(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7199384号
(P7199384)

(45)発行日　令和5年1月5日(2023.1.5)

(24)登録日　令和4年12月22日(2022.12.22)

(51)国際特許分類		FI		
C07K	*7/06 (2006.01)*	C07K	7/06	ZNA
C07K	*7/08 (2006.01)*	C07K	7/08	
C07K	*14/195 (2006.01)*	C07K	14/195	
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	D
G01N	*33/569 (2006.01)*	G01N	33/569	F

請求項の数　11　（全27頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-567783(P2019-567783)
(86)(22)出願日　平成30年2月22日(2018.2.22)
(65)公表番号　特表2020-512398(P2020-512398A)
(43)公表日　令和2年4月23日(2020.4.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2018/054396
(87)国際公開番号　WO2018/153991
(87)国際公開日　平成30年8月30日(2018.8.30)
審査請求日　令和3年1月28日(2021.1.28)
(31)優先権主張番号　1750203-0
(32)優先日　平成29年2月24日(2017.2.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関　スウェーデン(SE)
前置審査

(73)特許権者　320001248
バイオトム ピーティーワイ リミテッド
オーストラリア国 西オーストラリア州 ６１５９ ノース フリーマントル バーンズ ストリート ３３
(74)代理人　100120891
弁理士　林 一好
(74)代理人　100165157
弁理士　芝 哲央
(74)代理人　100205659
弁理士　齋藤 拓也
(74)代理人　100126000
弁理士　岩池 満
(74)代理人　100185269
弁理士　小菅 一弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新規なペプチド及び診断におけるその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号２～配列番号５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、多くとも２５アミノ酸からなるペプチド、または配列番号１からなるペプチド、を少なくとも含む、

ヘリコバクター・ピロリの感染の診断、または胃癌のリスクの予測に使用するためのペプチドの混合物。

【請求項２】

配列番号２～配列番号５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、多くとも２５アミノ酸からなるペプチド、を含む、請求項１に記載のペプチドの混合物。

【請求項３】

多くとも１０アミノ酸を含むペプチドを含む、請求項１又は２に記載のペプチドの混合物。

【請求項４】

配列番号１～配列番号５から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のペプチドの混合物。

【請求項５】

請求項１～４のいずれか一項に記載のペプチドの混合物を含む、キット。

【請求項６】

被検者由来の試料におけるヘリコバクター・ピロリＣａｇＡ結合抗体の検出方法であって、生物試料を配列番号２～配列番号５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

多くとも２５アミノ酸からなるペプチド、または配列番号１からなるペプチドと、インビトロで接触させる工程と、前記試料中の抗体の前記ペプチドへの結合を検出する工程とを備える、前記方法。

【請求項７】

前記試料が血液、血清、血漿又は胃組織試料である、請求項６に記載の方法。

【請求項８】

配列番号２～配列番号５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、多くとも２５アミノ酸からなるペプチド、または配列番号１からなるペプチド、を含む、

ヘリコバクター・ピロリの感染の診断、または胃癌のリスクの予測に使用する、混合物の調製のためのペプチドの使用。

【請求項９】

前記ペプチドは、配列番号２～配列番号５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、多くとも２５アミノ酸からなるペプチドを含む、請求項８に記載のペプチドの使用。

【請求項１０】

前記ペプチドは、多くとも１０アミノ酸を含むペプチドを含む、請求項８又は９に記載のペプチドの使用。

【請求項１１】

前記ペプチドは、配列番号１～配列番号５から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを含む、請求項８～１０のいずれか一項に記載のペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）のＣａｇＡタンパク質由来の新規なペプチドに関する。このペプチドは、細菌性感染症の予防、診断及び処置の改善、並びに胃癌リスクの評価のために使用することができる。

【背景技術】

【０００２】

ヘリコバクター・ピロリは、胃の中で通常見つかる細菌である。いくつかのヘリコバクター・ピロリ株は、病原因子をコードするＣａｇＡ（細胞毒素関連抗原Ａ）遺伝子を保有する。このＣａｇＡ遺伝子は、感染部位で胃上皮細胞の中へと移行する細菌性がんタンパク質である、１１４０～１１８０個のアミノ酸のタンパク質ＣａｇＡをコードする。移行後、ＣａｇＡは、上皮細胞の細胞内シグナル伝達経路に影響を及ぼす。

【０００３】

ＣａｇＡ遺伝子を保有するヘリコバクター・ピロリ細菌は、胃癌発症のリスクの上昇と関連し、抗ＣａｇＡ抗体の存在は、将来の胃癌リスクの上昇と関連する。ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染の早期検出は、癌生存率の上昇につながりうる。なぜなら、感染した個体における感染の根絶（すなわち除菌）は胃癌リスクを低下させるからである。それゆえ、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリを保有する個体を特定する方法は、高い胃癌リスクを診断し、これにより胃癌発症の防止を支援するために使用することができる。

【０００４】

しかしながら、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染についての既存の血清学的方法は臨床的に有用ではない。これは主に、それらの方法が十分に特異的ではないことによる。高レベルの偽陽性試料が存在する。これは、ヘリコバクター・ピロリに感染していない個体においてさえ、又はＣａｇＡを欠くヘリコバクター・ピロリ株に感染した個体においてさえＣａｇＡへの広範な抗体反応性があることを示す。このように、臨床的に有用な診断検査のためには特異性及び感度は十分ではない（非特許文献１；非特許文献２；非特許文献３）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】
【文献】Ｙａｍａｏｋａら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ １９９８：３６：３４３３
Ｙａｍａｏｋａら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １９９９：１１７：７４５
Ｆｉｇｕｅｉｒｅｄｏら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ２００１：３９：１３３９
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
それゆえ、診断特性が改善されたＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリについての診断検査、例えば特異性及び感度が改善された診断検査に対するニーズがある。
【０００７】
さらには、異なるヘリコバクター・ピロリ分離株の間でＤＮＡ配列において大きい変異性がある。あるＣａｇＡ変異体は、胃癌リスクにより強く関連する。それゆえ、ＣａｇＡ株の種類を特定できることも有用であろう。
【０００８】
抗体、特にＣａｇＡタンパク質に結合する抗体に特異的に結合するＣａｇＡペプチドに対するニーズもある。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本明細書において、胃癌発症の高いリスクにある個体の特定を含むヘリコバクター・ピロリ関連疾患に関する診断的応用に有用であるＣａｇＡ由来のペプチドについての情報が提供される。ヘリコバクター・ピロリに感染した個体は、ＣａｇＡを含むヘリコバクター・ピロリタンパク質に対する抗体を産生することになる。このように、ＣａｇＡ特異的抗体の存在はヘリコバクター・ピロリ感染を示す。
【００１０】
感染した個体に存在するすべてのＣａｇＡペプチドから、本発明者らは、１）どのサブセットが免疫原性であり抗体応答を惹起するするのかを明らかにした（表１を参照。表１では、タンパク質の長さの３４％が免疫原性である）。多くのペプチドは感染していない患者由来の血清とも反応することが明らかになった（図１の白棒）。免疫原性ペプチドのサブセットのうちで、本発明者らは、２）診断能力を有するペプチドのより小さいサブセットを特定し、最後に、診断用ペプチドのこのサブセットにおいて、本発明者らは、３）最高の診断能力を有するペプチドに共通する非常に重要なアミノ酸配列（１又は複数）を特定した。換言すれば、この診断能力は、感染した個体におけるペプチドの存在／不存在によって生じるだけでなく、重要なことに、感染していない個体には存在しない抗体応答を一貫して惹起する免疫原性ペプチドの小さいサブセットのみによっても生じる。
【００１１】
高精度血清学を利用することにより、タンパク質レベルではなくペプチドレベルでの解明によって、本発明者らは、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染を欠く個体における交差反応性抗体応答に起因して偽陽性を引き起こすペプチドを排除する一方で、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリを保有する個体においてのみ強い抗体応答を示すペプチドを特定した。それゆえ、本発明者らが特定した診断用ペプチドは、ＲＯＣ　ＡＵＣ値によって判断されるとおり、高い感度及び高い特異性の両方を有し、このため診断的応用のために有用であろう。
【００１２】
本発明の第１の態様では、配列番号１～配列番号７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか又はこれらのアミノ酸配列からなるペプチドが提供される。好ましくは、上記ペプチドは、多くとも２５アミノ酸、より好ましくは１５アミノ酸、さらに好ましくは多くとも１０アミノ酸からなる。好ましい実施形態では、当該ペプチドは、配列番号２～７からなる群から選択される配列、さらに好ましくは配列番号２～５からなる群から選択される配列を含むか、又はこれらの配列からなる。
【００１３】

これらの新規なペプチドは、それらが、診断、より具体的にはＣａｇＡ陽性ヘリコバクター・ピロリの診断のために使用できるという優位点を有する。従って、これらのペプチドを使用する診断は、より少ない偽陽性という結果を生じる。

【００１４】

特定された最小結合領域は、ＣａｇＡ特異的抗体を検出するためにも有用である。最小結合領域は短いので、バックグラウンド結合は低いであろう。さらには、当該ペプチドは短く、それゆえ低費用で製造することができる。

【００１５】

本発明の第２の態様では、診断において使用するための本発明の第１の態様に係るペプチドが提供される。好ましい実施形態では、この診断は、ヘリコバクター・ピロリ感染、より具体的にはＣａｇＡ陽性ヘリコバクター・ピロリの診断であるか、又は胃癌のリスクの予測のためのものである。

【００１６】

本発明の第３の態様では、本発明の第１の態様に係るペプチド又は本発明の第２の態様に係るペプチドの混合物を含むキットが提供される。当該キットは、好ましくは、診断、より具体的にはＣａｇＡ陽性ヘリコバクター・ピロリの診断のためのキット、又は胃癌のリスクの予測のためのキットである。

【００１７】

本発明の第４の態様では、ａ）被検者由来の試料を単離又は準備する工程と、ｂ）上記試料を本明細書に記載されるペプチド又は本明細書に記載されるペプチドの混合物と接触させる工程と、ｃ）上記試料中の抗体の上記ペプチドへの特異的結合を検出する工程とを備える診断方法が提供される。当該方法は、好ましい実施形態では、ヘリコバクター・ピロリ感染の検出又は胃癌についてのリスクの予測のために使用される。

【００１８】

本発明の第５の態様では、１）本明細書に記載される診断を実施する工程と、２）被検者における上記ヘリコバクター・ピロリＣａｇＡ＋感染を処置する工程とを備える、被検者における胃癌の予防方法が提供される。当該方法は、本明細書に記載される診断方法を使用して、被検者がヘリコバクター・ピロリ感染を有していることを判定する工程と、次いで上記感染を処置する工程とを備えてもよい。上記処置は、マクロライド類、β－ラクタム類、ニトロイミダゾール類、テトラサイクリン類及びフルオロキノロン類からなる群から選択される種類の抗生物質を投与する工程を伴ってもよい。上記処置は、上記種類から２つの抗生物質を投与する工程であって、上記２つの抗生物質が異なる種類に由来する工程を伴ってもよい。上記処置は、プロトンポンプ阻害剤を、好ましくは抗生物質と組み合わせて上記被検者に投与する工程をも伴ってもよい。

【００１９】

本発明の第６の態様では、被検者由来の試料におけるヘリコバクター・ピロリＣａｇＡ結合抗体の検出方法であって、生物試料を本発明の第１の態様に係るペプチドと接触させる工程と、上記試料中の抗体の上記ペプチドへの結合を検出する工程とを備える、前記方法が提供される。この試料は、血液、血清、血漿試料又は組織試料、例えば胃組織試料であってもよい。

【００２０】

本発明の第７の態様では、少なくとも２つの本発明の第１の態様に係るペプチドの混合物が提供される。このような混合物は、それがヘリコバクター・ピロリの２以上の異なるＣａｇＡ陽性株を効率的に検出するために使用することができるという優位点を有する。この混合物は、本明細書に記載されるペプチドと同様に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】ペプチドマイクロアレイ解析を用いたＣａｇＡの１８種の異なるリニアＢ細胞エピトープの特定。各ペプチド（ｎ＝１１７２ペプチド）についてのアレイスコアが、ＣａｇＡ配列における開始位置（ｘ軸）にある縦棒として示されている。黒棒はヘリコバクタ

ー・ピロリに感染した個体由来の血清の結果であり、白棒はヘリコバクター・ピロリに感染していない個体由来の血清の結果である。重要なことであるが、多くのペプチドが感染していない個体由来の血清にも反応性を示した（白棒）。

【図２ａ】１８種の特定されたＣａｇＡエピトープから試験されたすべてのペプチド（ｎ＝１１４４ペプチド）のＲＯＣ　ＡＵＣレベル。中央値、四分位範囲及び外れ値を含む箱ひげ図として示された結果。有用でない診断のＡＵＣ（ＡＵＣ＝０．５）は水平方向の点線として示されている。

【図２ｂ】１８種の特定されたＣａｇＡエピトープから試験されたすべてのペプチド（ｎ＝１１４４ペプチド）のＲＯＣ　ＡＵＣレベル。それぞれの個々のペプチドについての結果が、エピトープによってグループ分けされて、示されている。有用でない診断のＡＵＣ（ＡＵＣ＝０．５）は水平方向の点線として示されている。

【図３】非常に重要な配列モチーフを含有するすべてのペプチドについてのＲＯＣ　ＡＵＣスコア。データは、中央値、四分位範囲及び外れ値として示されている。ただ１つのペプチドが試験された場合は、中央値（水平方向の線）だけが示されている。配列モチーフの表示は表４の配列の名称と同一である。ＢＴ＿３００：ＩＩＮＱＫＶＴＤＫＶＤＮＬＮＱ（配列番号１３）（１５アミノ酸のうち少なくとも１２が同一、ｎ＝２９８ペプチド）；ＢＴ＿３０１：ＥＰＩＹＡ（配列番号８）（ｎ＝２７０）；ＢＴ＿３０２：ＥＰＩＹＡＫ（配列番号９）（ｎ＝１６）；ＢＴ＿３０３：ＥＰＩＹＡＱ（配列番号１０）（ｎ＝２１）；ＢＴ＿３０４：ＥＰＩＹＴ（配列番号１１）（ｎ＝２１）；ＢＴ＿３０５：ＥＰＩＹＡＴ（配列番号１２）（ｎ＝１９６）；ＢＴ＿３０６：ＦＸＬＫＲＨＸ（配列番号１）（ｎ＝２４６）；ＢＴ＿３０７：ＦＸＬＫＫＨＸ（配列番号２）（ｎ＝３４）；ＢＴ＿３０８：ＦＸＬＫＱＨＸ（配列番号３）（ｎ＝１）；ＢＴ＿３０９：ＹＸＬＫＲＨＸ（配列番号４）（ｎ＝３）；ＢＴ＿３１０：ＩＸＬＫＲＨＸ（配列番号５）（ｎ＝１）；ＢＴ＿３１１：ＦＸＬＲＲＹＸ（配列番号６）（ｎ＝１）；ＢＴ＿３１２：ＦＸＬＲＲＳＸ（配列番号７）（ｎ＝７）。ＡＵＣ＝０．５は水平方向の点線として示されている。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

本明細書中で、所々で配列の区間に言及される。これは、その区間の中のすべての配列に言及しており、従って、例えば「配列番号２～配列番号５」は、配列番号２、３、４及び５を指す。配列は、アミノ酸残基についての標準的な一文字表記を使用して書かれている。それらのアミノ酸残基は、好ましくはペプチド結合で連結されている。

【００２３】

本明細書中のいくつかのペプチドは、配列変異性を有していてもよい。このように、ある配列が、配列中のいずれのアミノ酸であってもよい位置を特定してもよい。これはＸ、又は配列表ではＸａａを用いて示されてもよい。Ｘ又はＸａａは、シトルリン等の翻訳後修飾から生じるアミノ酸を含めていずれのアミノ酸、好ましくはいずれのＬ－アミノ酸で置き換えられてもよい。このアミノ酸は、天然に存在するアミノ酸である必要はない。好ましくは、このアミノ酸はかさ高い側鎖を有しない。なぜなら、かさ高い側鎖は抗体が結合するのを妨げる可能性があるからである。このアミノ酸の好適な分子量は８５Ｄ～３００Ｄ、より好ましくは８９Ｄ～２２０Ｄであってもよい。

【００２４】

一般に、当該ペプチドは、配列番号１～配列番号３３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでもよいし、又はこれらのアミノ酸配列からなってもよい。当該ペプチドは、配列番号３２～配列番号３３０の配列の一部、例えば配列番号３２～配列番号３３０の残基の１２、より好ましくは１３、さらに好ましくは１４、最も好ましくは１５すべてを含んでもよい。当該ペプチドが配列番号３２～配列番号３３０のアミノ酸の１２、１３又は１４を含むか又はそれらのアミノ酸からなる場合、他のアミノ酸位置はＸ及びＸａａについて上述したいずれのアミノ酸で置き換えられてもよく、他方で残りのアミノ酸は配列番号３２～３３０のとおりの位置を有する。ある実施形態では、このアミノ酸は保存的に置き換えられてもよく、この場合、例えば疎水性アミノ酸が異なる疎水性アミノ酸で置

き換えられ、又は極性アミノ酸が異なる極性アミノ酸で置き換えられる。

【００２５】

いくつかの実施形態では、配列番号３２～配列番号３３０（表２及び表３）のアミノ酸配列を含むか又はそれらのアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい場合がある。１つの実施形態では、配列番号１４～配列番号３１のうちの１つを含むか又はそれらの配列からなるペプチドが使用される。１つの実施形態では、配列番号３２～配列番号２０７のうちの１つを含むか又はそれらの配列からなるペプチドが使用される（表２）。１つの実施形態では、配列番号２０８～配列番号３３０のうちの１つを含むか又はそれらの配列からなるペプチドが使用される（表３）。

【００２６】

好ましい実施形態では、配列番号１～配列番号１３のうちの１つ、例えば配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２又は１３（表４）を含むか又はそれらの配列からなるペプチドが使用される。これらの配列は、ある抗体の最小結合領域を含む。好ましい実施形態では、このペプチドは、配列番号１～配列番号１２から選択されるアミノ酸配列を含むか又はそれらの配列からなる。

【００２７】

さらに好ましい実施形態では、当該ペプチドは、配列番号１～配列番号７から選択される配列を含むか又はそれらの配列からなる。これらのペプチドは診断精度がより高いという優位点を有する。なぜならそれらは、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染を保有する個体のうちの高い割合（百分率）で強い抗体応答を惹起するからである。これらのペプチド（配列番号１～配列番号７）は、すべて同じエピトープ（エピトープ１２及び１４）に関連し、世界のすべてのＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ分離株の約９５％がこれらの配列変異体のうちの少なくとも１つを保有する。さらには、当該ペプチドは、下記の共通の構造的特徴を有する。

●それらはすべて７つのアミノ酸残基を有する。
●それらはすべて１番目の位置に疎水性残基（Ｆ、Ｙ又はＩ）を有する。
●それらはすべて２番目の位置にｘを有する。
●それらはすべて３番目の位置にＬを有する。
●それらはすべて４番目の位置にＫ又はＲ（正電荷を帯びる側鎖）を有する。
●それらはすべて７番目の位置にｘを有する。

【００２８】

配列番号１～配列番号７を含む有用なペプチドの例としては、配列番号１２９～配列番号１７０、配列番号１８６～配列番号１８７及び配列番号２６６～配列番号２７９の配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２９】

さらに好ましい実施形態では、当該ペプチドは、配列番号１、２、３、４及び５から選択される配列、又はさらに好ましくは配列番号２、３、４、５、６及び７からなる群から選択される１以上の配列、又はさらに好ましくは配列番号２、３、４及び５からなる群から選択される１以上の配列を含むか又はそれらの配列からなる。これらの配列を含む有用なペプチドの例は、表２～６及び表７～１０に記載されている。

【００３０】

１つの実施形態では、当該ペプチドは、配列番号１３の配列、若しくは当該配列から選択される１２アミノ酸残基の配列であって他の３つのアミノ酸残基は上記のとおりのいずれのアミノ酸であってもよい前記配列を含むか又はそれらの配列からなる。配列番号１３由来の少なくとも１２アミノ酸を含む有用なアミノ酸配列としては、配列番号５２～配列番号６７及び配列番号２３５～配列番号２５６等の配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３１】

１つの実施形態では、当該ペプチドは、配列番号１５３の配列、又は当該配列から選択される１２アミノ酸、１３アミノ酸若しくは１４アミノ酸の配列であって他のアミノ酸残

基は上記のとおりのいずれのアミノ酸であってもよい前記配列を含むか又はそれらの配列からなる。

【００３２】

当該ペプチドは、好ましくは２５アミノ酸以下、例えば２０アミノ酸又は１５アミノ酸の長さを有する。より短いペプチドが望ましい場合もある。なぜならより短いペプチドは、（抗体による）非特異的な結合がより少ないという結果をもたらし、それゆえより少ないバックグラウンドをもたらすからである。しかしながら、エピトープを露出させて立体障害なしに抗体結合を可能にするため、又はペプチドフォールディングを可能にするために、より長いペプチドが、ある場合には望ましいこともある。従って、より好ましくは、当該ペプチドは、１４アミノ酸残基、より好ましくは１３アミノ酸残基、さらにより好ましくは１２、１１、１０、９、８、７、６又は５アミノ酸残基（６は配列番号８、１１、９、１０及び１２にのみ当てはまり、５は配列番号８及び１１にのみ当てはまる）である。

【００３３】

好ましくは、当該ペプチドは、抗体、好ましくはヘリコバクター・ピロリＣａｇＡタンパク質にも結合する抗体に対して（免疫学的な意味で）特異的にかつ高い親和性で結合する。ペプチドが、代替の細胞又は物質に対してよりもより高頻度で、より迅速に、より長い継続期間及び／又はより大きい親和性で特定の細胞又は物質と反応又は会合する場合、抗体－ペプチド相互作用は、免疫学的な意味で「特異的結合」又は「選択的結合」を呈すると言われる。抗体が他の物質に結合するよりもより大きい親和性、結合活性で、より容易に及び／又はより長い継続期間、その抗体がペプチドに結合するとき、その抗体は「特異的に結合する」又は「選択的に結合する」。結合は、任意の好適な方法を用いて判定することができる。結合は、当該技術分野で公知の方法、例えばＥＬＩＳＡ、表面プラスモン共鳴、ウエスタンブロット又は本明細書に記載される他の方法（以下を参照）によって判定することができる。このような方法は、当該ペプチドの好適な長さ又はアミノ酸配列を決定するために使用することができる。

【００３４】

好ましくは、当該ペプチドの使用は、高い診断特異性及び高い診断感度の両方をもたらす。いずれの診断検査においても、これらの２つの特性は、どのレベルが陽性試験についてのカットオフ値として使用されるかに依存する。設定されたカットオフ値によらずに診断精度を評価するために、受信者動作特性曲線（ＲＯＣ曲線）を使用することができる。ＲＯＣ曲線では、カットオフ値が０から無限大まで変化するにつれて、真陽性率（感度）が偽陽性率（１－特異度）に対してプロットされる。次いで、ＲＯＣ曲線下面積（ＲＯＣ ＡＵＣ）を使用して全体的な診断精度が推定される。好ましくは、当該ペプチドの使用は、少なくとも０．５５のＲＯＣ ＡＵＣ、例えば少なくとも０．６０、０．６５、０．７０、０．７５、０．８０、０．８５、０．９０、０．９５、０．９６、０．９７、０．９８、０．９９のＲＯＣ ＡＵＣ又は１．００のＲＯＣ ＡＵＣを有する。好ましくは、当該ペプチドの使用は、少なくとも０．８５のＲＯＣ ＡＵＣ、最も好ましくは１のＲＯＣ ＡＵＣを有する。

【００３５】

本明細書で使用する場合、用語「ペプチド」は、ペプチド模倣化合物を含めてペプチド、タンパク質、タンパク質の断片等を意味するために使用される。用語「ペプチド模倣」は、構造上基礎とするペプチドの活性を有するペプチド様分子を意味し、この活性はＣａｇＡタンパク質に結合する抗体に対する特異的でかつ高い親和性の結合である。このようなペプチド模倣物としては、化学的に修飾されたペプチド、天然に存在しないアミノ酸を含有するペプチド様分子が挙げられる（例えば、Ｇｏｏｄｍａｎ及びＲｏ、Ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃｓ ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ、「Ｂｕｒｇｅｒ’ｓ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ」、第１巻（Ｍ．Ｅ．Ｗｏｌｆｆ編；Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ １９９５）、８０３－８６１ページを参照）。様々なペプチド模倣物は、例えば、束縛型（ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ）アミノ酸を含有するペプチド様分子を含めて当該技術分野で公知である。ある実施形態では、

環状ペプチドが使用されてもよい。

【００３６】

当該ペプチドは単離されたペプチドであってもよく、この単離されたペプチドは、例えば緩衝液中にあるもの、再構成を待つ乾燥形態にあるもの、キットの一部としてなど天然に存在する形態以外の形態にあるペプチドを意味する。

【００３７】

いくつかの実施形態では、当該ペプチドは実質的に精製されており、これは、天然では会合している他のタンパク質、脂質、炭水化物、核酸及び他の生物由来物質を実質的に含まないペプチドを意味する。例えば、実質的に純粋なペプチドは、乾燥重量の少なくとも約６０％、好ましくは乾燥重量の少なくとも約７０％、８０％、９０％、９５％又は９９％であってもよい。

【００３８】

本発明のペプチドは、塩の形態であってもよい。当該ペプチドと塩を形成することができる好適な酸及び塩基は、当業者にとって周知であり、無機及び有機の酸及び塩基が挙げられる。

【００３９】

当該ペプチドは、溶液において、例えば水溶液において提供されてもよい。そのような溶液は、好適な緩衝液、塩、プロテアーゼ阻害剤、又は当該技術分野で公知の他の好適な成分を含んでもよい。

【００４０】

当該ペプチドは、当該技術分野で公知の１以上の付加的部分と会合（例えば直接又は間接に共役、融合又は連結）していてもよい。限定を意図しないそのような部分の例としては、ビオチン、ポリヒスチジンタグ、ＧＳＴ、ＦＬＡＧタグ等のペプチド若しくは非ペプチド分子、又はリンカー若しくはスペーサが挙げられる。この会合は、共有結合であってもよく非共有結合であってもよい。この会合は、例えば、末端のシステイン残基又は化学的反応性を有する連結剤、ビオチン－アビジン系又はポリヒスチジンタグを介してであってもよい。例えば、当該ペプチドは、単一のビオチン接合リジン残基へペプチド結合によって連結されていてもよい。このビオチン接合リジン残基では、ペプチド例Ｈ－ＸＸＸＸＸＸＸＸＸＸＸＸＸＸＸ（Ｋ（ビオチン））－ＮＨ２（式中、Ｘは当該ペプチドのアミノ酸を示す）のように、リジンがその側鎖上のε－アミノ基を介してビオチン化されている。

【００４１】

該ペプチドを付着させ又は連結すること、精製を改善すること、宿主細胞における当該ペプチドの発現を増強すること、検出を支援すること、当該ペプチドを安定化することなどのために会合部分が使用されてもよい。基材、例えば固相に付着した短鎖ペプチドの場合、抗体が結合できるように抗体への当該ペプチドの曝露を確実にするために、リンカー又はスペーサを使用することが望ましい場合がある。

【００４２】

当該ペプチドは、ペプチドを固定する基材と会合されていてもよい。この基材は、例えば、固体又は半固体の担体、固相、支持体又は表面であってもよい。当該ペプチドは固体支持体上に固定されてもよい。例としては、ビーズ又はプレート内のウェル、例えば９６ウェルプレート等のマイクロタイタープレートが挙げられ、ラボオンチップ（ｌａｂ－ｏｎ－ａ－ｃｈｉｐ）の診断デバイス又は類似デバイスの表面も挙げられる。この会合は、共有結合的であってもよいし非共有結合的であってもよく、共有結合的結合又は非共有結合的結合を可能にするペプチドと会合した部分、例えば担体、固相、支持体又は表面に付着した成分に対して高い親和性を有する部分によって促されうる。例えば、ビオチン－アビジン系を使用することができる。

【００４３】

当該ペプチドは、被検者由来の試料におけるヘリコバクター・ピロリＣａｇＡ特異的抗体を検出するために使用することができ、この方法は、生物試料を本明細書に記載されるペプチドと接触させる工程と、この試料中の抗体の当該ペプチドへの結合を検出する工程

とを備える。当該ペプチドは、本明細書に記載されるとおり、ペプチドを固定する基材に会合されていてもよく、例えば固体支持体に付着されていてもよい。当該方法は、本明細書に記載されるとおり、結合、洗浄、及び抗体の検出を可能にするためのインキュベーションを含んでもよい。抗体の結合の検出方法は後述されるが、例えばＥＬＩＳＡが挙げられる。

【００４４】

当該ペプチドは、診断、特にヘリコバクター・ピロリの感染又は胃癌の診断のために使用することができる。ＣａｇＡヘリコバクター・ピロリ感染は胃癌についてのリスクの上昇と相関するということが知られている。従って、当該ペプチドは、被検者が胃癌を発症するリスクを評価するために使用することができる。胃癌発症のリスクとしては、胃癌を有しない段階から何らかのステージの胃癌を有する段階への進行のリスク、良性の病状から悪性の状態への進行のリスク又は悪性がより低い状態から悪性がより高い状態への進行のリスクが挙げられ得る。このように、上記リスクとしては、胃癌を有するか又は将来胃癌を発症するというリスクが挙げられ得る。好ましい実施形態では、当該ペプチドは、被検者が将来胃癌を発症するリスクを評価するために使用される。当該ペプチドは、ヘリコバクター・ピロリ感染と関連する他の疾患、例えば消化性潰瘍疾患、消化不良及び免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）の診断のためにも使用することができる。

【００４５】

診断はいずれの好適な方法を用いて実施してもよい。好ましい方法では、被検者由来の試料中の抗体がペプチドに結合するようにされ、結合が検出される。被検者は、ヒト又は動物、好ましくはヒトであってよい。当該ペプチドへの被検者由来の抗体のインビトロ結合は、その被検者の免疫系がその特定のペプチドに対して抗体を生成したこと、従ってそのペプチド、ひいてはそのＣａｇＡヘリコバクター・ピロリがその被検者の中に存在するということを示す。

【００４６】

当該方法は、（１）被検者から、抗体を含有している可能性がある体液若しくは組織の試料を単離するか又はそのような試料をインビトロで準備する工程と、（２）（上記抗体へのペプチドの特異的結合のために）特異的ペプチド抗体複合体の形成に有効な条件下で、その試料をペプチドと接触させる工程、例えば、上記試料及びペプチドを反応させるか又はインキュベーションする工程と、（３）抗体－ペプチドの反応の存在について上記接触させた（反応させた）試料をアッセイする工程（例えば、抗体－ペプチド複合体の量を決定する工程）とを備えてもよい。当該方法には、当該技術分野で公知のとおり、１以上の洗浄工程が含まれてもよい。工程２及び工程３は、インビトロで、つまり、試料が被検者から単離されたあとのその試料を使用して、被検者から以前に単離された試料の中で実施されることが好ましい。

【００４７】

上記試料は、いずれかの好適な試料、例えば血液、血清、血漿、唾液、粘膜の分泌物、腹水若しくは類似の体液、又は組織の試料であってもよい。

【００４８】

当該ペプチドに対する抗体応答は、様々な免疫学的／血清学的な方法によって検出することができる。当該ペプチドを用いて上記抗体の存在を検出する好適なフォーマットとしては、ペプチドマイクロアレイ、ＥＬＩＳＡ、クロマトグラフィ、ウエスタンブロット、ラボオンチップフォーマット、マイクロビーズに基づくシングルプレックスイムノアッセイ又はマルチプレックスイムノアッセイなどが挙げられる。

【００４９】

これらの方法は、固定相（ＥＬＩＳＡプレートのウェル又はマイクロビーズの表面等）に結合されたペプチドを立証する工程、液相にある分析するべき試料を加える工程、抗体を結合させる工程、次いで未結合の抗体を洗い流す工程を伴うことが多い。

【００５０】

抗体結合は、特定種のヒト抗体、例えばＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２又はＩｇ

Ｇ３、ＩｇＧ４に結合する標識された二次抗体を使用することによりインビトロで検出することができる。ＥＬＩＳＡでは、二次抗体は、酵素、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）又はアルカリホスファターゼ（ＡＰ）を用いて標識される。この二次抗体は、好適には、ヒト以外の別の種由来、例えばウサギ由来又はヤギ由来である。

【００５１】

あるいは、蛍光標識又は放射活性標識を使用することができる。

【００５２】

ＥＬＩＳＡにおいて当該ペプチドを使用するためのプロトコルは、どの二次抗体を使用するか、その希釈、緩衝液、ブロッキング溶液、洗浄液などに関して、当業者によって容易に最適化されうる。プレートを使用するＥＬＩＳＡプロトコルの一例の概略は、以下のとおりであってもよい。ポリスチレンマイクロタイタープレートが、交差力価測定によって決定される最適濃度の、ＰＢＳに室温で一晩溶解させた注目する当該ペプチドでコーティングされる。ＰＢＳで２回洗浄した後、ウェルが３７℃で３０分間、０．１％（重アミノ酸長積）ウシ血清アルブミン－ＰＢＳでブロックされる。その後のインキュベーションが室温で行われ、インキュベーションとインキュベーションとの間にプレートが０．０５％　Ｔｗｅｅｎを含有するＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ）で３回洗浄される。血清又は他の体液の試料が、例えば１／１０の開始希釈で二重又は三重に添加され、例えば３倍希釈系列で希釈される。以前に試験され、当該ペプチドに対する抗体を有することがわかっている対照試料が、陽性対照として使用される。既知濃度の抗体を有する試料が、標準曲線を作成するために使用されてもよい。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎだけが添加されているウェルが、バックグラウンド値の決定のための陰性対照として使用される。室温で９０分間のインキュベーション後、ＨＲＰ標識化ウサギ抗ヒトＩｇＡ抗体又はＨＲＰ標識化ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体が添加され、６０分間インキュベーションされる。その後、プレートは、０．１Ｍクエン酸ナトリウム緩衝液中のH_2O_2及びオルト－フェニレンジアミン二塩酸塩、ｐＨ４．５の添加後、分光光度計の中で２０分間読み取られる。各試料の終点力価は、４５０ｎｍで例えばバックグラウンドより０．４高い吸光度を与える内挿希釈率の逆数として決定される。あるいは、最終読取り値として、上記吸光度の値を使用することができる。当業者は、このＥＬＩＳＡプロトコルが一例にすぎないこと、及びこのプロトコルの多くの異なる変型及び変更が可能であることを認識した。

【００５３】

あるいは、１つの実施形態では、Ｂ細胞が被検者から単離され、この細胞が当該ペプチドに結合する抗体を産生できるか否かが分析される。これは、ＥＬＩＳＰＯＴ法、ＡＬＳ（リンパ球分泌物中の抗体）、又は類似の方法を使用することにより行うことができる。

【００５４】

診断は、配列番号３２～３３０、配列番号１～７、特に配列番号２～５を含むか又はそれらの配列からなるペプチドから選択されるペプチドに特異的な抗体を使用して、患者由来の組織試料におけるＣａｇＡタンパク質の存在を検出することによっても実施することができる。この試料は、好ましくは胃組織の試料である。所望の結合特異性をもつ抗体は、当業者によって生成することができる。この抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいしモノクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体が好ましい。この抗体は、例えばウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、免疫組織染色など、タンパク質を検出するためのいずれの有用なフォーマットにおいても使用することができる。この抗体は、本明細書中の診断方法のために使用することができる。

【００５５】

上記方法は、２つの可能性のある結果であるヘリコバクター・ピロリ感染が存在する、又はヘリコバクター・ピロリ感染は存在しないを生じることができるようなものであってもよい。ヘリコバクター・ピロリ感染は、例えば、上記アッセイにおけるシグナルカットオフ値に基づいて判定することができる。中間の結果である、さらなる検討又は再試料採取若しくは試料の再分析を必要とする不確かな結末もあってよい。

【００５６】

ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染が存在するということが確立されると、例えばその被検者が胃癌を発症するリスクを低下させるために、このヘリコバクター・ピロリ感染を処置することが有用である場合がある。処置は、当該技術分野で公知の方法によって、例えば抗生物質の使用によって行うことができる。様々な理由から、その理由のいくつかは、抗生物質耐性に関する問題とともに胃での活性な抗生物質のアベイラビリティが低いことであるが、ヘリコバクター・ピロリ感染について多くの異なる抗生物質処置レジメンが存在し、これらの有効性は、一般に世界の地域ごとに異なる。一般に、処置レジメンは、次クエン酸ビスマスカリウムの添加を伴う又は伴わない、マクロライド類、β－ラクタム類、ニトロイミダゾール類、テトラサイクリン類及びフルオロキノロン類の群から選択される少なくとも２つの異なる抗生物質を含み、１つの抗生物質が好ましくは各群から選択される。１以上の抗生物質が、プロトンポンプ阻害剤と組み合わせて投与されてもよい。１つの処置としては、７～１４日間のプロトンポンプ阻害剤オメプラゾール、並びに抗生物質アモキシシリン及びクラリスロマイシンの投与が挙げられる。

【００５７】

従って、１）被検者に対して本明細書に記載される診断を実施する工程と、２）上記被検者におけるヘリコバクター・ピロリ感染を処置する工程とを備える胃癌の防止方法も提供される。好ましくは、処置は、上記被検者がヘリコバクター・ピロリ感染を有しないように行われる。

【００５８】

ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染が存在すると確立されると、さらなる検討を行って早期の段階又は進行した段階の胃癌の存在を評価することも有用である可能性がある。これは、すべての患者に関係する可能性があるが、他の理由から高い胃癌のリスクを有するとわかっているか又は有することが疑われる被検者、例えば高胃癌リスクの国々出身の患者、喫煙者である被検者、及び／又は近親者が胃癌と診断されたことがあるとわかっている被検者には特別に関係する。このような検討は、胃内視鏡検査によって行うことができ、この胃内視鏡検査で、胃癌が存在するか否かを評価するために胃壁が視診される。胃腫瘍が観察されると、その腫瘍は、早期であれば内視鏡的切除術によって、又は進行期であれば外科手術によって、処置されてもよい。

【００５９】

あるいは、当該方法は、日常的な胃内視鏡検査による検討に対するフォローアップとして使用することができる。内視鏡検査及び／又はその後の病理組織試験で、例えばＯＬＧＡスコアの上昇によって胃に前癌状態が存在すると発見されると、当該方法は、さらなる患者の取り扱いを通知するために使用することができる。これは、フォローアップの胃内視鏡検査のための適切な時間間隔についての推奨の形態であってもよい。例えば、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染が存在すると確立された場合には、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染が存在しない場合よりも短い時間間隔でフォローアップの胃内視鏡検査を実施することが有益である可能性がある。

【００６０】

当該ペプチドは、当該技術分野で公知の方法によって合成することができる。当該ペプチドは、有機合成、例えば固相合成によって純粋にかつ大量に得ることができる。ペプチド合成のための方法は、例えばペプチド合成機を使用することなど、当該技術分野で周知である。当然、当該ペプチドは、ペプチド合成会社に発注してもよい。

【００６１】

当該ペプチドは、動物起源、植物起源、細菌起源又はウイルス起源のものであってもよい。その場合、当該ペプチドは、当該技術分野で公知のとおり、その生物から精製されてもよい。当該ペプチドは、組み換え技術を使用して、例えば真核細胞、細菌細胞、又はウイルス発現系を使用して産生されてもよい。詳細については、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、（Ａｕｓｕｂｅｌら編）、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、ＮＹ（最新版）が参照される。

【００６２】

ヘリコバクター・ピロリはＣａｇＡ配列においていくつかの遺伝的多様性を呈し、数種の株を特定するペプチド又は一群のペプチドを使用することが望ましい場合がある。配列番号１～配列番号７は、そのような一群のペプチドを代表する。なぜなら、世界中のすべてのＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ分離株の９５％は、これらの配列変異体のうちの少なくとも１つを保有するからである。従って、本明細書中の２以上のペプチド（配列番号１～３３０）の混合物（「カクテル」）を提供することが有用である場合がある。１つの実施形態では、このような混合物は、配列番号１～配列番号１３を含むか又はそれらの配列からなるペプチドから選択される少なくとも２種の、好ましくは３種の、より好ましくは４種の、より好ましくは５種の、より好ましくは６種の、より好ましくは７種のペプチドを含む。１つの実施形態では、これらの配列は、配列番号１～配列番号７から選択される。好ましい混合物としては、配列番号１、２、３、４、５、６及び７、配列番号１、２、３、４及び５、配列番号２、３、４、５、６及び７、並びに配列番号２、３、４及び５が挙げられる。配列番号１～配列番号５は、いわゆるＣａｇＡ　ＡＢＣ型、ＡＢＣＣ型及びＡＢＣＣＣ型に存在し、他方、配列番号６及び配列番号７は、ＡＢＤ型にしか存在しない。このように、１つの実施形態では、１つの配列は配列番号１～５から選択され、１つの配列は配列番号６及び７のうちの１つから選択される。配列番号６及び７のペプチドは、アジアにおけるヘリコバクター・ピロリ株の診断にとって特に有用である可能性がある。

【００６３】

別の実施形態では、当該ペプチドは、配列番号８～配列番号１３のペプチドから選択される。

【００６４】

１つより多いヘリコバクター・ピロリ株を検出するための別の有用なやり方は、配列番号８、９、１０及び１２に存在するモチーフＥＰＩＹＡを含有するペプチドを使用することである。

【００６５】

１以上のペプチドが１つのキットに含まれてもよい。このキットは、本明細書に記載される診断のために使用されてもよい。キットは、１以上のペプチド又はこれらの混合物、結合緩衝液、及び二次抗体等の検出剤を含んでもよい。当該キットは、本発明のペプチド（１又は複数種）が予め吸着されているＥＬＩＳＡプレート等のマイクロタイタープレート等の固体支持体等の当該ペプチドを固定する基材、種々の希釈剤及び緩衝液、特異的に結合された抗原又は二次抗体等の抗体の検出のための標識化接合体又は他の薬剤、並びに酵素基質、補因子及び色素原等の他の信号発生試薬を含んでもよい。キットの他の好適な構成要素は、当業者が容易に決定することができる。

【実施例】

【００６６】

実施例１

関連するＣａｇＡペプチドを、ペプチドアレイ実験を使用して３工程の手順を使用して特定した。これらのペプチドの抗体結合の痕跡を、そのアレイを、消化不良患者のコホート由来の、ヘリコバクター・ピロリに感染した個体由来及びヘリコバクター・ピロリに感染していない個体由来のプールされた血清試料又は個々の血清試料とともにインキュベーションすることにより分析した。このヘリコバクター・ピロリに感染した個体は、既知のＣａｇＡ状態（ｃａｇＡ遺伝子の存在／不存在）で感染症を有していた。

【００６７】

血清試料は、以前に記載されているとおり（Ｔｈｏｒｅｌｌら、ＢＭＣ　Ｅｖｏｌ　Ｂｉｏｌ　２０１６：１６：５３）、消化不良に起因して内視鏡検査を受けたニカラグアのマナグアの個体から得た。これらの患者の各々は、既知のヘリコバクター・ピロリ感染状態を有しており、当該患者らのヘリコバクター・ピロリ分離株のゲノム配列は、利用可能であった。

【００６８】

ヘリコバクター・ピロリの公開されたゲノム配列はＮＣＢＩから得た。ヘリコバクター・ピロリについての利用可能な全ゲノム（ｎ＝４９）は、２０１３年８月にＧｅｎＢａｎｋからダウンロードした。実験株Ｂ８、Ｒｉｆ１、Ｒｉｆ２、ＵＭ２９８及びＵＭ２９９を除外し、残りの４４の完全株を比較ゲノム解析のために使用した。２０１３年１１月１日現在でＧｅｎＢａｎｋで利用可能な全ゲノム配列解析された分離株をダウンロードし、動物中で継代した株又は実験的に誘導した株についてを除き、オープンリーディングフレーム情報を含有するすべての分離株を使用した。受入番号ＳＲＰ０４５４４９でＳｅｑｕｅｎｃｅ Ｒｅａｄ Ａｒｃｈｉｖｅデータベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｒａ）からの、以前に公開されたニカラグア人のゲノム配列も使用した。

【００６９】

これらの公に利用可能なゲノム配列に加えて、オーストラリアで単離されたヘリコバクター・ピロリ株の配列を、Ｂａｒｒｙ Ｊ Ｍａｒｓｈａｌｌ教授（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ａｕｓｔｒａｌｉａ、西オーストラリア州、オーストラリア）から得た。

【００７０】

上記利用可能なゲノム内の推定されるＣａｇＡタンパク質配列を特定するために、ｂｌａｓｔｐを使用する類似性検索を、株２６６９５（ＮＣ＿０００９１５．１）由来のＣａｇＡ配列を使用して実施した。本発明者らのゲノム配列のコレクションでは、２４５の株／分離株がｃａｇＡ遺伝子を含有していることが見出され、これらの分離株のすべての推定されるＣａｇＡタンパク質配列を、この後の分析のために使用した。

【００７１】

実施例２

ＣａｇＡペプチドに対する抗体応答を、ペプチドアレイ分析を使用してアッセイした。レーザー印刷合成技術を使用して中密度アレイを印刷した。これらのチップに対し、約８，６００の異なる１５アミノ酸（１５アミノ酸長）ヘリコバクター・ピロリペプチドを各チップ上にスポットした。その後、このチップを、患者血清の１／１０００倍希釈物、又は１０種の異なる血清試料のプールの１／１０００倍希釈物とともにインキュベーションし、次いで洗浄し、その後、蛍光色素と接合したウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体によるインキュベーションを行った。最後に、蛍光イメージスキャンニング及びデジタル画像解析を実施して、チップ上のペプチドの各々に対する抗体結合を検出した。チップ印刷及び抗体分析を、ＰＥＰｐｅｒＰＲＩＮＴ社（ハイデルベルク、ドイツ）によって実施した。

【００７２】

実施例３

オンチップフォトリソグラフィー合成を使用して高密度アレイを作成した。これらの実験では、約２００，０００種の異なる１５アミノ酸長ヘリコバクター・ピロリペプチドを各チップ上にスポットした。その後、このチップを、患者血清の１／１０００倍希釈物、又は１０種の異なる血清試料のプールの１／１０００倍希釈物とともにインキュベーションし、次いで洗浄し、その後、蛍光色素と接合したウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体又はウサギ抗ヒトＩｇＡ抗体によるインキュベーションを行った。最後に、蛍光イメージスキャンニング及びデジタル画像解析を実施して、チップ上のペプチドの各々に対する抗体結合を検出した。チップ印刷及び抗体分析を、Ｓｃｈａｆｅｒ－ｎ社（コペンハーゲン、デンマーク）によって実施した。

【００７３】

実施例４：ＣａｇＡのＢ細胞エピトープの特定

重複する１５アミノ酸長ペプチド及び血清試料のプールに対する血清抗体結合を評価することによりＣａｇＡ配列全体をスクリーニングした。配列の重複が１０アミノ酸である、ＣａｇＡ配列全体を網羅するペプチド（ｎ＝２３４ペプチド）でスポットした実施例２の中密度アレイを使用した。フォローアップ実験では、ＣａｇＡ配列全体を網羅する１５アミノ酸長ペプチドを用いた実施例３の高密度アレイを使用したが、この際、配列の重複

は１４アミノ酸であった（ｎ＝１１７２ペプチド）。両方の場合、ＣａｇＡペプチド配列の供給源としてヘリコバクター・ピロリ株２６６９５を使用した。各ペプチドへの抗体結合をアレイ上で個々に評価し、１つが１０人のヘリコバクター・ピロリに感染した（Ｈｐ＋）個体に由来するプールされた血清からなり、他方が１０人の感染していない（Ｈｐ－）個体に由来する血清からなる２つの血清プールを使用した。

【００７４】

Ｈｐ＋血清プールの抗体結合をＨｐ－プールの結合と比較した。直線状Ｂ細胞エピトープを、Ｈｐ－群においてよりもＨｐ＋群において抗体結合が少なくとも２倍高い少なくとも４つのアミノ酸の区間として定義した。このようにして、ヘリコバクター・ピロリＣａｇＡが１８種の異なる直線状Ｂ細胞エピトープを含有し、それらの平均長さが２２アミノ酸であることが判明した（表１及び図１）。これらのエピトープは、すべてＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染の診断のために有用である。

【００７５】

【表１】

配列番号	エピトープ	アミノ酸配列	開始[1]	終端[1]	長さ
14	CagA_01	NPTKKNQYFSDFIDKSNDLINKDNLIDVESS	80	110	31
15	CagA_02	DPSKINTRSIRNFMENIIQPPIPDD	134	158	25
16	CagA_03	KKQSSDVKEAINQEPVPHVQPDIATTTTDIQGL	223	255	33
17	CagA_04	PEARDLLDERGNFSKFTLGDMEMLDVEGVAD	257	287	31
18	CagA_05	KAQANSQKDEIFALINKEANRD	650	671	22
19	CagA_06	SKDLKDFSKSFDEFKNGKNKDFSK	696	719	24
20	CagA_07	GINPEWISKVENLNAALNEFKNGK	735	758	24
21	CagA_08	INQKVTDKVDNLNQAVS	781	797	17
22	CagA_09	FSDIKKELNEKFKNFNNNNN	870	889	20
23	CagA_10	KNSTEPIYAKVNKKKTG	892	908	17
24	CagA_11	YTQVAKKVNAKIDRLNQIAS	918	937	20
25	CagA_12	AAGFPLKRHDKVDDLSK	945	961	17
26	CagA_13	GLSASPEPIYATIDD	963	977	15
27	CagA_14	GGPFPLKRHDKVDDLSK	979	995	17
28	CagA_15	VSEAKAGFFGNLEQTID	1015	1031	17
29	CagA_16	ESAKKVPASLSAKLDNYA	1047	1064	18
30	CagA_17	GAINEKATGMLTQKNPEW	1078	1095	18
31	CagA_18	SEYDKIGFNQKNMKDYSDSFKFSTKLN	1114	1140	27

[1] 開始位置及び終端位置は、株２６６９５のＣａｇＡにおけるアミノ酸位置を指す。

【００７６】

実施例５：高い診断能力を有する１５アミノ酸長ＣａｇＡペプチドの特定

特定したエピトープへの抗体結合について個々の血清試料をアッセイして、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリを有するか又はＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリを欠く、ヘリコバクター・ピロリに感染した個体が、種々の上記エピトープに対する抗体と反応する頻度を評価した。上記１８種のエピトープが、各々、１つより多い１５アミノ酸長ペプチドにまたがっていたため、再び重複するペプチドを使用し、この際には、連続するペプチド間には１０アミノ酸又は１１アミノ酸の重複があった。さらには、種々のヘリコバクター・ピロリ分離株にはＣａｇＡのかなりの配列多様性があるため、各ペプチドについての配列変異体を含めた。このように、２６６９５ＣａｇＡ由来の各々の重複する１５アミノ酸長ペプチド配列について、このペプチドのあらゆる利用可能な配列変異体が２４５の世界中のＣａｇＡ配列の本発明者らのデータベースで配列変異体が少なくとも２回存在すると

判明した場合には、そのような配列変異体も使用した。全体で、１８種の特定されたエピトープ内の１１４４種の異なるＣａｇＡペプチド及び配列変異体を、高密度アレイを使用してアッセイした。ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染を有するか又は有しない個体由来、及び感染していない対照由来の個々の血清試料（ｎ＝４８）を用いて各ペプチドをアッセイした。

【００７７】

応答する個体が高頻度にありかつ強い抗体結合を示すエピトープは、ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染の診断のために使用するのに好適であろう。ＣａｇＡ抗体を評価するための以前に公知の方法が伴う課題は、偽陽性の個体、すなわちヘリコバクター・ピロリに感染していないが試験で陽性と判定される個体、の数が大きいことであった。それゆえ、ＣａｇＡ＋感染を有する個体において強い抗体応答を示すが、ＣａｇＡを欠く感染を有する個体及びヘリコバクター・ピロリに感染していない個体においては最小の応答しか示さないという良好な識別能力を有するペプチドを特定した。

【００７８】

ＲＯＣ曲線を使用するペプチドの識別能力をアッセイし、ＲＯＣ曲線の曲線下面積（ＡＵＣ）（ＲＯＣ　ＡＵＣ）を診断能力の評価として使用した。

【００７９】

上記１８種の特定されたＣａｇＡエピトープ由来の、配列変異体を含めた１１４４種の異なるペプチドのＲＯＣ　ＡＵＣ中央値は、０．５３であった（図２Ａ）。０．５３というＲＯＣ　ＡＵＣはコイントスの（すなわち、診断のために有用ではない）診断精度に非常に近いため、これは、ＣａｇＡタンパク質全体に対する抗体応答に頼る既存の血清学的な試験についての高い偽陽性率という課題を際立たせる。

【００８０】

異なるエピトープの間でＲＯＣ　ＡＵＣの偏在があり、エピトープ３～４、８～１４及び１７～１８は高診断能力を有するペプチドのほとんどを含有していた（図２Ｂ）。

【００８１】

上記１１４４種のペプチドのうちで、０．７よりも高いＲＯＣ　ＡＵＣをもつ１７６種のＣａｇＡペプチドを特定した（表２）。これらのペプチドの各々は、ヘリコバクター・ピロリＣａｇＡ＋感染の診断のために使用することができる。

【００８２】

【表２】

配列番号	名称	配列	AUC	エピトープ
32	BT_001	DVKEAINQEPVPHVQ	0.72	CagA_03
33	BT_002	DVKEAINQEPLPHVQ	0.76	
34	BT_003	DVKEAINQEPVPHIQ	0.74	
35	BT_004	DVKEAINQEPVPNVQ	0.72	
36	BT_005	TTTHIQGLPPESRDL	0.70	
37	BT_006	TTTPIQGLPPESRDL	0.72	
38	BT_007	TPTHIQGLPPEARDL	0.75	
39	BT_008	QGLPPESRDLLDERG	0.73	CagA_04
40	BT_009	QGLPPEARDLLDERG	0.75	
41	BT_010	QSLPPEARDLLDERG	0.78	
42	BT_011	QGLPLEARDLLDERG	0.74	
43	BT_012	ESRDLLDERGNFSKF	0.72	
44	BT_013	LDERGNFFKFTLGDM	0.70	
45	BT_014	NFSKFTLGDMEMLDV	0.76	
46	BT_015	NFFKFTLGDVEMLDV	0.70	
47	BT_016	NFSKFTLGDMNMLDV	0.81	
48	BT_017	DFSKFTLGDMEMLDV	0.77	
49	BT_018	NFFKFTLGDMEMLDV	0.75	
50	BT_019	NFPKFTLGDMEMLDV	0.78	
51	BT_020	NFSKFTLGDVEMLDV	0.76	
52	BT_021	IKDVIINQEITDKVD	0.74	CagA_08
53	BT_022	IINQKITDKVDNLNQ	0.81	
54	BT_023	IINQKVTDKVDNLNQ	0.83	
55	BT_024	IINQKITDKVDDLNQ	0.79	
56	BT_025	IINQKITDKVDNLSQ	0.78	
57	BT_026	IINQKITDKVDNLSS	0.84	
58	BT_027	IINQKVTDKVDDLNQ	0.79	
59	BT_028	IINQEITDKVDNLNQ	0.76	
60	BT_029	IINQKITDKADNLNQ	0.80	
61	BT_030	IINQKVTDKVDNLSS	0.80	
62	BT_031	IINQKITDKVDSLNQ	0.84	
63	BT_032	IINQKITDKVENLNQ	0.73	
64	BT_033	HINQQITDKVDNLNQ	0.79	
65	BT_034	IFNQKITDKVDDLNQ	0.79	
66	BT_035	ITDKVDNLNQAVSIA	0.70	
67	BT_036	ITDKVDNLNQAVSEA	0.70	
68	BT_037	TLAKNFSDIKKELNE	0.73	CagA_09
69	BT_038	TLSKNFSDIKKELNE	0.72	
70	BT_039	NLAKNFSDIKKELNE	0.72	
71	BT_040	NFSDIKKELNEKFKN	0.79	
72	BT_041	NFSDIKKELNEKLFG	0.75	
73	BT_042	KNSTEPIYAKVNKKK	0.84	CagA_10

【表３】

配列番号	名称	配列	AUC	エピトープ
74	BT_043	GLKNEPIYAKVNKKK	0.87	
75	BT_044	KNNTEPIYAQVNKKK	0.80	
76	BT_045	KNSGEPIYAQVNKKK	0.78	
77	BT_046	KGPEEPIYAKVNKKK	0.83	
78	BT_047	KNSAEPIYAQVNKKK	0.80	
79	BT_048	KNSGEPIYAKVNKKK	0.84	
80	BT_049	KNSAEPIYAKVNKKK	0.86	
81	BT_050	ENSTEPIYAKVNKKK	0.91	
82	BT_051	KNNEEPIYAQVNKKK	0.88	
83	BT_052	KNNTEPIYAKVNKKK	0.86	
84	BT_053	EPIYAKVNKKKTGQV	0.87	
85	BT_054	EPIYAQVNKKKTGQV	0.85	
86	BT_055	EPIYAKVNKKKAGQA	0.87	
87	BT_056	EPIYAKVNKKKTGQA	0.87	
88	BT_057	EPIYAKVNKKKAGQV	0.87	
89	BT_058	EPIYAQVNKKKTGQA	0.83	
90	BT_059	EPIYAQVNKKKAGQA	0.82	
91	BT_060	EPIYAQVNKKKAGQV	0.83	
92	BT_061	EPIYAKVNKKKTGEV	0.84	
93	BT_062	EPIYAKVNKKKTEQA	0.87	
94	BT_063	VASPEEPIYAQVAKK	0.78	CagA_11
95	BT_064	VASPEEPIYTQVAKK	0.78	
96	BT_065	AASPEEPIYAQVAKK	0.79	
97	BT_066	ATSPEEPIYAQVAKK	0.80	
98	BT_067	AASLEEPIYAQVAKK	0.78	
99	BT_068	AASPEEPIYTQVAKK	0.76	
100	BT_069	AASHEEPIYAQVAKK	0.79	
101	BT_070	VASLEEPIYTQVAKK	0.75	
102	BT_071	LENSTEPIYTQVAKK	0.74	
103	BT_072	ASPEEPVYTQVAKMV	0.81	
104	BT_073	VASHEEPIYAQVAKK	0.79	
105	BT_074	EEPIYAQVAKKVNAK	0.86	
106	BT_075	EEPIYTQVAKKVNAK	0.79	
107	BT_076	EEPIYAQVAKKVSAK	0.87	
108	BT_077	EEPIYAQVAKKVTQK	0.86	
109	BT_078	EEPIYAQVAKKVTKK	0.82	
110	BT_079	EEPIYTQVAKKVTKK	0.77	
111	BT_080	EEPIYTQVAKKVKAK	0.76	
112	BT_081	EEPIYTQVAKKVTQK	0.80	
113	BT_082	TEPIYTQVAKKVKAK	0.75	
114	BT_083	EEPVYTQVAKMVTQK	0.77	
115	BT_084	AQVAKKVNAKIDRLN	0.83	

【表４】

配列番号	名称	配列	AUC	エピトープ
116	BT_085	AQVAKKVSAKIDQLN	0.81	
117	BT_086	TQVAKKVNAKIDRLN	0.82	
118	BT_087	AQVAKKVNAKIDQLN	0.83	
119	BT_088	TQVAKKVNAKIDQLN	0.84	
120	BT_089	TQVAKKVKAKIDQLN	0.73	
121	BT_090	TQVAKKVTQKIDQLN	0.71	
122	BT_091	KKVNAKIDRLNQIAS	0.84	
123	BT_092	KKVNAKIDQLNQAAS	0.84	
124	BT_093	KKVNAKIDQLNQIAS	0.85	
125	BT_094	KKVNAKIDRLNQAAS	0.83	
126	BT_095	KKVKAKIDQLNQAAS	0.78	
127	BT_096	KKVNAKIDRLNQIAR	0.84	
128	BT_097	KKVSAKIDQLNQAAS	0.81	
129	BT_098	GVGQAAGFPLKRHDK	0.87	CagA_12/ CagA_14
130	BT_099	GVGQAAGFPLKKHDK	0.84	
131	BT_100	GVGQAAGFPLKKHGK	0.77	
132	BT_101	GVGQAASFPLKRHDK	0.81	
133	BT_102	GVGRAAGFPLKRHDK	0.87	
134	BT_103	GVGQAVGFPLKRHDK	0.87	
135	BT_104	GVGKAAGFPLKRHDK	0.89	
136	BT_105	DVGQAANFLLKRHDK	0.78	
137	BT_106	VVGQAVGFPLKRHDK	0.89	
138	BT_107	GVGQAAGYPLKRHDK	0.88	
139	BT_108	GVGQATGFPLKRHDK	0.87	
140	BT_109	GVGQVAGFPLKKHGK	0.77	
141	BT_110	VGQAGFPLKRHDKVD	0.91	
142	BT_111	VGQAGFPLKRHDKVE	0.92	
143	BT_112	VGQAGFPLKKHAKVE	0.82	
144	BT_113	VNQAGFPLKRHDKVD	0.91	
145	BT_114	VGQAGFLLKRHDKVD	0.88	
146	BT_115	AGFPLKRHDKVDDLS	0.91	
147	BT_116	GPFPLKRHDKVDDLS	0.91	
148	BT_117	AGFPLKRHDKVEDLS	0.91	
149	BT_118	AGFPLKKHDKVDDLS	0.87	
150	BT_119	AGFPLKKHAKVEDLS	0.87	
151	BT_120	AGFPLKKHDKVEDLS	0.86	
152	BT_121	ASFPLKRHDKVDDLS	0.90	
153	BT_122	EGFPLKRHDKVDDLS	0.94	
154	BT_123	AGFPLKKHGKVDDLS	0.86	
155	BT_124	AGFPLKRHDKVGDLS	0.93	
156	BT_125	GSFPLKRHDKVEDLS	0.92	
157	BT_126	AGYPLKRHDKVDDLS	0.91	

【表５】

配列番号	名称	配列	AUC	エピトープ
158	BT_127	GSSPLKRHAKVDDLS	0.78	
159	BT_128	TGFPLKRHDKVDDLS	0.92	
160	BT_129	GPFPLKKHAKVDDLS	0.84	
161	BT_130	LKRHDKVDDLSKVGL	0.84	
162	BT_131	LKRHDKVDDLSKVGR	0.83	
163	BT_132	LKRHDKVEDLSKVGR	0.76	
164	BT_133	LKRHDKVEDLSKVGL	0.70	
165	BT_134	LKRHDKVGDLSKVGL	0.73	
166	BT_135	LKKHDKVEDLSKVGR	0.71	
167	BT_136	LKKHDKVDDLSKVGR	0.81	
168	BT_137	LKRHAKVDDLSKVGL	0.79	
169	BT_138	LKKHDKVDDLSKVGL	0.81	
170	BT_139	LKKHGKVDDLSKVGL	0.74	
171	BT_140	RSVSPEPIYATIDDL	0.84	
172	BT_141	LSASPEPIYATIDDL	0.82	
173	BT_142	SASPEPIYATIDFDE	0.72	
174	BT_143	LSANPEPIYATIDDL	0.81	
175	BT_144	RLDSPEPIYATIDDL	0.82	
176	BT_145	LSANHEPIYATIDDL	0.77	
177	BT_146	NSDRSEPIYATIDDL	0.74	
178	BT_147	LSASPEPIYATIDEL	0.82	CagA_13
179	BT_148	PEPIYATIDDLGGPF	0.81	
180	BT_149	PEPIYATIDDLGGSF	0.79	
181	BT_150	PEPIYATIDELGGPF	0.77	
182	BT_151	SEPIYATIDDLGGPF	0.76	
183	BT_152	HEPIYATIDDLDGPF	0.74	
184	BT_153	HEPIYATIDDLGGPF	0.74	
185	BT_154	EPIYATIDDLDGSSP	0.74	
186	BT_155	IDDLGGPFPLKRHDK	0.91	CagA_14
187	BT_156	RHDKVDDLSKVGRSV	0.70	
188	BT_157	DLNQAVSEAKIGHFD	0.71	CagA_15
189	BT_158	NGAINEKATGMLTQK	0.76	
190	BT_159	NGTINEKATGMLTQK	0.71	
191	BT_160	SGTINEKATGMLTQK	0.70	CagA_17
192	BT_161	TGTINEKATGMLTQK	0.74	
193	BT_162	EKATGMLTQKNPEWL	0.72	
194	BT_163	EKVTGMLTQKNPEWL	0.72	
195	BT_164	LSEYDKIGFNQKNMK	0.74	
196	BT_165	LSAYDKIGFNQKNMK	0.78	
197	BT_166	LSDYDKIGFNQKNMK	0.81	CagA_18
198	BT_167	LSEYDNIGFNQKNMK	0.76	
199	BT_168	LLEYDKIGFNQKNMK	0.73	

【表６】

配列番号	名称	配列	AUC	エピトープ
200	BT_169	LSEYDKIGFSQKNMK	0.74	
201	BT_170	LSEYDKIGFNQKSMK	0.84	
202	BT_171	LSDYDKIGFNQKDMK	0.78	
203	BT_172	KDYSDSFKFSTKLNN	0.73	
204	BT_173	KDYSDSFKFSTKLSN	0.71	
205	BT_174	KDYSDSFKFSTKLND	0.72	
206	BT_175	KDYSDSFKFSTRLNN	0.75	
207	BT_176	KDYSDSFKFSIKLSN	0.72	

【００８３】
実施例６
０．７未満のＲＯＣ　ＡＵＣを用いる診断であっても診断能力を有する可能性がある。これを評価するために、一貫した割合のＣａｇＡ＋個体が抗体応答を有するがＣａｇＡ陰性株を有するか又はヘリコバクター・ピロリ感染を欠く個体は誰もそのような応答を有しないペプチドを特定した。このようにして、真陽性率が１０％超であり偽陽性率が０％である０．７未満のＲＯＣ　ＡＵＣを示す１２３種のペプチドを特定した（表３）。これらのペプチドの各々も、ヘリコバクター・ピロリＣａｇＡ＋感染の診断のために使用することができる。
【００８４】

【表 7 】

配列番号	名称	配列	AUC[1]	FPR[2]	TPR[3]	エピトープ
208	BT_177	NKSNDLINKDALIDV	0.49	0	14	CagA_01
209	BT_178	TTTDIQGLPPESRDL	0.69	0	11	CagA_03
210	BT_179	STTHIQGLPPESRDL	0.66	0	11	
211	BT_180	SFIFDKKQSSDVKEA	0.55	0	11	
212	BT_181	SFVFDKKQSSDLKET	0.54	0	11	
213	BT_182	SFAFDKKQSSDLKET	0.53	0	11	
214	BT_183	ESRDLLDERGNFFKF	0.66	0	14	CagA_04
215	BT_184	EARDLLDERGDFSKF	0.63	0	14	
216	BT_185	EARDLLDERGNFFKF	0.62	0	14	
217	BT_186	LTPEARKLLEEAKKS	0.52	0	14	
218	BT_187	NSQKDEIFALISKEA	0.65	0	11	CagA_05
219	BT_188	NSQKDEIFALINQET	0.65	0	11	
220	BT_189	NSQKNEIFALINKEA	0.64	0	11	
221	BT_190	NSQKDEIFKLINEGA	0.57	0	11	
222	BT_191	NSQKDEILALINKEA	0.52	0	11	
223	BT_192	VNKDLKDFSKSFDEF	0.58	0	14	CagA_06
224	BT_193	INKDLKDFSKSFDDF	0.58	0	14	
225	BT_194	INKNLKDFSKSFDEF	0.58	0	14	
226	BT_195	ISKDLKDFSKSFDEF	0.56	0	14	
227	BT_196	KSFDGFKNGKNKDFS	0.56	0	11	
228	BT_197	KIENLNVALNDFKNG	0.55	0	11	CagA_07
229	BT_198	EWISKIENLNVALND	0.54	0	11	
230	BT_199	EWVSKVENLNAALNE	0.53	0	11	
231	BT_200	EWISKVENLNAALND	0.53	0	11	
232	BT_201	KVENLNAALNEFKNS	0.52	0	11	
233	BT_202	KVENLNAALNEFKSG	0.50	0	11	
234	BT_203	EWISKIENLNAALND	0.49	0	11	
235	BT_204	IINQKITDKVGNLSS	0.69	0	18	CagA_08
236	BT_205	ITDKVDNLNQAVLVA	0.67	0	18	
237	BT_206	KVDNLNQAVSEAKAT	0.67	0	22	
238	BT_207	KVDNLNQAVSEAKLT	0.66	0	14	
239	BT_208	VTDKVDNLNQAVSIA	0.65	0	14	
240	BT_209	ITDKVDNLNQAVSMA	0.64	0	11	
241	BT_210	VTDKVDNLNQEVSVA	0.63	0	11	
242	BT_211	VTDKVDNLNQAVSMA	0.62	0	14	
243	BT_212	ITDKVDNLNQAVSET	0.62	0	11	
244	BT_213	VTDKVDNLNQAVSVA	0.61	0	14	
245	BT_214	ITDKVDNLNQAVSVA	0.61	0	11	
246	BT_215	KVDNLNQAVSIAKET	0.59	0	25	
247	BT_216	KVDNLNQAVSVAKIT	0.59	0	25	
248	BT_217	ITDKVDDLNQAVSVA	0.59	0	11	
249	BT_218	KVDNLNQAVSIAKAT	0.57	0	25	

【表８】

配列番号	名称	配列	AUC[1]	FPR[2]	TPR[3]	エピトープ
250	BT_219	KVDNLSQAVSVAKIA	0.56	0	11	
251	BT_220	KVDDLNQAVSVAKAT	0.56	0	14	
252	BT_221	ITDKVDDLNQAVLVA	0.56	0	11	
253	BT_222	ITNKVDDLNQAVSVA	0.52	0	11	
254	BT_223	KVDNLSSAVSVAKAM	0.52	0	11	
255	BT_224	VTDKVDDLNQAVSVA	0.52	0	11	
256	BT_225	ITDKVDDLNQAVSMA	0.50	0	11	
257	BT_226	TLSKNFSDIKKELNA	0.68	0	22	CagA_09
258	BT_227	TLTKKFSDIKKELNE	0.68	0	18	
259	BT_228	NLTKNFSDIRKELNE	0.67	0	11	
260	BT_229	TLTKNFSDIRKELNE	0.66	0	14	
261	BT_230	NEKFKNFNNNNNGLK	0.55	0	14	
262	BT_231	NSNGLKNSAEPIYAQ	0.62	0	11	CagA_10
263	BT_232	NNNGLKNSTEPIYAK	0.60	0	11	
264	BT_233	TQVAKKVKAKIDRLD	0.67	0	11	CagA_11
265	BT_234	TQVAKKVTKKIDQLN	0.61	0	11	
266	BT_235	RHDKVDDLSKIGRSV	0.69	0	14	CagA_12
267	BT_236	RHDKVDDLSKVGLSR	0.69	0	22	
268	BT_237	KHAKVDDLSKVGRSV	0.68	0	14	
269	BT_238	RHDKVDDLSKVGLSA	0.68	0	18	
270	BT_239	LKRYAKVDDLSKVGL	0.68	0	25	
271	BT_240	RHDKVDDLSKVGRSR	0.66	0	18	
272	BT_241	LKRYAKVDDLSKAGR	0.66	0	22	
273	BT_242	RYAKVDDLSKVGLSR	0.63	0	18	
274	BT_243	KVDDLSKVGLSANHE	0.62	0	14	
275	BT_244	KVDDLSKVGLSREQE	0.60	0	14	
276	BT_245	KVDDLTKVGFSREQE	0.60	0	11	
277	BT_246	KVDDLSKVGLSANPE	0.60	0	14	
278	BT_247	VGQAGFPFKKHAKVE	0.59	0	11	
279	BT_248	GSSPLKRYAKVDDLS	0.56	0	11	
280	BT_249	PEPIYATIDFDDANQ	0.68	0	18	CagA_13
281	BT_250	PEPIYATIDFDEANQ	0.61	0	18	
282	BT_251	AVSEAKAGFFGNLEQ	0.66	0	14	CagA_15
283	BT_252	KAGFFGNLEQTIDKL	0.64	0	18	
284	BT_253	AVSEAKAGFFGNLER	0.64	0	14	
285	BT_254	KAGFFGNLEQTIGNL	0.64	0	18	
286	BT_255	KVGFFGNLEQTIDKL	0.63	0	11	
287	BT_256	AVSEAKVGFFGNLEQ	0.63	0	11	
288	BT_257	KAGFFGNLEQTIDNL	0.63	0	22	
289	BT_258	KAGFFGNLEQTINNL	0.63	0	14	
290	BT_259	KAGYFGNLEQTIDNL	0.63	0	14	
291	BT_260	KAGFFGNLERTIDKL	0.62	0	25	

【表９】

配列番号	名称	配列	AUC[1]	FPR[2]	TPR[3]	エピトープ
292	BT_261	AVSEAKSGFFGNLEQ	0.62	0	14	
293	BT_262	KAGFFGNLEQTMDRL	0.61	0	18	
294	BT_263	KAGYFGNLEQTIDKL	0.61	0	25	
295	BT_264	KAGFFGNLERTIDNL	0.61	0	18	
296	BT_265	AVSEAKAGYFGNLEQ	0.54	0	14	
297	BT_266	KVPDSLSAKLDNYAT	0.62	0	14	
298	BT_267	MNLWAESAKKVPAGL	0.58	0	11	
299	BT_268	VNLWAESAKKVPVSL	0.57	0	14	
300	BT_269	KVPASLLEKLDNYAT	0.56	0	18	CagA_16
301	BT_270	MNLWAESAKKVPASL	0.55	0	11	
302	BT_271	VNLWAENAKKLPASL	0.54	0	11	
303	BT_272	VESAKQVPAGLQAKL	0.48	0	11	
304	BT_273	NGGINEKATGMLTQK	0.69	0	14	
305	BT_274	EKAIGMLTQKNPEWL	0.66	0	11	CagA_17
306	BT_275	EKATGVLTQKNPEWL	0.63	0	11	
307	BT_276	EKATGMLMQKNPEWL	0.58	0	11	
308	BT_277	KDYSDSFKFSTKLNS	0.69	0	37	
309	BT_278	GSVPLSAYDKIGFNQ	0.69	0	18	
310	BT_279	GSVSLSEYDKIGFNQ	0.69	0	22	
311	BT_280	GSTHLSEYDKIGFNQ	0.67	0	18	
312	BT_281	LSEYDNIGFSQKNMK	0.65	0	11	
313	BT_282	GSAHLSEYDKIGFNQ	0.64	0	18	
314	BT_283	GSAPLSDYDKIGFNQ	0.64	0	18	
315	BT_284	DSFKFSTKLNSAIKD	0.64	0	18	
316	BT_285	GSVPLSEYDKIGFNQ	0.64	0	22	
317	BT_286	GSAPLSEYDNIGFSQ	0.63	0	11	
318	BT_287	GSAPLSEYDKIGFNQ	0.62	0	22	
319	BT_288	GSAPLSAYDKIGFNQ	0.62	0	22	CagA_18
320	BT_289	DSFKFSTKLNDAVKD	0.62	0	18	
321	BT_290	DSFKFSTKLNNAVKN	0.61	0	14	
322	BT_291	GSVPLSEYDNIGFNQ	0.61	0	22	
323	BT_292	DSFKFSTKLNNAVKD	0.61	0	14	
324	BT_293	DSFKFSTKLSNAVKN	0.61	0	11	
325	BT_294	DSFKFSTRLNNAVKD	0.60	0	11	
326	BT_295	GSTPLSDYDKIGFNQ	0.60	0	22	
327	BT_296	DSFKFSTELNNAVKD	0.60	0	11	
328	BT_297	GSTPLSEYDKIGFNQ	0.59	0	22	
329	BT_298	DSFKFSTKLSNAVKD	0.57	0	11	
330	BT_299	DSFKFSTKSNNAVKD	0.55	0	14	

[1] ＡＵＣ－受信者動作特性（ＲＯＣ）曲線についての曲線下面積。
[2] ＦＰＲ－試験したすべてのペプチド（ｎ＝１１４４ペプチド）の第９５パーセンタイルに設定したカットオフ値に基づく偽陽性率（％）。
[3] ＴＰＲ－試験したすべてのペプチド（ｎ＝１１４４ペプチド）の第９５パーセンタイルに設定したカットオフ値に基づく真陽性率（％）。

【００８５】

実施例７：ＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染を診断するための非常に重要なアミノ酸配列の特定

高度に診断力があると特定したペプチド内のヘリコバクター・ピロリＣａｇＡのＢ細胞エピトープの詳細なマッピングを実施した。マッピングは、高密度ペプチドアレイを使用して実施した。個々の血清試料（ｎ＝４８）を、選択した各ペプチドの配列変異体への抗体結合について試験した。これは、抗体結合に寄与し、それゆえ診断的応用の中に含めるべく非常に重要であろうと思われる、各ペプチド中のアミノ酸位置を目立たせるために行った。

【００８６】

本発明者らは最も高い診断の潜在能力を有するペプチドを選択し、選択したペプチドの各々について、本発明者らは３００種の異なる配列変異体を作成した。これは、いわゆる完全一残基置換によって行った。これは、各ペプチドの１５のアミノ酸位置の各々について、本発明者らがその位置の配列だけが異なる２０種の異なる配列変異体を作成したということ、つまりその位置において、上記２０種の変異体が２０種の異なる一般的なタンパク質アミノ酸の各１つを有するということを意味する。アミノ酸位置１つにつき２０種の異なる配列変異体があり、上記ペプチドが１５アミノ酸の長さであるので、全部で３００種の異なる配列変異体があった。手順はこれまでに記載されている（Ｈａｎｓｅｎら、ＰＬＯＳ　Ｏｎｅ　２０１３：８（７）：ｅ６８９０２）。この分析で、ペプチド内の所定の残基位置が上記抗体への上記ペプチドの結合にとって重要でないか否か、すなわち未変性の配列の中のそのアミノ酸残基を、結合に影響を及ぼすことなく自由に置換することができるか否かを判定した。

【００８７】

このようにして、選択したペプチドのすべての変異体を、４８の血清試料の各々によって抗体結合について試験した。本発明者らは、どのペプチド変異体がもとのペプチドよりも有意に／実質的に低いＲＯＣ　ＡＵＣスコアを得たかを観察し、この情報に基づいて、本発明者らはＣａｇＡ＋ヘリコバクター・ピロリ感染の識別能力について非常に重要である配列モチーフを特定することができた。

【００８８】

上記ペプチドの非常に重要な一部分が５～６アミノ酸の間にまたがっていること、及びこれらの非常に重要な配列の位置の一部に重複性があるということが明らかになった。特定のエピトープについての非常に重要な配列を表１１に示し、それらのＲＯＣ　ＡＵＣレベルを図３に示す。表１１のペプチドは、ヘリコバクター・ピロリ感染及び胃癌の診断及び処置に、癌の防止も含めて特に有用である。なぜなら、表１１のペプチドは高度に特異的だからである。

【００８９】

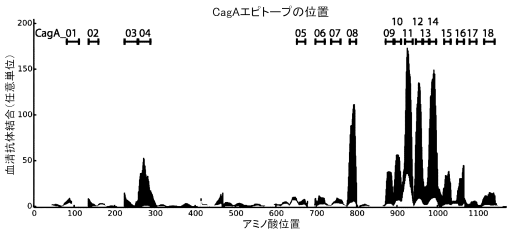
【表１０】

配列番号	名称	配列[1]	AUC[2]		n[3]	エピトープ（１又は複数）
13	BT_300	IINQKVTDKVDNLNQ[4]	0.80	(0.77-0.82)	298	CagA_08
8	BT_301	EPIYA	0.70	(0.66-0.73)	283	CagA_10 _11 _13
9	BT_302	EPIYAK	0.86	(0.84-0.87)	16	CagA_10
10	BT_303	EPIYAQ	0.80	(0.78-0.83)	21	CagA_10 _11
11	BT_304	EPIYT	0.75	(0.73-0.78)	21	CagA_11
12	BT_305	EPIYAT	0.70	(0.66-0.72)	211	CagA_13
1	BT_306	FXLKRHX	0.90	(0.87-0.91)	275	CagA_12 _14
2	BT_307	FXLKKHX	0.85	(0.84-0.87)	34	
3	BT_308	FXLKQHX	0.84	N.A.	1	
4	BT_309	YXLKRHX	0.91	(0.89-0.91)	3	
5	BT_310	IXLKRHX	0.87	N.A.	1	
6	BT_311	FXLRRYX	0.49	N.A.	1	
7	BT_312	FXLRRSX	0.47	(0.44-0.51)	7	

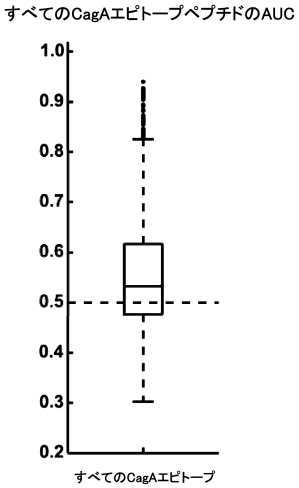
[1] 「Ｘ」は、本明細書に記載されるとおり、いずれか１つのアミノ酸を意味する。
[2] ＡＵＣは中央値として表されており、四分位範囲をかっこ内に示している（Ｎ．Ａ＝適用なし）。
[3] 試験した異なる１５アミノ酸長ペプチド配列の数。
[4] 配列番号１３のＡＵＣデータは配列１３の配列変異体を含む。データは、１５アミノ酸のうちの少なくとも１２と正確にマッチングするすべてのペプチドを含む。

【図面】

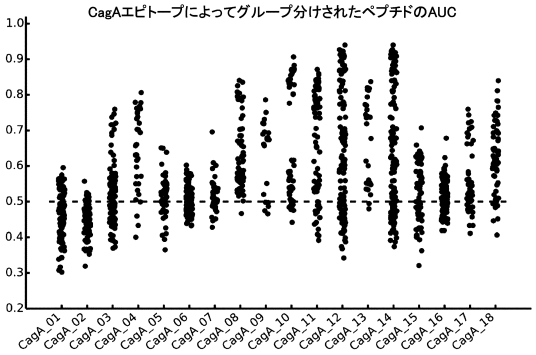
【図１】



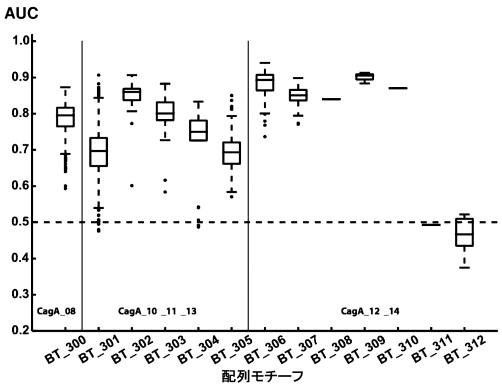
【図２ａ】



【図２ｂ】



【図３】



【配列表】

0007199384000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　ＦＩ
Ｇ０１Ｎ　33/574(2006.01)　　Ｇ０１Ｎ　33/574　　Ａ

(72)発明者　ルンディン ブロル サムエル
スウェーデン国 エスイー－４３１ ４０ メルンダール アクスガタン ３３

審査官　平林 由利子

(56)参考文献　米国特許出願公開第２００５／００１４１３８（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１５／０１５３３５６（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２００１／０４２２７７（ＷＯ，Ａ２）
国際公開第２０１６／１７２７２２（ＷＯ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１６／００３０５１０（ＵＳ，Ａ１）
米国特許第０７１４１２４４（ＵＳ，Ｂ１）
特開２００６－０５５１６８（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－３５０５９１（ＪＰ，Ａ）
特表平１１－５０６９０５（ＪＰ，Ａ）
YASUDA A. et al.，APMIS，2009年，117(12)，p.893-899

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ