

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-536429

(P2018-536429A)

(43) 公表日 平成30年12月13日(2018.12.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31 Z N A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 A	4 B 0 6 5
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 A	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-535813 (P2018-535813)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月15日 (2016. 9. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年5月11日 (2018. 5. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/051896
 (87) 国際公開番号 W02017/053167
 (87) 国際公開日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)
 (31) 優先権主張番号 62/233, 192
 (32) 優先日 平成27年9月25日 (2015. 9. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 518099767
 キアゲン サイエンス リミテッド ラ
 イアビリティ カンパニー
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 74 ジャーマンタウン ジャーマンタウ
 ン ロード 19300
 (71) 出願人 518099778
 バイオペプチドス コーポレイション
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 117
 33 イースト セタウキット ウッドハ
 ル ロード 18

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ライム病を診断するためのおよび治療後のライム病スピロヘータ除去を予測するための組成物および方法

(57) 【要約】

ライム病の異なる段階で発現するボレリアタンパク質に由来するT細胞エピトープ含有領域を含む合成ペプチドと、LDを有すると疑われる対象由来の全血試料をインピトロで接触させること、および、ペプチドによる刺激に反応して産生されるT細胞免疫応答インジケータ（例えば、インターフェロン- γ ）を決定することによってLD特異的活性化T細胞を間接的に検出することを含む、ライム病（LD）を検出、診断および予後予測するための組成物および方法を提供する。また、LD治療を受けているLD患者由来の全血試料を、ライム病の異なる段階で発現するボレリアタンパク質の特定のT細胞エピトープ領域を含むペプチドに暴露させ、そして、T細胞免疫応答インジケータ（例えば、インターフェロン- γ ）が存在しないことから、試料中にボレリア特異的活性化T細胞が含まれていないことを確認する、LD治療を受けているLD患者におけるLDスピロヘータ除去を予測する方法も開示する。

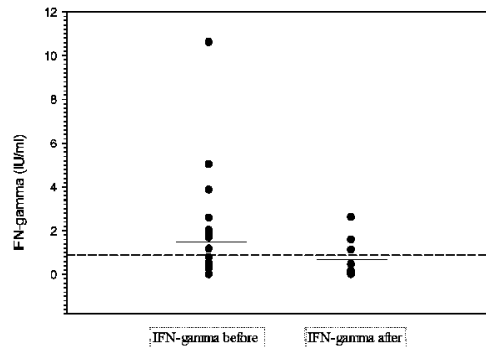


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の組成物および第 2 の組成物から選択されるライム病を診断または予後予測するための組成物であって、ここで：

(I) 第 1 の組成物は、

(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの単離 F l a B ペプチド；

(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 D b p B ペプチド；

(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 9 ~ 3 1 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 1 9 ~ 3 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 p 6 6 ペプチド；および

(d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 3 2 ~ 3 3 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 3 2 ~ 3 3 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つまたは 2 つの単離 O s p C ペプチドを含み、前記組成物は、ライム病に関連するボレリア菌種に感染した対象から得られた全血と接触させた後に、T 細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができ；ならびに、

(I I) 第 2 の組成物は、

(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、5 つの単離 F l a B ペプチド；

(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 D b p B ペプチド；

(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 9 ~ 3 1 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 1 9 ~ 3 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 p 6 6 ペプチド；および

(d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 3 2 ~ 3 3 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 3 2 ~ 3 3 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される 2 つの単離 O s p C ペプチドを含む、

第 1 の組成物および第 2 の組成物から選択されるライム病を診断または予後予測するための組成物。

【請求項 2】

前記組成物が少なくとも、

(a) 各ペプチドを少なくとも約 1 ナノグラムずつ含むが、各ペプチドの量は約 1 0 0 ナノグラムを超えず、

(b) 各ペプチドを少なくとも約 1 0 0、2 0 0、3 0 0、または 4 0 0 ナノグラムずつ含むが、各ペプチドの量は約 5 0 0 ナノグラムを超えず、

10

20

30

40

50

- (c) 各ペプチドを少なくとも約500、600、700、800、または900ナノグラムずつ含むが、各ペプチドの量は約1000ナノグラムを超えず、
- (d) 各ペプチドを少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8または1.9マイクログラムずつ含むが、各ペプチドの量は約2マイクログラムを超えず、または
- (e) 各ペプチドを少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8または9マイクログラムずつ含むが、各ペプチドの量は約10マイクログラムを超えない、
- のうちのいずれか1つである、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

対象のライム病を検出する方法、または対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする方法であって、

(A) 第1のテストインキュベーション混合物を得るために、(i) ライム病であることまたはライム病を有するリスクがあることが知られている対象から第1の時点で得られた第1の生体試料(ここで前記生体試料はT細胞と抗原提示細胞を含んでいる)と、(ii) ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物、をインビトロで接触させること、

(B) T細胞免疫応答インジケータの生成を刺激するために前記ペプチド組成物中に存在するボレリアT細胞エピトープの前記T細胞による特異的認識に十分な条件および時間で前記第1のテストインキュベーション混合物をインキュベートすること；

(C) 前記第1のテストインキュベーション混合物のT細胞免疫応答インジケータの第1のレベルを検出することを含み、

ここで、前記対象におけるボレリア感染の存在は、(C)で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第1のレベルが、前記第1の生体試料にライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物を加えずにインキュベートした第1の対照インキュベーションから得られた第1の対照レベルよりも高いことで示され、

かつ、ライム病を診断するまたは予後予測するための前記ペプチド組成物は、

(a) それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1～5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体から選択される、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの単離FlaBペプチド；

(b) それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6～18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6～18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体から選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離DbpBペプチド；

(c) それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19～31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19～31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体から選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離p66ペプチド；および

(d) それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32～33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32～33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体から選択される、1つまたは2つの単離OspCペプチドを含み、

それによって対象におけるライム病を検出するか、または前記対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする、前記対象のライム病を検出する方法、または前記対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする方法。

【請求項4】

前記第1の時点が、ライム病治療の前記対象への投与前である、請求項3に記載の方法

【請求項 5】

ライム病を診断するまたは予後予測するための前記ペプチド組成物が、

(a) それぞれがボレリア T 細胞エпитープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、5 つの単離 F l a B ペプチド；

(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 D b p B ペプチド；

(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 p 6 6 ペプチド；および

(d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される 2 つの単離 O s p C ペプチド、を含む、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 3 または 4 に記載の方法であって、

(D) 第 2 のテストインキュベーション混合物を得るために、(i) 第 1 の時点よりも遅く、かつ、ライム病の治療を対象に投与した後に対象から得られた第 2 の生体試料（ここでこの生体試料は T 細胞と抗原提示細胞を含んでいる）と、(ii) ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物、をインビトロで接触させること、

(E) T 細胞免疫応答インジケータの生成を刺激するために前記ペプチド組成物中に存在するボレリア T 細胞エピトープの前記 T 細胞による特異的認識に十分な条件および時間で第 2 のテストインキュベーション混合物をインキュベートすること；および

(F) 第 2 のテストインキュベーション混合物の T 細胞免疫応答インジケータの第 2 のレベルを検出することをさらに含み、

ここで、対象におけるボレリア感染の存在は、(F) で検出される T 細胞免疫応答インジケータの第 2 のレベルが、第 2 の生体試料にライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物を加えずにインキュベートした第 2 の対照インキュベーションから得られた第 2 の対照レベルよりも高いことで示され、

かつ、ライム病治療の有効性は、(F) で検出される T 細胞免疫応答インジケータの第 2 のレベルが、(c) で検出される T 細胞免疫応答インジケータの第 1 のレベルよりも低いことで示される、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 7】

ライム病を診断するまたは予後予測するための前記ペプチド組成物が、

(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、5 つの単離 F l a B ペプチド；

(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 D b p B ペプチド；

(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 p 6 6 ペプチド；および

10

20

30

40

50

(d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体から選択される、2 つの単離 O s p C ペプチドを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも 1 種の病原性ボレリア菌種による感染を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記病原性ボレリア菌種が、ヒトに対する病原性をもつ、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ヒトに対する病原性をもつボレリア菌種が、ボレリア・ブルグドルフェリ、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アゼフェリ、ボレリア・ガリニ、ボレリア・パレイシアナ、ボレリア・スピルマニ、ボレリア・ピセッティ、ボレリア・ルシタニアおよびボレリア・パバリエンシスから選択される、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記ライム病の治療が、抗生物質を対象に投与することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗生物質が、テトラサイクリン；オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、もしくはミノサイクリン；ペニシリン；アモキシシリンもしくはペニシリン；セファロsporin；セファクロール、セフペラゾン、セフミノクス、セフトキシム、セフォタン、セフメタゾール、セフォキシチン、セフロキシムアセチル、セフロキシムアセチル、セフチンもしくはセフトリアキソン；マクロライド類；アジスロマイシン、クラリスロマイシンまたはエリスロマイシンから選択される、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記生体試料が、全血、脳脊髄液、または滑液の少なくとも 1 つを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 14】

前記生体試料が、(a) 全血、(b) 全血の細胞画分、(c) 単離された末梢血白血球、または (d) 単離された末梢血単核細胞の少なくとも 1 つを含む、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記 T 細胞免疫応答インジケータが、インターフェロン - ガンマ (I F N -) である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 I F N - が、T 細胞によって放出される可溶性 I F N - である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 T 細胞免疫応答インジケータが、T 細胞の増殖および T 細胞サイトカインの発現のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記 T 細胞サイトカインが、I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 10、I L - 12、I L - 17、T N F -、T N F - および I F N - から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 T 細胞サイトカインの発現が、T 細胞によって放出される可溶性 T 細胞サイトカインとして検出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 T 細胞サイトカインは、I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 10、I L - 12、I L - 17、T N F -、T N F - および I F N - から選択される、請求項 1

50

9に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 T 細胞サイトカインが、結合剤と前記 T 細胞サイトカインの検出可能な特異的結合を決定することによって検出される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記結合剤が、前記 T 細胞サイトカインに特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記少なくとも 1 つの抗体が、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記少なくとも 1 つの抗体が、固相に固定されている、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

ライム病が、少なくとも 1 つの病原性ボレリア菌種による感染を含むものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記病原性ボレリア菌種が、ヒトに対する病原性をもつものである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ヒトに対して病原性をもつボレリア菌種が、ボレリア・ブルグドルフェリ、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アゼフェリ、ボレリア・ガリニ、ボレリア・パレイシアナ、ボレリア・スピルマニ、ボレリア・ピセッティ、ボレリア・ルシタニア及びボレリア・パバリアンシスから選択される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記ライム病の治療が、抗生物質を対象に投与することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記抗生物質が、テトラサイクリン；オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、もしくはミノサイクリン；ペニシリン；アモキシシリンもしくはペニシリン；セファロsporin；セファクロール、セフペラゾン、セフミノクス、セフトキシム、セフォタン、セフメタゾール、セフォキシチン、セフロキシムアキセチル、セフロキシムアセチル、セフチンもしくはセフトリアキソン；マクロライド類；アジスロマイシン、クラリスロマイシンまたはエリスロマイシンから選択される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記生体試料が、全血、脳脊髄液、または滑液の少なくとも 1 つを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記生体試料が、(a) 全血、(b) 全血の細胞画分、(c) 単離された末梢血白血球、または(d) 単離された末梢血単核細胞の少なくとも 1 つを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 T 細胞免疫応答インジケーターが、インターフェロン - ガンマ (I F N -) である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記 I F N - が、T 細胞によって放出される可溶性 I F N - である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 T 細胞免疫応答インジケーターが、T 細胞の増殖および T 細胞サイトカインの発現のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

前記 T 細胞サイトカインが、IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 10、IL - 12、IL - 17、TNF -、TNF - および IFN - から選択される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 T 細胞サイトカインの発現が、前記 T 細胞によって放出される可溶性 T 細胞サイトカインとして検出される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 T 細胞サイトカインが、IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 10、IL - 12、IL - 17、TNF -、TNF - および IFN - から選択される、請求項 36 に記載の方法。

10

【請求項 38】

前記 T 細胞サイトカインが、結合剤と前記 T 細胞サイトカインの検出可能な特異的結合を決定することによって検出される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記結合剤が、前記 T 細胞サイトカインに特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体を含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記少なくとも 1 つの抗体が、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体から選択される、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 41】

前記少なくとも 1 つの抗体が、固相に固定されている、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記第 1 の時点よりも遅く、かつ、ライム病の前記治療を前記対象に投与した後である、互いに異なる複数の第 2 の時点で、工程 (D)、(E)、および (F) を繰り返すことを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 43】

複数の第 2 の時点には、2、3、4、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、44、45、46、47、48、49、または 50 の時点が含まれる、請求項 42 に記載の方法。

30

【請求項 44】

第 1 の核酸組成物および第 2 の核酸組成物から選択される組成物であって、

(I) 第 1 の核酸組成物は、

(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する Fla B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの単離 Fla B ペプチド；

(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する Dbp B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 Dbp B ペプチド；

40

(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p66 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 p66 ペプチド；および

(d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示され

50

るアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つまたは 2 つの単離 O s p C ペプチド；をコードする 1 つまたは複数の単離された核酸分子を含み、

ここで、F l a B、D b p B、p 6 6 および O s p C ペプチドは、ライム病に関連するボレリア種に感染した対象から得られた全血と接触させると、T 細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができ；

(I I) 第 2 の核酸組成物は、

(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、5 つの単離 F l a B ペプチド；

(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 D b p B ペプチド；

(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 p 6 6 ペプチド；および

(d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、2 つの単離 O s p C ペプチド；をコードする 1 つまたは複数の単離された核酸分子を含み、

ここで、F l a B、D b p B、p 6 6 および O s p C ペプチドは、ライム病に関連するボレリア種に感染した対象から得られた全血と接触させると、T 細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができる、第 1 の核酸組成物および第 2 の核酸組成物から選択される組成物。

【請求項 45】

請求項 44 に記載の核酸組成物を含んでいる 1 つ以上の核酸ベクターを含む、ベクター組成物。

【請求項 46】

請求項 45 に記載のベクター組成物を含んでいる、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

配列表に関する記述

この出願に関する配列表は、紙の写しの代わりにテキスト形式で提供され、参照することにより本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は 770025__466WO__SEQUENCE__LISTING.txt である。テキストファイルは 12.3KB で、2016 年 9 月 14 日に作成し、EFS-Web 経由で電子的に提出した。

【技術分野】

【0002】

本開示は、一般に、ライム病を診断し、ライム病治療の有効性を評価するための組成物および方法に関する。より具体的には、複数のボレリアポリペプチド抗原に由来し、ライム病の異なる段階で発現される複数の T 細胞エピトープ含有ペプチドの組み合わせであって、ボレリア特異的 T 細胞応答性に関する高感度な二次インビトロ免疫応答アッセイで使用するための T 細胞エピトープ含有ペプチドの組み合わせを提供する。

10

20

30

40

50

【0003】

関連技術の説明

ライム病は、ボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdorferi*)、ボレリア・アフゼリ (*B. afzelii*)、ボレリア・ガリニ (*B. garinii*)、および他のボレリア菌種を含むボレリア菌種の病原性スピロヘータによって引き起こされるダニ媒介性感染症である。感染性微生物はダニの唾液から咬傷に伝染し、臨床的に定義された病気の3つの段階のうちの最初の「早期局限 (*early localized*)」期は、典型的には、ダニ咬まれてから2週間以内に現れる。早期局限段階は、紅斑移行部位 (*EM*)、すなわちダニの咬傷部位の紅斑性皮膚病変を伴うことが多いが、必ずしもそうではない。病気は、血液および/またはリンパ循環を介して伝染性のボレリア細菌が全身に広がり、さらなる皮膚病変、疲労、筋肉痛、関節痛、神経学的および心臓の症状のうちの1つ以上を伴うことがある、第2の「初期播種 (*early disseminated*)」期に進行する。未治療の場合、この疾患は、関節炎、脳脊髄炎および/または末梢神経障害、ならびに慢性的なライム病を含む潜在的な他の症状を特徴とする「後期 (*late stage*)」のライム病にさらに進行し得る。米国では毎年、約25,000~30,000例のライム病が報告されており、未報告の例も含めると、CDCは、その発生率この10倍にも達すると推定している。この他に、ヨーロッパやアジアでも症例が報告されている (ライトら、2012、*アメリカン・ファミリー・フィジシャン (Am. Fam. Physician)* 85:1086; シャピロ、2014、*ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (N. Engl. J. Med.)* 370:1724)。

10

20

【0004】

ボレリア菌種抗原性タンパク質の発現パターンの変化はライム病の進行を伴い、また、慢性ライム病の原因となる可能性のある免疫回避メカニズムの基礎となると考えられている (例えば、ドレクトラら、2013、*PLoS One* 8(7):e68799; シュミットら、2011、*微生物学の新天地 (Front. Microbiol.)* 2:141; サロら、2011、*米国感染症学会誌 (J. Infect. Dis.)* 204:65; リアンら、2004、*米国感染症学会誌* 72:5759; アベレル、2007、*ドイツ皮膚科学会誌 (J. Dtsch. Dermatol. Ges.)* 5(5):406)。

【0005】

ライム病 (*LD*) の効果的な治療は、ボレリア菌種による早期感染を正確に検出することにかかっている。いくつかの例では、病気がまだ早期局限期にある場合、特徴的な紅斑性移行部 (*EM*) 皮膚病変が存在することで、十分に正確な診断が可能となる (例えば、ナデルマンら、1996、*アメリカン・ジャーナル・オブ・メディシン (Am. J. Med.)* 100:502-508)。しかしながら、相当数の患者が、*EM* 病変を発症しないか、あるいは発疹が検出されないままであるか、または誤認されている。このような例では、抗ボレリア *IgM* および/または *IgG* 抗体応答を検出するための、従来より行われている血清検査が、病気を確認するために最も広く使用される (例えば、ダットワイラーら、2010、*臨床感染症 (Clin. Infect. Dis.)* 50:521-522; ジョンソンら、1996、*米国感染症学会誌* 174:346)。

30

40

【0006】

現在、標準的な治療コース (例えば、抗生物質の処方) の投与後に、*LD* の治療が成功したか否かを正確に予測することができる臨床検査はない。ボレリア感染によって惹起された循環抗体は、感染を排除するための抗生物質治療が成功した後も、何年も持続する可能性がある。したがって、ボレリア特異的抗体試験の有用性は限定的である。例えば、ボレリア菌種スピロヘータは、複数の哺乳類組織に定着し、関節および/または筋肉痛または一般的な倦怠感など、多くの非特異的な臨床的異常を引き起こすことがある。これらの症状は、持続的なボレリア感染によるものではない類似の臨床症状と区別することが難しく、かなりの混乱と医療費の増加を招く可能性がある。従って、*LD* の治療後に、病原性ボレリア菌種のスピロヘータが効果的に排除されたことを臨床的に確認することができる

50

ことは極めて有用であろう。

【0007】

国際公開第2013/116668号には、ボレリア菌種に応答して生成された抗体によって認識されるペプチド抗原が記載されている。しかし、抗ボレリア抗体は、通常、感染後数週間に検出可能なレベルでは産生されないため、LDの早期症例の多くが見逃されている。前述したように、ライム病スピロヘータ感染に反応して産生される抗体のレベルは、ボレリアスピロヘータを排除する抗生物質治療などの治療が成功した後も、感染後数年間上昇したままであり得る。したがって、抗ボレリア抗体の応答を決定することは、病原性のボレリア菌種の診断試験としては、感度も信頼性も低く、ボレリア感染の治療後の予後試験としてはほとんど役に立たない。

10

【0008】

ボレリア感染はまた、T細胞免疫応答を誘発し得る。グリックシュタインら(2003、感染と免疫(Infected Immun.)71:6051)およびダットワイラーら(1988、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン319:1441)は、ボレリア・ブルグドルフェリに暴露されたヒト対象が、病気の早期局所におけるEMを伴う炎症性サイトカインの存在によって明らかな、激しく持続的なT細胞応答を生じること示した。このT細胞応答は、検出可能なレベルで測定できる抗体応答に先行して起こった。例えば、ライム病スピロヘータに反応して活性化されたT細胞は、確かに、インターフェロンを産生した(エケルフェルトら、1999、臨床および実験免疫学(Clin. Exp. Immunol.)115:498;シカンドら、1999、臨床および診断研究免疫学(Clin. Diagnost. Lab. Immunol.)6:445)。活性化されたT細胞は、2つの患者集団、すなわち(i)LDの症状が現れていないが、血中から抗ボレリア抗体が検出可能であった患者、および(ii)ボレリア感染の特徴的な臨床的徴候を示した患者(すなわち、LD症状)、において同程度の発現率を示した(エケルフェルトら、1999)。国際公開第2012/039614号パンフレットでは、固定され、簡単に分画されたボレリア細胞全体と一緒にインキュベートした後のボレリア感染個体から得られた末梢白血球によって誘発された、インビトロにおけるT細胞サイトカインの応答が記載されている。しかしながら国際公開第2012/039614号パンフレットには、ボレリア病原体がT細胞によって認識される可能性のあるボレリア感染の特定の段階(例えば、早期局所、早期播種、後期播種)を特定する開示はなく、そのような応答を誘発することができるボレリア抗原も、T細胞によって認識される任意のボレリア抗原性エピトープの構造も含まれていない。したがって、初期のLDにおけるT細胞免疫応答の有意性および特異性は分かっていない。特に、LDの病因において、T細胞によって認識される特異的なボレリア菌種抗原が分かっていない場合、また、ボレリア特異的T細胞エピトープが知られていない場合に関して、未解明のままである。

20

30

【0009】

LDを早期にかつより高感度で検出することや、LDの投与治療の治療効果をモニタリングする能力などを含む、ライム病の、より良い診断および予後評価の必要性が依然として残っていることが明白である。ここで開示する本発明の態様は、これらのニーズに対処し、他の関連する利点を提供するものである。

40

【発明の概要】

【0010】

本明細書中に開示される本発明の特定の態様によれば、第1の組成物および第2の組成物から選択されるライム病を診断または予後予測するための組成物が提供され、ここで：(I)第1の組成物は、(a)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1~5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体から選択される、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの単離FlaBペプチド；(b)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6~18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6~18に示されるアミノ

50

酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離DbpBペプチド；(c)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19~31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19~31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離p66ペプチド；および(d)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32~33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32~33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1つまたは2つの単離OspCペプチドを含み、この組成物は、ライム病に関連するボレリア菌種に感染した対象から得られた全血と接触させた後に、T細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができ；ならびに、

10

【0011】

(II)第2の組成物は、(a)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1~5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、5つの単離FlaBペプチド；(b)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6~18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6~18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、13の単離DbpBペプチド；(c)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19~31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19~31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、13の単離p66ペプチド；および(d)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32~33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32~33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、2つの単離OspCペプチドを含む。

20

【0012】

特定のさらなる態様では、この組成物は少なくとも、(a)各ペプチドを少なくとも約1ナノグラムずつ含むが、各ペプチドの量は約100ナノグラムを超えず、(b)各ペプチドを少なくとも約100、200、300、または400ナノグラムずつ含むが、各ペプチドの量は約500ナノグラムを超えず、(c)各ペプチドを少なくとも約500、600、700、800、または900ナノグラムずつ含むが、各ペプチドの量は約1000ナノグラムを超えず、(d)各ペプチドを少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8または1.9マイクログラムずつ含むが、各ペプチドの量は約2マイクログラムを超えず、または(e)各ペプチドを少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8または9マイクログラムずつ含むが、各ペプチドの量は約10マイクログラムを超えない、のうちのいずれか1つである。

30

40

【0013】

本発明の別の態様では、対象のライム病を検出する方法、または対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする方法が提供され、この方法は、(A)第1のテストインキュベーション混合物を得るために、(i)ライム病であることまたはライム病を有するリスクがあることが知られている対象から第1の時点で得られた第1の生体試料(ここでこの生体試料はT細胞と抗原提示細胞を含んでいる)と、(ii)ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物、をインビトロで接触させること、(B)T細胞免疫応答インジケータの生成を刺激するために前記ペプチド組成物中に存在するボレリアT細胞エピトープの前記T細胞による特異的認識に十分な条件および時間で第1のテストインキュベーション混合物をインキュベートすること；(C)第1のテストインキュ

50

バージョン混合物の T 細胞免疫応答インジケータの第 1 のレベルを検出することを含み、ここで、対象におけるボレリア感染の存在は、(C) で検出される T 細胞免疫応答インジケータの第 1 のレベルが、第 1 の生体試料にライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物を加えずにインキュベートした第 1 の対照インキュベーションから得られた第 1 の対照レベルよりも高いことで示され、かつ、ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物は、(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの単離 F l a B ペプチド；(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 D b p B ペプチド；(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 p 6 6 ペプチド；および (d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つまたは 2 つの単離 O s p C ペプチドを含み、それによって対象におけるライム病を検出するか、または対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする。

【 0 0 1 4 】

特定のさらなる態様では、第 1 の時点とは、ライム病治療の対象への投与前である。

【 0 0 1 5 】

特定の関連する態様では、ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物は、(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、5 つの単離 F l a B ペプチド；(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 D b p B ペプチド；(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、13 の単離 p 6 6 ペプチド；および (d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、2 つの単離 O s p C ペプチド、を含む。

【 0 0 1 6 】

前述した方法のさらに特定の態様において、本方法は、(D) 第 2 のテストインキュベーション混合物を得るために、(i) 第 1 の時点よりも遅く、かつ、ライム病の治療を対象に投与した後に対象から得られた第 2 の生体試料（ここでこの生体試料は T 細胞と抗原提示細胞を含んでいる）と、(i i) ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物、をインピット口で接触させること、(E) T 細胞免疫応答インジケータの生成を刺激するために前記ペプチド組成物中に存在するボレリア T 細胞エピトープの前記 T 細胞による特異的認識に十分な条件および時間で第 2 のテストインキュベーション混合物

をインキュベートすること；および（F）第2のテストインキュベーション混合物のT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルを検出することをさらに含み、ここで、対象におけるボレリア感染の存在は、（F）で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルが、第2の生体試料にライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物を加えずにインキュベートした第2の対照インキュベーションから得られた第2の対照レベルよりも高いことで示され、かつ、ライム病治療の有効性は、（F）で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルが、（c）で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第1のレベルよりも低いことで示される。

【0017】

なおさらなる特定の態様では、ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物は、（a）それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1～5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、5つの単離FlaBペプチド；（b）それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6～18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6～18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、13の単離DbpBペプチド；（c）それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19～31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19～31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、13の単離p66ペプチド；および（d）それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32～33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32～33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、2つの単離OspCペプチド、を含む。

【0018】

前述した方法いずれかの特定の態様では、ライム病は、少なくとも1種の病原性ボレリア菌種による感染を含み、特定のさらなる態様では、病原性ボレリア菌種は、ヒトに対する病原性をもつ。なおさらなる特定の態様では、ヒトに対する病原性をもつボレリア菌種は、ボレリア・ブルグドルフェリ、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アゼフェリ、ボレリア・ガリニ、ボレリア・バレイシアナ、ボレリア・スピルマニ、ボレリア・ピセッティ、ボレリア・ルシタニアおよびボレリア・ババリエンスから選択される。

【0019】

前述した方法いずれかの特定の態様では、ライム病の治療は、抗生物質を対象に投与することを含む。特定のさらなる態様では、抗生物質は、テトラサイクリン；オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、もしくはミノサイクリン；ペニシリン；アモキシシリンもしくはペニシリン；セファロsporin；セファクロール、セフペラゾン、セフミノクス、セフトキシム、セフトetan、セフメタゾール、セフォキシチン、セフロキシムアキセチル、セフロキシムアセチル、セフチンもしくはセフトリアキソン；マクロライド類；アジスロマイシン、クラリスロマイシンまたはエリスロマイシンから選択される。

【0020】

前述した方法いずれかの特定の態様では、生体試料は、全血、脳脊髄液、または滑液の少なくとも1つを含む。前述した方法いずれかの特定の態様では、生体試料は、（a）全血、（b）全血の細胞画分、（c）単離された末梢血白血球、または（d）単離された末梢血単核細胞の少なくとも1つを含む。

【0021】

前述した方法いずれかの特定の態様においてT細胞免疫応答インジケータは、インターフェロン-ガンマ（IFN- γ ）である。特定のさらなる態様においてIFN- γ は、T細胞によって放出される可溶性IFN- γ である。前述した方法いずれかの特定の態様

10

20

30

40

50

においてT細胞免疫応答インジケータは、T細胞の増殖およびT細胞サイトカインの発現のうち少なくとも1つを含む。特定のさらなる態様では、T細胞サイトカインは、IL-1、IL-1、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17、TNF-、TNF- およびIFN- から選択される。特定の態様では、T細胞サイトカインの発現は、T細胞によって放出される可溶性T細胞サイトカインとして検出される。特定のさらなる態様では、T細胞サイトカインは、IL-1、IL-1、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17、TNF-、TNF- およびIFN- から選択される。特定の態様では、T細胞サイトカインは、結合剤とT細胞サイトカインの検出可能な特異的結合を決定することによって検出される。特定のさらなる態様では、結合剤は、T細胞サイトカインに特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む。特定のさらなる態様において、少なくとも1つの抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体から選択される。特定の態様において、少なくとも1つの抗体は、固相に固定される。

10

【0022】

前述した方法いずれかの特定の態様では、ライム病は、少なくとも1つの病原性ボレリア菌種による感染を含む。特定の態様では、病原性ボレリア菌種はヒトに対する病原性をもつ。特定のさらなる態様において、ヒトに対して病原性をもつボレリア菌種は、ボレリア・ブルグドルフェリ、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アゼフェリ、ボレリア・ガリニ、ボレリア・パレイシアナ、ボレリア・スピルマニ、ボレリア・ピセッティ、ボレリア・ルシタニア及びボレリア・ババリアンシスから選択される。

20

【0023】

前述した方法（例えば、第2の生体試料に関する工程（D）～（F）を含む方法）の特定のさらなる態様では、ライム病の治療は、抗生物質を対象に投与することを含む。特定のさらなる態様では、抗生物質は、テトラサイクリン；オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、もしくはミノサイクリン；ペニシリン；アモキシシリンもしくはペニシリン；セファロsporin；セファクロール、セフペラゾン、セフミノクス、セフトキシム、セフォタン、セフメタゾール、セフォキシチン、セフロキシムアセチル、セフロキシムアセチル、セフチンもしくはセフトリアキソン；マクロライド類；アジスロマイシン、クラリスロマイシンまたはエリスロマイシンから選択される。特定の態様では、生体試料は、全血、脳脊髄液、または滑液の少なくとも1つを含む。特定の態様では、生体試料は、（a）全血、（b）全血の細胞画分、（c）単離された末梢血白血球、または（d）単離された末梢血単核細胞の少なくとも1つを含む。特定の態様では、T細胞免疫応答インジケータは、インターフェロン-ガンマ（IFN-）であり、特定のさらなる態様においては、IFN- は、T細胞によって放出される可溶性IFN- である。特定の態様では、T細胞免疫応答インジケータは、T細胞の増殖およびT細胞サイトカインの発現のうち少なくとも1つを含み、特定のさらなる態様では、T細胞サイトカインは、IL-1、IL-1、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17、TNF-、TNF- およびIFN- から選択される。特定の態様では、T細胞サイトカインの発現は、T細胞によって放出される可溶性T細胞サイトカインとして検出される。特定の態様では、T細胞サイトカインは、IL-1、IL-1、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17、TNF-、TNF- およびIFN- から選択される。特定のさらなる態様では、T細胞サイトカインは、結合剤とT細胞サイトカインの検出可能な特異的結合を決定することによって検出される。特定のさらなる態様では、結合剤は、T細胞サイトカインに特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む。特定のさらなる態様において、少なくとも1つの抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体から選択される。特定のさらなる態様において、少なくとも1つの抗体は、固相に固定される。特定のさらなる態様では、この方法は、第1の時点よりも遅く、かつ、ライム病の治療を対象に投与した後である、互いに異なる複数の第2の時点で、工程（D）、（E）、および（F）を繰り返すことを含む。特定のさらなる態様において、複数の第2の時点には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、

30

40

50

28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50の時点が含まれる。

【0024】

別の態様に目を向けると、第1の核酸組成物および第2の核酸組成物から選択される組成物が提供され、(I)第1の核酸組成物は、(a)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1~5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの単離FlaBペプチド；(b)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6~18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6~18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離DbpBペプチド；(c)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19~31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19~31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離p66ペプチド；および(d)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32~33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32~33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1つまたは2つの単離OspCペプチド；をコードする1つまたは複数の単離された核酸分子を含み、ここで、FlaB、DbpB、p66およびOspCペプチドは、ライム病に関連するボレリア種に感染した対象から得られた全血と接触させると、T細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができ；および、

10

20

【0025】

(II)第2の核酸組成物は、(a)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1~5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、5つの単離FlaBペプチド；(b)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6~18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6~18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、13の単離DbpBペプチド；(c)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19~31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19~31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、13の単離p66ペプチド；および(d)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32~33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32~33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、2つの単離OspCペプチド；をコードする1つまたは複数の単離された核酸分子を含み、ここで、FlaB、DbpB、p66およびOspCペプチドは、ライム病に関連するボレリア種に感染した対象から得られた全血と接触させると、T細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができる。別の態様では、上記の第1の核酸組成物および/または上記の第2の核酸組成物を含む1つ以上の核酸ベクターを含むベクター組成物が提供される。別の態様では、上記のベクター組成物を含む宿主細胞が提供される。

30

40

【0026】

本発明のこれらおよび他の局面および態様は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによって明らかになるであろう。本明細書で参照されている、および/または出願データシートに記載されている米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許文献の全ては、あたかもそれぞれが個別に参照により組み

50

込まれているかのように、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明の局面および態様は、本発明のなおさらなる態様を提供するために、様々な特許、出願および刊行物の概念を使用するよう、必要に応じて変更することができる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、治療の前および治療後約60日目に採取した血液試料中のペプチドプール（配列番号1～33）によって二次インビトロT細胞が活性化された後のIFN- γ の検出を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

ここで開示する本発明の態様は、驚くほど好感度なライム病（LD）診断および予後予測を可能にする、定義されたペプチドの天然に存在しない組み合わせを含む人工組成物に関する。したがって、本明細書に記載されるように、現在開示されている病原性ボレリア菌種に由来する、フラジェリン（FlaB）[配列番号1-5]、デコリン結合タンパク質（DbpB）[配列番号6-18]、共通抗原（p66）[配列番号19-31]、および細胞表面タンパク質C（OspC）[配列番号32-33]のペプチド領域、またはその変異体ペプチドそれぞれのうちの1つ以上のペプチドを含むペプチドの組み合わせを含む組成物を提供する。本明細書において初めて開示されることであるが、各ペプチドは、ボレリア菌種特異的T細胞エピトープを含む。また、対象におけるライム病を診断する方法、および対照の治療後に、病原性ボレリア菌種の排除をモニタリングするための方法など、関連する方法も提供する。

【0029】

FlaB、DbpB、p66、およびOspCが、ライム病の進行において異なる段階（通常、早期限局期、早期播種期および後期播種期と呼ばれる）で発現することが知られていることを考慮すると、本記載のペプチドの組み合わせは自然に生じることはなく、そのため、感染した宿主の免疫系がそのような組み合わせに自然に曝されることはない。例えば、OspCは、感染初期の早期限局期にボレリア菌種細菌によって発現され、DbpBおよびp66は、ボレリア感染の播種後に発現され、FlaBは、後期播種期および早期限局期に発現される。本開示のペプチド混合物はまた、抗原提示細胞によってインビトロで提示され、ボレリア菌種によって天然に加工される抗原断片とは異なる人工ペプチドを含有してもよい。さらに、現在開示されているFlaB、DbpB、p66、およびOspCペプチドはすべて、天然においては、ある1個の病原性ボレリア菌種にだけ見出されるものではなく、したがって1人のライム病患者の免疫系だけが直面するものとは考えられない。したがって、本発明の態様は、予期せず、ライム病を有するかまたは有すると疑われる広範囲の対象におけるライム病の早期検出を可能にする。またこの検出は、対象由来のT細胞が本組成物に対して引き起こす二次インビトロ応答を検出することによって達成することができる。

【0030】

以下に記載するように、例えば、LD対象由来のT細胞を含む全試料は、たとえある種の試料のT細胞がFlaB、DbpB、p66およびOspCの4つすべてのペプチドに

応答しない場合でも、本明細書に記載のFlaB、DbpB、p66、およびOspCボレリアT細胞エピトープ含有ポリペプチドのうち少なくとも1つ（表1および2）から選択される少なくとも1つのペプチドに反応した。さらに、LD対象由来のT細胞を含む全試料は、FlaB、DbpB、p66およびOspCの4種すべてから選択される少なくとも1つのペプチドを含むペプチド混合物に

応答した。したがって、非限定的な理論によれば、本態様は、対象が感染している可能性のある病原菌が特定のボレリア菌種であるかに関わらず、また、T細胞が得られたときの疾患進行の段階（早期限局、早期播種、または後期播種）にかかわらず、試料中のボレリア菌種特異的T細胞を迅速かつ高感度

に検出することができる。本態様はさらに、これまでにはなかった、ライム病の全ての期に存在する代表的なエピトープを含むボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドの組み合わせを

10

20

30

40

50

提供することによって、その対象がLDに罹っているかどうか分からない例においてさえも、試料中のボレリア特異的T細胞を検出することを可能にする。本開示の態様は、病原性をもつ種々のボレリア菌種のうちのいずれかによって生じる可能性のあるライム病の検出に有用であり、種々のボレリア菌種としては、ヒトに対しても病原性を有する、ボレリア・ブルグドルフェリ、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アゼフェリ、ボレリア・ガリニ、ボレリア・パレイシアナ、ボレリア・スピルマニ、ボレリア・ピセッティ、ボレリア・ルシタニアおよびボレリア・ババリエンシスなどが挙げられる（ライトら、2012、アメリカン・ファミリー・フィジシャン85：1086；シャピロ、2014、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン370：1724；シュツェルら、2012、微生物学会誌（J. Bacteriol.）194（2）：545を参照のこと）。

10

【0031】

本明細書に記載されているように、FlaB、DbpB、p66、およびOspC（例えば、表2に記載の配列番号1～33）それぞれに由来する、開示のボレリア菌種T細胞エピトープ含有ペプチドのうち少なくとも1つの組み合わせを含有している本発明の組成物は、個々の構成ペプチドいずれかの特徴、または、付随して発現されるペプチドの任意のサブセット（本明細書で提供するFlaB [配列番号1～5]、DbpB [配列番号6～18]、p66 [配列番号6～18]およびOspC [配列番号32～33]ペプチドの少なくとも1つを含まない）の特徴とは大きく異なる特徴を有する。本発明の組成物は驚くことに、個々の構成ペプチド（またはFlaB、DbpB、p66、もしくはOspCペプチドの少なくとも1つを欠く不完全なサブセット）が誘発する応答よりも、LD罹患対象（早期LDを含む）に由来するT細胞によるより強力な二次インビトロ免疫応答を誘発し、これにより、LDの早期検出を含む検出のための前例のない感度を提供する。したがって、単に本明細書に記載の個々の構成ペプチドのいずれか（または不随して発現されるボレリア菌種ポリペプチドに由来するわずかなペプチドだけを含むがFlaB、DbpB、p66、もしくはOspCペプチドの少なくとも1つを欠く、ペプチドの不完全なセット）に対する二次インビトロT細胞応答をアッセイするだけで、LDの早期検出が可能となり、本態様は、ボレリア菌種の天然に生じるサブコンビネーションのいずれかを用いたより有用な方法を提供する。

20

【0032】

したがって本開示の組成物は、天然に存在しない組み合わせでボレリア特異的T細胞エピトープを含む、ボレリア菌種のFlaB、DbpB、p66、およびOspCペプチドまたはその変異体を含む組成物であり、特定の態様において本開示の組成物は、本明細書に記載の利点を達成するために（およびさらに非限定的な理論により）、ボレリア菌種のFlaB、DbpB、p66、およびOspCペプチドまたはその変異体を、天然には存在しない量比で含む。

30

【0033】

したがって、本明細書では、ライム病スピロヘータタンパク質それぞれに含まれる特定の領域に曝されたことで活性化されたT細胞によって産生された免疫応答インジケータ（例えば、インターフェロン- γ ）を検出する試験を提供することにより、LDを有するかまたは有すると疑われる対象におけるライム病（LD）の存在を確認するための、これまでに知られているいかなる方法とも異なる方法を開示する。本明細書では、ボレリア菌種のタンパク質抗原であるFlaB（ジェンバンク受入番号ACI49679.1）、DbpB（ジェンバンク受入番号AAC70029.1）、p66（ジェンバンク受入番号AAC66949.1）、およびOspC（ジェンバンク受入番号ABQ42983.1）それぞれに含まれる特定のT細胞反応性エピトープについて説明し、また、非限定的な理論によれば、特定のT細胞反応性エピトープは、T細胞の直線状抗原性ペプチドエピトープによる認識の結果、本発明の組成物および方法において使用できると考えられる。

40

【0034】

この戦略に基づくLD試験は、少なくとも2つの重要な利点をもたらすと考えられてい

50

る。第1に、活性化されたT細胞は抗体産生性B細胞よりも急速に増殖するので、この試験は他の抗体検出試験と比較して、病原性ボレリア感染の初期においても非常に高感度な試験となり得る。

【0035】

第2に、ライム病スピロヘータに応答して産生される抗体のレベルは、通常、治療が成功したか否かに関わらず、数ヶ月から数年の間上昇したままであるが、T細胞の調節は通常、誘発性刺激（例えば感染病原体）を除去した後のT細胞の活性化レベルの緩和として顕れる。したがって、本開示の予後予測法は、LDの一連の治療経過によって病原性ボレリア感染が軽減されたか（例えば、適切な対照と比較して統計的に有意な様式で減少した）または除去されたかに関する優れた評価を提供し得る。このような利点は、T細胞が通常、ボレリア感染の解消後は短期間のみ活性化されたままであるために生じると考えられる。そのため、本明細書に記載の組成物との二次的なインビトロ負荷に応答して、LD治療後のLD患者から得られた試料中に存在するT細胞によって、高まったT細胞免疫応答インジケータ（例えば、活性化T細胞によるインターフェロンの放出）のレベルを検出できないこともまた、治療が成功したことを正確に予測するものとなり得る。

10

【0036】

本明細書に記載されるように、ペプチド混合物に含まれる、臨床的に重要な各ボレリア菌種（例えば、ボレリア・ガリニ、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・ブルグドルフェリB31）のタンパク質に基づく特定のペプチドを、二次インビトロ免疫応答において、それらがLD患者から得られた活性化T細胞によってインターフェロン- γ 産生を誘導する能力（T細胞免疫応答インジケータの例）に関して評価した。コンセプトの証明として、ボレリア菌種特異的T細胞エピトープ含有ペプチドからなるこのようなペプチド混合物が、ライム病特異的活性型T細胞によってインターフェロン- γ を誘導する能力を、ボレリア・ブルグドルフェリ感染初期の患者から得た血液を使って特に評価した。また、抗生物質治療の直前にLD患者から採取したT細胞によって産生されたインターフェロン- γ のレベルを、抗生物質治療が効果的だったLD患者の治療後およそ60日目に採取したT細胞によって産生されたインターフェロン- γ のレベルと比較した。

20

【0037】

ボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド。

特定の態様において本開示は、第1の組成物および第2の組成物から選択されるライム病を診断または予後予測するための組成物が提供され、ここで：

30

(I) 第1の組成物は、(a)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列を有するFlaBペプチド、または配列番号1~5に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの単離FlaBペプチド；(b)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号6~18に示されるアミノ酸配列を有するDbpBペプチド、または配列番号6~18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離DbpBペプチド；(c)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号19~31に示されるアミノ酸配列を有するp66ペプチド、または配列番号19~31に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13の単離p66ペプチド；および(d)それぞれがボレリアT細胞エピトープを含み、かつ、配列番号32~33に示されるアミノ酸配列を有するOspCペプチド、または配列番号32~33に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するその1つ以上の変異体からから選択される、1つまたは2つの単離OspCペプチドを含み、この組成物は、ライム病に関連するボレリア菌種に感染した対象から得られた全血と接触させた後に、T細胞による二次インビトロ免疫応答を誘発することができ；ならびに、

40

50

【 0 0 3 8 】

(I I) 第 2 の 組 成 物 は、 (a) そ れ ぞ れ が ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ を 含 み、 か つ、 配 列 番 号 1 ~ 5 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 を 有 す る F l a B ペ プ チ ド、 ま た は 配 列 番 号 1 ~ 5 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 な く と も 8 0 % の ア ミ ノ 酸 配 列 同 一 性 を 有 す る そ の 1 つ 以 上 の 変 異 体 か ら 選 択 さ れ る、 5 つ の 単 離 F l a B ペ プ チ ド； (b) そ れ ぞ れ が ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ を 含 み、 か つ、 配 列 番 号 6 ~ 1 8 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 を 有 す る D b p B ペ プ チ ド、 ま た は 配 列 番 号 6 ~ 1 8 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 な く と も 8 0 % の ア ミ ノ 酸 配 列 同 一 性 を 有 す る そ の 1 つ 以 上 の 変 異 体 か ら 選 択 さ れ る、 1 3 の 単 離 D b p B ペ プ チ ド； (c) そ れ ぞ れ が ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ を 含 み、 か つ、 配 列 番 号 1 9 ~ 3 1 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 を 有 す る p 6 6 ペ プ チ ド、 ま た は 配 列 番 号 1 9 ~ 3 1 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 な く と も 8 0 % の ア ミ ノ 酸 配 列 同 一 性 を 有 す る そ の 1 つ 以 上 の 変 異 体 か ら 選 択 さ れ る、 1 3 の 単 離 p 6 6 ペ プ チ ド； お よ び (d) そ れ ぞ れ が ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ を 含 み、 か つ、 配 列 番 号 3 2 ~ 3 3 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 を 有 す る O s p C ペ プ チ ド、 ま た は 配 列 番 号 3 2 ~ 3 3 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 な く と も 8 0 % の ア ミ ノ 酸 配 列 同 一 性 を 有 す る そ の 1 つ 以 上 の 変 異 体 か ら 選 択 さ れ る、 2 つ の 単 離 O s p C ペ プ チ ド を 含 む。

10

【 0 0 3 9 】

本 明 細 書 で 想 定 さ れ る 特 定 の 態 様 に お い て 使 用 さ れ る ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ を 含 む ボ レ リ ア 菌 種 の F l a B、 D b p B、 p 6 6、 ま た は O s p C ペ プ チ ド は、 F l a B ペ プ チ ド に 関 し て は、 配 列 番 号 1 ~ 5 に 記 載 の ア ミ ノ 酸 配 列 の う ち の い ず れ か 1 つ、 D b p B ペ プ チ ド に 関 し て は 配 列 番 号 6 ~ 1 8 の い ず れ か 1 つ の、 p 6 6 ペ プ チ ド に 関 し て は 配 列 番 号 1 9 ~ 3 1 の い ず れ か 1 つ、 お よ び O s p C ペ プ チ ド に 関 し て は 配 列 番 号 3 2 ~ 3 3 の い ず れ か 1 つ を 含 む 場 合 が あり、 特 定 の 他 の 態 様 は、 配 列 番 号 1 ~ 3 3 の ペ プ チ ド の う ち の 少 な く と も 1 つ と、 少 な く と も 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 % ま た は 9 9 % 相 同 で、 か つ、 少 な く と も 1 種 の 病 原 性 ボ レ リ ア 菌 種 応 答 性 の T 細 胞 に よ っ て 特 異 的 に 認 識 さ れ る ア ミ ノ 酸 配 列 を 有 す る ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ 含 有 ペ プ チ ド 変 異 体 を 含 む 場 合 が あり、 こ こ で、 少 な く と も 1 種 の 病 原 性 ボ レ リ ア 菌 種 は ヒ ト に 対 す る 病 原 性 を 有 す る も の で あり、 こ の よ う な ボ レ リ ア 菌 種 に は、 こ れ ら に は 限 定 さ れ ない が、 ボ レ リ ア ・ ブ ル グ ド ル フ ェ リ、 狭 義 の ボ レ リ ア ・ ブ ル グ ド ル フ ェ リ、 ボ レ リ ア ・ ア ゼ フ ェ リ、 ボ レ リ ア ・ ガ リ ニ、 ボ レ リ ア ・ バ レ イ シ ア ナ、 ボ レ リ ア ・ ス ピ ル マ ニ、 ボ レ リ ア ・ ビ セ ッ テ ィ、 ボ レ リ ア ・ ル シ タ ニ ア お よ び ボ レ リ ア ・ バ バ リ エ ン シ ス が 含 ま れ 得 る。

20

30

【 0 0 4 0 】

配 列 番 号 1 ~ 3 3 の ボ レ リ ア T 細 胞 エ ピ ト ー プ 含 有 ペ プ チ ド を 表 1 に 示 す。

【表 1】

表 1. ボレリア T 細胞エピトープ含有ペプチド

FLAB、DBPB、P66 および OSPC タンパク質内のボレリア菌種に特異的な領域

抗原	ペプチドの名称/ (アミノ酸位置)	配列	配列番号
Fla B	FlaB (51-75)	NVRTAEELGMQPAKINTPASLSGSQ	1
	FlaB (66-85)	NTPASLSGSQASWTLRVHVG	2
	FlaB (71-90)	LSGSQASWTLRVHVGANQDE	3
	FlaB (88-107)	QDEAIAVNIYAANVANLFSG	4
	FlaB (156-174)	SLAKIENAIMISDQRANL	5
DbpB	DbpB (5-20)	SIVMVLFFDLLVACSIGLVE	6
	DbpB (5-25)	LFFDLLVACSIGLVERTNAA	7
	DbpB (16-40)	IGLVERTNAALESSSKDLKNKILKI	8
	DbpB (31-55)	KDLKNKILKIKKEATGKGVLFEAFT	9
	DbpB (46-70)	GKGVLFEAFTGLKTGSKVTSGGLAL	10
	DbpB (61-85)	SKVTSGGLALREAKVQAI VETGKFL	11
	DbpB (76-100)	QAI VETGKFLKII EEEAL K L K E T G N	12
	DbpB (91-115)	EAL K L K E T G N S G Q F L A M F D L M L E V V	13
	DbpB (106-130)	A M F D L M L E V V E S L E D V G I I G L K A R V	14
	DbpB (121-145)	V G I I G L K A R V L E E S K N N P I N T A E R L	15
	DbpB (136-160)	N N P I N T A E R L L A A K A Q I E N Q L K V V K	16
	DbpB (151-175)	Q I E N Q L K V V K E K Q N I E N G G E K K N N K	17
	DbpB (156-180)	L K V V K E K Q N I E N G G E K K N N K S K K K K	18

10

20

30

抗原	ペプチドの名称/ (アミノ酸位置)	配列	配列番号
p66	p66 (251-275)	FGLSGAYGNETFNNSSITYSLKDKS	19
	p66 (266-290)	SITYSLKDKSVVGNLDSPTLSNSA	20
	p66 (281-305)	LLSPTLSNSAILASFGAKYKLGKTK	21
	p66 (296-315)	GAKYKLGKTKINDKNTYLIL	22
	p66 (301-320)	LGLTKINDKNTYLILQMGTD	23
	p66 (311-330)	TYLILQMGTDFGIDPFASDF	24
	p66 (316-335)	QMGTDFGIDPFASDFSIFGH	25
	p66 (326-350)	FASDFSIFGHISKAANFKKETPSDP	26
	p66 (341-365)	NFKKETPSDPNKKAEIFDPNGNALN	27
	p66 (356-380)	IFDPNGNALNFSKNTLGIASFSTGA	28
	p66 (371-390)	ELGIASFSTGASIGFAWNKDT	29
	p66 (376-400)	FSTGASIGFAWNKDTGEKES	30
	p66 (376-395)	FSTGASIGFAWNKDTGEKESWAIKG	31
OspC	OspC (171-185)	KEMLANSVKELTSPi	32
	OspC (55-75)	ATKAIGKKIQNGGLAVEAGH	33

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

配列番号 1 ~ 33 に示したペプチドいずれかのようなボレリア T 細胞エピトープ含有ペプチドのボレリア T 細胞エピトープ含有ペプチド変異体は、配列番号 1 ~ 33 に示される天然の（例えば、野生型、または優性または天然に存在する対立遺伝子型の）ボレリア T 細胞エピトープ含有ペプチド配列に、1 つまたは複数のアミノ酸置換、付加、欠失および/または置換を含み得る。変異体は、天然のボレリア菌種の T 細胞エピトープ含有ポリペプチド配列領域中の対応する部分、例えば、本明細書の表 2 で、ボレリアポリペプチド抗原であるボレリア・ブルグドルフェリ Fla B（ジェンバンク受入番号 ACI 49679.1）、ボレリア・ブルグドルフェリ Dbp B（ジェンバンク受入番号 AAC 70029.1）、ボレリア・ブルグドルフェリ p66（ジェンバンク受入番号 AAC 66949.1）、およびボレリア・ブルグドルフェリ Osp C（ジェンバンク受入番号 ABQ 42983.1）に由来する T 細胞エピトープを含むことを最初に示した領域のアミノ酸配列と、好ましくは少なくとも約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88% または 89%、より好ましくは少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を示す。パーセント同一性は、ペプチド変異体の配列を完全長ポリペプチドの対応する部分と比較することによって容易に決定することができる。対応する部分は、確立された方法に従って、例えば、配列同一性つまり配列相同性を示す配列領域を整列させることによって、容易に同定することができる。配列に挿入または欠失もしくは保存的置換、または短いミスマッチ領域などがある場合は、必要に応じて、短い配列ギャップが生じる可能性がある。配列比較のための技術には、Align または BLAST アルゴリズム（アルチュル、分子生物学会誌（J. Mol. Biol.）219: 555 - 565、1991；ヘニコフおよびヘニコフ、米国科学アカデミー紀要、89: 10915 - 10919、1992）など、当業者に周知のコンピューターアルゴリズムがあり、これは NCBI ウェブサイト（インターネット上での URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST> を参照のこと）で利用可能である。デフォルトまたはカスタム

パラメータを使用できる。

【0042】

さらに、当該技術分野では、当業者が特定のポリペプチドの機能的変異体を確認するために、タンパク質またはペプチドの三次元構造を予測することを可能にするコンピュータアルゴリズムも利用可能である。例えば、3次元構造の全てまたは一部が、1つ以上の修飾、置換、付加、欠失および/または挿入によって実質的に改変されていない変異体を同定することができる。(例えば、シーメイヤーら、2014バイオインフォマティクス(Bioinformatics)30:3128;ラーマンら、2010サイエンスエクスプレス(ScienceExpress)2010年2月4号10.1126/サイエンス.1183649;グリベンコら、2009米国科学アカデミー紀要106:2601;ブラッドレイら、サイエンス309:1868-1871(2005);シュエラー-ファーマンら、サイエンス310:638(2005);ディエツら、米国科学アカデミー紀要103:1244(2006);ドッドソンら、ネイチャー450:176(2007);Qianら、ネイチャー450:259(2007);ベイカー, 2014生化学学会活動報告(Biochem.Soc.Trans.)42:225;コレイアラ、2014ネイチャー507:201;キングら、2014米国科学アカデミー紀要111:8577;ロシュら、2012プロスワン7(5):e38219;チャンら、2013酵素学における手法(Meths.Enzymol.)523:21;クーリーら、2014生命工学の最新知見(Trends Biotechnol.)32:99;オメアラら、2015化学理論と計算学雑誌(J.Chem.TheoryComput.)11:609;パクラ、2015ストラクチャー(Structure)23:1123;ペイルら、2015タンパク質の科学(Protein Sci.)doi:10.1002/pro.2748電子出版PMID26174163;パクラ、2015タンパク質(Proteins)doi:10.1002/prot.24862電子出版PMID26205421;リンら、2015米国科学アカデミー紀要pii:201509508電子出版PMID26396255を参照のこと)。このようにして当業者は、特定のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド変異体またはその機能的断片が、少なくとも1種の病原性ボレリア種反応性のT細胞によって特異的に認識され得るのに十分なエピトープ構造を保持するかどうかを容易に決定することができる。

【0043】

ボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドは、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13または14つの連続したアミノ酸のペプチドであってよく、特定の態様では、通常、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55または50以下のアミノ酸長を有する。特定の好ましい態様では、ボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドの長さは、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、44、45、46、47、48、49、または50個の連続したアミノ酸となる場合がある。

【0044】

T細胞エピトープとは、通常は、エピトープをT細胞レセプターに提示する適切な主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスI分子またはクラスII分子に関する状況で、抗原のT細胞受容体(「T細胞レセプター」)によって特異的に認識され得る抗原の構造領域を指すと理解される。約8~13アミノ酸長のT細胞エピトープ含有ペプチドは、典型的には、MHCクラスI分子によってCD8 T細胞受容体に提示され;約15~25アミノ酸長さのT細胞エピトープ含有ペプチドは、典型的には、MHCクラスII分子によってCD4 T細胞受容体に提示される。T細胞レセプターの特異性は絶対的ではない代りに無差別的であるとみなされる。すなわち所与のT細胞レセプターは、特定のT細胞エピトープの構造と、密接に関連した一定範囲のエピトープ構造を特異的に認識することができる。T細胞によって適切に提示されたT細胞エピトープの特異的認識は、本明細書に記載されるようなT細胞免疫応答インジケーター(例えば、IFN- の放出などの、T細胞

10

20

30

40

50

胞によるサイトカイン放出)の刺激を生じることによって検出可能になる。したがって、ボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドとは、インビボでT細胞が予備刺激されているボレリア菌種の抗原とは同一でない場合も含めて、二次インビトロ免疫応答において、ボレリア菌種抗原を認識するように予備刺激された(例えば、活性化された)T細胞を刺激することができるペプチド抗原を指し得る。

【0045】

本明細書で提供されるボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドおよびその変異体である機能的断片の設計、産生および試験のための方法論は、当該技術分野で知られている既存の方法を少し改変することで、例えば、文献において詳細に説明されているウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および組換えDNA技術を利用することで、全て入手することができる。例えば、サンプルックら、分子クローニング(Molecular Cloning):実験の手引き(A Laboratory Manual)第二版;マニアティスら、分子クローニング(Molecular Cloning):実験の手引き(A Laboratory Manual)(1982);DNAクローニング(DNA Cloning):実践的なアプローチ(A Practical Approach)IおよびII巻(D.グローバー編);オリゴヌクレオチドの合成(Oligonucleotide Synthesis)(N.ガイト編、1984);核酸ハイブリダイゼーション(Nucleic Acid Hybridization)(B.ヘイムズおよびS.ヒギンズ編1985);転写と翻訳(Transcription and Translation)(B.ヘイムズおよびS.ヒギンズ編、1984);動物細胞の培養(Animal Cell Culture)(R.フレッシュニー編、1986);パーバル、分子クローニングの実践的ガイド(A Practical Guide to Molecular Cloning)(1984)を参照のこと。

10

20

【0046】

「ポリペプチド」、「タンパク質」および「ペプチド」という用語は、本明細書においては互換的に使用され、任意の特定の長さ限定されないアミノ酸のポリマーを意味する。この用語は、ミリスチル化、硫酸化、グリコシル化、リン酸化、ホルミル化、およびシグナル配列の付加または欠失などの修飾を除外しない。「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸鎖を意味し、ここで、各鎖はペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸を含み、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、非共有結合および/または共有結合した複数の鎖を含む場合があり;天然に存在する、具体的には非組換え細胞によって、または遺伝的に改変された細胞もしくは組換え細胞によって産生される天然のタンパク質の配列を有し;天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子、または天然の配列に対して1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、および/または置換を有する分子を含む。したがって、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、1本のアミノ酸鎖(「モノマー」と呼ばれる)または複数のアミノ酸鎖(「マルチマー」と呼ばれる)を含み得る。「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、特に、本開示のペプチド、または本明細書に記載のペプチドに対して1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、および/または置換を有する配列を包含する。

30

40

【0047】

「単離された(isolated)」という用語は、その物質が元の環境(例えば、天然に存在する場合には自然環境)から除去されることを意味する。例えば、生きている動物中に存在する天然に存在するポリペプチドまたは核酸は単離されていないが、天然系の共存する物質の一部または全部から分離された同じポリペプチドまたは核酸は、単離されていると言える。そのような核酸はベクターの一部であってもよく、および/またはそのような核酸またはポリペプチドは、組成物(例えば、細胞溶解物)の一部であってもよく、さらに、そのようなベクターまたは組成物はその核酸またはポリペプチドの天然の環境の一部ではなく単離されていてもよい。「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖の生成に参与するDNAのセグメントを意味する。遺伝子は、コード領域、コード領域の前後の「リーダー(leader)およびトレーラー(trailer)」領域、ならびに個々

50

のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含む。

【0048】

本明細書でいう「単離タンパク質 (isolated protein)」、「単離ポリペプチド (isolated polypeptide)」および「単離ペプチド (isolated peptide)」という用語は、対象のタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドが、(1)天然で通常見られる、少なくともいくつかの他のタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドを含まないこと；(2)同一源由来の（例えば同種由来の）他のタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドを本質的に含まないこと；(3)異なる種由来の細胞によって発現されること；(4)天然では付随しているポリヌクレオチド、脂質、糖質またはその他の物質の少なくとも50%から分離されていること；(5)天然では結合している可能性のある単離されたタンパク質、単離されたペプチドもしくは単離されたポリペプチドの一部と、(共有相互作用または非共有相互作用で)結合していないこと；(6)天然では結合していないポリペプチドと(共有相互作用または非共有相互作用で)操作可能に結合していること；または(7)天然には存在しないこと、を意味する。そのような単離されたタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドは、ゲノムDNA、cDNA、mRNAまたは他のRNAによってコードされ得るか、または人工ペプチドおよびタンパク質合成に関する多くのよく知られている化学のいずれか、またはそれらの任意の組合せによる合成起源であり得る。特定の態様において、単離されたタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドは、その使用(治療、診断、予防、研究またはその他)を妨害するその天然の環境で見出されるタンパク質またはポリペプチドまたは他の汚染物質を実質的に含まない。

10

20

【0049】

「ペプチド断片」または「ポリペプチド断片」は、天然由来のまたは組換え的に生産されたポリペプチドに、アミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失および/または内部欠失または置換を有する、単量体または多量体であり得るペプチドまたはポリペプチドを指す。本明細書中で使用する場合、「連続する (contiguous) アミノ酸」は、開示されるアミノ酸配列の中断されていない直線部分に対応する、共有結合で繋がったアミノ酸を指す。特定の態様では、ポリペプチド断片は、少なくとも5~約100アミノ酸長のアミノ酸鎖を含む可能性がある。当然のことながら、特定の態様では、断片は、少なくとも3、4、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、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100アミノ酸長のアミノ酸配列を有する。

30

【0050】

特定の好ましい態様では、『アミノ酸およびペプチドの合成 (Amino Acid and Peptide Synthesis)』(ジョーンズ、J.、2002オックスフォード大学出版、米国、ニューヨーク)、ラメーカーズら(2014化学学会誌レビュー (Chem. Soc. Rev.) 43:2743)、パーゼルら(2013ケムバイオケム (ChemBiochem.) 14:1032)、チャンドルデュら(2013モレキュールズ (Molecules) 18:4373)、および/またはメイドら(2004有機化学に関するベイルスタイン・ジャーナル (Beilstein J. Org. Chem.) 10:1197)に記載されているようないくつもの確立された方法論のいずれかに従って、本明細書に記載のペプチド(例えば、ボレリアT細胞エプトープ含有ペプチド)が完全に人工的に化学合成されたものであることを想定する。例えば、メリフィールド法または他の固相ペプチド合成技術をベースとし、それらにさらに改良を加えた手動のまたは好ましくは自動の固相ペプチド合成技術(例えば、メリフィールド、1963米国化学学会誌 (J. Am. Chem. Soc.) 85:2149; ミッチェルら、1978有機化学学会誌 (J. Org. Chem.) 43:2485; アルベリシオ、F. (2000). 固相合成 (Solid-Phase Synthesis): 実践ガイド (A

40

50

Practical Guide) (第一版)、ボカラトン：CRC出版；ニルソンら、2005生物物理・生体分子構造学年会誌(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.) 34；シュノルツァーら、臨床薬理・治療学雑誌(Int. J. Peptide Res. Therap.) 13(1-2)：31；リーら2013モレキュールズ18：9797)が、ペプチド合成技術において慣習的に行われており、本明細書に記載のペプチドを化学的に合成するために使用され得る。

【0051】

ポリペプチドまたはペプチドは、タンパク質のN末端にシグナル(またはリーダー)配列を含む場合があり、これはタンパク質の翻訳と同時にまたは翻訳後に、タンパク質の移行を促す。ポリペプチドまたはペプチドは、ポリペプチドの合成、精製または同定(例えばポリ-His)を容易にするため、またはポリペプチドまたはペプチドの固相支持体への結合を促進するためにリンカーまたは他の配列にインフレームで融合している場合もある。融合ドメインポリペプチドは、N-末端および/またはC-末端でポリペプチドまたはペプチドに連結され得、非限定的な例として、当業者によく知られている、Ig定常領域配列もしくはその一部などの免疫グロブリン由来配列；ヒスタグ(例えば、ヘキサヒスチジンまたは他のポリヒスチジン)、FLAG(登録商標)もしくはmycもしくは他のペプチド親和性タグなどの親和性タグ；緑色蛍光タンパク質(GFP)もしくはその変異体(例えば、黄色蛍光タンパク質(YFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、他のエクオリンもしくはその誘導体など)または他の検出可能なポリペプチド融合ドメイン、その酵素もしくは部分(例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST))または他の既知の酵素検出および/またはレポーター融合ドメインなどの検出可能なポリペプチド部分；が挙げられる。

【0052】

ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の組換え発現のためのシステムは当技術分野で知られており、特定の態様では、本明細書に記載のペプチドを産生するために使用され得る。例えば、大腸菌組換えタンパク質発現系などの特定の細菌発現系は、N末端ホルミル化メチオニンを有するポリペプチド産物を生じる。従っていくつかの状況では、組換え産生されたペプチドは、N-末端メチオニン残基(これは、未修飾メチオニンまたはホルミル-メチオニンまたは別のメチオニン類似体、変異体、模倣体または誘導体であってもよい)、場合により、所望のペプチド配列(例えば、ボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド)の直前にあって開始メチオニンとも呼ばれる、を含む。したがって、本明細書に記載のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドのうちの1つまたは複数が、N末端メチオニン(例えば、メチオニンまたはN-ホルミルメチオニンとして)を含有する形で生成され、そして当技術分野で受け入れられている技術によって、N末端メチオニンを切断して新生ポリペプチド産物からそれを除去することができる酵素であるメチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)も発現している宿主細胞中で組換え的に発現させることができる。例えば、ナタラジャンら、2011プロスワン6(5)：e20176；シェンら、1993米国科学アカデミー紀要90：8108；シェンら、1997タンパク質工学(Prot. Eng.) 10：1085を参照のこと。あるいは、MAP酵素自体を組換え的に産生するか(例えばツナサワら、1997生物科学雑誌(J. Biochem.) 122：843；ブラッドショーら、1998生化学における最新知見(Trends Biochem. Sci.) 23：263；ベン-パサーら、1987微生物学雑誌(J. Bacteriol.) 169：751)、または購入するか(シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ、例えば、カタログ番号M6435)して、合成後の本ペプチドからN末端メチオニンを除去するために使用してもよい。

【0053】

特定の好ましい態様によれば、ボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドは、配列番号1~33のいずれかに記載のアミノ酸配列を含んでいる少なくとも5個以上で、かつ、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、2

10

20

30

40

50

3、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7または6個を超えないポリペプチドを含むかもしくはそれらと構造的特徴が近い配列同一性を共有するか、または構造特徴を共有しているペプチド、ポリペプチドまたはペプチド模倣物を含む場合があり、ここで、ボレリアT細胞エпитープを含むペプチドは、少なくとも1種の病原性ボレリア菌種、好ましくはヒトに対する病原性を有するボレリア種(このようなボレリア菌種には、これらには限定されないが、ボレリア・ブルグドルフェリ、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アゼフェリ、ボレリア・ガリニ、ボレリア・パレイシアナ、ボレリア・スピルマニ、ボレリア・ビセッティ、ボレリア・ルシタニアおよびボレリア・パバリエンシスが含まれ得る)と反応するT細胞によって特異的に認識され得る。このようなT細胞反応性を決定するためのアッセイ方法は、本明細書に記載されており、本明細書に初めて開示されるボレリアT細胞エпитープ含有タンパク質およびペプチドの同定を除けば、一般に当該分野においても知られている。

10

【0054】

当該分野で一般的に言及されているように、そして本明細書中で使用する場合、配列同一性と配列相同性は同じ意味で用いられる場合があり、一般に、候補配列と参照配列を整列させ、必要に応じて、パーセンテージで表す配列同一性を最大にするためにギャップを導入した後の、場合によっては保存的置換を配列同一性の一部として考慮しなかったときの、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸のそれぞれと同一である候補配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを指す。特定の態様では、本明細書に開示されているようなペプチドの変異体、例えば、ボレリア菌種T細胞エпитープ含有ペプチド(例えば配列番号1~33のいずれか1つのペプチド)は、配列番号1~33のいずれか1つのペプチド配列と、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、91%、92%、93%、もしくは94%、または少なくとも約95%、96%、97%、98%もしくは99%のアミノ酸残基(またはそのようなペプチドをコードしているポリヌクレオチド中のヌクレオチド)を共有している。そのような配列同一性は、前述したもののようによく知られている配列分析アルゴリズムであって、FASTA、Gap、Bestfit、BLASTなどのウィスコンシン大学コンピューター遺伝学グループ(マジソン、ウィスコンシン)から入手可能なアルゴリズムを使って決定することができる。

20

【0055】

「天然のまたは非天然のアミノ酸」は、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質(例えば、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、スレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y))を生合成するための基本単位となる、天然に生じる一般的なアミノ酸のいずれをも含み、また、天然に生じるかもしくは合成されたものであるかに関わらず、修飾された、誘導体化された、鏡像異性的な、稀少なおよび/または一般的でないアミノ酸、例えば、例えば、N-ホルミルメチオニン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、-N-メチルリジン、-N-トリメチルリジン、メチルヒスチジン、デヒドロ酪酸、デヒドロアラニン、(-アミノ酪酸、アラニン、-アミノ酪酸、ホモシステイン、ホモセリン、シトルリン、オルニチンや、「タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸原典(Proteins, Peptides and Amino Acids Sourcebook)」(ホワイト、J. S. およびホワイト、D. C.、2002、ヒューマンプレス、トトワ、ニュージャージー)または「アミノ酸およびペプチド合成」(ジョーンズ、J.、2002オックスフォード大学出版、米国、ニューヨーク)または「非天然アミノ酸(Unnatural Amino Acids)、化学物質ファイル(CheMFiles)1巻、5号(2001フルカ試薬社;シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ)もしくは「非天然アミノ酸II、化学物質ファイル2巻、4号」(2002フルカ試薬社;シグマ・アルドリ

30

40

50

ッチ、セントルイス、ミズーリ)に記載されているような、天然源から単離されていてもよい、および/または化学的に合成されたアミノ酸であってもよいアミノ酸が含まれる。天然および/または非天然アミノ酸のさらなる説明は、例えば、コティア、2003アメリカ化学学会誌(Acc. Chem. Res.) 36: 342; マルオカ、2004米国科学アカデミー紀要101: 5824; ランドキストラ、2001オーガニック・レターズ(Org. Lett.) 3: 781; タンら、2002有機化学学会誌67: 7819; ロスマンら、2003有機化学学会誌68: 6795; クレブスら、2004化学(Chemistry) 10: 544; グッドマンら、2001バイオポリマーズ(Biopolymers) 60: 229; サバットら、2000オーガニック・レターズ2: 1089; Fuら、2001有機化学学会誌66: 7118; およびウルビーら、1994分子生物学における手法(Meths. Mol. Biol.) 35: 249に見られる。本明細書では、標準的な3文字略語および1文字記号を用いて、天然および非天然アミノ酸を指す。

【0056】

他の非天然アミノ酸またはアミノ酸類似体は当該分野でよく知られており、また、これらに限定されないが、非天然LもしくはD誘導體(上述したまたは本明細書のどこかに記載のペプチドおよび/またはペプチド模倣物中に存在するD-アミノ酸など)、蛍光標識したアミノ酸、並びに具体例として、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、3-ヨード-チロシン、O-プロパルギル-チロシン、ホモグルタミン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、3-ニトロ-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-セリン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、m-アセチル-L-フェニルアラニン、セレノメチオニン、テルロメチオニン、セレノシステイン、アルキンフェニルアラニン、O-アリル-L-チロシン、O-(2-プロピニル)-L-チロシン、p-エチルチオカルボニル-L-フェニルアラニン、p-(3-オキソブタノイル)-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、ホモプロバグリニン、アジドホモアラニン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモ-L-フェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン、p-ニトロ-L-フェニルアラニン、m-メトキシ-L-フェニルアラニン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、および、イソプロピル-L-フェニルアラニン、トリフルオロロイシン、ノルロイシン(Nle)、D-ノルロイシン(dNleもしくはD-Nle)、5-フルオロ-トリプトファン、パラ-ハロ-フェニルアラニン、ホモフェニルアラニン(ホモ-Phe)、セレノ-メチオニン、エチオニン、S-ニトロソ-ホモシステイン、チア-プロリン、3-チエニル-アラニン、ホモ-アリル-グリシン、トリフルオロイソロイシン、トランスおよびシス-2-アミノ-4-ヘキセン酸、2-ブチニル-グリシン、アリル-グリシン、パラ-アジド-フェニルアラニン、パラ-シアノ-フェニルアラニン、パラ-エチニル-フェニルアラニン、ヘキサフルオロロイシン、1,2,4-トリアゾール-3-アラニン、2-フルオロ-ヒスチジン、L-メチルヒスチジン、3-メチル-L-ヒスチジン、-2-チエニル-L-アラニン、-(2-チアゾリル)-DL-アラニン、ホモプロパルギルグリニン(HPG)およびアジドホモアラニン(AHA)などが挙げられる。

【0057】

特定の態様では、例えばフェニルアラニンもしくはトリプトファンまたはその類似体において見られるような、芳香族環系が存在する時にその構造から当業者が容易に認識できる芳香族側鎖を含む天然または非天然アミノ酸が存在してもよく、そのような他の天然または非天然アミノ酸は、典型的には、水素および炭素のみからなる6~19個の炭素原子を含む芳香族単環式または多環式炭化水素環系の形態で、環系は部分的にまたは完全に飽和していてもよく、かつ、これに限定されるものではないが、フルオレニル、フェニルお

10

20

30

40

50

よびナフチルのような基などの基として存在していてもよい。

【0058】

特定の態様では、例えばアラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンもしくはメチオニンまたはそれらの類似体に見られるような、疎水性側鎖（例えば、典型的には生理学的環境中に非極性であるもの）が存在する時にその構造から当業者が容易に認識できる疎水性側鎖を含む天然または非天然アミノ酸が存在してもよい。特定の態様では、例えばリシン、アルギニンまたはヒスチジンまたはそれらの類似体に見られるような、塩基性（例えば、典型的には極性であり、生理学的環境では正電荷を有する）が存在する場合にその構造から当業者が容易に認識できる塩基性側鎖を含む天然または非天然アミノ酸が存在してもよい。

10

【0059】

特定の態様では、本明細書に開示されるペプチドは、ペプチドの生物学的活性が維持される限り、L-および/またはD-アミノ酸を含み得る（例えば、ボレリア菌種T細胞エпитープ含有ペプチドは、本明細書に記載のT細胞免疫応答インジケータとして生成される刺激によって明らかのように、ライム病に関連するボレリア種に感染した対象由来のT細胞によって引き起こされる二次インビトロ免疫応答によって認識され得る）。このペプチドはまた、特定の態様では、翻訳後または合成後に起こる既知の天然のおよび人工の共有的な化学修飾を含んでいてもよく、このような修飾を生じる反応としては、グリコシル化（例えば、アスパラギン残基でのN結合型オリゴ糖付加、セリンまたはトレオニン残基でのO結合型オリゴ糖付加、糖化など）、脂肪族のアシル化、アセチル化、ホルミル化、ペグ化を挙げることができる。本明細書に開示されるペプチドはさらに、アミノ酸欠失、あるいは1つ以上のアミノ酸残基への他の天然アミノ酸残基もしくは非天然アミノ酸残基の付加、または1つ以上のアミノ酸残基と他の天然アミノ酸残基もしくは非天然アミノ酸残基との置換を含み得る類似体、対立遺伝子および対立遺伝子変異体を含む場合がある。

20

【0060】

ペプチド類似体や非ペプチド類似体はペプチド模倣薬またはペプチド模倣薬と呼ばれ、医薬産業において知られている（*Faust et al., J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); *Ebanks et al., J. Med.* 30:1229 (1987)）。これらの化合物は、1つ以上の非天然アミノ酸残基、1つ以上の化学修飾部分（例えば、グリコシル化、ペグ化、蛍光、放射能または他の部分）、および/または1つ以上の非天然のペプチド結合（例えば、還元ペプチド結合： $-CH_2-NH_2-$ ）を含む場合がある。ペプチド模倣体は、コンピューターを使った分子モデリング、ランダムなまたは部位特異的な突然変異誘発、PCRに基づく戦略、化学的突然変異誘発などを含む様々な方法によって開発することができる。

30

【0061】

前述したように、特定の態様はまた、ペプチド模倣体または「人工」ポリペプチドにも関する。このようなポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失または置換、1つ以上の改変または人工的なペプチド結合、1つ以上の化学的部分（ポリエチレングリコール、グリコシル化、検出可能な標識、または他の部分など）、および/または1つ以上の非天然アミノ酸を含み得る。ペプチド模倣物の合成は、当該分野でよく知られており、そのような方法の例としては、化学的突然変異誘発、点突然変異誘発もしくは複数部位特異的突然変異誘発、PCRシャッフリング、改変されたアミノアシルtRNAもしくはアミノアシルtRNAシンテターゼ分子の使用、アンバーサプレッサーのような停止コドンの使用、4または5塩基対コドンの使用、または他の手段によって天然に生じるタンパク質またはポリペプチドを変化させることが挙げられ得る。

40

【0062】

表2は、配列番号1~33（表3に示される）のボレリア菌種T細胞エпитープ含有ペプチドの全長または一部を得るかまたは誘導するもとなつた、ボレリアの菌種、提供源タンパク質の識別番号、アミノ酸配列領域を示している。

50

【表 2】

表 2. FlaB、DbpB、p66、およびOspCタンパク質内の
ボレリア菌種特異的ペプチド領域のアミノ酸配列

元の タンパク質	由来の菌種	ジェンバンク 受託番号	アミノ酸の 位置番号	アミノ酸配列	配列番号
FlaB	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ACI49679.1	51-90	NVRTAEELGMQPAKI NTPASLSGSQASWTL RVHVGANQDE	34
FlaB	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ACI49679.1	88-107	QDEAIAVNIYAANVA NLFSG	35
FlaB	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ACI49679.1	156-174	SLAKIENAIRMISDQ RANL	36
DbpB	<i>Borrelia burgdorferi</i>	AAC70029.1	1-180	SIVMVLFFDLLVACS IGLVERTNAALESSS KDLKNKILKIKKEAT GKGVLFEAFTGLKTG SKVTSGLLALREAKV QAIVETGKFLKIIIE EALKLKETGNSGQFL AMFDLMLEVVESLED VGIIGLKARVLEESK NNPINTAERLLAAKA QIENQLKVVKEKQNI ENGGEKKNKSKKKK	37

10

20

30

元のタンパク質	由来の菌種	ジェンバンク受託番号	アミノ酸の位置番号	アミノ酸配列	配列番号
p66	<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	AAC66949.1	251-400	FGLSGAYGNE TFNNSITYS LKDKSVVGND LLSPTLSNSA ILASFGAKYK LGLTKINDKN TYLILQMGTD FGIDPFASDF SIFGHISKAA NFKKETPSDP NKKAEIFDPN GNALNFSKNT ELGIAFSTGA SIGFAWNKDT GEKESWAIKG	38
OspC	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ABQ42983.1	55-75	ATKAIGKKIQQNGGLA VEAGH	39
OspC	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ABQ42983.1	171-185	KEMLANSVKELTSPI	40

10

20

【表 3】

表 3. Fla B、Dbp B、p 66、およびO s p Cタンパク質内の
ボレリア菌種特異的領域から調製した合成ペプチド

抗原プール 1ml 中に それぞれ 1 μ g	ペプチドの名称/ 位置	配列	配列番号
Fla B	FlaB (51-75)	NVRTAEELGMQPAKINTPASLSGSQ	1
	FlaB (66-85)	NTPASLSGSQASWTLRVHVG	2
	FlaB (71-90)	LSGSQASWTLRVHVGANQDE	3
	FlaB (88-107)	QDEAIAVNIYAANVANLFSG	4
	FlaB (156-174)	SLAKIENAIMISDQRANL	5
DbpB	DbpB (5-20)	SIVMVLFFDLLVACSIGLVE	6
	DbpB (5-25)	LFFDLLVACSIGLVERTNAA	7
	DbpB (16-40)	IGLVERTNAALESSSKDLKNKILKI	8
	DbpB (31-55)	KDLKNKILKIKKEATGKGVLFEAFT	9
	DbpB (46-70)	GKGVLFEAFTGLKTGSKVTSGGLAL	10
	DbpB (61-85)	SKVTSGGLALREAKVQAI VETGKFL	11
	DbpB (76-100)	QAI VETGKFLKII EEEAL K L K E T G N	12
	DbpB (91-115)	EAL K L K E T G N S G Q F L A M F D L M L E V V	13
	DbpB (106-130)	A M F D L M L E V V E S L E D V G I I G L K A R V	14
	DbpB (121-145)	V G I I G L K A R V L E E S K N N P I N T A E R L	15
	DbpB (136-160)	N N P I N T A E R L L A A K A Q I E N Q L K V V K	16
	DbpB (151-175)	Q I E N Q L K V V K E K Q N I E N G G E K K N N K	17
	DbpB (156-180)	L K V V K E K Q N I E N G G E K K N N K S K K K K	18

10

20

30

抗原プール 1ml 中に それぞれ 1 μ g	ペプチドの名称/ 位置	配列	配列番号
p66	p66 (251-275)	FGLSGAYGNETFNNSITYSLKDKS	19
	p66 (266-290)	SITYSLKDKSIVGNDLLSPTLSNSA	20
	p66 (281-305)	LLSPTLSNSAILASFGAKYKLGLTK	21
	p66 (296-315)	GAKYKLGLTKINDKNTYLIL	22
	p66 (301-320)	LGLTKINDKNTYLILQMGTD	23
	p66 (311-330)	TYLILQMGTDFGIDPFASDF	24
	p66 (316-335)	QMGTDFGIDPFASDFSIFGH	25
	p66 (326-350)	FASDFSIFGHISKAANFKKETPSDP	26
	p66 (341-365)	NFKKETPSDPNKKAEIFDPNGNALN	27
	p66 (356-380)	IFDPNGNALNFSKNTTELGIAFSTGA	28
	p66 (371-390)	ELGIAFSTGASIGFAWNKDT	29
	p66 (376-400)	FSTGASIGFAWNKDTGEKES	30
	p66 (376-395)	FSTGASIGFAWNKDTGEKESWAIKG	31
OspC	OspC (171-185)	KEMLANSVKELTSPi	32
	OspC (55-75)	ATKAIGKKIQQNGGLAVEAGH	33

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

本明細書で開示の組成物に関してここで想定される特定の態様では表3に示すペプチドの任意の組み合わせを使用してもよく、特に好ましい態様では、開示の4つのボレリアポリペプチド領域 F l a B (配列番号1~5)、D b p B (配列番号6~18)、p66 (配列番号19~31) および O s p C (配列番号32~33) のそれぞれに由来する少なくとも1つのペプチドが存在する。複数のペプチドの相対量、および前記1つ以上のペプチドの絶対量は、当業者によく知られているように、特定の免疫化学的方法、免疫学的方法および/または生化学的方法論により、組成物が使用される試験のデザインや具体的な技術に応じて変わり得る。特定の態様において、限定ではなく例示としてであるが、組成物は、少なくとも約1ナノグラムずつであり、かつ、約100ナノグラムを超えない量の各ペプチドを含み得る。特定の態様では、組成物は、少なくとも約100、200、300、または400ナノグラムであり、かつ、約500ナノグラムを超えない量の各ペプチドを含み得る。特定の態様では、組成物は、少なくとも約500、600、700、800、または900ナノグラムであり、かつ、約1000ナノグラムを超えない量の各ペプチドを含み得る。特定の態様では、組成物は、少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8または1.9マイクログラムであり、かつ、約2マイクログラムを超えない量の各ペプチドを含み得る。特定の態様では、組成物は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8または9マイクログラムであり、かつ、約10マイクログラムを超えない量の各ペプチドを含み得る。

【 0 0 6 4 】

ライム病の診断または予後予測のための方法

本明細書で開示の通り、特定の態様では、対象におけるライム病を検出するため、または対象におけるライム病治療の有効性をモニタリングするための組成物および方法を提供

し、この組成物および方法は部分的に、ここで同定したボレリア菌種 F l a B、D b p B、p 6 6 および O s p C タンパク質領域（例えば、表 2 および 3）のそれぞれに由来するボレリア特異的 T 細胞エピトープ含有ペプチドを少なくとも 1 つ含んでいるペプチド混合物が、実質的にすべての LD 患者由来の T 細胞が、二次インビトロ免疫応答において、本明細書で提供する T 細胞免疫応答インジケータ（例えばインターフェロンの放出）を生成することによって反応する組成物をもたらすという発見に基づいている。

【 0 0 6 5 】

したがって、これらのおよび関連する態様では、対象におけるボレリア特異的抗体の出現を検出することが可能な時点よりも疾患の進行の早い時点で、対象の LD を検出することを可能にする。さらに、また前述の通り、本開示は、LD 治療がうまくいった後も数ヶ月から数年にわたって高レベルで血中に残存し、そのため、成功したボレリアスピロヘータ根絶の効果を覆い隠してしまう可能性のある検出可能なボレリア特異的抗体の評価とは異なり、ボレリアスピロヘータを根絶するための LD 治療が成功している対象から得られた T 細胞を循環させることによって引き起こされる検出可能なボレリア特異的 T 細胞応答性が低下していることに基づく、LD 治療の有効性を評価することを可能にする。

10

【 0 0 6 6 】

したがって特定の態様では、対象のライム病を検出する方法、または対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする方法が提供され、この方法は、(A) 第 1 のテストインキュベーション混合物を得るために、(i) ライム病であることまたはライム病を有するリスクがあることが知られている対象から第 1 の時点で得られた第 1 の生体試料（ここでこの生体試料は T 細胞と抗原提示細胞を含んでいる）と、(i i) ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物、をインビトロで接触させること、(B) T 細胞免疫応答インジケータの生成を刺激するために前記ペプチド組成物中に存在するボレリア T 細胞エピトープの前記 T 細胞による特異的認識に十分な条件および時間で第 1 のテストインキュベーション混合物をインキュベートすること；(C) 第 1 のテストインキュベーション混合物の T 細胞免疫応答インジケータの第 1 のレベルを検出することを含み、ここで、対象におけるボレリア感染の存在は、(C) で検出される T 細胞免疫応答インジケータの第 1 のレベルが、第 1 の生体試料にライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物を加えずにインキュベートした第 1 の対照インキュベーションから得られた第 1 の対照レベルよりも高いことで示され、かつ、ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物は、ここで同定されたボレリア菌種の F l a B、D b p B、p 6 6 および O s p C タンパク質領域（例えば、表 2 および 3）それぞれに由来する少なくとも 1 つのボレリア特異的 T 細胞エピトープ含有ペプチド、例えば、

20

30

【 0 0 6 7 】

(a) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列を有する F l a B ペプチド、または配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの単離 F l a B ペプチド；(b) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列を有する D b p B ペプチド、または配列番号 6 ~ 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 D b p B ペプチド；(c) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列を有する p 6 6 ペプチド、または配列番号 19 ~ 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の単離 p 6 6 ペプチド；および (d) それぞれがボレリア T 細胞エピトープを含み、かつ、配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列を有する O s p C ペプチド、または配列番号 32 ~ 33 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するその 1 つ以上の変異体からから選択される、1 つまたは 2 つの単離 O s p C ペプチドを含むペ

40

50

チド混合物を含み、それによって対象におけるライム病を検出するか、または対象におけるライム病の治療の有効性をモニタリングする。

【0068】

特定の好ましい態様では、第1の時点とは、ライム病治療の対象への投与前である。

【0069】

さらに特定態様において、本方法は、(D)第2のテストインキュベーション混合物を得るために、(i)第1の時点よりも遅く、かつ、ライム病の治療を対象に投与した後に対象から得られた第2の生体試料(ここでこの生体試料はT細胞と抗原提示細胞を含んでいる)と、(ii)ライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物、をインビトロで接触させること、(E)T細胞免疫応答インジケータの生成を刺激するために前記ペプチド組成物中に存在するボレリアT細胞エピトープの前記T細胞による特異的認識に十分な条件および時間で第2のテストインキュベーション混合物をインキュベートすること;および(F)第2のテストインキュベーション混合物のT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルを検出することをさらに含み、ここで、対象におけるボレリア感染の存在は、(F)で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルが、第2の生体試料にライム病を診断するまたは予後予測するためのペプチド組成物を加えずにインキュベートした第2の対照インキュベーションから得られた第2の対照レベルよりも高いことで示され、かつ、ライム病治療の有効性は、(F)で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルが、(c)で検出されるT細胞免疫応答インジケータの第1のレベルよりも低いことで示される。

10

20

【0070】

そのため、これらおよびいくつかの関連する態様では、第1の時点は、ライム病の所与の治療を対象に投与する前であり、第2のまたはそれ以降の時点は、LDに対する所与の治療を対象に投与した後であり得、例えば、検出されるT細胞免疫応答インジケータの第2のレベルの低下(例えば、適切な対照と比較したときの統計学的に有意な減少)に反映されるような治療の有効性が決定できる。非限定的な理論として、そのような結果は、T細胞免疫応答インジケータの刺激生成についてアッセイした場合に、LD治療後の対象においてボレリア感染が実質的に除去されたことに起因して第2の試料ではT細胞反応性が負に調節されたおよび/またはなくなった結果、第2またはそれ以降の時点で、第2の生体試料のボレリア特異的T細胞反応性が第1の時点よりも低いレベルであることを意味し得る。

30

【0071】

このようにして、LDに関連するボレリア感染の重篤度は、1つまたは第2のもしくはそれ以降の時点の経過のような様々な期間にわたってモニタリングすることで対象のボレリア病原菌負荷の顕性のインジケータであるT細胞免疫応答インジケータによって反映される病気の進行を評価できること、また、LDに対する1つ以上の治療の有効性も評価できることが理解されるであろう。場合によっては、対象におけるボレリア特異的T細胞活性をモニタリングするために、対象から得られた複数の生体試料を、連続する第2およびそれ以降の時点にわたって繰り返し試験することが望ましい場合がある。したがって、特定の態様では、ここに記載の接触する、インキュベートする、および検出する工程は、対象のLDを長期間モニタリングすることが望ましい状況においては何回繰り返しても良い。例えば、それぞれが様々な間隔で隔てられている、例えば、数日、数週間、数ヶ月、または数年の間隔で隔てられている、2、3、4、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、44、45、46、47、48、49、もしくは50回、またはそれ以上などの時点にわたって繰り返すことができる。

40

【0072】

そのため、本明細書に記載の特定の態様では、ライム病の治療に使用するのに適切であるとして当該分野で知られている1つ以上の抗生物質化合物、例えば、病原性ボレリア菌

50

種に対して、例えば本明細書で言及するいずれものボレリア菌種、特にヒトに対する病原性を有するボレリア菌種に対して、有効な活性プロファイルを有する抗生物質に基づく抗生物質化合物に関連する組成物および/または方法が想定される。医学分野の当業者に理解されるように、「治療する」および「治療」という用語は、対象（すなわち、ヒトであってもヒト以外の動物であってもよい患者、宿主）の疾患、障害または状態の医学的管理を指す（例えば、ステッドマン医学大辞典を参照のこと）。

【0073】

抗生物質は当該分野で知られており、典型的には、ある種の微生物によって産生された化合物から製造され、別の種の微生物を殺す薬剤、または同一または類似の化学構造および作用機序を有する合成生成物、例えば、そのような薬物を局所的に使用した場合に生体内または生体の表面上の微生物を破壊する薬剤である。

10

【0074】

ライム病の治療に適切であることが当該技術分野で知られている抗生物質には、テトラサイクリン類（オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、またはミノサイクリン）；ペニシリン類（アモキシシリンまたはペニシリン）；セファロsporin類（セフトキシム、セフトゾール、セフメタゾール、セフォキシチン、セフロキシムアセチル、セフロキシムアセチル、セフチンまたはセフトリアキソン）；マクロライド類（アジスロマイシン、クラリスロマイシン、またはエリスロマイシン）のうちの1つ以上が含まれるが、これに限定されるものではない（例えば、キャメロンら、2014抗感染性治療における最新の知見（Expert Rev Anti Infect Ther.）12（9）：1103-1135；シャピロ、2014ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディスン370（18）：1724-31；ライトら、2012アメリカン・ファミリー・フィジシャン85：1086を参照のこと）。臨床的に有用なこれらのおよび他の抗生物質の一覧（例えば、ワシントン大学医学部、内科治療のためのワシントンマニュアル（第32版）、2007年、リップスコット、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス、フィラデルフィア、PA；ハウザー、AL、臨床医のための抗生物質の基礎、2007年、リップスコット、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス、フィラデルフィア、PA）が利用可能であり、当業者に知られている。

20

【0075】

本明細書に記載の方法で使用するために、生体試料を、本開示のT細胞免疫応答インジケータの有無およびレベルを決定するために、対象から得ることができる。適切な生体試料としては、例えば、全血試料、または脳脊髄液試料、または滑液試料を挙げることができる。そのいずれも、当業者が認識するようなライム病を発症する危険性があると疑われる対象（例えば、ヒトまたは動物対象、好ましい態様ではヒト）、例えば、ダニに咬まれた患者、または遊走性紅斑を臨床的に呈する患者、または1つ以上のライム病危険因子を有する患者から得ることができる（例えば、シャピロ、2014ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディスン370：1724；ライトら、2012アメリカン・ファミリー・フィジシャン85：1086を参照のこと）。特定の態様では、生体試料は、全血（場合により抗凝固剤を含む）、または全血の細胞画分、または単離された末梢血白血球、または単離された末梢血単核細胞の少なくとも1つを含み得る。生体試料は、LD治療を対象に投与する前の第1の時点で対象から得てもよく、この生体試料は、診断的におよび/またはベースライン（すなわち、治療前）データを確立するための対照として有用であり得る；LD治療の対象に投与した後の1回以上の第2のもしくはそれ以降の時点からも、さらに、対象から生体試料を得ることができる。

30

40

【0076】

T細胞免疫応答インジケータの検出

【0077】

インビトロ抗原特異的T細胞応答は、通常、記載のある多くの測定可能なT細胞機能的パラメータ（例えば、増殖、サイトカインの発現、サイトカインの生合成、サイトカインの放出、変化した細胞表面マーカーの表現型など）として観察され、適切な状況で同

50

族抗原（例えば、免疫適合性抗原提示細胞によって提示される場合、T細胞を刺激または活性化するために使用される抗原）に曝露されたT細胞と、代わりに構造的に異なるまたは無関係な対照抗原に曝露した同じ供給源集団に由来するT細胞との間で生じるT細胞応答を比較することで決定される。同族抗原に対する応答が対照抗原に対する応答よりも統計学的に有意に高いことは、抗原に対して特異的であることを意味する。

【0078】

二次インビトロボレリア菌種特異的免疫応答のレベルは、本明細書に記載されているおよび/または当技術分野で日常的に実施されている多数の免疫学的方法のいずれか1つによって決定することができる。二次インビトロボレリア菌種特異的免疫応答のレベルは、T細胞含有生体試料および抗原提示細胞の由来となった対象（例えばライム病に罹っていることが疑われる対象）に、本明細書に記載のライム病治療のいずれか1つを投与する前および投与後を含む、1つ以上の時点で決定され得る。

10

【0079】

実施例に記載したように、ボレリア菌種T細胞エピトープ含有ペプチド（例えば、本明細書に開示の配列番号1～33のFlaB、DbpB、p66、およびOspCペプチドのうち1つ以上、またはその変異体）を含む診断または予後予測のための本開示の組成物が、ライム病に関連するボレリア菌種感染初期の対象に由来するT細胞と抗原提示細胞を含んでいる生物学資料により、テストインキュベーションにおいてインビトロで、T細胞免疫応答インジケータの検出可能な生成を刺激可能なことが示された。検出されたT細胞免疫応答インジケータのレベルは、ボレリア菌種ペプチド組成物を含んでいない以外はテストインキュベーションと同様の対照インキュベーション中で生物試料をインキュベートすることで得られた、インジケータの対照レベルよりも高かった。

20

【0080】

したがって、本明細書で提供されるようなT細胞免疫応答指標のレベルの高まりは、特定の態様において、T細胞および抗原提示細胞を本明細書に記載のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド組成物（FlaB、DbpB、p66、OspC）とT細胞による特異的な抗原認識に十分な条件で十分な時間インキュベートした後に検出可能なインジケータのレベルが、適切な対照条件（例えば、ボレリアペプチド組成物が存在しない）において検出可能なインジケータのレベルに対する統計的に有意な増加という形をとる。

【0081】

これに限定するものではなく一例として、好ましい態様では、T細胞をボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド組成物で刺激することによって生成されるT細胞免疫応答インジケータは、インビトロでのインキュベーション後にT細胞によって誘導、発現および/または放出される、少なくとも1つのT細胞サイトカインである。好ましくは、T細胞サイトカインは、IL-1、IL-1、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17、TNF-、TNF- およびIFN- から選択される。特定の好ましい態様では、放出されたIFN- は、T細胞をボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド組成物で刺激することによって生成されるT細胞免疫応答インジケータである。しかしながら、想定される態様はこれに限定されるものではなく、そのため、本明細書に記載のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド組成物に対する二次インビトロ抗原特異的応答を高めるその能力に関し、本明細書に記載したように、生体試料を評価するための多種多様な方法論が含まれ得る。様々なアッセイ構成および技術が当該分野で知られており（例えば免疫学の最新手法（Current Protocols in Immunology）、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク（2009））、本開示に基づく本方法に使用することができる。従って、サイトカインのレベルは、例えば、ELISA、ELISPOT、細胞内サイトカイン染色、および/またはフローサイトメトリーを含む、本明細書に記載され、当技術分野で実施される方法に従って決定することができる。

30

40

【0082】

好ましい態様においてT細胞免疫応答インジケータとは、試料と本明細書に記載のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチド組成物をインキュベートする工程の間に生体試料の

50

T細胞から放出されたIFN- γ であり、放出されたIFN- γ のレベルは、結合剤とT細胞サイトカイン(すなわち、IFN- γ)との間の検出可能な特異的結合の決定によりIFN- γ を検出する、多数のインビトロ技術のいずれかによって免疫化学的に決定される。従って、結合剤は、サイトカイン(例えば、IFN- γ)に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む場合があり、この抗体は、少なくとも1つのモノクローナル抗体を含んでいても、または代わりにポリクローナル抗体を含んでいてもよい。特定の態様によれば、T細胞免疫応答インジケータは、T細胞によって放出され、固相に固定化された抗体への結合によって検出されるサイトカインである。

【0083】

IFN- γ に関する代表的なイムノメトリック(immunometric)アッセイには、QUANTIFERON(登録商標)(セレスティス社(Cellectis)、カーネギー、ピクトリア、オーストラリアから入手可能)があり、これは、結核に関して広く使用されている試験においてIFN- γ 検出の代表格として確立されており(例えば、パイラ、2004ランセット感染症(Lancet Infect Dis)4:761)、これによるIFN- γ の定量的検出は、結核抗原の代わりに本明細書に記載のボレリア抗原を用いることで、本明細書における使用に適用可能である(例えば、ユンら、2014臨床微生物学雑誌(J. Clin. Microbiol.)52:90;ベルクナップら、2014実験薬学の臨床講義(Clin. Lab. Med.)34:337;ファーガソンら、2015移植(Transplantation)99:1084;ルアンら2014臨床リウマチ学(Clin. Rheumatol.)電子出版PMID25376466も参照のこと)。

10

20

【0084】

抗体が検出可能なレベルで抗原と、好ましくは約 $10^4 M^{-1}$ 以上、または約 $10^5 M^{-1}$ 以上、約 $10^6 M^{-1}$ 、約 $10^7 M$ 以上、または $10^8 M^{-1}$ 以上の親和定数Kaで反応する場合、結合パートナーまたは抗体は、目的の抗原(例えば、検出可能なT細胞免疫応答インジケータとしてアッセイされるサイトカイン、例えば、IFN- γ)に対して「免疫特異的(immunospecific)」「特異的(specific for)」もしくは「特異的に結合する(specifically bind)」と言える。その同族抗原に対する抗体の親和性は一般的に、解離定数KDとしても表され、抗体は目的の抗原に、約 $10^{-4} M$ 以下、約 $10^{-5} M$ 、約 $10^{-6} M$ 以下、 $10^{-7} M$ 以下、または $10^{-8} M$ 以下で特異的に結合している場合に、特異的に結合していると言える。

30

40

【0085】

結合パートナー、つまり抗体の親和性は、従来技術、例えば、スキヤッチャードらが記載の方法(ニューヨーク科学アカデミー年会誌(Ann. N. Y. Acad. Sci. USA)51:660(1949))および表面プラズモン共鳴(SPR; BIACORE(登録商標)、バイオセンサー、ピスカタウェイ、ニュージャージー)などの一般的に使用されている技術によって容易に測定することができる。表面プラズモン共鳴の場合には、標的分子を固相に固定化し、フローセルに沿って移動する移動相中で、結合パートナー(つまりリガンド)に曝露する。リガンドが固定化された標的に結合すると、局所的な屈折率が変わることでSPR角の変化が生じ、これを、反射光の強度の変化を検出することによって、リアルタイムでモニタリングすることができる。SPRシグナルの変化速度を分析して、結合反応の会合および解離相の見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比によって、見かけの平衡定数(親和性)が分かる(例えば、ウォルフら、癌研究(Cancer Res.)53:2560-2565(1993)を参照のこと)。

【0086】

本明細書で使用する場合、「ポリクローナル抗体」という用語は、特異的抗原の2つ以上のエピトープを認識する抗原特異的抗体の集団から得られる抗体を指す。「抗原」または「免疫原」は、適応免疫系によって認識されるペプチド、脂質、多糖またはポリヌクレオチドを指す。抗原は、自己または非自己分子であり得る。抗原の例には、細菌細胞壁成分、花粉およびrh因子が含まれるが、これらには限定されない。特異的抗体によって、

50

または特異的 T 細胞レセプターによって特異的に認識される抗原の領域が、「エピトープ」または「抗原決定基」である。1つの抗原が、複数のエピトープを有する場合もある。

【0087】

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体」(mAb)という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す。すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然の突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位を指向する。さらに、異なるエピトープを指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原のたった1つのエピトープを指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成され得るという利点がある。「モノクローナル」という修飾語は、特定の方法のいずれかによる抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、クーラーら、ネイチャー、256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製されてもよく、または細菌、真核生物の動物または植物細胞を使った組換えDNA法を用いて作製されてもよい(例えば、米国特許第4、816、567号を参照のこと)。「モノクローナル抗体」はまた、クラックソンら、ネイチャー、352:624-628(1991)およびマークスら、分子生物学雑誌222:581-597(1991)に記載されている技術を使って、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

【0088】

核酸およびポリヌクレオチド

本明細書で提供されるようなボレリア菌種 T 細胞エピトープ含有ポリペプチドおよびペプチド、ならびにコードしている核酸分子およびベクターは、実質的に純粋もしくは均一の形態で、あるいは核酸の場合には、所望の機能を有するポリペプチドをコードしている配列以外には、提供源の核酸または遺伝子を実質的に含まない形態で、単離および/または精製され得る。核酸は、DNAまたはRNAを含んでいてもよく、また、完全にもしくは部分的に合成されたものであってもよい。本明細書に記載のヌクレオチド配列への言及は、特定された配列を有するDNA分子を包含し、そうでないことが文脈から明らかでないかぎり、UがTで置換される特定の配列を有するRNA分子を包含する。

20

【0089】

したがって、本発明はさらに、特定の態様において、配列番号1~33に記載のアミノ酸配列を有するボレリア菌種 T 細胞エピトープ含有ペプチドのいずれかをコードする単離された核酸を提供する。

30

「作動可能に連結された」という用語は、用語が適用される構成要素が、適切な条件下でそれらの固有の機能を実行することができる関係にあることを意味する。例えば、タンパク質コード配列に「作動可能に連結された」転写制御配列は、制御配列の転写活性と適合する条件下でタンパク質コード配列が発現するように、それに連結されている。

【0090】

本明細書で使用される「制御配列」という用語は、それらが連結または作動可能に連結されるコード配列の発現、プロセッシングまたは細胞内局在に影響を与え得るポリヌクレオチド配列を指す。そのような制御配列の性質は、宿主生物に依存する場合がある。特定の態様では、原核生物の転写制御配列は、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含み得る。他の特定の態様では、真核生物の転写制御配列は、転写因子、転写エンハンサー配列、転写終結配列およびポリアデニル化配列に関する1つ以上の認識部位を含むプロモーターを含み得る。特定の態様において、「制御配列」は、リーダー配列および/または融合パートナー配列を含み得る。

40

【0091】

本明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖の核酸ポリマーを意味する。特定の態様では、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、またはいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾形態であり得る。このような修飾には、プロモウリジン、アラビノシドおよび2

50

、3'-ジデオキシリボースなどのリボース修飾、およびホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロセレノエート、ホスホロアニテロエート、ホスホラニレートおよびホスホロアミデートなどのヌクレオチド間結合修飾などの塩基修飾が含まれ得る。「ポリヌクレオチド」という用語は、具体的には、一本鎖および二本鎖形態のDNAを含む。

【0092】

「天然に生じるヌクレオチド(naturally occurring nucleotide)」という用語は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。「修飾されたヌクレオチド(modified nucleotide)」という用語は、修飾または置換された糖基などを有するヌクレオチドを含む。「オリゴヌクレオチド結合(oligonucleotide linkage)」という用語には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニチオエート、ホスホラニレート、ホスホロアミデートなどのオリゴヌクレオチド結合が含まれる。例えば、その開示内容が、いかなる目的のためにも参照により本明細書に組み込まれる、ラブランシェら、1986、核酸研究(Nucl. Acids Res.) 14: 9081; ステックら、1984、米国化学学会誌 106: 6077; ステインら、1988、核酸研究 16: 3209; ゾンら、1991、抗がん剤の設計(Anti-Cancer Drug Design)、6: 539; ゾンら、1991、オリゴヌクレオチドおよび類似体(Oligonucleotides and Analogues): 実践的なアプローチ(A Practical Approach)、87-108頁(F. エックスタイン編)、オックスフォード大学出版、オックスフォード、英国; ステックら、米国特許第5,151,510号; ウールマンおよびペイマン、1990、ケミカルレビューズ(Chemical Reviews)、90: 543を参照のこと。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの検出またはそのハイブリダイゼーションを可能にする検出可能な標識を含む場合がある。

10

20

【0093】

「ベクター」という用語は、コード情報を宿主細胞に移入するために使用される任意の分子(例えば、核酸、プラスミドまたはウイルス)を指すために使用される。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞の形質転換に適しており、挿入された異種核酸配列の発現を指示および/または制御する核酸配列を含むベクターを指す。発現には、転写、翻訳、およびイントロンが存在する場合にはRNAスプライシングなどのプロセスが含まれるが、これには限定されない。

30

【0094】

当業者に理解されるように、ポリヌクレオチドは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現するかまたは発現するように適合された、ゲノム配列、外来ゲノムおよびプラスミドコード配列、および遺伝子操作されたより小さな遺伝子セグメントを含み得る。そのようなセグメントは、自然から単離されたものであっても、当業者によって人工的に改変されたものであってもよい。

【0095】

さらに当業者によって認識されているように、ポリヌクレオチドは一本鎖(コードまたはアンチセンス)であっても、二本鎖であってもよく、また、DNA(ゲノム、cDNAまたは合成)であっても、RNA分子であってもよい。RNA分子は、イントロンを含み、DNA分子に一对一に対応するHnRNA分子も、イントロンを含まないmRNA分子も含み得る。その他のコード配列または非コード配列は、本開示によるポリヌクレオチド内に存在してもよいが、必ずしもそうである必要はなく、ポリヌクレオチドは、他の分子および/または担体材料に連結されていてもよいが、必ずしもそうでなくてもよい。ポリヌクレオチドは天然配列を含んでいてもよく、またはそのような配列の変異体もしくは誘導体をコードする配列を含んでいてもよい。

40

【0096】

したがって、これらおよび関連する態様によれば、本開示はまた、ボレリア菌種T細胞

50

エピトープ含有ペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。特定の態様では、本明細書に記載のペプチドおよびそのようなポリヌクレオチドの相補体をコードするポリヌクレオチド配列の一部または全部を含むポリヌクレオチドが提供される。

【0097】

他の関連する態様においてポリヌクレオチド変異体は、本明細書に記載のボレリア菌種 T細胞エピトープ含有ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と実質的に同一であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の方法（例えば、以下に記載されるような標準的パラメーターを使用する B L A S T 分析）を使用して、本明細書に記載のボレリア菌種 T細胞エピトープ含有ペプチドをコードしている配列などの参照ヌクレオチド配列（例えばそのアミノ酸配列として配列番号 1 ~ 33 のペプチドを有する）と比較したときに、少なくとも 80% の配列同一性、好ましくは少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドであり得る。当業者は、コドン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレーム位置決定などを考慮に入れて、これらの値を適宜調整し、2つのヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはペプチドの対応する同一性を決定することができることを理解している。

10

【0098】

別の態様では、中程度から高ストリンジェントな条件下で、本明細書中に提供されるボレリア菌種 T細胞エピトープ含有ペプチドもしくはその変異体、またはその断片、あるいは相補的配列をコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドが提供される。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学の分野においてはよく知られている。本明細書で提供されるポリヌクレオチドの他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するのに適する適度なストリンジェント条件の例を挙げると、その例示には、5 × S S C、0.5% S D S、1.0 m M E D T A (p H 8.0) の溶液中での予備洗浄；5 × S S C 中、50 ~ 60 で一晩ハイブリダイズ；続いて 0.1% S D S を含む 2 ×、0.5 × および 0.2 × S S C のそれぞれで、65 で 20 分間 2 回洗浄することが含まれる。当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液の塩含有量および/またはハイブリダイゼーションが行われる温度を変更するなど、容易に操作できることを知っている。例えば、別の態様において、適度に高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、ハイブリダイゼーションの温度が、例えば 60 ~ 65 または 65、70 まで上げることを除いて、前述したような条件が含まれる。

20

30

【0099】

本明細書の他の箇所に記載されているように、代表的なボレリア菌種の T細胞エピトープ含有ペプチド（例えば、配列番号 1 ~ 33 またはその変異体）の 3次元構造は、選択された天然のまたは非天然のアミノ酸の 1つ以上を置換、付加、欠失または挿入するなどの一般に行われている方法論を介して決定され、そのように誘導された構造変異体が本開示の種の空間充填特性を保持するかどうかを決定する目的で、事実上モデル化することができる。例えばボレリア特異的 T細胞認識が維持されるような、ペプチド内の適切なアミノ酸置換（またはアミノ酸配列をコードする適切なポリヌクレオチド）を決定するための様々なコンピュータプログラムが当業者に知られている。

40

【0100】

本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはその断片は、コード配列自体の長さやそのコード配列自体にかかわらず、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどの他の D N A 配列と組み合わせることができ、そのため、それらの全長は大きく異なる可能性がある。従って、ほぼどのような長さの核酸断片も用いることができるが、本開示のボレリア T細胞エピトープ含有ペプチドを産生するための、目的の組換え D N A プロトコールにおける調製および使用の容易さによって、全長は好ましくは制限される。例えば、その全長が約 10,000、約 5,000、約 3,000、約 2,000、約 1,000、約 500、約 200、約 100

50

、約50塩基対等の例示的なポリヌクレオチドセグメント（全ての間隔長を含む）が有用であると考えられる。

【0101】

ポリヌクレオチド配列を比較するために、以下に記載するように2つの配列中のヌクレオチド配列が最大に一致するように整列させたときに、2つ配列が同じである場合2つの配列は「同一」と言える。2つの配列間の比較は、典型的には、部分的な領域の配列類似性を同定および比較するために比較ウィンドウにわたる配列を比較することによって行われる。本明細書で使用する「比較ウィンドウ (comparison window)」は、少なくとも約20個の連続した位置、通常は30～約75、40～約50のセグメントを指し、2つの配列を適切に整列させた後に、同じ数の連続した一を有する参照配列と配列を比較することができる。

10

【0102】

比較のために配列を適切に整列させることは、レーザージーン (Lasergene) スイートのバイオインフォマティクスソフトウェア (DNASTAR社、マジソン、ウィスコンシン) のメガライン (Megalign) プログラムを用い、デフォルトパラメータを使用して行うことができる。このプログラムは、以下の参考文献に記載されているいくつかのアライメントスキームを具体化したものである：デイホフ、M. O. (1978) タンパク質の進化的変化のモデル - 遠方の関係を検出するための行列。デイホフ、M. O. (編) タンパク質の配列および構造の地図 (Atlas of Protein Sequence and Structure)、米国国立生物医学研究財団 (National Biomedical Research Foundation)、ワシントンDC、5巻、3号、345 - 358頁；ハインJ.、アライメントおよび系統発生に関する統一アプローチ (Unified Approach to Alignment and Phylogenesis) 626 - 645頁 (1990)；酵素学における手法 183巻、アカデミックプレス、サンディエゴ、カリフォルニア；ヒギンズ、D. G. シャープ、P. M.、CABIOS 5 : 151 - 153 (1989)；マイヤーズ、E. W. およびミュラーW.、CABIOS 4 : 11 - 17 (1988)；ロビンソン、E. D.、統合理論 (Comb. Theor) 11 : 105 (1971)；サントウ、N. ネス、M.、分子生物学と進化 (Mol. Biol. Evol.) 4 : 406 - 425 (1987)；スニース、P. H. A. ソカル、R. R.、計量分類学 (Numerical Taxonomy)、フリーマンプレス、サンフランシスコ、カリフォルニア (1973)；ウィルバー、W. J. a およびリップマン、D. J.、米国科学アカデミー紀要 80 : 726 - 730 (1983) に記載されている。

20

30

【0103】

あるいは、比較のために配列を適切に整列させることは、スミスおよびウォーターマン、応用数学 (Add. Appl. Math) 2 : 482 (1981) の部分的同一性アルゴリズム (local identity algorithm) によって、ニードルマンおよびウンシュ、分子生物学会誌 48 : 443 (1970) の同一性整列アルゴリズム (identity alignment algorithm) によって、ピアソンおよびリップマン、米国科学アカデミー紀要 85 : 2444 (1988) と同様の方法を検索することによって、コンピューターに実装されているアルゴリズム (ウィスコンシン、ジェネティクスソフトウェアパッケージ、ジェネティクス・コンピューター・グループ、575サイエンス通り、マジソン、ウィスコンシン (Wisconsin Genetic Software Package, Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Dr., Madison, WI) に入っているGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFAST) によって、または目視によって、行うことができる。

40

【0104】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適切なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ

50

れ、アルチュルら、核酸研究、25:3389-3402(1977)およびアルチュルら、分子生物学会誌、215:403-410(1990)に記載されている。2つ以上のポリヌクレオチド間の配列同一性の割合を決定するために、BLASTおよびBLAST2.0を、例えば本明細書に記載のパラメーターで使うことができる。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センターを通じて一般に入手可能である。1つの例示的な例において、累積スコアは、ヌクレオチド配列に関して、パラメーターM(一致する残基の対についての報酬スコア;常に>0)およびN(不一致の残基についてのペナルティスコア;常に<0)を使用して計算することができる。各方向のワードヒットの延長は、累積アライメントスコアが最大到達値から量Xだけ減少したとき;配列させた残基のネガティブスコアが1つ以上蓄積し、累積スコアがゼロ以下になったとき;またはいずれかのシーケンスの終わりに達したときに停止する。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、10の期待値(E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス(ヘニコフおよびヘニコフ、米国科学アカデミー紀要、89:10915(1989))を参照)、(B)50、期待値(E)10、M=5、N=-4、両方の鎖の比較を用いる。

【0105】

特定の態様では、「配列同一性のパーセンテージ」は、2つの最適に整列された配列を、少なくとも20の位置の比較ウィンドウにわたって比較することによって決定され、ここで比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列を適切に整列させるための参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、20%以下、通常5~15%、または10~12%の付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含む場合がある。パーセンテージは、両方の配列において同一の核酸塩基が生じる位置の数を決定し、一致する位置の数を求め、一致した位置の数を参照配列内の位置の総数(すなわちウィンドウサイズ)で除算し、その結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることによって、算出される。

【0106】

遺伝コードの縮重の結果、本明細書に記載のボレリア菌種T細胞エプトープ含有ペプチドをコードする多数のヌクレオチド配列が存在することは、当業者には理解されるであろう。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、本明細書に記載のボレリア菌種T細胞エプトープ含有ペプチドをコードする天然または元のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド配列との配列同一性が最少である。本開示では、言うまでも無く、コドン使用頻度の違いによって変化し得るポリヌクレオチドが明確に想定される。特定の態様では、哺乳動物発現のためにコドン最適化された配列が特に企図される。

【0107】

したがって、本発明の別の態様では、部位特異的突然変異誘発のような突然変異誘発手法を使用して、本明細書に記載のボレリアT細胞エプトープ含有ペプチドの変異体および/または誘導体を調製することができる。このアプローチでは、ポリペプチド配列をコードしている、基礎となるポリヌクレオチドの突然変異誘発によって、そのポリペプチド配列を特異的に修飾することができる。これらの技術は、ポリヌクレオチドに1つ以上のヌクレオチド配列の変化を導入することによって配列変異体を調製および試験するための、例えば上記の考慮事項の1つまたは複数を組み込むなどの、直接的なアプローチである。

【0108】

部位特異的突然変異誘発は、所望の突然変異のDNA配列をコードする特異的オリゴヌクレオチド配列と十分な数の隣接するヌクレオチドを使用して突然変異体を産生させ、変異を起こした欠失接合部の両側に安定な二本鎖を形成するのに十分な大きさと配列複雑性をもつプライマー配列をもたらしことを可能にする。突然変異誘発は、ポリヌクレオチド自体の特性を改善、変更、減少、改変、または他の方法で変化させるために、および/またはコードされたポリペプチドの特性、活性、組成、安定性、または一次配列を改変する

ために、選択されたポリヌクレオチド配列において行われ得る。

【0109】

特定の関連する態様によれば、本明細書に記載の1つ以上の構築物を含む組換え宿主細胞；ボレリア菌種T細胞エピトープ含有ペプチドまたはその変異体をコードする核酸；および、コード産物の製造方法（それをコードする核酸からの発現を含む）が提供される。発現は、核酸を含有する組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することで簡便に達成され得る。発現による産生に続いて、ボレリア菌種T細胞エピトープ含有ペプチドは、任意の適切な技術によって単離および/または精製され、次いで所望の目的に使用され得る。

【0110】

種々の異なる宿主細胞においてポリペプチドをクローニングし、発現させるための系はよく知られている。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母およびバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当技術分野で利用可能な哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NSOマウスメラノーマ細胞などが挙げられる。一般的に好ましい細菌宿主は大腸菌である。大腸菌のような原核細胞におけるペプチドの組換え発現は、当技術分野において十分に確立されており、培養中の真核細胞での発現もまた確立されている。

10

【0111】

プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカ遺伝子、および必要に応じてその他の配列を含む適切な調節配列を含む好適なベクターを選択または構築することができる。ベクターは、プラスミド、ウイルス、例えばファージ、またはファージミドであってもよい。さらなる詳細については、例えば分子クローニング(Molecular Cloning)：実験の手引き(A Laboratory Manual)：第4版、グリーンおよびサンプルック、2012、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨークを参照されたい。核酸の操作、例えば核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現、およびタンパク質の分析のための多くの既知の技術およびプロトコルは、分子生物学の最新手法(Current Protocols in Molecular Biology)、アウスベルら編、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク、2015、またはその改訂版において詳しく説明されている。

20

30

【0112】

「宿主細胞」という用語は、本明細書に記載のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドの1つ以上をコードする核酸配列が導入された、またはそれを導入することができる細胞であり、さらに、本明細書に記載の任意のボレリアT細胞エピトープ含有ペプチドをコードする遺伝子のような、目的の選択された遺伝子を発現するか、または発現することができる細胞を指す。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が元の親と形態学的にまたは遺伝的に同一であるか否かにかかわらず、親細胞の子孫を含む。したがって、そのような核酸を宿主細胞に導入することを含む方法も想定される。導入には、利用可能な技術を採用することができる。真核細胞の場合、適切な技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リボソーム媒介性トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルスを用いる、例えばワクシニア、または昆虫細胞については、バキュロウイルスを用いる形質導入が挙げられる。細菌細胞の場合、適切な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーションおよびバクテリオファージを用いたトランスフェクションが含まれ得る。導入に続いて、例えば、遺伝子を発現させるための条件下で宿主細胞を培養することにより、核酸からの発現を引き起こすかまたは可能にすることができる。一態様では、核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）に組み込まれる。組込みは、標準的な技術に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列を含めることによって促進され得る。

40

【0113】

本発明はまた、特定の態様では、特定のポリペプチド、例えば本明細書に記載のボレリ

50

ア菌種T細胞エピトープ含有ペプチドなどを発現させるために、発現系において前述したもののような構築物を使用することを含む方法も提供する。「形質導入」という用語は、1つの細菌から別の細菌へ、通常はファージによって遺伝子を導入することを指すために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達も指す。「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来性または外来性のDNAの取り込みを指すために使用され、外来性DNAが細胞膜の内部に導入された場合、細胞は「トランスフェクト」されていると言える。多くのトランスフェクション技術が当該分野でよく知られており、また、本明細書に開示されている。例えば、グリーンおよびサンプルック、分子クロニング：実験の手引き：第4版、2012、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク；分子生物学の最新手法、アウスベルら編、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク、2015、またはその改訂版を参照のこと。このような技術を用いて、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入することができる。

10

【0114】

本明細書で使用される「形質転換」という用語は、細胞の遺伝的特徴における変化を指し、細胞は、新しいDNAを含むように改変された場合に形質転換されたと言える。例えば、細胞はその天然状態から遺伝的に改変された場合に、形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入の後、導入 (transforming) DNAは、細胞の染色体に物理的に組み込まれることによって細胞のDNAと再結合し得るか、または複製されないエピソーム要素として一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立に複製され得る。細胞分裂に伴ってDNAが複製された場合、細胞は安定に形質転換されたと考えられる。核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質に関連して使用される場合、「天然に存在する (naturally occurring)」または「天然 (native)」という用語は、天然に見出され、ヒトによって操作されていない物質を指す。同様に、本明細書で使用される「天然に存在しない (non-naturally occurring)」または「非天然 (non-native)」は、天然には見出されないか、またはヒトによって構造的に修飾されているかもしくは合成された物質を指す。

20

【0115】

本発明のいくつかの態様の実施には、そうでないことが明記されていない限り、ウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および組換えDNA技術における当業者の技術範囲内の従来の方法が用いられ、およびそのような方法の多くを、以下に、例示のための目的で説明する。また、このような技術は文献中で十分に説明されている。例えば、グリーンおよびサンプルック、分子クロニング：実験の手引き：第4版、2012、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク；分子生物学の最新手法、アウスベルら編、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク、2015；分子生物学の最新手法 (Current Protocols in Molecular Biology) または免疫学の最新手法 (Current Protocols in Immunology)、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク、(2009)；アウスベルら、分子生物学の手短なプロトコール (Short Protocols in Molecular Biology)、第3版、ワイリー・アンド・サンズ、1995；サンプルックおよびラッセル、分子クロニング：実験の手引き (第3版、2001)；マニアティスら、分子クロニング：実験の手引き (1982)；DNAクロニング：実践的なアプローチ、IおよびII巻 (D. グローバー編)；オリゴヌクレオチドの合成 (N. ガイト編、1984)；核酸ハイブリダイゼーション (B. ヘイムズおよびS. ヒギンズ編、1985)；転写と翻訳 (B. ヘイムズおよびS. ヒギンズ編、1984)；動物細胞の培養 (R. フレッシュニー編、1986)；パーバル、分子クロニングの実践的ガイド (1984)などの参考文献を参照のこと。

30

40

【0116】

50

本明細書に記載の各態様は、そうでないことが明記されていない限り、他のすべての態様に準用される。

【0117】

生化学および免疫化学ならびに免疫学的アッセイ、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、微生物および哺乳類の細胞および組織の培養および形質転換（例えばエレクトロポレーション、リポフェクション）には、標準的な技術を使用することができる。酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従って、または当技術分野で一般的に達成されているか、または本明細書に記載されているように実施することができる。これらおよび関連する技術および手順は、基本的に、当技術分野でよく知られている従来の方法に従って、ならびに、本明細書で引用し、本明細書全体を通じて議論される、微生物学、分子生物学、生化学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学および免疫学の技術における多数の一般的なおよびより具体的な参考文献にしたがって実施され得る。例えば、サンプルックら、分子クローニング：実験の手引き、第3版、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク；分子生物学の最新手法（ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、2008年7月改訂）；分子生物学の手短なプロトコール：分子生物学の最新手法からの方法一覧（A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology）、グリーン出版アソシエーツおよびワイリー・インターサイエンス；グローバー、DNAクローニング：A実践的なアプローチ、IおよびII巻（IRLプレス、オックスフォード大学出版局USA、1985）；免疫学の最新手法（ジョンE．コリガン、アダM．クルイスピーク、デビッドH．マーグリーズ、イーサンM．シェバック、ウォーレン・ストローパー編、2001、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、ニューヨーク）；リアルタイムPCR：最新の技術および応用（Current Technology and Applications）ジュリー・ローガン、キルスタイン・エドワードおよびニック・スタンダーズ編、2009、カистер・アカデミック・プレス、ノーフォーク、英国；アナンド、複雑なゲノム分析のための技術（Techniques for the Analysis of Complex Genomes）、（アカデミック・プレス、ニューヨーク、1992）；グスリーおよびフィンク、酵母の遺伝学および分子生物学に関する指針（Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology）（アカデミック・プレス、ニューヨーク、1991）；オリゴヌクレオチドの合成（N．ガイト編、1984）；核酸ハイブリダイゼーション（B．ヘイムズおよびS．ヒギンズ編、1985）；転写と翻訳（B．ヘイムズおよびS．ヒギンズ編、1984）；動物細胞の培養（R．フレッシュニー編、1986）；パーバル、分子クローニングの実践的ガイド（1984）；次世代ゲノムシーケンシング（Next-Generation Genome Sequencing）（ジャンニツ、2008、ワイリー-VCH）；PCRプロトコール（PCR Protocols）（分子生物学の手法）（パク編、第3版、2010、ヒューマンプレス）；固定された細胞と酵素（Immobilized Cells And Enzymes）（IRLプレス、1986）；方法論、酵素学の方法（Methods in Enzymology）（アカデミック・プレス社、ニューヨーク）；Transfer（J．M．ミラーおよびM．P．キャロス編、1987、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局）；ハロウおよびレーン、抗体（Antibodies）、（コールド・スプリング・ハーバー研究所出版局、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1998）；細胞および分子生物学における免疫学的手法（Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology）（メイヤーおよびウォーカー編、アカデミック・プレス、ロンドン、1987）；実験免疫学ハンドブック（Handbook Of Experimental Immunology）、I-I V巻（D．M．ウェイヤーおよびC．C．ブラックウェル編、1986）；リオット、エッセンシャル・イムノロジー（Essential Immunology）、第6版、（ブラックウェル・サイエンティフィック出版、オックスフォード、1988）

10

20

30

40

50

；胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells)：方法と手順 (Methods and Protocols) (分子生物学の手法) (クルスタッド・ツルクセン編、2002)；胚性幹細胞のプロトコール (Embryonic Stem Cell Protocols)：I巻：単離と解析 (Isolation and Characterization) (分子生物学の手法) (クルスタッド・ツルクセン編、2006)；胚性幹細胞のプロトコール：II巻：分化モデル (Differentiation Models) (分子生物学の手法) (クルスタッド・ツルクセン編、2006)；ヒト胚性幹細胞のプロトコール (Human Embryonic Stem Cell Protocols) (分子生物学の手法) (クルスタッド・ツルクセン編、2006)；間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells)：方法と手順 (分子生物学の手法) (ダーウィンJ・プロコップ、ドナルドG・フィニー、およびブルースA・ブネル編、2008)；造血幹細胞のプロトコール (Hematopoietic Stem Cell Protocols) (分子生物学の手法) (クリストファーA・クルグ、およびクレイグT・ジョーダン編、2001)；造血幹細胞のプロトコール (分子生物学の手法) (ケビンD・ブンティン編、2008) 神経幹細胞 (Neural Stem Cells)：方法と手順 (分子生物学の手法) (レスリーP・ウェイナー編、2008)などを参照のこと。

10

【0118】

特段の定義がある場合を除いて、本明細書に記載の分子生物学、分析化学、合成有機化学、ならびに医学および薬学に関連する命名法および実験手順および技術は、当該技術分野においてよく知られており、かつ、一般的に使用されているものである。組換え技術、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、医薬品の調製、製剤化、送達、ならびに患者の治療に標準的な技術を使用することができる。

20

【0119】

文脈上他の意味に解釈すべき場合を除き、本明細書および特許請求の範囲を通して、「含む (comprise)」という単語およびその変化形、例えば、「含む (comprises)」および「含んでいる (comprising)」などは、「これに限定されない」と同様に、広く、包括的な意味で解釈される。「からなる (consisting of)」は、「からなる (consisting of)」という語句に続くものを含み、典型的にはそれらに限定されることを意味する。「本質的に～からなる (consisting essentially of)」とは、その語句の後に列挙される任意の要素を含み、列挙された要素に関する開示において定義された活動または作用に干渉しないかまたは寄与しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「本質的に～からなる」という表現は、列挙された要素が必須であるか、または要求されることを示しているが、列挙された要素の活動または動作に影響を及ぼすか否かに関わらず、その他の要素は要求されない、または存在してもしなくてもよいことを示している。

30

【0120】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形の「1つ (a)」、「1種 (an)」および「その (the)」は、内容からそうでないことが明らかでない限り、複数の参照物を含む。本明細書の特定の態様で使用されるように、数値の前にあるときの「約 (about)」または「およそ (approximately)」という用語は、その値プラスまたはマイナス5%、6%、7%、8%または9%の範囲の値が含まれることを示す。他の態様では、数値の前にあるときの「約」または「およそ」という用語は、その値プラスまたはマイナス10%、11%、12%、13%または14%の範囲の値が含まれることを示す。さらに他の態様において、数値の前にあるときの「約」または「およそ」という用語は、その値プラスまたはマイナス15%、16%、17%、18%、19%または20%の範囲の値が含まれることを示す。

40

【0121】

本明細書を通じて、「一態様」または「態様」または「ある局面」を参照することは、その態様に関連した特定の特徵、構造または特性が本発明の少なくとも1つの態様に含ま

50

れることを意味する。したがって、本明細書の様々な箇所に出現する「一態様において」または「態様において」という表現は、必ずしもすべて同じ態様を指しているとは限らない。さらに、特定の特徴、構造、または特性は、1つ以上の態様において、任意の適切な方法で組み合わせることができる。

【実施例】

【0122】

実施例1．人工的なペプチド組成物に対する二次インビトロT細胞応答によるライム病の検出および治療の有効性のモニタリング

この実施例では、個々のボレリア菌種タンパク質の領域に由来し、複数ペプチド混合物に含まれる特異的ペプチドが、LD患者から得られた活性型T細胞によるインビトロでのインターフェロン- γ 産生を誘導する能力を評価することについて説明する。特に、ボレリア菌種特異的ペプチドからなる混合物が、最初期のB．ブルグドルフェリ感染患者から得た血液試料中のライム病特異的活性型T細胞によるインビトロにおけるインターフェロン- γ 放出を誘導する能力について試験した。インビトロでのインターフェロン- γ 産生のレベルは、抗生物質治療の直前の第1の時点でLD患者から採取したT細胞、および患者を効果的に抗生物質で治療してから約60日後の第2の時点で採取したT細胞についてもまた測定した。

【0123】

[材料および方法]

ライム病特異的タンパク質ペプチドの選択および調製。ボレリア・フラジェリン(F1aB)、デコリン結合タンパク質(DbpB)、共通抗原(p66)および細胞表層タンパク質C(OspC)は、哺乳動物に感染すると、異なる時点でボレリア菌種の表面に豊富に発現する。具体的には、F1aBは、感染の播種後期および早期局期で多く発現する鞭毛の主要なフィラメントタンパク質である。DbpBはダニの摂食行動中および/または感染直後に発現が上昇し、感染の早期局期に現れるアドヘシンであり、そしてp66は免疫細胞への細菌付着を促進し、感染の蔓延後に発現するインテグリン結合タンパク質である。さらに、OspCの発現は早期局期に見られ、哺乳動物感染を確立するために必須であると考えられている。また、OspC特異的抗体は早期ヒトLDにおける主要な抗体である。ボレリア菌種F1aB、DbpB、p66およびOspCはそれぞれ、LDスピロヘータによる感染に反応して産生される抗体を検出するために信頼性をもって使用されている。

【0124】

これらのボレリアタンパク質(表2~3)の各々から選択されたボレリア特異的ペプチド領域を含むペプチドの混合物が、ライム病スピロヘータに感染した直後のLD患者から得た末梢血試料中のT細胞を活性化させる能力について評価した。LD関連T細胞を刺激可能性のあるペプチド組成物の特異性を高めるために、最初に、完全長タンパク質配列をBLASTアルゴリズムによって分析して、適切なボレリア特異的領域を同定した(表4)。次に、各タンパク質内の特異的領域から合成ペプチドを合成した。各ペプチドは約15~25アミノ酸長で、10~15個のアミノ末端が重複しているものとした(表3)。

【0125】

患者の登録。その後、ダニ曝露およびその後の紅斑性移行(EM)と一致する特徴を有する皮膚病変の発症を特徴とする初期のライム病が疑われる患者に、概念実証研究への参加を要請した。各ボランティアからインフォームド・コンセントを得て、各対象は、少なくとも10日間、1日2回100mgのドキシサイクリンでの治療を必要とする、ライム病の推定診断を得た。ただし、1人の対象(#6)だけは単回治療とした。

10

20

30

40

【表 4】

表 4. FlaB、BbpB、p66、およびOspC内の
ボレリア菌種特異的領域のアミノ酸配列。

FlaB, フラジェリン, パーシャル[ボレリア・ブルグドフェリ], ジェンバンク:ACI49679.1

NVRTAEELGM QPAKINTPAS LSGSQASWTL RVHVGANQDE	(51-90)	[配列番号 34]	
QDEAIAVNIYAANVANLFSG	(88-107)	[配列番号 35]	10
SLAKIENAIRMISDQRANL	(156-174)	[配列番号 36]	

DbpB(デコリン結合タンパク質 B), パーシャル[ボレリア・ブルグドフェリ], ジェンバンク:
AAC70029.1

SIVMVLFFDL LVACSIGLVE RTNAALESSS KDLKNKILKI KKEATGKGV LFEAFTGLKTG			
SKVTSGLLAL REAKVQAIVE TGKFLKIEE EALKLKETGN SGQFLAMFDL MLEVESLED			20
VGIIGLKARV LEESKNNPIN TAERLLAACA QIENQLKVVK EKQNIENGGE KKNKSKKKK	(1-180)	[配列番号 37]	

p66, 外部膜内在性タンパク質 p66[ボレリア・ブルグドフェリ B31], ジェンバンク:
AAC66949.1

FGLSGAYGNE TFNNSITYS LKDKSVVGNL LLSPTLSNSA ILASFGAKYK LGLTKINDKN			
TYLILQMGTD FGIDPFASDF SIFGHISKAA NFKKETPSDP NKKAEIFDPN GNALNFSKNT			30
ELGIAFSTGA SIGFAWNKDT GEKESWAIKG	(251-400)	[配列番号 38]	

OspC, 細胞表層タンパク質 C[ボレリア・ブルグドフェリ], ジェンバンク:ABQ42983.1

ATKAIGKKIQQNGGLAVEAGH	(55-75)	[配列番号 39]	40
KEMLANSVKELTSPI	(171-185)	[配列番号 40]	

【 0 1 2 6 】

血液試料の採取と処理。治療前（初期提示）および治療後 60 日間の通院中、血液試料を上部が緑色の（リチウム - ヘパリン）チューブに収集し、速やかに処理した。1本のチューブの血液は、遠心分離して血漿を分離し、分離した血漿を取り出し、試験まで - 80 で保存した。分離した 1 ml 容量の血液を、表 3 に示したボレリアペプチド（配列番号 1 ~ 33）を 1 μg ずつ含む、33種のボレリアペプチドのプール 10 μl 容量を予め装

填した滅菌発熱物質を含まないチューブ（セレスティス社、カーネギー、ピクトリア、オーストラリア）に直ちに移した。さらに、別の1ml容量の血液を、ペプチドを含まないか（nil）、またはマイトジェン対照を予め装填した分離チューブに加えた。各チューブの内容物をしっかりと混合し、37℃で18～24時間インキュベートした。

【0127】

インターフェロンの検出。インキュベーション後、3000×gで15分間遠心分離して、細胞を除去することで血漿を採取し、血漿中のインターフェロンのレベルを、QuantIFERON（登録商標）-TBGoldELISAキット（セレスティス社）を用い、製造業者の説明に従って、免疫化学的に定量した。QuantIFERON（登録商標）アッセイは、結核（TB）患者から得られた血液試料を、得られた二次インビトロ活性型T細胞（特定のマイコバクテリアへの暴露によって刺激されているT細胞）によって産生されたIFN- γ を検出することによって、結核菌の感染を確認するために確立された検定である。本明細書では、QuantIFERON（登録商標）プラットフォームを、結核菌の代わりに、B.ブルグドフェリへの感染に应答して活性化されたT細胞によって産生されたIFN- γ も検出するために使用した。血漿試料を評価する前に、有意な反応のカットオフ値を、ライム病の病歴または疑いがない8人のボランティア対象由来の血清を試験することにより、最初に決定した。血液を静脈穿刺により採血して凝血塊活性化管に入れ、血清を取り出して直ちに試験した。次いで得られた値の平均を計算し、平均値（0.452以上）より大きいOD値>2の標準偏差を有意（「a」）とした。

10

【0128】

LDの血清診断検査。一对（同じ対象からの治療前および治療後）の血漿試料について、抗C6抗体およびウエスタンブロット反応性についても試験した。抗C6抗体は、既に記載があるようにELISAによって検出した（Jobeら、2008、ボレリア・ブルグドフェリOspCのボレリア酸抗体エピトープを使用したペプチド-酵素結合免疫吸着アッセイによる初期ライム病診断の正確性に関する著しい改善（Significantly improved accuracy of diagnosis of early Lyme disease by peptide enzyme-linked immunosorbent assay based on the borrelia acid antibody epitope of Borrelia burgdorferi OspC.）、臨床およびワクチン免疫学（Clin Vacc Immunol）15：981-985）。評価の前に、有意な反応のカットオフ値を、LDの病歴または疑いがないボランティア対象由来の、十分に特徴が分かっている15の血清を試験することによって決定した。血液を静脈穿刺により採血して凝血塊活性化管に入れ、血清を取り出して直ちに試験した。得られた光学密度（OD）値の平均（平均IgM 0.534、IgG 0.140）を計算し、OD値>2の標準偏差を有意（「a」）とみなした。適切な陽性対照および正常対照血清も、ELISAプレート上の別々のウェルに含めた。

20

30

【0129】

市販のキット（マーブロット（Marblot）（商標）、トリニティ・バイオテック、プレー、ウィックロー、アイルランド）を用い、製造業者の推奨事項に従って、電氣的に分離したボレリア抗原に対する血清免疫グロブリンのウエスタンイムノブロット反応性を検出した（モギリアンスキら、2004、臨床および診断における実験免疫学（Clin Diag Lab Immunol）11：924）。疾病対策センター（CDC、アトランタ、ジョージア、米国）が推奨する基準（IgM-23、39または41のバンドのうちの少なくとも2本が検出される、IgG-18、23、28、30、39、41、45、58、66、または93のバンドのうちの少なくとも5本が検出される）を用い、陽性率を決定した。

40

【0130】

結果

研究コホート。合計21人の患者（18歳以上）が試験を完了した。それぞれの患者は

50

、シカダニ (*Ixodes scapularis*) に咬まれた形跡があるか調べられるか、または単一または複数の推定紅斑性移行部病変が検出される前の30日以内にダニ刺咬が確認された。そして、1日だけ抗生物質治療(ドキシサイクリン)を受けた対象#6を除き、それぞれの対象は、病気の早期段階でスピロヘータをうまく除去するためのおおよそ一般的な治療計画である(コワルスキラ、2010、臨床感染症50:512-520)、少なくとも10日間のドキシサイクリンによる治療を受けた。治療をさらに効果的なものにするための支援として、回復期の血液試料を提供する時点で各対象にインタビューしたが、異常を訴えた患者はいなかった。

【0131】

LDの血清診断検。最初に、各対象からの急性期および回復期の血清を、抗C6抗体またはウエスタンプロット反応性について評価して、各登録者がB.ブルグドルフェリに感染したことを血清診断によって確認した。10名(48%)の対象からの急性期血清には、有意なレベルのIgM抗C6抗体が含まれており、さらに2名の対象の血清が、回復期の間に抗体陽転した(表5)。加えて、12人(57%)の対象由来の急性血清にはIgG抗C6抗体が含まれており、IgG抗体を産生している8人の患者ではIgM抗体も産生されていた。さらに、有意なレベルのIgG抗体が、その他4人の対象(19%)の回復期血清で検出された。集団所見から、21人の登録者のうち17人(81%)において、ライム病の血清診断検査が提供された。

10

【0132】

対照的に、わずか2名(10%)の対象からの急性期血清が、B.ブルグドフェリ感染の確認に関する疾病管理センター(CDC)基準を満たすのに十分なIgM抗体反応性を示した(表6)。さらに、その他4人の対象において、60日後には応答が確認レベルまで(より反応性のIgMおよびIgGのバンド)上がった。ウエスタンプロットにより、21人の登録者のうち6人(29%)のみは、血清診断による確認が得られた。さらに、抗C6抗体が生成されなかった対象も、ウエスタンプロットによって陰性であった。4人(19%)の対象では、C6試験およびウエスタンプロットの結果を組み合わせても、LDの血清診断的確認が得られなかった。さらに意義深いことに、各試験手順によって検出された抗体のレベルは、LDスピロヘータが抗生物質療法によってほぼ確実に排除されたにもかかわらず、治療後の回復期血清において高いことが多かった。したがって、C6試験またはウエスタンプロット試験は、治療が成功しているかどうかを正確に予測するものだと信頼できるものではなかった。

20

30

【表 5】

表 5. 抗 C 6 抗体の検出による初期ライム病の血清診断検査。

対象	有意な抗-C6 抗体 ^a (+/-)				
	IgM		IgG		
	急性期	回復期	急性期	回復期	
1	+ (0.618)	- (0.512)	+ (0.196)	+ (0.441)	10
2	- (0.125)	- (0.264)	+ (0.175)	+ (0.761)	
3	+ (2.372)	+ (0.841)	+ (2.804)	+ (2.656)	
4	+ (0.839)	+ (0.991)	+ (1.329)	+ (1.719)	
5	- (0.245)	- (0.174)	- (0.028)	- (0.124)	
6	- (0.396)	- 0.438)	+ (0.226)	- (0.071)	20
7	+ (0.818)	+ (1.406)	- (0.036)	+ (1.734)	
8	+ (0.544)	+ (0.678)	+ (1.050)	+ (2.210)	
9	+ (1.980)	+ (0.718)	+ (2.922)	+ (2.540)	
10	- (0.532)	- (0.220)	- (0.074)	+ (0.801)	
11	- (0.505)	+ (0.698)	- (0.081)	+ (1.047)	
12	+ (0.534)	- (0.482)	- (0.065)	+ (0.249)	
13	- (0.236)	- (0.204)	+ (0.198)	- (0.133)	30
14	+ (0.599)	+ (0.309)	+ (0.863)	+ (0.172)	
15	- (.0209)	- (0.367)	- (0.067)	+ (0.236)	
16	+ (0.687)	+ (1.294)	+ (0.561)	+ (0.832)	
17	+ (1.883)	+ (1.273)	+ (3.399)	+ (3.872)	
18	- (0.308)	+ (0.372)	+ (3.212)	+ (3.226)	
19	- (0.302)	- (0.263)	- (0.000)	- (0.037)	
20	- (0.106)	- (0.143)	- (0.048)	- (0.052)	40
21	- (0.277)	- (0.272)	- (0.012)	- (0.042)	

【表 6】

表 6. ウェスタンブロッティングによる初期ライム病の血清診断検査。

対象	有意なウェスタンブロット反応性 ^a (+/-)				
	gM		IgG		
	急性期	回復期	急性期	回復期	
1	-	-	-	-(41)	
2	-	-	-	-(41)	
3	-(41)	-(41)	-(41)	-(41)	
4	-(41)	-	-(39, 41, 45)	-(39, 41)	
5	-	-	-	-(41)	10
6	-	-	-	-	20
7	-(23)	-(23)	-(41)	-(23, 39, 41, 45)	
8	-	-	-(41)	-(41, 58)	
9	+(23, 41)	+(23, 41)	-(23, 41, 45)	-(23, 41, 45)	
10	-(23)	+(23, 39, 41)	-(23, 41)	-(23, 39, 41)	
11	-	-(23)	-	-(23, 39, 41)	
12	-(23)	+(23, 41)	-	-	
13	-	-	-(41)	-(41)	30
14	-	-	-	-	
15	-	-(23)	-	-(23, 41)	
16	-(23)	+(23, 41)	-	-(23, 41)	
17	+(23, 39, 41)	+(23, 39, 41)	-(23, 39, 41)	-(23, 39, 41, 45)	
18	-(23)	-(23)	-(41, 45, 58)	+(18, 41, 45, 58, 66)	
19	-(23)	-(23)	-	-	
20	-	-	-(41)	-(41)	40
21	-	-	-	-	40

【0133】

ボレリアペプチドプールによる T 細胞刺激後のインターフェロンの検出。血清診断（前段を参照）により LD に罹患していることが確認された 17 名の対象から、疾患の急性期および回復期に採取した末梢血 T 細胞のインターフェロンのレベルを、表 2 に示す 33 のボレリアペプチドのプールを使用して、インビトロ刺激後に放出された IFN- γ の免疫検出によって決定した。抗体検査では、急性期血清の提供源となった 10 人（59%）の対象（表 5）のテストインキュベーション混合物において、有意なレベルのインターフェロン γ が検出された（表 7、急性、「+」）。さらに、その他の、回復期（表 7、

回復期)以降の対象ではインターフェロン 応答は検出されず、試料に含まれる抗体に関するC6およびウエスタンイムノブロット試験の所見とは対照的に、最初の10人の陽性患者でも、インターフェロン の応答は有意に減少した(n=4、表7、回復期、“+”)か、またはIFN- 応答はもはや検出不可能であった(n=6)。

【0134】

次いで、抗生物質治療後に採取された血液試料中に、検出可能に活性化されたT細胞が存在しないかどうか、つまり、そのようなLDの治療後のスピロヘータ除去を意味するかどうかの可能性を(ボレリアペプチドプールに反応するIFN- 放出に基づいて)検討した。この問題に対応するために、抗生物質治療の直前に検出されたインターフェロン- の反応性の平均値(図1、「治療前IFN- 」参照)を、治療後に検出されたインターフェロン- の反応性の平均値(図1、「治療後IFN- 」)と比較した。治療の投与および症状の臨床的な解消と一致して、反応性の平均値が有意に低下した(p値=0.0002)ことが認められた。これらの知見は、本明細書に開示のボレリアペプチドプールに対する二次インビトロ応答におけるT細胞によるインターフェロン- 産生を定量することが、疾患の初期段階においてLDを確認するのに有用であるという強力な証拠となった。さらに、活性化されたT細胞は、抗生物質療法によってスピロヘータが上手く除去されたのと同時に急速に減少した。このことは、抗生物質治療後に採取したT細胞により、本明細書に記載のボレリアペプチドプールに反応して、テストインキュベーション混合物中で生成された検出可能なIFN- のレベルの低下によって証明された。

【表 7】

表 7. LDであると診断が確定した患者における、ペプチドプールによる T細胞活性化後の IFN- γ の検出。

対象	有意な ^a IFN- γ (+/-)			
	急性期	回復期		
1	+ (1.164)	- (0)	10	
2	- (0)	- (0.064)		
3	+ (5.031)	- (0)		
4	- (0)	- (0)		
6	+ (3.860)	+ (2.611)		
7	+ (1.815)	- (0.159)		20
8	- (0.447)	- (0.019)		
9	+ (1.689)	+ (1.590)		
10	+ (0.784)	+ (0.460)		
11	+ (0.493)	- (0.116)		30
12	- (0.291)	- (0)		
13	- (0.329)	- (0)		
14	- (0)	- (0)		
15	+ (2.578)	- (0)		
16	+ (2.016)	- (0.105)		
17	- (0)	- (0)		
18	+ (10.609)	+ (1.12)		

【 0 1 3 5 】

上述の様々な態様を組み合わせて、さらなる態様を提供することができる。2015年9月25日に出願された米国特許出願第62/233,192号を含む、本明細書で言及するか、および/または出願データシートに列挙された全ての米国特許、米国特許出願公開公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。必要に応じて態様の局面を変更し、様々な特許、出願および刊行物の概念を使用して、さらに別の態様を提供することができる。

【 0 1 3 6 】

態様には、前述の詳細な説明に照らして、これらのおよびこの他の変更を行うことができる。一般に、以下の特許請求の範囲において使用される用語は、特許請求の範囲を、明細書および特許請求の範囲に開示した特定の態様に限定するものと解釈されるべきではなく、そのような特許請求が適用される、想定可能な全ての態様の均等物の全てを含むと解釈される。したがって、特許請求の範囲は本開示によって限定されるものではない。

10

20

30

40

【 図 1 】

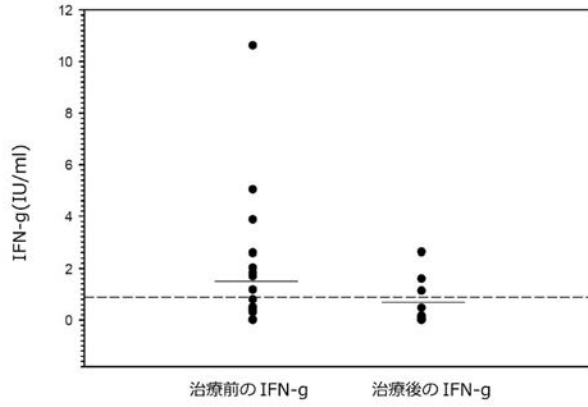


図 1

【 配 列 表 】

2018536429000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/051896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/569 C07K14/20 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHENGGANG JIN ET AL: "An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to <i>Borrelia burgdorferi</i> ", CELLS, vol. 2, no. 3, 13 September 2013 (2013-09-13), pages 607-620, XP055319150, DOI: 10.3390/cells2030607 abstract page 609, paragraph 3; figures 1-4 ----- -/--	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 November 2016		Date of mailing of the international search report 02/12/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van der Kooij, M

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/051896

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Chenggang Jin ET AL: "iSpot Lyme(TM): A New Generation of Lyme Disease Testing", ³ 1 April 2013 (2013-04-01), pages 120801-8009, XP055319210, Retrieved from the Internet: URL:http://www.functionalmedicineuniversity.com/iSpotLymePaper.pdf [retrieved on 2016-11-14] the whole document -----</p>	1-46
A	<p>David Marc ET AL: "Novel Laboratory Assessments for the Detection of Borrelia burgdorferi", ³ 1 January 2010 (2010-01-01), XP055135474, Retrieved from the Internet: URL:http://integrativewellness.org/Documents/Lyme White Papers.pdf [retrieved on 2014-08-20] page 2, column 1, paragraph 1 -----</p>	1-46
A	<p>US 2012/142023 A1 (ASCOLI CARL A [US] ET AL) 7 June 2012 (2012-06-07) claims 1-20; sequence 9 -----</p>	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/051896

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/051896

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012142023 A1	07-06-2012	US 2012142023 A1	07-06-2012
		US 2014308677 A1	16-10-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 14/20 (2006.01)	C 0 7 K 14/20	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

- (71)出願人 518099789
 ガンダーセン ルテラーン メディカル ファウンデーション インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 54601 ラクロス サウス アベニュー 1900 メール ストップ アレックス
- (74)代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
- (72)発明者 カリスター スティーヴン エム
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 54650 オナラスカ グランドヴィユ ブールヴァード 2050
- (72)発明者 ボイル ジェフ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 20874 ジャーマンタウン ジャーマンタウン ロード 19300 キアゲン サイエンス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
- (72)発明者 ミヤマ ミサト
 アメリカ合衆国 メリーランド州 20904 シルヴァー スプリング ノットリー ロード 1100
- (72)発明者 ダットワイラー レイモンド ジェイ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11733 イースト セタウキット ウッドハル ロード 18
- (72)発明者 アルナボルディ ポール エム
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12563 パターソン ジル コート 15
- Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QR48
 4B065 AA26X AB01 AC14 CA24 CA44 CA46
 4H045 BA17 BA18 CA11 DA75 DA76 EA50

专利名称(译)	用于预测莱姆病螺旋体去除以诊断莱姆病和治疗后的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2018536429A	公开(公告)日	2018-12-13
申请号	JP2018535813	申请日	2016-09-15
[标]发明人	カリスター スティーヴン エム ポイル ジェフ ミヤマス ミサト ダットワイラー レイモンド ジェイ アルナボルディ ポール エム		
发明人	カリスター スティーヴン エム ポイル ジェフ ミヤマス ミサト ダットワイラー レイモンド ジェイ アルナボルディ ポール エム		
IPC分类号	C12N15/31 G01N33/531 G01N33/569 C12Q1/02 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/20 C07K7/08		
CPC分类号	G01N33/569 G01N2333/20 G01N2800/52 Y02A50/57 G01N33/56911 G01N33/68 G01N2333/195 C07K14/20		
FI分类号	C12N15/31.ZNA G01N33/531.A G01N33/569.A C12Q1/02 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/20 C07K7/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	62/233192 2015-09-25 US		
其他公开文献	JP2018536429A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过肽接触的合成肽，其包含-T细胞从疏螺旋体的蛋白质含有表位的区域在莱姆病，从怀疑患有体外一个LD的受试者的全血样品的不同阶段表达，并且，响应于刺激莱姆病（LD）的检测，诊断和预后，包括通过确定产生的T细胞免疫应答指标（例如，干扰素- γ ）间接检测LD特异性活化的T细胞用于预测的组合物和方法。此外，来自经历LD治疗的LD患者的全血样品暴露于含有在莱姆病的不同阶段表达的疏螺旋体蛋白的特异性T细胞表位区域的肽和T细胞免疫应答指示物（例如，干扰素- γ ）不存在，我们还公开了一种预测接受LD治疗的LD患者中LD螺旋体去除的方法，证实样本中不包括疏螺旋体特异性活化的T细胞。

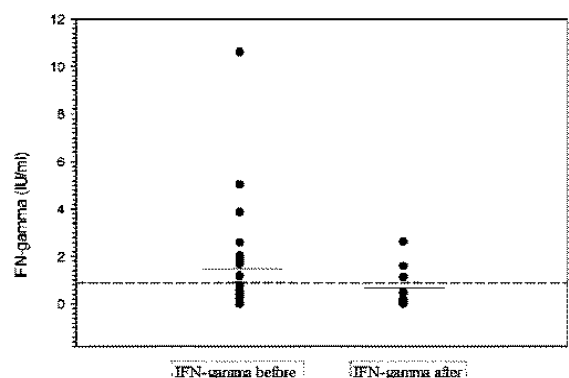


Figure 1