析、および定量アミノ酸分析を含む、標準方法を使用することによって、ペプチドまたはポリペプチドの純度を決定することができる。

20

【0098】

方法

別の態様において、本発明は、試料中のエールリヒア抗原のエピトープに対する抗体を検出する方法を提供する。特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明のペプチドと接触させることと、該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、該複合体の形成は、該試料における、エールリヒア抗原のエピトープに対する抗体の存在を示す。いくつかの実施形態において、エールリヒア抗原は、感染性エールリヒア種に由来する。特定の実施形態において、エールリヒア抗原は、病原性エールリヒア種、例えば、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、エールリヒア・ムリス、またはエールリヒア・カニスに由来する。単球および/または顆粒球エールリヒア症に関連した他のエールリヒア種は、それらが本発明のペプチドと特異的に反応することができる抗体を誘導するならば、本発明の方法を使用して検出することもできる。故に、本明細書において使用されるとき、「病原性エールリヒア」という用語は、単球および/または顆粒球エールリヒア症を引き起こす、任意のかかるエールリヒア種を指す。特定の実施形態において、これらの方法は、試料中の複数の種（例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・エウイング、およびエールリヒア・ムリス）からのエールリヒア抗原に対する抗体の検出を同時に提供する。

30

40

【0099】

特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上（例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、またはそれ以上）の異なるペプチドの混合物または集団と接触させることを含む。例え

50

ば、特定の一実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号1の配列を含む。別の特定実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号3の配列を含む。さらに別の実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号72の配列を含む。いくつかの実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号1、配列番号3、または配列番号72の配列を含む。他の実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号83、または配列番号85の配列を含む。

10

【0100】

特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の1つ以上のペプチドおよび1つ以上の他のペプチド（例えば、エールリヒアペプチド、またはその抗原性断片もしくはエピトープ、例えば、エールリヒア表面抗原、またはOMP-1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE-3タンパク質）の混合物と接触させることを含む。例えば、いくつかの実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の1つ以上のペプチド（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85）および配列番号71の配列を有する1つ以上のエールリヒア抗原性ペプチドの混合物と接触させることを含む。特定の一実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。別の実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。別の実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。一実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。本発明のペプチドの混合物は、いくつかの実施形態において、試料中の複数のエールリヒア種（例えば、エールリヒア・カニス、エールリヒア・ムリス、エールリヒア・シャフェンシス、およびエールリヒア・エウイング）からの抗原に対する抗体の検出を同時に可能にする。

20

30

【0101】

特定の実施形態において、ペプチドまたは混合物もしくは集団中の各ペプチドは、単離（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。特定の実施形態において、ペプチドまたはペプチドの混合物（すなわち、ペプチドの集団）は、固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。特定の実施形態において、固体支持体は、ビーズ（例えば、金属ナノ粒子もしくはナノシェル、ナノ粒子、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路（例えば多孔質膜）、分析用もしくは遠心分離用ローター内の流路、プロット（ウェスタンプロット、ドットプロット、もしくはスロットプロット）、管もしくはウェル（例えば、ELISAアッセイに好適なプレート内）、またはセンサー（例えば、電気化学、光学、または光電子工学センサー）である。いくつかの実施形態において、ペプチドまたはペプチドの混合物は、いくつかの実施形態において、カドミウム、亜鉛、水銀、または貴金属（例えば、金、銀、銅、および白金）で構成され得る金属ナノ層を介して固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。

40

【0102】

50

特定の実施形態において、検出するステップは、E L I S Aまたは免疫蛍光アッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出するステップは、ラテラルフロー免疫アッセイを行うことを含む。他の実施形態において、検出するステップは、凝集アッセイ（例えば、血球凝集または粒子/ビーズ凝集アッセイ）を行うことを含む。他の実施形態において、検出するステップは、試料を分析用または遠心分離用ローター内で回転させることを含む。いくつかの実施形態において、検出するステップは、波長シフトアッセイを行うことを含む。かかる波長シフトアッセイは、金属ナノ層または金属ナノ粒子/ナノシェルに付着したペプチドへの抗体の結合から生じる表面プラズモン共鳴または局所表面プラズモン共鳴の変化を測定または決定することを含み得る。さらに他の実施形態において、検出するステップは、電気化学、光学、または光電子工学センサーを用いて、試料を分析

10

【0103】

本発明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アッセイがある。例えば、検出するステップは、E L I S Aアッセイを行うこと、免疫蛍光アッセイを行うこと、ラテラルフロー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、もしくはドットブロットを行うこと、分析用もしくは遠心分離用ローター内で試料を分析すること、または電気化学、光学、もしくは光電子工学センサーを用いて試料を分析することを含み得る。これらの異なるアッセイは、本明細書に記載される、および/または当業者に周知である。

20

【0104】

一実施形態において、方法は、感染した対象の免疫系によってその生体液または組織中で産生され、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドの組み合わせ、および任意に1つ以上の好適な付加的抗原性ポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合することができる、1つ以上のエールリヒア抗原（例えば、病原性エールリヒア、例えば、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・ムリス、エールリヒア・エウイング、またはエールリヒア・カニスの抗原）に対する天然に存在する抗体の存在を検出することを伴う。

【0105】

好適な免疫アッセイ方法は、典型的に、抗体を含有する可能性がある体液または組織の試料を（例えば、患者から）受け取るか、または入手することと、アッセイされる試料を、特異的ペプチド-抗体複合体の形成に（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、本発明のペプチドと接触させること（例えば、インキュベートするか、または反応させること）と、接触した（反応した）試料を抗体-ペプチド反応の存在についてアッセイすること（例えば、抗体-ペプチド複合体の量を決定すること）とを含む。漸増量の抗体-ペプチド複合体の存在は、対象が、感染性エールリヒア種に曝露され、感染したことを示す。その修飾形態を含む、エールリヒア抗原に対する抗体に「特異的に結合する」（例えば、該抗体「に特異的な」または該抗体に対して「選好的に」結合する）ペプチドは、抗体の検出を可能にする量で、十分な時間、抗体と相互作用するか、またはそれとの物理的結合を形成もしくは経験する。「特異的に」または「選好的に」とは、ペプチドが、試料中の他の抗体に対するよりも、かかる抗体に対して高い親和性（例えば、より高い程度の選択性）を有することを意味する。例えば、ペプチドは、試料中の他の抗体に対するよりも、その抗体に対して少なくとも約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、またはそれより高い親和性を有し得る。かかる親和性または特異度の程度は、例えば、競合的結合研究を含む、多様なルーチン手順によって決定され得る。E L I S Aアッセイにおいて、陽性応答は、健常対照の群の平均値よりも大きな値2または3の標準偏差として定義される。いくつかの実施形態において、単球および/または顆粒球エールリヒア症の明白な血清診断を提供するために、二次アッセイが必要とされる。

30

40

【0106】

「抗体を含有する試料」または「試料中の抗体を検出する」のような表現は、抗体が含有されていないか、または検出されない場合に、試料または決定（例えば、検出試行）を

50

排除することを意味しない。一般的な意味において、この発明は、感染性エールリヒアの感染にตอบสนองして産生された抗体が、検出されるか否かに関わらず、試料中に存在するかどうかを決定するアッセイを伴う。

【0107】

ペプチドおよび抗体を、それらが特異的に反応するように反応させるための条件は、当業者に周知である。例えば、*Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc) を参照されたい。

【0108】

方法は、抗体を含有する可能性のある体液または組織の試料を、対象から受け取ること、または入手することを含む。抗体は、例えば、IgG、IgE、IgD、IgM、またはIgA型であり得る。一般に、IgMおよび/またはIgA抗体は、例えば、感染の早期段階での検出のために検出される。IgG抗体は、上述の付加的ペプチドのうちのいくつかがこの方法で使用されるときに検出され得る（例えば、鞭毛タンパク質の検出のためのペプチド）。試料は、好ましくは入手が容易であり、静脈血試料またはさらには指穿刺から得られる全血、血漿、または血清であってよい。他の身体部分または他の体液、例えば、脳脊髄液（CSF）、唾液、胃分泌液、粘膜、尿等からの組織は、抗体を含有することが知られており、試料の供給源として使用され得る。試料は、組織抽出物または細胞溶解物であってよい。

【0109】

ペプチド抗原および試料抗体を好適な培地中で反応させることができたら、抗体-ペプチド反応の存在または不在を決定するためのアッセイを行う。多種の好適なアッセイの中で、免疫沈降および凝集アッセイは熟練者に明らかとなるであろう。

【0110】

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）を固定化することと、本発明のペプチドを添加することと、ペプチドに結合された抗体の程度を、例えば、標識されるペプチドによって、または標識結合パートナーのような標識物質（例えば、ストレプトアビジン-HRPもしくはストレプトアビジン-コロイド金複合体）、またはペプチドを特異的に認識する標識抗体を添加することによって検出することとを含む。例えば、図2を参照されたい。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と、抗体を含有する試料を添加することと、ペプチドに結合された抗体の量を、例えば、標識（例えば、金属ナノ粒子もしくは金属ナノシェル蛍光標識）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）に直接または間接的に共役された本発明の別のペプチドを添加することによって、または結合パートナーのような標識物質、も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、抗ヒトIgM抗体、抗イヌIgG抗体、抗イヌIgM抗体、抗ネコIgG抗体、抗ネコIgM抗体、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、またはそれらの組み合わせ等）を添加することによって検出することとを含む。例えば、図1、3、および4を参照されたい。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と、抗体を含有する試料を添加することと、ペプチドに結合された抗体の量を、例えば、試料抗体（例えば、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgM抗体、抗イヌIgG抗体、抗イヌIgM抗体、抗ネコIgG抗体、抗ネコIgM抗体、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等）を特異的に認識する第1の結合パートナーを添加し、第2の結合パートナー（例えば、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等）をさらに添加することによって検出することとを含み、この第2の結合パートナーは標識され、該第1の結合パートナーを認識する。さらに他の実施形態において、アッセイは、ペプチドおよび抗体を含有する試料を、固定化されている反応物質のいずれも用いることなく反応させることと、次に、抗体およびペプチドの複合体の量を、例えば、標識されているペプチドによって、または標識結合パートナーのような標識物質（例えば、ストレプトアビ

10

20

30

40

50

ジン - HRPもしくはストレプトアビジン - コロイド金複合体) またはペプチドを特異的に認識する標識抗体の添加によって検出することを含む。

【0111】

本発明のペプチドの固定化は、共有結合性または非共有結合性のいずれかであり得、非共有結合性の固定化は、非特異的であり得る(例えば、マイクロタイターウェルにおいて、例えば、ポリスチレン表面に非特異的に結合する)。固体もしくは半固体担体、支持体、または表面への特異的もしくは半特異的結合は、固体もしくは半固体担体、支持体、または表面へのその共有結合もしくは非共有結合を可能にする部分を有する(それと結合している)ペプチドによって、達成され得る。例えば、この部分は、担体、支持体、または表面に付着した構成要素に対する親和性を有することができる。この場合、この部分は、例えば、ビオチンもしくはビオチニル基、またはペプチドのアミノ酸基に結合したその類似体、例えば、6-アミノヘキサン酸であってよく、次に構成要素は、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはその類似体である。代替例は、この部分が、アミノ酸配列 His - His - His - His - His - His (配列番号82)を有し、担体は、Ni⁺⁺またはCo⁺⁺イオンで電荷されたニトリロ三酢酸(NTA)誘導体を含む。特定の実施形態において、部分は、融合パートナー、例えば、BSAである。例示的实施形態において、本発明のペプチドは、ペプチドのN末端および/またはC末端残基を介してBSAに共役され得る。一実施形態において、本発明の1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、25個、30個、またはそれ以上のペプチドが、BSAに置換され得る、例えば、BSAと共役され得る。当業者によって理解されるように、置換レベルは、アッセイの感度に影響し得る。より少ないペプチドの分子を含有する高濃度のBSA-ペプチドによって提供される感度を達成するために、より低濃度の高度置換BSAが必要とされる。特定の他の実施形態において、融合パートナーは、MAPSであり得る。特定の例示的实施形態において、MAPSは、4つ、8つ、またはそれ以上の非対称分岐からなり得る。

【0112】

好適な担体、支持体、および表面としては、金属ナノ層、ビーズ(例えば、磁気ビーズ、コロイド粒子、もしくは金属ナノ粒子、もしくはナノシェル、例えば、コロイド金、またはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、もしくはPDVF)、コポリマーのラテックス、例えば、スチレン-ジビニルベンゼン、水酸化スチレン-ジビニルベンゼン、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、非活性化または塩化ポリスチレンもしく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気ガラス、ゼラチンもしくは多糖類粒子または他のタンパク質粒子、赤血球、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、またはかかる抗体のFab断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0113】

特異的抗体の検出のために抗原を使用するイムノアッセイのプロトコルは、当該技術分野において周知である。例えば、従来のサンドイッチアッセイを使用することができるか、または従来の比較アッセイ形式を使用することができる。いくつかの好適な種類のアッセイに関する論考については、Current Protocols in Immunology(上記)を参照されたい。特定の実施形態において、本発明のペプチドは、抗体を含有する試料の添加前または添加後のいずれかに、共有結合または非共有結合によって固体もしくは半固体表面または担体の表面に固定化されている。

【0114】

特異的結合アッセイ、特にイムノアッセイを行うためのデバイスは既知であり、本方法で使用するために容易に適合され得る。固相アッセイは、一般に、試薬の分離がより早く単純であるため、沈降、遠心分離、濾過、クロマトグラフィー、または磁力のような分離ステップを必要とする異種アッセイ方法よりも容易に行われる。固相アッセイデバイスとしては、マイクロタイタープレート、フロースルーアッセイデバイス(例えばラテラルフローイムノアッセイデバイス)、ディップスティック、および免疫キャピラリーまたは免

10

20

30

40

50

疫クロマトグラフィーイムノアッセイデバイスが挙げられる。

【0115】

本発明の実施形態において、固体もしくは半固体表面または担体は以下である：マイクロタイターウェル内の床もしくは壁、フィルター表面もしくは膜（例えば、ニトロセルロース膜もしくはPVDf（ポリビニリデンフルオライド）膜、例えば、Immobilon（商標）膜）、中空ファイバー、ビーズ付きクロマトグラフィー培地（例えば、アガロースもしくはポリアクリルアミドゲル）、磁気ビーズ、繊維状セルロースマトリックス、HPLCマトリックス、FPLCマトリックス、ペプチドが結合している分子が液相に溶解または分散されたときにフィルターによって保持できるようなサイズの分子を有する物質、ミセルを形成できるかミセルの形成に關与でき該ミセルを混入することなく液相を変化させるか交換する物質、水溶性ポリマー、または任意の他の好適な担体、支持体、もしくは表面。

10

【0116】

本発明のいくつかの実施形態において、ペプチドは、検出を可能にする好適な標識とともに提供される。単独で、または他の組成物もしくは化合物と併せて、検出可能なシグナルを提供することができる従来の標識が使用され得る。好適な標識は、酵素（例えば、HRP、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、蛍光標識、放射性標識、着色ラテックス粒子、および金属共役標識（例えば、金属ナノ層、金属ナノ粒子、または金属ナノシェル共役標識）を含むが、これらに限定されない。好適な金属ナノ粒子または金属ナノシェル標識としては、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、金コーティングシリカナノシェル、およびシリカコーティング金シェルが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な層に好適な金属ナノ層は、カドミウム、亜鉛、水銀、および貴金属（例えば、金、銀、銅、および白金）で構成されるナノ層を含む。

20

【0117】

好適な検出方法としては、例えば、比色分析アッセイを用いて直接もしくは間接的にタグ付けされた剤の検出（例えば、HRPもしくは α -ガラクトシダーゼ活性の検出のため）、光学顕微鏡を使用する目視検査、共焦点顕微鏡を含む免疫蛍光顕微鏡、また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、放射性標識された剤の検出のため）、電子顕微鏡法、免疫染色、細胞下分画等が挙げられる。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、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、フルオレセイン共役抗体との結合等を介してペプチドと結合する。一実施形態において、抗体の検出可能な特異的結合パートナーが、混合物に添加される。例えば、結合パートナーは、検出可能な二次抗体、または一次抗体に結合する他の結合剤（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインL、またはそれらの組み合わせ）であり得る。この二次抗体または他の結合剤は、例えば、放射性、酵素、蛍光、発光、金属ナノ粒子もしくは金属ナノシェル（例えば、コロイド金）、またはアビジン/ビオチン系のような他の検出可能な標識で標識され得る。別の実施形態において、結合パートナーは、ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼのような酵素、または他のシグナル伝達部分に直接または間接的に（例えば、ビオチン/アビジン相互作用を介して）共役され得る、本発明のペプチドである。かかる実施形態において、検出可能なシグナルは、色原体、蛍光発生、または化学発光基質のような検出可能なシグナルを産生する酵素の基質を添加することによって、産生される。

30

40

【0118】

結合されたペプチドを検出するための「検出系」は、本明細書において使用されるとき、ペプチドに特異的な抗体のような検出可能な結合パートナーを含み得る。一実施形態において、結合パートナーは、直接標識される。別の実施形態において、結合パートナーは、シグナル生成試薬、例えば、好適な基質の存在下で検出可能なシグナルを産生することができる酵素に付着している。ペプチドを固定化するための表面は、任意に検出系を伴う

50

ことができる。

【0119】

本発明のいくつかの実施形態において、検出手順は、抗体 - ペプチド複合体を色変化について目視検査すること、または抗体 - ペプチド複合体を物理化学変化について検査することを含む。物理 - 化学変化は、酸化反応または他の化学反応とともに発生し得る。それらは、目視、分光光度計を使用する等によって検出され得る。

【0120】

特に有用なアッセイ形式は、ラテラルフローイムノアッセイ形式である。ヒトまたは動物（例えば、イヌ、マウス、シカ等）免疫グロブリン、またはスタフA、G、もしくはLタンパク質に対する抗体は、乾燥され、ガラスファイバーパッド（試料適用パッドまたは共役パッド）上に置かれたシグナルジェネレーターまたはレポーター（例えば、コロイド金）で標識され得る。診断ペプチドは、ニトロセルロースまたはPVDf（ポリビニリデンフルオリド）膜（例えば、Immobilon（商標）膜）のような膜の表面に固定化されている。試料（血液、血清等）の溶液が試料適用パッドに適用される（または共役パッドを通じて流れる）と、それは標識レポーターを溶解し、次に試料中の全ての抗体に結合する。次に、得られた複合体は、毛管作用によって次の膜（PVDfまたは診断ペプチドを含有するニトロセルロース）に輸送される。診断ペプチドに対する抗体が存在する場合、それらは膜上で縞状の診断ペプチドに結合し、それによってシグナル（例えば、見ることができるか、または可視化され得るバンド）を生成する。標識抗体または二次標識抗体に特異的な付加抗体を使用して、制御シグナルを産生することができる。

【0121】

ラテラルフローイムノアッセイの代替形式は、リガンド（例えば、ビオチン）に共役され、標識リガンド受容体（例えば、ストレプトアビジン - コロイド金）と複合体形成する本発明のペプチドまたは組成物を含む。標識ペプチド複合体は、試料適用パッドまたは共役パッド上に置かれ得る。抗ヒトIgG / IgMまたは抗動物（例えば、イヌ、マウス、シカ）IgG / IgM抗体または本発明の他のペプチドは、PVDfのニトロセルロースのような膜上の試験部位（例えば、試験ライン）で固定化されている。試料が試料適用パッドに添加されると、試料中の抗体は、標識ペプチド複合体と反応し、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。次に、試料中の抗体は、毛管作用によって次の膜（PVDfもしくは診断ペプチドを含有するニトロセルロース）に輸送され、固定化抗ヒトIgG / IgMもしくは抗動物IgG / IgM抗体（もしくはプロテイン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、もしくはそれらの組み合わせ）または本発明の固定化ペプチドに結合する。試料抗体のうちのいずれかが本発明の標識ペプチドに結合されている場合、ペプチドと結合した標識を、試験部位において見ることができるか、または可視化され得る。本発明のペプチドを試験部位における固定化捕捉剤としておよび試料中の抗体と反応するための可溶性標識複合体として使用する、この種類のラテラルフローデバイスの別の実施形態は、図1に示される。かかる実施形態において、検出シグナルを増幅するために、検出可能な標識（例えば、金属ナノ粒子またはナノシェル、HRP、ALP、フルオロフォア、着色ラテックス粒子）に共役された、プロテインA、プロテインG、および/またはプロテインA / G融合タンパク質を、試験部位に適用することができ、それらは、本発明の固定化ペプチドによって捕捉されたエールリヒア抗原に対する任意の抗体のFc領域に結合する。このアッセイに好適な対照は、例えば、試料適用パッドまたは共役パッドに位置するニワトリIgY - コロイド金共役体、および試験部位の近位に位置する対照部位に固定化された抗ニワトリIgY抗体を含むことができる。

【0122】

血液製剤または他の生理液もしくは生体液のスクリーニングのための別のアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ、すなわち、ELISAである。典型的に、ELISAにおいて、本発明の単離ペプチドまたはペプチドの混合物もしくは集団は、マイクロタイターウェルの表面に直接、または捕捉マトリックス（例えば、抗体）を介して、吸着される。次

10

20

30

40

50

に、表面上の残存非特異的タンパク質結合部位を、ウシ血清アルブミン (B S A)、熱不活性化正常ヤギ血清 (N G S)、または B L O T T O (保存剤、塩、および消泡剤も含有する無脂肪乾燥乳の緩衝溶液) のような適切な薬剤で阻止する。次に、特異的抗エールリヒア (例えば、抗エールリヒア・シャフェンシス、抗エールリヒア・ムリス、抗エールリヒア・エウイング、または抗エールリヒア・カニス) 抗体を含有することが疑われる生体試料と共にウェルをインキュベートする。試料は未希釈で適用され得るか、またはより多くの場合、通常は B S A、N G S、または B L O T T O のような少量のタンパク質 (0 . 1 ~ 5 . 0 重量 %) を含有する緩衝溶液に、希釈され得る。特異的結合を発生させるのに十分な長さの時間インキュベートした後、ウェルを洗浄して非結合タンパク質を除去し、次に、最適濃度の適切な抗免疫グロブリン抗体 (例えば、ヒト対象、イヌ、マウス、ウシ等の別の動物からの抗ヒト免疫グロブリン (H u I g)) と共に、または、標準手順によって酵素もしくは他の標識に共役されかつ阻止緩衝液に溶解される本発明の別のペプチドと共に、インキュベートする。標識は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (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)、グルコースオキシダーゼ等を含む多様な酵素から選択することができる。特異的結合が再度発生するように十分な時間をかけ、次にウェルを再度洗浄して非結合共役体を除去し、酵素に好適な基質を添加する。発色させて、ウェルの内容物の光学密度を目視または器具で決定する (適切な波長で測定する)。カットオフ O D 値は、エールリヒア症が風土病ではない地域からの個体から収集された少なくとも 5 0 例の血清試料の平均 O D + 3 標準偏差 (S D) として、または他のかかる従来の定義によって定義され得る。非常に特異的なアッセイの場合、O D + 2 S D をカットオフ値として使用することができる。

【 0 1 2 3 】

E L I S A の一実施形態において、本発明のペプチドを、9 6 ウェル E L I S A プレートまたはストレプトアビジンもしくは同様のビオチン結合化合物でコーティングされた同等の固相のような表面上で、アルカリコーティング緩衝液中、最適濃度で固定化し、4 で終夜インキュベートする。標準洗浄緩衝液で好適な回数洗浄した後、従来の阻止緩衝液に溶解された最適濃度のビオチン化形態の本発明のペプチドまたは組成物を、各ウェルに適用する。次に、試料を添加し、アッセイを上記のとおり進める。E L I S A アッセイを行うための条件は、当該技術分野において周知である。

【 0 1 2 4 】

E L I S A の別の実施形態において、本発明のペプチドまたはペプチドの混合物は、融合パートナー、例えば、B S A または M A P S を介して、9 6 ウェル E L I S A プレートまたは同等の固相のような表面上に固定化されている。次に、試料を添加し、アッセイを上記のとおり進める。

【 0 1 2 5 】

E L I S A アッセイの代替形態は、H R P のような適切な酵素に付着している (例えば、融合される) 本発明のペプチド (複数可) を特徴とする。かかる E L I S A を実行するためのステップは、プレートのウェルを抗イヌ、抗ネコ、または抗ヒト I g G / I g M でコーティングすることと、本発明のペプチドに対する抗体を含有することが疑われる試料を、固定化された該各 I g G / I g M と共にインキュベートすることと、未反応の試料を除去して、ウェルを好適な洗浄緩衝液で洗浄することと、本発明の酵素結合 (例えば、H R P 結合) ペプチドを適用することと、それを任意の捕捉された抗エールリヒア抗体と反応させることと、適切な酵素基質 (例えば、T M B) を適用することによって酵素結合ペプチドを可視化することと、を含む。

【 0 1 2 6 】

別の実施形態において、これらの方法は、凝集アッセイを含む。例えば、特定の実施形態において、金属ナノ粒子もしくは金属ナノシェル (例えば、コロイド金等) またはラテックスビーズは、本発明のペプチドまたは組成物に共役されている。続いて、生体液を、ビーズ / ペプチド共役体と共にインキュベートし、それによって反応混合物を形成する。次に、反応混合物を分析して、抗体の存在を決定する。特定の実施形態において、凝集ア

10

20

30

40

50

ッセイは、(1)競合アッセイの場合、本発明の組成物のペプチドに特異的な抗体、または(2)サンドイッチアッセイの場合、試料抗体(例えば、抗ヒトIgGもしくはIgM抗体、抗イヌIgGもしくはIgM抗体、抗ネコIgGもしくはIgM抗体等)を検出することができる抗体に共役されている、金属ナノ粒子もしくは金属ナノシェル(例えば、コロイド金等)またはラテックスビーズのような粒子の二次集団の使用を含む。好適な凝集方法は、凝集の程度を評価する手段として遠心分離を含み得る。

【0127】

さらに他の実施形態において、本発明のペプチドまたは組成物は、ニトロセルロース紙の上にエレクトロプロットまたはドットプロットされる。続いて、生体液(例えば、血清または血漿)のような試料を、プロット抗原と共にインキュベートし、生体液中の抗体を、抗原(複数可)に結合させる。次に、結合抗体は、例えば、標準免疫酵素方法によって、または可視化によって、二次抗体に結合された金属ナノ粒子もしくはナノシェル、または他の抗体結合剤、例えば、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、もしくはそれらの組み合わせを使用して検出することができる。

10

【0128】

任意の数の従来のタンパク質アッセイ形式、特にイムノアッセイ形式は、対象におけるエールリヒア抗体および病原性エールリヒア(例えば、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・ムリス、エールリヒア・エウイング、またはエールリヒア・カニス)による感染の検出のために本発明の単離ペプチドを利用するように設計され得る。故に、本発明は、特定のアッセイ形式の選択によって限定されず、当業者に既知のアッセイ形式を包含すると考えられる。

20

【0129】

特定の実施形態において、これらの方法で使用される試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液のような体液である。他の実施形態において、試料は、組織(例えば、組織ホモジネート)または細胞溶解物である。特定の実施形態において、試料は、野生動物に由来する(例えば、シカまたは齧歯類、例えば、マウス、シマリス、リス等)。他の実施形態において、試料は、実験動物に由来する(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等)。他の実施形態において、試料は、家畜または野生動物に由来する(例えば、イヌ、ネコ、ウマ)。さらに他の実施形態において、試料は、ヒトに由来する。

30

【0130】

前述の論考の大部分は、病原性エールリヒアに対する抗体の検出を対象とする。しかしながら、この論考は、インビトロまたはインビボのいずれかでの感作されたT細胞の検出にも適用することを理解されたい。

【0131】

IgGが産生されるため、細胞媒介性免疫応答(例えば、Tヘルパー応答)が生成されることが予想される。したがって、感作されたT細胞と本発明のペプチドとの間の免疫学的反応性を決定することが可能となることが予想される。これはインビトロで、対象から単離されたT細胞をインキュベートし、免疫反応性を測定することによって、例えば、続くT細胞増殖を測定することによって、またはIFN- γ のようなT細胞からのサイトカインの放出を測定することによって、行うことができる。これらの方法は、当該技術分野において周知である。

40

【0132】

本発明の方法が、インビボで行われるとき、多様な従来のアッセイのいずれかを使用することができる。例えば、皮膚試験の形態で、例えば、対象において本発明のペプチドを皮内注射することによってアッセイを行うことができる。注射箇所での陽性皮膚応答は、対象が、単球および/または顆粒球エールリヒア症を引き起こすことができる病原性エールリヒアに曝露され、感染したことを示し、注射箇所での陰性皮膚応答は、対象がそれに曝露/感染しなかったことを示す。この試験、または他のインビボ試験は、対象におけるT細胞反応の検出に依存する。

50

【 0 1 3 3 】

別の態様において、本発明は、対象における単球および/または顆粒球エールリヒア症を診断する方法を提供する。対象は、単球および/または顆粒球エールリヒア症の原因物質に対する抗体を有することが疑われる対象であり得る。診断方法は、単球および/または顆粒球エールリヒア症の臨床症状を呈する対象を診断するために有用である。ヒト単球/顆粒球エールリヒア症の臨床症状としては、発熱、頭痛、不快感、筋肉痛、発疹、血小板減少症、白血球減少症、および上昇した血清トランスアミナーゼレベルが挙げられるが、これらに限定されない。動物（例えば、イヌ）におけるエールリヒア症の臨床症状としては、発熱、点状出血、出血障害、血管炎、リンパ節症、鼻および眼からの分泌物、脚および陰囊の浮腫、体重減少、貧血に起因する淡い歯肉、血小板減少症に起因する出血、血管炎、リンパ節症、呼吸困難、咳、多尿、多渴症、および跛行が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 3 4 】

特定の実施形態において、これらの方法は、対象からの試料を、本発明のペプチドと接触させることと、該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とを含み、該複合体の形成は、対象がエールリヒア症疾患を有することを示す。特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の2つ、3つ、4つ、またはそれ以上（例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、またはそれ以上）の異なるペプチドの混合物または集団と接触させることを含む。例えば、特定の一実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号1の配列を含む。別の特定実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号3の配列を含む。さらに別の実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号72の配列を含む。いくつかの実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号1、配列番号3、または配列番号72の配列を含む。他の実施形態において、これらの方法は、試料を、2つ以上の異なる単離ペプチドの混合物または集団と接触させることを含み、各単離ペプチドは、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号83、または配列番号85の配列を含む。

20

30

【 0 1 3 5 】

特定の実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の1つ以上のペプチドおよび1つ以上の他のペプチド（例えば、エールリヒアペプチド、またはその抗原性断片もしくはエピトープ、例えば、エールリヒア表面抗原、またはエールリヒアOMP - 1、p38、p43、p120、p140、p153、p156、p200、gp19、gp36、gp47、gp200、またはHGE - 3タンパク質の混合物と接触させることを含む。例えば、いくつかの実施形態において、これらの方法は、試料を、本発明の1つ以上のペプチド（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号70、配列番号72、配列番号83、または配列番号85）および配列番号71の配列を有する1つ以上のエールリヒア抗原性ペプチドの混合物と接触させることを含む。特定の一実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。別の実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号71の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。別の実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、および配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。一実施形態において、これらの方法は、試料を、配列番号72の配列を有する1つ以上のペプチド、配列番号3の配列を有する1つ以上のペプチ

40

50

ド、および配列番号 71 の配列を有する 1 つ以上のペプチドの混合物と接触させることを含む。

【0136】

特定の実施形態において、ペプチドまたは混合物もしくは集団中の各ペプチドは、単離（例えば、合成および/または精製）ペプチドである。特定の実施形態において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物（すなわち、ペプチドの集団）は、基体（例えば、固体または半固体支持体）に付着しているか、またはその表面に固定化されている。例えば、特定の実施形態において、基体は、ビーズ（例えば、コロイドもしくは他の種類の粒子、または金属ナノ粒子もしくはナノシェル）、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路（例えば多孔質膜）、分析用もしくは遠心分離用ローター内の流路、プロット（例えば、ウエスタンプロット、ドットプロット、もしくはスロットプロット）、管もしくはウェル（例えば ELISA アッセイに好適なプレート内）、またはセンサー（例えば、電気化学、光学、または光電子工学センサー）である。いくつかの実施形態において、ペプチドまたはペプチドの混合物は、いくつかの実施形態において、カドミウム、亜鉛、水銀、または貴金属（例えば、金、銀、銅、および白金）で構成され得る金属ナノ層を介して固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。

10

【0137】

本発明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アッセイがある。例えば、検出するステップは、ELISA アッセイを行うこと、ラテラルフロー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、ウエスタンプロット、スロットプロット、もしくはドットプロットを行うこと、分析用もしくは遠心分離用ローター内で試料を分析すること、または電気化学、光学、もしくは光電子工学センサーを用いて試料を分析することを含み得る。これらの異なるアッセイは、上述される、および/または当業者に周知である。

20

【0138】

特定の実施形態において、試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液のような体液である。他の実施形態において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。特定の実施形態において、対象は、野生動物である（例えば、シカまたは齧歯類、例えば、マウス、シマリス、リス等）。他の実施形態において、対象は、実験動物である（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等）。他の実施形態において、対象は、家畜または野生動物である（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）。さらに他の実施形態において、対象は、ヒトである。

30

【0139】

キット

なおも別の態様において、本発明はキットを提供する。特定の実施形態において、キットは、本発明のペプチドを含む。特定の実施形態において、キットは、本発明の 2 つ、3 つ、4 つ、もしくはそれ以上の異なるペプチド、または本発明のペプチドの混合物もしくは集団を含む。ペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 7、配列番号 70、配列番号 72、配列番号 83、配列番号 85 の配列、またはその断片を含むことができる。特定の実施形態において、ペプチドは、固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。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、または白金ナノ層）を介して固体支持体に付着しているか、またはその表面に固定化されている。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、もしくは金属ナノ粒子、もしくはナノシェル）、ラテラルフローイムノアッセイデバイス内の流路、分析用もしくは遠心分離用ローター内の流路、管もしくはウェル（例えばプレート内）、またはセンサー（例えば、電気化学、光学、もしくは光電子工学センサー）である。

40

【0140】

特定の種類のアッセイのための試薬は、本発明のキットで提供することもできる。故に、キットは、ビーズの集団（例えば、凝集アッセイもしくはラテラルフローアッセイに好

50

適な)またはプレート(例えば、ELISAアッセイに好適なプレート)を含み得る。他の実施形態において、キットは、ラテラルフロー免疫アッセイデバイス、分析用もしくは遠心分離用ローター、ウェスタンブロット、ドットブロット、スロットブロット、電気化学センサー、光学センサー、または光電子工学センサーのようなデバイスを含む。ビーズの集団、プレート、またはデバイスは、免疫アッセイを行うために有用である。例えば、それらは、試料からの抗体および本発明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に有用であり得る。特定の実施形態において、ペプチド、本発明の異なるペプチドの混合物(すなわち、ペプチドの集団)、または本発明のペプチド組成物は、ビーズ、プレート、またはデバイスに付着しているか、またはその表面に固定化されている。

10

【0141】

加えて、キットは、様々な希釈液および緩衝液、標識共役体または特異的に結合した抗原もしくは抗体の検出のための他の剤(例えば、標識試薬)、および他のシグナル生成試薬、例えば、酵素基質、共因子、および色原体を含み得る。いくつかの実施形態において、キットは、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、もしくは酵素)に共役された抗ヒト、抗イヌ、または抗ネコIgG/IgM抗体を標識試薬として含む。他の実施形態において、キットは、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、もしくは酵素)に共役された、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、またはそれらの組み合わせを標識試薬として含む。例示的プロテインA/G融合タンパク質は、プロテインAから4つのFc結合領域を、プロテインGからの2つと合わせる。例えば、Sikkema, J. W. D., Amer. Biotech. Lab., 7: 42, 1989、およびEliasson et al., J. Biol. Chem. 263, 4323-4327, 1988を参照されたい(いずれも参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)。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、もしくは酵素)に共役された本発明の第2のペプチドの集団である。第2のペプチドの集団は、第1のペプチドの集団と同じであり得るか、または異なり得、任意に固体支持体に付着し得るか、またはその表面に固定化され得る。

20

30

【0142】

キットの他の構成要素は、当業者によって容易に決定され得る。かかる構成要素は、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もしくはモノクローナル捕捉抗体、または抗体のうちの2つ以上のカクテル、標準としてこれらの抗原の精製もしくは半精製抽出物、モノクローナル抗体検出抗体、検出可能な標識に共役された抗マウス、抗イヌ、抗ネコ、抗ニワトリ、もしくは抗ヒト抗体、比色分析比較のための指標チャート、使い捨てグローブ、除染指示書、アプリケーション棒もしくは容器、試料調製カップ等を含んでよい。一実施形態において、キットは、緩衝液またはペプチド-抗体複合体を形成させる反応培地を構成するために適切な他の試薬を含む。

【0143】

かかるキットは、臨床検査室が、病原性エールリヒア、例えば、エールリヒア・シャフェンシス、エールリヒア・ムリス、エールリヒア・エウイング、またはエールリヒア・カニスによる感染を診断するための便宜的、効率的な方法を提供する。故に、特定の実施形態において、キットは指示書をさらに含む。例えば、特定の実施形態において、キットは、1つ以上のエールリヒア抗原に対する抗体を検出するか、または単球および/もしくは顆粒球エールリヒア症を診断するために、本発明のペプチドまたはペプチドの集団を使用する方法を示す指示書を含む。特定の実施形態において、キットは、1つ以上のエールリヒア抗原に対する抗体を検出するか、または単球および/もしくは顆粒球エールリヒア症を診断するために、ビーズの集団、プレート、またはデバイス(例えば、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物を含む)を使用する方法を示す指示書を含む。

40

50

【0144】

本発明のペプチド、ペプチドを含む組成物およびデバイス、キット、ならびに方法は、多数の利点を提供する。例えば、それらは、単球および/または顆粒球エールリヒア症の簡素、安価、迅速、高感度、および正確な検出を可能にし、同様の症状を持つ他の状態との血清学的交差反応を防ぐ。これが正確な診断を可能にする。さらに、本発明の診断試験（例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローイムノアッセイ、もしくは凝集アッセイ）は、エールリヒアの外面タンパク質に基づいて、抗OMP-1抗体またはワクチンに反応して産生された他の抗体を含有する血清試料中で有用である。

【0145】

以下の実施例は、本発明の様々な態様を説明する。当然のことながら、これらの実施例は、本発明の特定の実施形態のみを単に説明するものであり、本発明の範囲に制限を設けるものではないことを理解されたい。

【実施例】

【0146】

実施例1 - ELISAアッセイ

3つの異なるペプチドの集団を、標準合成手順を使用して合成した。第1のペプチドの集団内の各ペプチド（E C H E W 1）は、配列番号72の配列を含有していた。第1のペプチドの集団は、複数のエールリヒア種（例えば、カニス、シャフェンシス、およびエウイング）によって誘発された抗体に特異的に結合する。第2のペプチドの集団内の各ペプチド（E E 1 2 E W 1）は、配列番号3の配列を含有していた。第2のペプチドの集団は、主にエールリヒア・カニスおよびエールリヒア・シャフェンシスによって誘発された抗体に特異的に結合し、エールリヒア・エウイングに対していくらかの交差反応性を有する。第3のペプチドの集団内の各ペプチド（E E 1 3）は、配列番号71の配列を含有していた。第3のペプチドの集団は、主にエールリヒア・エウイングによって誘発された抗体に特異的に結合し、エールリヒア・カニスおよびエールリヒア・シャフェンシスに対していくらかの交差反応性を有する。

【0147】

第3のペプチドの集団内の各ペプチドを、チオ-エーテル化学作用を使用して、担体タンパク質ウシ血清アルブミン（BSA）に別個に連結した。得られたBSA-ペプチド共役体を、96ウェルELISAプレートにおいて捕捉実体として使用し、3つの別個のELISAアッセイ（1プレート当たり1つのペプチド集団）を創出した。次に、プレートを閉鎖して望ましくない非特異的結合を防いだ。

【0148】

エールリヒア種に対して陽性のイヌ血漿試料を、間接免疫蛍光アッセイ（IFA）、IDEXX SNAP 4DX Plus（商標）、および/またはSNAP 3DX（商標）によって決定されるように、3つのELISAプレートのそれぞれにおいて、固定化した捕捉ペプチドと共にインキュベートした。1時間のインキュベーション後、マイクロウェルを洗浄することによって、未反応の物質を除去した。特異的に捕捉されたイヌIgGまたはIgMは、HRP標識プロテインAとの反応によって検出された。市販のTMB基質を使用して、HRPをアッセイした。各ウェルの光学密度を、プレートリーダーを用いて650nmで読み出した。

【0149】

合計156個の試料を評価したところ、そのうち152個は、ELISAプレートにおいて試験結果が陽性であり、4個の試料は、試験結果が陰性であった。故に、試験の感度のパーセントは、97.4%であった。感染性エールリヒア種によって選別された結果の要約は、以下の表1に示される。これらの実験結果は、配列番号72、配列番号3、または配列番号71によって定義されたペプチドの集団が、様々なエールリヒア種からの抗原に対する抗体の存在を検出することにおいて高い程度の感度を有することを示す。

【0150】

（表1）既知のエールリヒア陽性試料のELISA結果

10

20

30

40

50

	ELISAで陽性	ELISAで陰性	合計
エールリヒア・カニス 陽性試料の数 ¹	44	1	45
エールリヒア・シャフェンシス 陽性試料の数 ²	38	2	40
エールリヒア・エウインギ 陽性試料の数 ³	46	1	47
陽性試料の数； 中間種 ⁴	24	0	24
試験した試料の合計	156		
正確に特定された (ELISAで陽性と 検出された) 陽性試料の総数	152		
不正確に特定された (ELISAで陰性と 検出された) 陽性試料の総数	4		
感度%	97.4		

10

20

¹ これらの試料は、ペプチドの E C H E W 1 (配列番号 7 2) および E E 1 2 E W 1 (配列番号 3) 集団を用いた E L I S A アッセイにおいて陽性の試験結果を示し、I F A でエールリヒア・カニスに対してより高い力価を有した。

² これらの試料は、ペプチドの E C H E W 1 (配列番号 7 2) および E E 1 2 E W 1 (配列番号 3) 集団を用いた E L I S A アッセイにおいて陽性の試験結果を示し、I F A でエールリヒア・シャフェンシスに対してより高い力価を有した。

³ これらの試料は、ペプチドの E C H E W 1 (配列番号 7 2) および E E 1 3 (配列番号 7 1) 集団を用いた E L I S A アッセイにおいて陽性の試験結果を示した。

⁴ これらの試料中のエールリヒア種を、I F A または S N A P アッセイによって確定することはできなかったが、試料は、E C H E W 1 (配列番号 7 2) を用いた E L I S A アッセイにおいて陽性の試験結果を示した。

30

【 0 1 5 1 】

実施例 2 - ラテラルフローアッセイ

二重抗原サンドウィッチ形式のラテラルフローイムノアッセイを、複数種からのエールリヒア抗原に特異的な抗体の存在を検出するように構築した。配列番号 7 2 によって定義されたペプチドの集団を B S A に連結し、得られた複合体を、試験共役体 (金ナノ粒子で標識されたペプチド) としても、捕捉体 (デバイスの試験ラインで固定化された) としても使用した。試験ラインにおいて産生されたシグナルは、標識ペプチド共役体に付加されたプロテイン A およびプロテイン G - 金共役体によって強化された。デバイスは、図 5 に表される。

40

【 0 1 5 2 】

アッセイを行うために、抗凝固処理済の全血、血清、または血漿の一滴は、デバイスの試料ポートに適用される。血液分離パッドは、全血から血液細胞を濾過する。血漿 (または血清) は、移動して、共役パッド上に存在する試験共役体に特異的に結合し、任意の形成された抗体 - ペプチド複合体は、試験領域および制御領域を含有するニトロセルロース膜に移行する。試料適用後のチェイス緩衝液の適用は、遊離および結合試験共役体を、ニトロセルロース膜を通じて上部吸収パッドに向かって動かす。標識ペプチド - 抗体複合体は試験ラインまで移動し、ここで固定化ペプチドが、抗体上の第 2 の結合部位を介して標識ペプチド - 抗体複合体を捕捉する。共役体混合物中のプロテイン A - 金およびプロテ

50

ンG - 金共役体は、検出シグナルを増幅する捕捉抗体に結合する。試験部位における1本の赤いラインおよび制御部位における第2の1本の赤いラインの出現は、試料における、エールリヒア種（例えば、カニス、シャフェンシス、またはエウインギ）に対する抗体の存在を示す。制御部位のみでの赤いラインの出現は、試料における、エールリヒア種の全てに対する抗体の不在を示す。この試験は、(i)試験ラインでのシグナルは出現するが、制御ラインでのシグナルは存在しない場合、または(ii)制御ラインもしくは試験ラインのいずれかにおいてシグナルが観察されない場合に無効であると見なされる。

【0153】

実施例1においてELISAアッセイによって評価された同じ156個の既知のエールリヒア陽性イヌ血漿試料を、ラテラルフローデバイス内で試験した。加えて、間接免疫蛍光アッセイまたはIDEXX SNAP 4DX Plus（商標）によって陰性であると決定された120個のイヌ試料（血漿試料100および全血試料20）も評価した。結果を以下の表2に要約する。ラテラルフローアッセイは、93.6～99.3%の95%信頼区間で97.4%の感度を有した。アッセイの特異度は、94.1～99.8%の95%信頼区間で98.3%であった。この実施例は、配列番号72によって定義されたペプチドの集団が、ラテラルアッセイ形式で用いられるときに、エールリヒア抗原に対する抗体を効果的に検出できることを実証する。

【0154】

(表2) 既知のエールリヒア陽性および陰性試料のラテラルフローアッセイ結果

	ラテラルフローで陰性	ラテラルフローで陽性
既知の陰性試料の数	118	2
既知の陽性試料の数	4	152

【0155】

実施例3 - 間接免疫抗体アッセイ

間接免疫抗体試験は、本発明の1つ以上のペプチドでコーティングされたラテックスビーズを使用して構築される。特定の実施形態において、配列番号71、配列番号72、配列番号3、または配列番号5によって定義されたペプチドを使用する。本発明のペプチドを、チオ-エーテル化学作用を使用して、マレイミド誘導体化ラテックスビーズの表面にコーティングする。代替として、本発明のペプチドは、チオ-エーテル化学作用または同様の化学作用を介してBSAに共役されてよく、ラテックスビーズ表面に受動的に吸収される。次に、かかるビーズの集団を、既知の技術を使用してガラススライドの表面上に固定化する。

【0156】

アッセイを行うために、抗エールリヒア抗体を有することが疑われるイヌからの一滴の血清または血漿（好適な緩衝液で適切に希釈された）を、ラテックスビーズでコーティングされたガラススライドに適用する。好適なインキュベーション時間に続いて、未反応の物質を洗い流し、一滴の蛍光標識抗イヌIgG（またはIgM）を適用して、スライドを追加の期間インキュベートする。最終調製物を蛍光顕微鏡下で見て、蛍光タグ付けされたラテックスビーズを決定する。試験血清/血漿の陽性または陰性分類は、適切な対照との比較に基づく。可視化ステップが酵素基質を用いる場合、蛍光標識の代わりに酵素標識が使用されてもよい。例えば、アルカリホスファターゼで標識された抗イヌIgG/IgMは、スライドをBCIP-ニトロBT基質に曝露することによって可視化することができる。標識プロテインA、プロテインG、またはプロテインA/G融合を、標識抗イヌIgGおよび抗イヌIgMの代わりに使用して、ペプチドコーティングされたビーズに結合された抗体を検出することができる。

【0157】

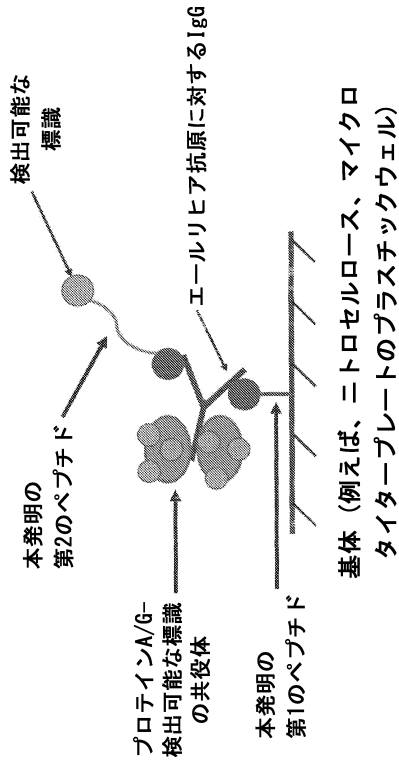
参照により組み込まれる文書における任意の定義が、本明細書に提供される定義と一致する限り、本明細書に提供される定義が優先する。本発明は、現在好まれている実施形態

を参照して説明されたが、当業者には明らかとなるように、様々な変更および修飾を、本発明の趣旨から逸脱することなく行うことができることを理解されたい。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限される。

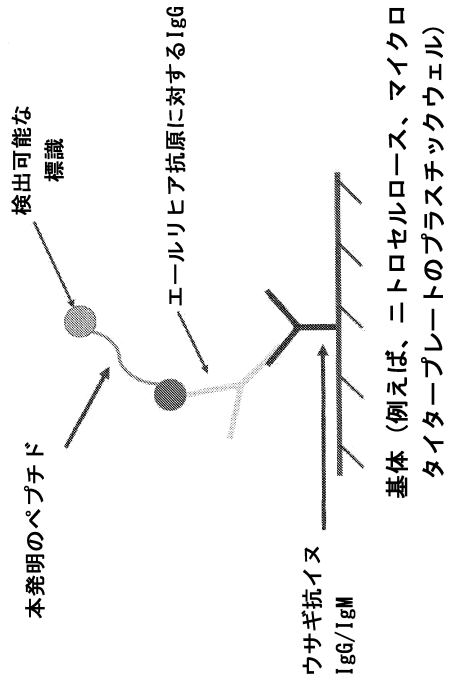
【 0 1 5 8 】

本明細書で引用されるありとあらゆる特許、特許出願、および刊行物の特許請求の範囲、図、および/または図面の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 図 1 】



【 図 2 】



【配列表】

0006325553000001.app

フロントページの続き

- (51) Int. Cl. F I
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 4 5 A
 G 0 1 N 33/543 5 8 1 A
 G 0 1 N 33/553
 C 0 7 K 14/705
 C 1 2 Q 1/02
- (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 メーラ ラジェッシュ ケイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ユニオンシティ ウィッブル ロード 3 2
 4 0 内
- (72)発明者 アロン ケニス ピー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ユニオンシティ ウィッブル ロード 3 2
 4 0 内
- (72)発明者 ブレイル デニス エム .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ユニオンシティ ウィッブル ロード 3 2
 4 0 内
- (72)発明者 フォーサイス ティモシー ピー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ユニオンシティ ウィッブル ロード 3 2
 4 0 内
- (72)発明者 ウォーカー ジェレミー ディー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ユニオンシティ ウィッブル ロード 3 2
 4 0 内
- (72)発明者 ケシコ クリスティーナ アール .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ユニオンシティ ウィッブル ロード 3 2
 4 0 内

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 国際公開第2011/063235(WO, A1)
 特表2005-502586(JP, A)
 米国特許出願公開第2009/0010956(US, A1)
 特表2006-505270(JP, A)
 特表2003-517282(JP, A)
 特表2002-527042(JP, A)
 特表2002-515763(JP, A)
 ZHANG, C. et al., Identification of 19 Polymorphic Major Outer Membrane Protein Genes a

nd Their Immunogenic Peptides in Ehrlichia ewingii for Use in a Serodiagnostic Assay ,
Clinical and Vaccine Immunology , 米国 , American society for microbiology , 2008年
3月 , Vol.15, No.3 , p.402-411

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N	3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 0 7 K	1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5
C 1 2 Q	1 / 0 0 - 3 / 0 0

专利名称(译)	用于检测埃立克体抗体的肽，装置和方法		
公开(公告)号	JP6325553B2	公开(公告)日	2018-05-16
申请号	JP2015536934	申请日	2013-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	艾巴希斯公司		
申请(专利权)人(译)	Abakushisu公司		
当前申请(专利权)人(译)	Abakushisu公司		
[标]发明人	メーララジェッシュケイ アロンケニスピー ブレイルデニスエム フォーサイステイモシーピー ウォーカージェレミーディー ケシコクリスティーナアール		
发明人	メーラ ラジェッシュ ケイ. アロン ケニス ピー. ブレイル デニス エム. フォーサイステイモシー ピー. ウォーカー ジェレミー ディー. ケシコ クリスティーナ アール.		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/553 C07K14/705 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N2333/29 G01N2469/20 C07K14/29 C07K17/14 G01N33/54306 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.ZNA.U G01N33/53.N G01N33/531.A G01N33/543.541.Z G01N33/543.545.A G01N33/543.581.A G01N33/553 C07K14/705 C12Q1/02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/712578 2012-10-11 US		
其他公开文献	JP2016500815A5 JP2016500815A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测与埃利希体抗原结合的抗体的肽组合物和混合物。肽组合物和混合物包含基于埃利希体外膜蛋白1 (OMP-1) 蛋白的免疫原性片段的多肽序列。本发明中，检测抗体结合于埃里希氏体抗原，以及在有用提供含有这样的肽组合物和混合物的单核细胞和/或粒细胞埃里希体病，装置，方法和试剂盒的诊断。

(45) 発行日 平成30年5月16日(2018.5.16)

(24) 登録日 平成30年4月20日(2018.4.20)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 1
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	Z N A U
GO 1 N	33/531	(2006.01)	GO 1 N	33/53	N
GO 1 N	33/563	(2006.01)	GO 1 N	33/531	A
CO 7 K	14/705	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 4 1 Z

請求項の数 13 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-536934 (P2015-536934)

(86) (22) 出願日 平成25年10月11日 (2013.10.11)

(65) 公表番号 特表2016-500815 (P2016-500815A)

(43) 公表日 平成28年1月14日 (2016.1.14)

(86) 国際出願番号 PCT/US2013/064536

(87) 国際公開番号 W02014/059274

(87) 国際公開日 平成26年4月17日 (2014.4.17)

審査請求日 平成28年9月5日 (2016.9.5)

(31) 優先権主張番号 61/712,578

(32) 優先日 平成24年10月11日 (2012.10.11)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505452771
 アバクシス、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 587 ユニオンシティー ウィッブル
 ロード 3240

(74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 100160923
 弁理士 山口 裕季
 100119507
 弁理士 刑部 俊
 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エールリヒア抗体の検出のためのペプチド、デバイス、および方法