

(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2013-518563

(P2013-518563A)

(43) 公表日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/20 (2006.01)	C 0 7 K 14/20	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-551129 (P2012-551129)  
 (86) (22) 出願日 平成23年1月28日 (2011.1.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年9月27日 (2012.9.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2011/050090  
 (87) 国際公開番号 W02011/093783  
 (87) 国際公開日 平成23年8月4日 (2011.8.4)  
 (31) 優先権主張番号 61/360,986  
 (32) 優先日 平成22年7月2日 (2010.7.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/298,960  
 (32) 優先日 平成22年1月28日 (2010.1.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512197342  
 アンナ・ロサンデル  
 スウェーデン国 7 5 6 5 3 ウブサラ  
 , オルスティゲン 1 0  
 (71) 出願人 512197353  
 マリット・プリングル  
 スウェーデン国 7 4 1 9 2 クニヴス  
 タ, ボエングスパーイェン, ハッセルバッ  
 シェン  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100096013  
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンにおいて使用するための組換えタンパク質、前記タンパク質に対する抗体、ならびに該タンパク質を含む診断法および療法

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質および/またはその断片および誘導体、ならびにワクチンとしての、およびバイオテクノロジー法におけるその使用に関する。ワクチンには、特に、ウシにおける趾皮膚炎から単離されるトレポネマ属 (T r e p o n e m a ) 種における免疫原性タンパク質が含まれる。本発明はさらに、前記タンパク質またはその断片に対して作製される抗体、ならびに抗体がウシにおける趾皮膚炎の徴候として検出される診断法における前記タンパク質の使用にも関する。

【選択図】

なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応を誘導可能なその断片または誘導体、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能な断片または誘導体。

## 【請求項 2】

獣医学的医薬品において使用するための、請求項 1 記載のタンパク質、断片または誘導体。

## 【請求項 3】

トレポネーマ属 (*Treponema*) 種によって引き起こされる疾患、例えば趾皮膚炎の防止において使用するための、請求項 1 記載のタンパク質、断片または誘導体。

## 【請求項 4】

トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の治療または防止のための方法であって、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応を誘導可能なその断片または誘導体を、被験体に投与する工程を含む、前記方法。

## 【請求項 5】

トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患が趾皮膚炎である、請求項 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応を誘導可能なその断片または誘導体、および場合による薬学的に許容されうるアジュバント、キャリアーおよび/または希釈剤を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 7】

試料において、トレポネーマ属種由来のタンパク質に対する抗体の存在を検出するための方法であって：

- 前記試料を、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能なその断片または誘導体と接触させ；そして

- 前記タンパク質、断片または誘導体に結合する抗体を検出する

工程を含む、前記方法。

## 【請求項 8】

トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の *in vitro* 診断のための方法であって：

- 被験体由来の体液または組織の試料を得て；

- 前記試料を、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能なその断片または誘導体と接触させ；そして

- 前記タンパク質、断片または誘導体に結合する抗体を検出する；

ここで、前記タンパク質、断片または誘導体に結合する抗体の存在が、トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の指標となる

工程を含む、前記方法。

## 【請求項 9】

前記疾患が趾皮膚炎である、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質に特異的に結合する抗体、またはその結合性断片。

## 【請求項 11】

10

20

30

40

50

トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の治療または防止のための方法であって、請求項10記載の抗体を被験体に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項12】

トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患が趾皮膚炎である、請求項11記載の方法。

【請求項13】

試料からトレポネーマ属細菌を分離するための方法であって：

- 固相に結合した請求項10記載の抗体と、前記試料を接触させ；
- 前記抗体が、前記トレポネーマ属細菌中のトレポネーマ属タンパク質に結合するのを可能にし；そして
- 前記試料から前記固相を分離し

それによって、前記試料から前記トレポネーマ属細菌を分離する工程を含む、前記方法。

【請求項14】

前記分離が免疫磁気分離である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

請求項1記載のタンパク質、断片または誘導体をコードする核酸分子。

【請求項16】

配列番号1、配列番号3または配列番号5記載のヌクレオチド配列を有する、請求項15記載の核酸分子。

【請求項17】

請求項15または16記載の核酸分子、および場合によって宿主細胞における発現のための制御配列を含む、ベクター。

【請求項18】

請求項17記載のベクターを含むトランスジェニック宿主細胞。

【請求項19】

請求項1記載のタンパク質、断片または誘導体を産生するための方法であって：

- 適切な培地中で請求項18記載の宿主細胞を培養し；そして
- 前記培地から前記タンパク質、断片または誘導体を単離する

工程を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質および/またはその断片および誘導体、ならびにワクチンとしての、およびバイオテクノロジー法におけるその使用に関する。ワクチンには、特に、ウシにおける趾皮膚炎から単離されるトレポネーマ属 (*Treponema*) 種における免疫原性タンパク質が含まれる。本発明はさらに、前記タンパク質またはその断片に対して作製される抗体、ならびに抗体がウシにおける趾皮膚炎の徴候として検出される診断法における前記タンパク質の使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

趾皮膚炎 (DD) は、ウシにおける、最も一般的には集約的酪農生産において見られる、跛行を引き起こす感染性鉤爪疾患である。該疾患は、1974年、イタリアで最初に記載された。スウェーデンでは、最近、DDの最初の群れが記載された (Hillsstrom および Bergsten、2005) が、以前には、散発的な非定型の症例しか報告されてきていない (Manskeら、2002)。湿った/汚い鉤爪環境およびDDの発生の間に強い関連があり (Rodriguez-Lainzら、1996)、例えば通路 (alley) 上の糞便および尿の集積が典型的な衛生上の問題である小部屋 (cubicle) 系において強い関連がある。動物福祉の問題であることに加えて、ミルク産生減少および体重喪失による経済的な損失が、DDに関連付けられている (Losinge

10

20

30

40

50

r、2006)。

#### 【0003】

DD病変を抗生物質で処置すると迅速な反応があることから、細菌が原因であることが強く裏付けられる。異なる属の多くの細菌、例えばトレポネマ属、フゾバクテリウム属 (*Fusobacterium*)、ディケロバクター属 (*Dichelobacter*)、プレボテラ属 (*Prevotella*)、およびポルフィロモナス属 (*Porphyromonas*) がDD病変から単離され、そして原因が多微生物性であるとしばしば論じられる。しかし、DDの病因において、トレポネマ属種が主因である強い状況証拠がある。早くは1964年に、ウシの「腐蹄」徴候の異なる変種由来のスミアにおいて、スピロヘータ (*Spirochete*) が観察された (Guptaら、1964)。スピロヘータの別の初期観察は、1988年に行われ、これは、英国においてDDが記載された最初の例であった (BloweyおよびSharp、1988)。DDからの最初のスピロヘータ培養が1995年に報告された (Walkerら、1995)。DD病変由来の組織プレパラートにおいて、トレポネマが表皮のより深部の層に浸潤していることが見出されている (Moterら、1998)。さらに、感染したウシにおいて、トレポネマ属種に対する体液性免疫反応が立証されてきている (Walkerら、1997; Trotterら、2003)。DD病変からの新鮮な剥離物の接種を通じた疾患の実験的伝染の成功が1996年に記載された (ReadおよびWalker、1996)。接種1~2週間後に、スピロヘータが組織に浸潤することもまた、組織病理によって確認された (Readら、1998)。

10

20

#### 【0004】

トレポネマ属のいくつかの系統型が同じ病変中に存在する可能性もある。異なる系統型が同じ動物から単離されてきており (Walkerら、1995; Evansら、2008)、そして16S rRNA遺伝子のクローニングおよび配列決定によって、5つの異なる系統型が4頭のウシ由来のプール試料中で同定された (Choiら、1997)。DD病変由来の生検に対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって、皮膚における分布が系統型間で異なることもまた立証されてきている (Moterら、1998)。トレポネマ・ファゲデニス (*Treponema phagedenis*) 様系統型は主に、角質層および有棘層に位置した。いくつかの系統型は、いまだに培養されたとは報告されていない。最近、いくつかの研究において、トレポネマ・ファゲデニス様系統型は、DDの発病における重要な病原体であることが示されてきている (Klitgaardら、2008、Nordhoffら、2008、Yanoら、2009)。

30

#### 【0005】

DDが蔓延している国々では、抗生物質を含有するフットバスがしばしば用いられる。これらのフットバスは、迅速に糞便および汚れで汚染され、そしてしたがって、抗生物質耐性細菌の巨大選択培養物として機能する。スウェーデンにおいてはテトラサイクリンが用いられるが、個々の動物の局所治療に関してのみであり、これは、群れのレベルでは、硫酸銅を含むフットバスが推奨されているためである。

#### 【0006】

現在まで、DDに関する商業的なワクチンまたは血清学的試験は利用可能でない。トレポネマ属種に対する体液性反応は、DDに罹患したウシにおいて示されてきており、そして研究において、全細胞溶解物ELISA研究に用いられている (Demirkanら、1999、Trotterら、2003、Vinkら、2009、Walkerら、1997)。Novartisは、2000年代初期に数年間、USA市場用に全細胞溶解物DDワクチン (*TrepShield*) を製造した (Berryら、2004、Keilら、2002)。

40

#### 【0007】

ワクチン開発のための技術および戦略は、とりわけ、Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies (Caister Academic Press, 2011) および Vacc

50

ines: From Concept to Clinic: A Guide to the Development and Clinical Testing of Vaccines for Human Use (Informa Healthcare, 1998)に記載される。ワクチンとしての組換えタンパク質の使用は、Erdileら、1997に記載される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】HillstroemおよびBergsten、2005

【非特許文献2】Manskeら、2002

10

【非特許文献3】Rodriguez-Lainzら、1996

【非特許文献4】Losinger、2006

【非特許文献5】Guptaら、1964

【非特許文献6】BloweyおよびSharp、1988

【非特許文献7】Walkerら、1995

【非特許文献8】Moterら、1998

【非特許文献9】Walkerら、1997

【非特許文献10】Trottら、2003

【非特許文献11】ReadおよびWalker、1996

【非特許文献12】Readら、1998

20

【非特許文献13】Evansら、2008

【非特許文献14】Choiら、1997

【非特許文献15】Klitgaardら、2008

【非特許文献16】Nordhoffら、2008

【非特許文献17】Yanoら、2009

【非特許文献18】Demirkanら、1999

【非特許文献19】Vinkら、2009

【非特許文献20】Berryら、2004

【非特許文献21】Keilら、2002

【非特許文献22】Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies (Caister Academic Press, 2011)

30

【非特許文献23】Vaccines: From Concept to Clinic: A Guide to the Development and Clinical Testing of Vaccines for Human Use (Informa Healthcare, 1998)

【非特許文献24】Erdileら、1997

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

40

本発明は、動物における皮膚炎、特に反芻動物における趾皮膚炎の効率的な診断法および該皮膚炎に対する免疫保護、ならびに前記目的のための製品を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、ウシにおいて趾皮膚炎から単離されるトレポネーマ属種における免疫原性タンパク質、そしてより具体的には組換えタンパク質に関する。

第一の側面において、本発明は、以下にさらに定義するように、それぞれ配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を持つ単離トレポネーマ・ファゲデニス様タンパク質、TmpA、Ttm、およびPr r Aに関し、トレポネーマ属種に対する免

50

疫反応を誘導可能なその断片および誘導体に関し、そして前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能な断片および誘導体に関する。

【0011】

本発明の1つの態様において、トレポネーマ属タンパク質、ならびにその断片および誘導体は、組換え的に産生される。

1つの側面において、本発明は、本発明記載のタンパク質、断片および誘導体をコードする核酸分子に関する。

【0012】

本発明はまた、獣医学的医薬品における、特に、趾皮膚炎の防止のためのワクチンとしての、前記タンパク質、その断片および誘導体の使用にも関する。

さらなる側面において、本発明は、趾皮膚炎に対する保護のための獣医学的ワクチンであって、1またはそれより多い前記組換えタンパク質および/またはその活性断片、ならびに慣用的でそして適切なアジュバントを含む、前記ワクチンを提供する。こうしたワクチンには、さらに、より広い免疫反応のためのワクチンにおいて、他のトレポネーマ属疫原、または異なるトレポネーマ属種の全細胞溶解物がさらに含まれてもよいし、または含まれなくてもよい。

【0013】

別の側面にしたがって、本発明はまた、動物における趾皮膚炎の防止のための方法であって、前記ワクチンを投与する必要がある動物に前記ワクチンを投与する工程を含む、前記方法にも関する。

【0014】

さらにさらなる側面にしたがって、前記組換えタンパク質および/または活性断片が、前記試料中のトレポネーマ属種に対する抗体の存在を検出するのに用いられる、試料中のトレポネーマ属種に対する抗体の存在を検出する方法を提供する。

【0015】

さらにさらなる側面にしたがって、前記組換えタンパク質および/または活性断片が、動物中のトレポネーマ属種に対する抗体の存在を検出するのに用いられる、動物における趾皮膚炎の診断のための方法を提供する。

【0016】

前記検出法または診断法の1つの態様において、前記組換えタンパク質および/または活性断片が、ELISA(酵素連結免疫吸着アッセイ)法において用いられる。

1つの側面において、本発明は、前記免疫原性タンパク質、あるいはその免疫原性誘導体または断片に対して作製される抗体に関する。こうした抗体は、受動免疫による、トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の治療に有用であり、そしてまたトレポネーマ属種細菌の免疫磁気分離などの多様な実験法においてもまた有用である。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】トレポネーマ・ファゲデニス様株V1免疫原性タンパク質TmpA、Ttm、およびPrmAを抗原として用いた酵素連結免疫吸着アッセイ。該アッセイは、急性趾皮膚炎に罹患した8頭の乳牛(黒いバー)、趾皮膚炎の既知の病歴がない2頭の乳牛および6~7ヶ月齢の5頭の子ウシ(灰色のバー)由来の血清を用いて行われた。西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート化ウサギ抗ウシIgG抗体(Sigma)(A)またはモノクローナル22:26抗ウシIgG-HRP抗体(Svanova Biotech AB)(B)を二次抗体として用いた。補正光学密度(COD)を450nmで測定した。

【図1B】トレポネーマ・ファゲデニス様株V1免疫原性タンパク質TmpA、Ttm、およびPrmAを抗原として用いた酵素連結免疫吸着アッセイ。該アッセイは、急性趾皮膚炎に罹患した8頭の乳牛(黒いバー)、趾皮膚炎の既知の病歴がない2頭の乳牛および6~7ヶ月齢の5頭の子ウシ(灰色のバー)由来の血清を用いて行われた。西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート化ウサギ抗ウシIgG抗体(Sigma)(

10

20

30

40

50

A) またはモノクローナル 22 : 26 抗ウシ IgG - HRP 抗体 (Svanova Biotech AB) (B) を二次抗体として用いた。補正光学密度 (COD) を 450 nm で測定した。

【発明を実施するための形態】

【0018】

定義

「免疫原性物質」または「免疫原」は、場合によってアジュバントと組み合わせられて、患者に投与された際に、それ自体に対する免疫学的反応を誘導可能である。

【0019】

「活性断片」または「活性誘導体」は、本明細書において、場合によってアジュバントと組み合わせられて、患者に投与された際に、前記天然免疫原性物質に対する免疫学的反応を誘導可能な、天然免疫原性物質の断片または誘導体である。活性断片または誘導体は、少なくとも1つの「エピトープ」または「抗原決定基」を含むかまたは模倣する。

10

【0020】

「結合性断片」または「結合性誘導体」は、本明細書において、前記天然免疫原性物質に対する免疫反応において、被験体によって産生される抗体に免疫特異的に結合可能な、天然免疫原性物質の断片または誘導体である。結合性断片または誘導体は、少なくとも1つの「エピトープ」または「抗原決定基」を含むかまたは模倣する。

【0021】

タンパク質の「誘導体」は、元来のタンパク質に対する実質的な配列相同性を示すタンパク質であってもよい。配列相同性は、アミノ酸配列の50%同一性またはそれより大きく、例えば65%、80%、85%、90%、95%または99%同一性であってもよい。置換されるアミノ酸は好ましくは保存性置換である。置換されるアミノ酸は、天然または非天然アミノ酸であってもよい。

20

【0022】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、Bおよび/またはT細胞が反応する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、隣接するアミノ酸、またはタンパク質の三次フォールディングによって並置される非隣接アミノ酸の両方から形成可能である。隣接アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露に際して保持されるが、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒での処理に際して失われる。エピトープには、典型的には、ユニークな空間コンホメーションにある、少なくとも3、そしてより一般的には、少なくとも5または8~10アミノ酸が含まれる。エピトープの空間コンホメーションを決定する方法には、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris 監修 (1996) を参照されたい。

30

【0023】

同じエピトープを認識する抗体は、1つの抗体が、ターゲット免疫原、あるいはその断片または誘導体に対する別の抗体の結合を遮断する能力を示す、単純なイムノアッセイにおいて、同定可能である。

40

【0024】

用語「抗体」は、損なわれていない (intact) 抗体またはその結合性断片を指す。抗体は、完全抗体分子 (ポリクローナル、モノクローナルまたはキメラを含む) を含んでもよいし、またはその抗原結合性断片を含んでもよい。抗体断片には、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、Fv、Fc、およびFd断片が含まれ、そして単ドメイン抗体、一本鎖抗体、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ディアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NARおよびビス-scfv内に取り込まれていてもよい (例えば Hollinger および Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 を参照されたい)。

【0025】

50

## 配列表

【 0 0 2 6 】

【 表 1 】

配列番号	タイプ	説明
1	DNA	TmpA 相同体、完全コード配列
2	タンパク質	TmpA 相同体、タンパク質
3	DNA	推定上のテール・テープ測定タンパク質 (Ttm)、完全コード配列
4	タンパク質	推定上のテール・テープ測定タンパク質 (Ttm)、タンパク質
5	DNA	推定上のプロリンリッチ・リポタンパク質 (PrrA)、完全コード配列
6	タンパク質	推定上のプロリンリッチ・リポタンパク質 (PrrA)、タンパク質
7	DNA	GSTtmpAF1 (順方向)
8	DNA	GSTtmpAR1 (逆方向)
9	DNA	GSTkallaF1 (順方向)
10	DNA	GSTkallaR1 (逆方向)
11	DNA	GSTPGKEEF1 (順方向)
12	DNA	GSTPGKEER1 (逆方向)
13	DNA	ImpactPGKEEF1 (順方向)
14	DNA	ImpactPGKEER1 (逆方向)
15	DNA	ImpactkallaF1 (順方向)
16	DNA	ImpactkallaR1 (逆方向)
17	DNA	プライマーSAsekv

【 0 0 2 7 】

## 詳細な説明

本発明の側面および態様のさらなる概要

1つの側面において、本発明は、配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応を誘導可能なその断片または誘導體、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能な断片または誘導體に関する。前記タンパク質、断片または誘導體は、獣医学的医薬品において使用されてもよく、例えば、トレポネーマ属種によ

10

20

30

40

50

って引き起こされる疾患、例えば趾皮膚炎の防止において使用されてもよい。

【0028】

別の側面において、本発明は、トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の治療または防止のための方法であって、配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応を誘導可能なその断片または誘導体を、被験体に投与する工程を含む、前記方法に関する。前記方法は、趾皮膚炎などの疾患のために使用されてもよい。

【0029】

さらなる側面において、本発明は、配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応を誘導可能なその断片または誘導体、および場合による薬学的に許容されうるアジュバント、キャリアーおよび/または希釈剤を含む、薬学的組成物に関する。

10

【0030】

さらに別の側面において、本発明は、試料において、トレポネーマ属種由来のタンパク質に対する抗体の存在を検出するための方法であって：

- 前記試料を、配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能なその断片または誘導体と接触させ；そして

- 前記タンパク質、断片または誘導体に結合する抗体を検出する工程を含む、前記方法に関する。

20

【0031】

本発明のさらなる側面は、トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の *in vitro* 診断のための方法であって：

- 被験体由来の体液または組織の試料を得て；

- 前記試料を、配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質、あるいは前記タンパク質に対する免疫反応において被験体によって産生される抗体に結合可能なその断片または誘導体と接触させ；そして

- 前記タンパク質、断片または誘導体に結合する抗体を検出する；

ここで、前記タンパク質、断片または誘導体に結合する抗体の存在が、トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の指標となる

30

工程を含む、前記方法に関する。

【0032】

前記方法は、趾皮膚炎などの疾患のために使用されてもよい。

本発明のさらなる側面は、配列番号2、配列番号4または配列番号6記載のアミノ酸配列を有する単離タンパク質に特異的に結合する抗体、またはその結合性断片に関する。

【0033】

本発明の別の側面は、トレポネーマ属種によって引き起こされる疾患の治療または防止のための方法であって、前記抗体を被験体に投与する工程を含む、前記方法に関する。趾皮膚炎はこうした疾患の一例である。

【0034】

本発明のさらなる側面は、試料からトレポネーマ属細菌を分離するための方法であって：

- 固相に結合した前記抗体と、前記試料を接触させ；

- 前記抗体が、前記トレポネーマ属細菌中のトレポネーマ属タンパク質に結合するのを可能にし；そして

- 前記試料から前記固相を分離し

それによって、前記試料から前記トレポネーマ属細菌を分離する

工程を含む、前記方法に関する。

40

【0035】

前記方法において、分離は、例えば免疫磁気分離によって達成可能である。

50

本発明の別の側面は、本発明記載のタンパク質、断片または誘導体をコードする核酸分子に関する。1つの態様において、タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5およびその一部からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する。

【0036】

本発明のさらなる側面は、前記核酸分子、および場合によって宿主細胞における発現のための制御配列を含む、ベクターに関する。

本発明の別の側面は、前記ベクターを含むトランスジェニック宿主細胞に関する。

【0037】

本発明はまた、本発明記載のタンパク質、断片または誘導体を産生するための方法であって：

- 適切な培地中で本発明記載の宿主細胞を培養し；そして
- 前記培地から前記タンパク質、断片または誘導体を単離する

工程を含む、前記方法にも関する。

【0038】

詳細

ショットガン・ファージディスプレイを用いて、*T. ファゲデニス*に緊密に関連するDDトレポネーマ属系統型の単離体(V1)における3つの免疫原性タンパク質を同定した。この系統型は、DDの発病における重要な病原体であることがいくつかの研究において示されてきている(Klitgaardら、2008、Nordhoffら、2008、Yanoら、2009)。ファージ・ライブラリーは、生きた細菌で免疫したウサギ由来の抗体に対して選択された。

【0039】

梅毒トレポネーマ亜種パリダム(*T. pallidum subsp. pallidum*)のよく性質決定された免疫原性タンパク質Tm p Aに対する相同体、ならびにいかなる既知のスピロヘータ・タンパク質にも相同性を持たない2つのタンパク質が同定された。454 Sequencing<sup>TM</sup>によって生成されたV1のゲノム配列から、これらのタンパク質の完全アミノ酸配列を予測した。3つの特異的免疫原性タンパク質、およびそのアミノ酸配列は、配列番号2、4および6に記載される。

【0040】

本発明の第一の側面記載のタンパク質、断片および誘導体は、*T. ファゲデニス*株V1に緊密に関連するトレポネーマ属系統型の培養物から単離されるか、または好ましくは以下に記載するように組換え的に産生されてもよい。

【0041】

ウェスタンブロットを行って、免疫したウサギ由来の抗体ならびに天然感染したウシ由来の抗体の両方が、組換え的に産生されたTm p A相同体およびT t m断片に結合することを示した。

【0042】

パイロットELISA実験を行い、そしてDDに罹患したおよびしていないウシ由来の血清間で、吸光度における相違が記録されてきている(表1)。単一抗原(Tm p A相同体またはT t m断片)を用いると、健康群および感染群の結果間にはわずかな重複しかなく、そして2つの抗原の組み合わせを用いると、重複はなかった。

【0043】

本発明記載の免疫原性タンパク質、およびその活性断片を、*T. ファゲデニス*に緊密に関連するトレポネーマ属系統型または他のトレポネーマ属種によって少なくとも部分的に引き起こされる疾患に対するワクチンにおいて使用してもよい。

【0044】

特定の態様において、完全タンパク質がワクチンにおいて用いられる。特定の態様において、適切なエピトープを含む断片のみが用いられる。特定の態様において、1またはそれより多いタンパク質の1またはそれより多いエピトープが単一の分子に組み合わせられ、

10

20

30

40

50

そしてワクチンにおいて用いられる。組換えタンパク質、その誘導体または断片は、したがって、単独で、または異なる組み合わせで、または結合性エピトープの融合タンパク質として用いられうる。

#### 【実施例】

#### 【0045】

##### 方法

ヘルパーファージ、細菌株、増殖条件、およびDNA技術

ファージR408 (Promega)をヘルパー・ファージとして用いた。ファージまたはファージミドが関与するすべての実験において、大腸菌 (*Escherichia coli*) TG1 (lac-proAB) (mcrB-hsdSM)5 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>-</sup>) thi-1 supE [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup> Z M15] ; Stratagene)を宿主として用い、そしてLuria-Bertaniプロス(LB)中、またはLuria-Bertani寒天(LA)上で増殖させた。適切な場合、50 μg/mlアンピシリン(C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SNa、Roche)を添加した。インキュベーションは37 °Cであった。ファージライブラリーの構築のため、トレポネマ属種株V1由来の染色体DNAを用いた。嫌気性ジャー中、振盪装置(90 rpm)上で、FABGS(1リットルあたり2.0g D-グルコースおよび25%ウシ胎児血清、S0115、Biochrom AG、ドイツを含む、偏好性嫌気性細菌プロス、LAB 71、LabM、英国ランカシャー州)を含むフラスコ中、37 °Cでインキュベーションし、トレポネマ属株を増殖させた。プロス培養物を等張生理食塩水(pH 6.3)で3回洗浄し、その後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH 7.3)で1回洗浄した。慣用的なフェノール-クロロホルム抽出によってトレポネマ属DNAを調製した。制限酵素および修飾酵素は、MBI Fermentas AB由来であり、そしてこれらを製造者の指示にしたがって用いた。QIAprep<sup>TM</sup> Miniprep(QIAGEN)を用いて、プラスミドを調製した。

10

20

#### 【0046】

免疫およびポリクローナル抗体の精製

研究のこの部分は、ウブサラにおける動物実験に関する倫理委員会によって認可された(C300/8)。ニュージーランドホワイト・ウサギを、トレポネマ属種株V1の生菌培養物で皮下免疫した。2回洗浄し、そして0.5 ml体積の等張生理食塩水中に分配したおよそ10<sup>9</sup>細菌の用量を20日おいて2回注射した。最初の免疫の38日後の最終出血由来の血清を、この研究のための抗体(IgG)の精製に用いた。0.45 μmシリンジフィルターを通じて10 mlの血清を滅菌ろ過し、そして5 ml HiTrap<sup>TM</sup> プロテインG HPカラム(GE Healthcare)上に適用した。Ab緩衝液キット(GE Healthcare)を用いて、製造者の指示にしたがって、ウサギIgGを精製した。Zebaスピン脱塩カラム(Pierce)を用いて、精製抗体の溶出物を脱塩し、そしてマイナス20 °C、PBS中で保存した。

30

#### 【0047】

トレポネマ属種ファージディスプレイライブラリーの構築および結合性ファージの選択(パニング)

pG8SAETファージミドベクター中で、ファージライブラリーを構築した。大部分の断片が長さ0.4~1.5 kbになるまで、トレポネマ属種株V1染色体DNAを超音波処理によって断片化した。T4 DNAポリメラーゼおよびT4 DNAキナーゼ処理によって、断片を平滑端化し、そして次いで、Ready-To-Go<sup>TM</sup> T4 DNAリガーゼ試験管(GE Healthcare)を用いて、SnaB1消化しそして脱リン酸化したファージミドベクターpG8SAET内に連結した。連結した物質を大腸菌TG1細胞に電気形質転換し(2.5 kV、25 μF、360 μs)、ヘルパーファージを用いて感染させ、そしてファージ粒子を増殖させることによって、最終ライブラリーを生成した。この方法は、ユニークなクローンと見なされる、4 x 10<sup>7</sup>形質転換体を生じ、14のランダムに選択されたクローンに対するコロニーPCRによって決定すると、こ

40

50

のうち86%が挿入物を所持した。最終ライブラリーは、1mlあたり、 $1 \times 10^{11}$ コロニー形成単位の力価を有した。

#### 【0048】

ウサギ抗トレポネーマ属種株V1 IgGに対するパニングによって、免疫原性ポリペプチドをディスプレイするファージを単離した。3回のパニング実験を行った。マイクロウェル(MaxiSorp<sup>TM</sup>、Nalge Nunc International)を、200 $\mu$ lの50mM炭酸ナトリウム、pH9.5中、10 $\mu$ gの濃度のZymed組換えプロテインG(Invitrogen)でコーティングした。その後、0.05% Tween20を含むリン酸緩衝生理食塩水pH7.4(PBS-T)でウェルをブロッキングした。ウサギ抗トレポネーマ属種株V1 IgGを200 $\mu$ l PBSまたは100 $\mu$ l PBS+100 $\mu$ l未精製大腸菌溶解物(ブロッキング用)中、85または215 $\mu$ gの濃度で添加した。洗浄後、200 $\mu$ lのファージライブラリーを添加した。ウェルを室温で3時間または2で一晚インキュベーションし、その後、これらを25回洗浄した後、50mMクエン酸Na/140mM NaCl pH2.0を添加することによって、ファージを溶出させた。2M Tris緩衝液pH8.0で溶出物を直ちに中和し、そしてアンピシリンを含むLAプレート(LAamp)上にプレATINGした大腸菌TG1を感染させるのに用いた。1つのパニング実験において、ウェルに添加したTG1細胞を、結合したファージによって直接感染させることによってまた、溶出を行った。一晚インキュベーションした後、コロニーを計数し、そして100のコロニーをLAampプレートに移した。次いで、マウス抗E-タグ抗体(GE Healthcare)および西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識した二次ヒツジ抗マウス抗体(GE Healthcare)を用いたE-タグ発現のスクリーニングのために、これらのコロニーをニトロセルロース・フィルターにトランスファーした。残ったコロニーをプレートから洗い流し、そしてヘルパーファージで重感染させて、濃縮ライブラリー/ファージストックを作製し、同じプロトコルにしたがって、これを二次濃縮サイクル(再パニング)において用いた。全部で2回の再パニングを行った。プラスミド調製およびプライマーSasekv(5'-TATCTGGTGGGCGTAA CACCTGCT-3'、配列番号17)を用いた挿入物の配列決定のため、200を超えるE-タグ陽性コロニーを選択した。ウブサラ・ゲノム・センターで、3730x1 DNA分析装置(Applied Biosystems)上、プラスミドDNAを配列決定し、そしてCLC Main Workbenchソフトウェア(CLC bio)で分析した。挿入物の分析によって、3つの異なる遺伝子から、それぞれ、9、9、および8の重複する部分配列が明らかになった。

#### 【0049】

##### ゲノム配列決定および配列分析

トレポネーマ属種株V1の染色体DNAを配列決定し、そしてロングリードGS FLXチタン化学反応および454新規アセンブリー装置、Newbler(454 Life Sciences、米国コネチカット州ブランフォード)とともに、ゲノム配列決定装置FLX系を用いて、KTH王立工科大学のKTHゲノムセンター、スウェーデン・ストックホルムでアセンブリーした。CLC Genomics Workbench 3(CLC bio)を用いて読み取り配列のさらなる新規アセンブリーを行い、そしてさらなる配列編集のため、CLC Main Workbench 5(CLC bio)を用いた。

#### 【0050】

ゲノム配列を用いて、3つの免疫原性タンパク質の全長オープンリーディングフレームおよび対応するアミノ酸配列を予測した。National Center for Biotechnology InformationのBLASTアルゴリズムを用いて、相同性検索を行った。シグナルペプチドの予測には、グラム陽性データを含むSignalP 3.0サーバーを用いた。1つのタンパク質は、Setubalら、2006にしたがって、リポタンパク質と予測された。

10

20

30

40

50

## 【0051】

タンパク質発現および精製のためのクローンの構築

グラム陰性細菌用のプロトコルにしたがって、DNeasy血液および組織キット(QIAGEN)を用いて、PCR用のゲノム・トレポネーマ属種株V1 DNAを調製した。MgSO<sub>4</sub>を含む10X Pfu緩衝剤(Fermentas)5 μl、各0.2 mMのデオキシヌクレオチド、表2に示すような0.2 μMの順方向および逆方向プライマー、1.25 U Pfu DNAポリメラーゼ(Fermentas)および50 ngゲノムDNAの50 μl反応混合物を調製した。熱サイクリング条件は、95 1分間、30周期の95 30秒間、50 30秒間および72 3分間、ならびに72 5分間の最終伸長であった。アガロースゲル電気泳動によってPCR産物を分析し、そしてillu 10  
stra GFX PCR DNAおよびゲルバンド精製キット(GE Healthcare)を用いて精製した。製造者の指示(Fast digest, Fermentas)にしたがって、精製アンプリコンを、BamHIおよびXhoIまたはNdeIおよびSapIのいずれかで消化し、そして先に記載するように精製した。消化アンプリコンを、Ready To Go T4 DNAリガーゼ(GE Healthcare)を用いて、それぞれのベクター、BamHIおよびXhoIで消化したpGEX-6P-1(バルクGST精製モジュール、GE Healthcare)またはNdeIおよびSapIで消化したpTXB1(IMPACT<sup>TM</sup>キット、New England Biolabs)内に連結した。連結した材料を、コンピテント大腸菌株BL21(DE3)(GST)またはER2566(IMPACT)内に電気形質転換し、そしてアンピシリン(最終濃度50 μg/ml)を補充したLA上にスプレッドした。ベクター配列決定プライマーを用いたPCRによって、多くのコロニー中の挿入物の存在を分析した。DNA配列決定によって、正しいサイズの挿入物を持つクローンをさらに分析した。 20

## 【0052】

組換え免疫原性トレポネーマ属タンパク質の産生

組換え免疫原性トレポネーマ属タンパク質の産生のため、製造者の指示にしたがって、商業的に入手可能なタンパク質発現および精製系、例えばバルクGST精製モジュール(GE Healthcare)またはIMPACT<sup>TM</sup>キット(New England Biolabs)を用いた。アンピシリン(最終濃度50 μg/ml)を補充したLB培地中、37 で、組換えクローンを増殖させた。光学密度(OD<sub>600nm</sub>)~0.6 30  
の際、増殖培地にIPTG(最終濃度0.3 mM)を補充し、そして増殖温度を20 にシフトした。一晚インキュベーションした後、細胞を採取し、そして緩衝液[20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、500 mM NaCl、0.1 mM EDTA、および0.05% (v/v) TWEEN 20]中に再懸濁し、そして凍結融解によって溶解した。遠心分離後、上清を滅菌ろ過し、そしてキチンカラム上に適用した。同じ緩衝液を用いてカラムを徹底的に洗浄し、そして続いて切断緩衝液[20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、50 mM NaCl、0.1 mM EDTA、および30 mM ジチオスレイトール(DTT)]で処理した。抗原を含有する溶出試料を、リン酸緩衝生理食塩水[PBS; 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4)]に対して透析した。 40

## 【0053】

GST-グルタチオン・アフィニティ系において、上記方法にしたがって、増殖、誘導および採取後、最終濃度0.1% (v/v) TWEEN 20を補充したPBS(PBST)中に大腸菌細胞を懸濁したら、凍結融解によって細胞を溶解した。遠心分離後、上清を滅菌ろ過し、そしてグルタチオン-セファロース・ビーズでバッチ精製した。PBSTを用いて徹底的に洗浄した後、グルタチオン溶出緩衝液で融合タンパク質を溶出させるか、またはscissorsプロテアーゼで処理して、生じたタンパク質を放出させた。最後に、分光光度測定を用いて、得られた抗原の量を決定し、そしてSDS-PAGEクーマシー染色によって品質を分析した。最後にタンパク質を-20 で保存した。

## 【0054】

10

20

30

40

50

### 酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA)

ELISAにおいて、全細胞溶解物に比較して、大腸菌で組換え的に産生された精製タンパク質を用いる利点は、大規模産生の可能性があり、そして試験が最適化されることである(タンパク質の異なる組み合わせを用いると、しばしば、特異性がより高くなるため、バックグラウンドがより低くなる)。趾皮膚炎(DD)に罹患したおよびしていないウシ由来の血清、ならびに免疫したウサギ(上記)由来の血清を用いて、最初のELISA試験を行った。マイクロプレート(PolySorp<sup>TM</sup>、Nalge Nunc International)を、100 $\mu$ lの50mM炭酸ナトリウム、pH9.5中、それぞれ2.5 $\mu$ gおよび/または0.31 $\mu$ gの濃度で、組換えTnpA相同体および/または組換えテール・テープ測定タンパク質断片で、2で一晚、コーティングした。0.05% Tween 20を含む400 $\mu$ lのリン酸緩衝生理食塩水、pH7.4(PBS-T)で、ウェルを2回洗浄した。その後、PBS-Tで、室温で1時間、ウェルをブロッキングした。100 $\mu$ lの血清またはPBS-Tを各ウェルに添加した。各血清の4つの希釈、1:25、1:50、1:100、および1:200を用いた。マイクロプレートを37で1時間インキュベーションし、そして次いで、400 $\mu$ l PBS-Tで3回洗浄した。それぞれ1:4000および1:500希釈した西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ・コンジュゲート化ブタ抗ウサギ(Dako)およびウサギ抗ウシ(Dako)抗体を適切なウェルに添加し、そしてプレートを37で1時間インキュベーションした。400 $\mu$ l PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、1:20で混合した20mMテトラメチルベンジジン(TMB)と0.1Mクエン酸カリウム/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(230 $\mu$ l/l)pH4.25からなる100 $\mu$ l溶液を添加した。プレートを室温で10分間インキュベーションした。反応を停止するため、50 $\mu$ lの10%硫酸を添加した。光学密度(OD)を450nmで測定し、そして読み取り値を試料緩衝液ブランクに対して補正した。

10

20

30

40

50

### 【0055】

#### 抗体を用いた免疫磁気分離

トレポネマ属種は、増殖のために複雑な培地および嫌気性環境を必要とする偏好性生物である。さらに、ウシ鉤爪由来の試料は、培養を汚染させる大量の他の細菌を有する。培養およびDNA単離のためにトレポネマ属種を濃縮しそして精製するオプションは、免疫磁気分離である(Demirkanら、1999、Demirkanら、2001、Choiら、1996)。例えば前記免疫原性タンパク質、その誘導体または活性断片に対して作製されたウサギ抗体とカップリングされた抗ウサギIgGで共有的にコーティングされた免疫磁気ビーズを、T.ファゲデニスに緊密に関連するDDトレポネマ属系統の特異的分離に用いてもよい。

### 【0056】

#### ワクチン

免疫系を刺激して抗体を産生させる細菌タンパク質はまた、ワクチン開発にも使用可能である。組換えタンパク質を免疫刺激複合体(ISCOM)および/または全細胞溶解物と組み合わせて、動物における免疫反応を、そしてしたがって、疾患原因物質(単数または複数)に対する保護を増加させることも可能である。

### 【0057】

#### 行ったさらなる実験

#### 酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)

材料および方法: Tpl株V1が単離された群れからの、急性DDに罹患した8頭の乳牛、既知のDDの病歴がない別の群れからの2頭の乳牛、および6~7ヶ月齢の5頭の子ウシ由来の血清を用いてアッセイを行った。趾皮膚炎診断は、視覚的検査によって行われた。マイクロプレート(PolySorp<sup>TM</sup>、Nalge Nunc International)を、100 $\mu$ lの50mM炭酸ナトリウム、pH9.5中、1 $\mu$ g/ml TnpA、0.8 $\mu$ g/ml Ttmまたは0.02 $\mu$ g/ml Pr r Aの濃度の組換えタンパク質で、2で一晚コーティングした。PBS-Tでウェルを2回洗浄し、そしてPBS-Tで、室温で1時間、ブロッキングした。PBS-T中で1:100希釈し

た171の100 $\mu$ l血清を各ウェルに添加した。マイクロプレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションし、そして次いでPBS-Tで洗浄した。1:8000希釈した西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート化ウサギ抗ウシIgG抗体(Sigma)または1:4000希釈したモノクローナル22:26抗ウシIgG-HRP抗体(Svanova Biotech AB)をウェルに添加し、そして37 $^{\circ}$ Cで1時間、プレートをインキュベーションした。PBS-Tでウェルを3回洗浄し、その後、0.1Mクエン酸カリウムpH4.25中の1mMテトラメチルベンジジンおよび0.006%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>からなる100 $\mu$ l溶液を添加した。プレートを室温で10分間インキュベーションした。反応を停止するため、50 $\mu$ lの10%硫酸を添加した。光学密度を450nmで測定し、そして読み取り値から試料緩衝液ブランクの光学密度を減じて、補正光学密度(COD)を生じた。

10

## 【0058】

結果：Tp1株V1で同定された3つの免疫原性タンパク質を組換え的に産生した；予測されるリポタンパク質シグナルペプチドのシステイン残基に対してaa+1から停止コドン前の最後のaaまでの全長成熟タンパク質としてのPr r A (aa : s 22 ~ 251)、予測されるリポタンパク質シグナルペプチドのシステイン残基に対してaa+7から停止コドン前の最後のaaまでのT m p A (aa : s 29 ~ 344)、およびパニング実験由来の重複T t m配列のコンセンサス配列を構成するaa : sであるaa : s 689 ~ 970を含む部分的ポリペプチドとしてのT t m。これらのタンパク質/ポリペプチドを、間接ELISAにおける抗原として用い、ここでDDに罹患したおよびしていないウシ由来の血清試料を、抗原に対する抗体の存在に関して分析した。異なる濃度の抗原、血清、および二次抗体をパイロット実験において試験した(データ未提示)。DDに罹患したおよびしていないウシの間の最適な区別を達成する条件を、最終実験で用いた。T m p A抗原に関して、DDに罹患したウシ由来の3つの試料に関する光学密度は、臨床的に健康な269頭のウシ由来の試料に関する最高値よりも低く、一方、T t mおよびPr r Aを用いた試験は、1つを除きすべての場合で識別力があつた(図1AおよびB)。

20

## 【0059】

【表 2】

タンパク質/タンパク質断片	DD に罹患していないウシ (OD, 450 nm)					DD に罹患したウシ (OD, 450 nm)										
	1670	1680	242	243	245	246	251	5510	RK	SK	413	571	1004	2326	5542	6437
TempA 相同体	1.23	1.06	1.28	0.91	1.31	0.75	0.73	2.55	1.25	1.7	2.18	2.26	2.44	1.82	2.96	3.15
推定上のテール・テープ測定タンパク質断片	1.30	1.47	1.08	1.20	1.59	0.75	0.70	2.14	1.66	1.91	1.61	1.86	2.06	1.76	1.74	1.56
TempA 相同体 + 推定上のテール・テープ測定タンパク質断片	1.36	1.23	0.63	0.90	0.91	0.83	0.60	2.47	1.83	1.84	1.40	1.73	2.17	1.87	2.65	2.03

【 0 0 6 0 0 】

10

20

30

40

50

表 1 . 趾皮膚炎 ( D D ) に罹患したおよびしていないウシ由来の血清の最初の E L I S A 試験。450 nm で光学密度 ( O D ) を測定し、そして試料緩衝液ブランクに対して読み取り値を補正した。血清を 1 : 100 に希釈し、T m p A の濃度は 2 . 5 μ g / ウェルであり、そして推定上のテール・テープ測定タンパク質断片の濃度は 0 . 31 μ g / ウェルであった。

【 0 0 6 1 】

【 表 3 】

配列番号	順方向および逆方向プライマー対の名称	配列、各プライマーの 5' から 3'。制限酵素切断部位を太字で示す
7 8	GSTtmpAF1 (順方向) GSTtmpAR1 (逆方向)	GGT GGT <b>GGA TCC</b> AAA GCG GAA CAA GAA GCT CA GGT GGT <b>CTC GAG</b> TCA TTG TAC ACC TCC CTC TA
9 10	GSTkallaF1 (順方向) GSTkallaR1 (逆方向)	GGT GGT <b>GGA TCC</b> AAG AAA GAG CTG TTA GAT TT GGT GGT <b>CTC GAG</b> TTA TTT ATC AAT TTC TGC CAA
11 12	GSTPGKEEF1 (順方向) GSTPGKEER1 (逆方向)	GGT GGT <b>GGA TCC</b> CAA GGT CCA GCT AAC CCC ACA GGT GGT <b>CTC GAG</b> TTA GAG CTT CTC TAG CAC AAA
13 14	ImpactPGKEEF1 (順方向) ImpactPGKEER1 (逆方向)	GGT GGT <b>CAT ATG</b> CAA GGT CCA GCT AAC CCC ACA GGT GGT <b>TGC TCT</b> TCC GCA GAG CTT CTC TAG CAC AAA
15 16	ImpactkallaF1 (順方向) ImpactkallaR1 (逆方向)	GGT GGT <b>CAT ATG</b> AAG AAA GAG CTG TTA GAT TT GGT GGT <b>TGC TCT</b> TCC GCA TTT ATC AAT TTC TGC CAA

10

20

【 0 0 6 2 】

表 2 : デオキシオリゴリボヌクレオチド

参考文献

【 0 0 6 3 】

## 【化 1 - 1】

- Berry, S.L., Ertze, R.A., Read, D.H., Hird, D.W., 2004, Field evaluation of prophylactic and therapeutic effects of a vaccine against (Papillomatous) Digital Dermatitis of dairy cattle in two Californian dairies. In: Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Symposium and Conference on Lameness in Ruminants, Maribor, Slovenija, p. 147.
- Blowey, R.W., Sharp, M.W., 1988. Digital dermatitis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 122, 505-508.
- Choi, B.K., Wyss, C., Gobel, U.B., 1996, Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. *J Clin Microbiol.* 34, 1922-1925. 10
- Choi, B.K., Nattermann, H., Grund, S., Haider, W., Göbel, U.B., 1997. Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 175-181.
- Demirkan, I., Carter, S.D., Hart, C.A., Woodward, M.J., 1999. Isolation and cultivation of a spirochaete from bovine digital dermatitis. *Vet. Rec.* 145, 497-498.
- Demirkan, I., Walker, R.L., Murray, R.D., Blowey, R.W., Carter, S.D., 1999, Serological evidence of spirochaetal infections associated with digital dermatitis in dairy cattle. *Vet J.* 157, 69-77. 20
- Demirkan, I., Carter, S.D., Winstanley, C., Bruce, K.D., McNair, N.M., Woodside, M., Hart, C.A., 2001, Isolation and characterisation of a novel spirochaete from severe virulent ovine foot rot. *J Med Microbiol.* 50, 1061-1068.
- Erdile LF, Guy B. OspA lipoprotein of *Borrelia burgdorferi* is a mucosal immunogen and adjuvant Vaccine. 1997 Jun;15(9):988-96. 30
- Evans, N.J., Brown, J.M., Demirkan, I., Murray, R.D., Vink, W.D., Blowey, R.W., Hart, C.A., Carter, S.D., 2008. Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet. Microbiol.* 30, 141-50.
- Gupta, R.B., Fincher, M.G., Bruner, D.W., 1964. A study of the etiology of foot-rot in cattle. *Cornell Vet.* 54, 66-77.
- Hillström, A., Bergsten, C., 2005. Digital dermatitis - a new infectious foot disease in Swedish dairy cattle. *Svensk Vet. Tidn.* 57, 15-20. 40
- Keil, D.J., Liem, A., Stine, D.L., Anderson, G.A., 2002, Serological and clinical response of cattle to farm specific digital dermatitis bacterins. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Symposium on Lameness in Ruminants, Orlando, FL, USA, p. 385.

## 【 0 0 6 4 】

【化 1 - 2】

- Klitgaard, K., Boye, M., Capion, N., Jensen, T.K., 2008, Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. J Clin Microbiol. 46, 3012-3020. Epub 2008 Jun 3018.
- Losinger W.C., 2006. Economic impacts of reduced milk production associated with papillomatous digital dermatitis in dairy cows in the USA. J. Dairy Res. 73, 244-256. 10
- Manske, T., Hultgren, J., Bergsten, C., 2002. Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel-horn erosion in a Swedish dairy herd. Prev. Vet. Med. 53, 215-231.
- Moter, A., Leist, G., Rudolph, R., Schrank, K., Choi, B.K., Wagner, M., Göbel, U.B., 1998. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. Microbiology 144, 2459-2467.
- Nordhoff, M., Moter, A., Schrank, K., Wieler, L.H., 2008, High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis-a molecular epidemiology. Vet Microbiol. 131, 293-300. 20  
Epub 2008 Apr 2022.
- Read, D., Walker, R., 1996. Experimental transmission of papillomatous digital dermatitis (footwarts) in cattle. Vet. pathol. 33, 607.
- Read, D., Nordhausen, R., Walker, R.L., 1998. Pathogenesis of experimental papillomatous digital dermatitis (footwarts) in cattle: Bacterial morphotypes associated with early lesion development. In: Lischer C. and Ossent P. (Eds.), Proceedings 10th international symposium on lameness i ruminants, Lucerne, Switzerland, p. 271. 30
- Rodriguez-Lainz, A., Hird, D.W., Carpenter, T.E., Read, D.H., 1996. Case-control study of papillomatous digital dermatitis in Southern California dairy farms. Prev. Vet. Med. 28, 117-131.
- Setubal, J.C., Reis, M., Matsunaga, J., Haake, D.A., 2006, Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. Microbiol. 152, 113-121.
- Trott, D.J., Moeller, M.R., Zuerner, R.L., Goff, J.P., Waters, W.R., Alt, D.P., Walker, R.L., Wannemuehler, M.J., 2003, Characterization of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions in dairy cattle. J Clin Microbiol. 41, 2522-2529. 40
- Vink, W.D., Jones, G., Johnson, W.O., Brown, J., Demirkan, I., Carter, S.D., French, N.P., 2009, Diagnostic assessment without cut-offs: application of serology for the modelling of bovine digital dermatitis infection. Prev Vet Med. 92, 235-248.

【 0 0 6 5 】

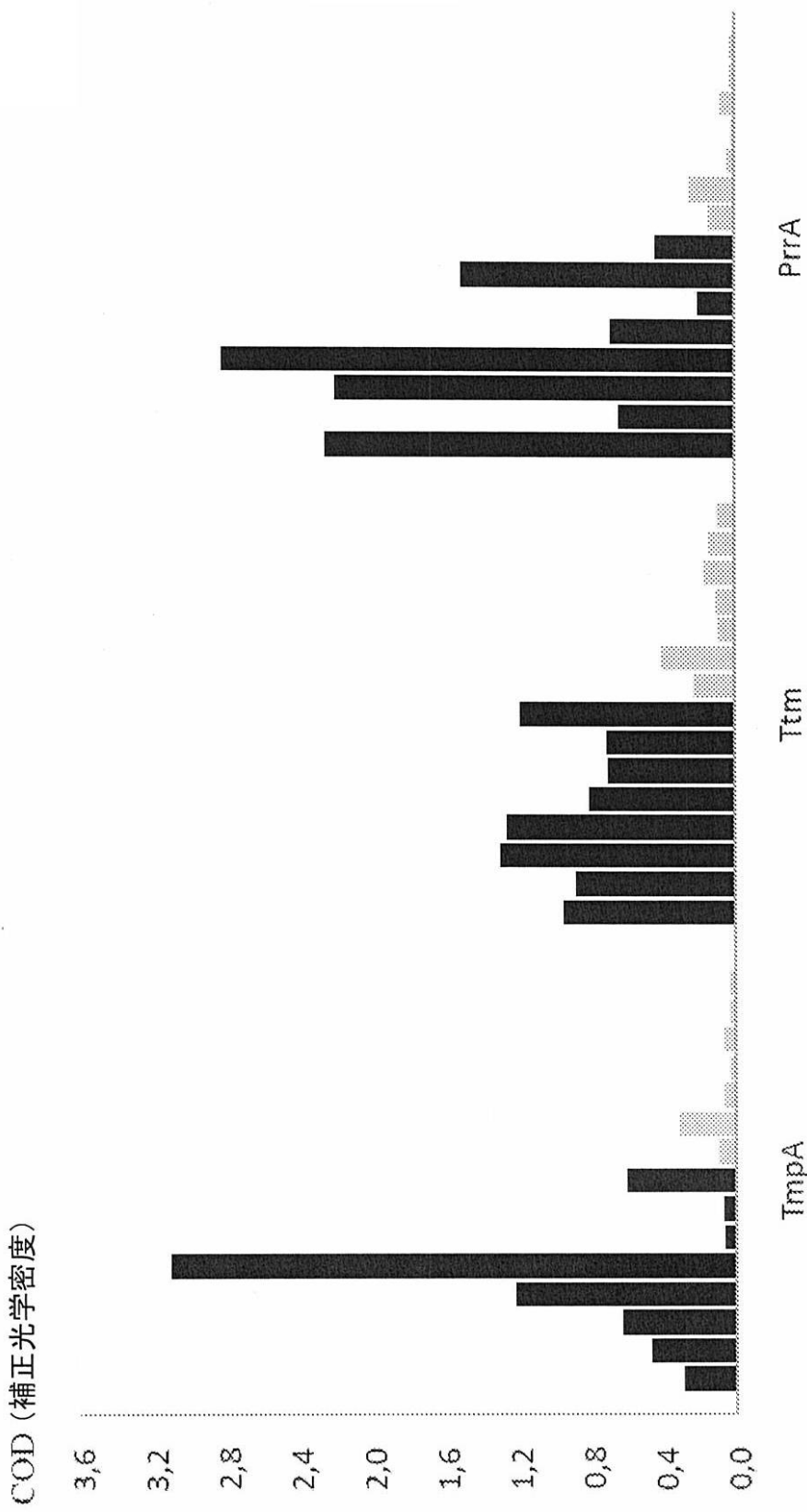
## 【化 1 - 3】

Walker, R.L., Read, D.H., Loretz, K.J., Nordhausen, R.W., 1995. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Vet. Microbiol.* 47, 343-355.

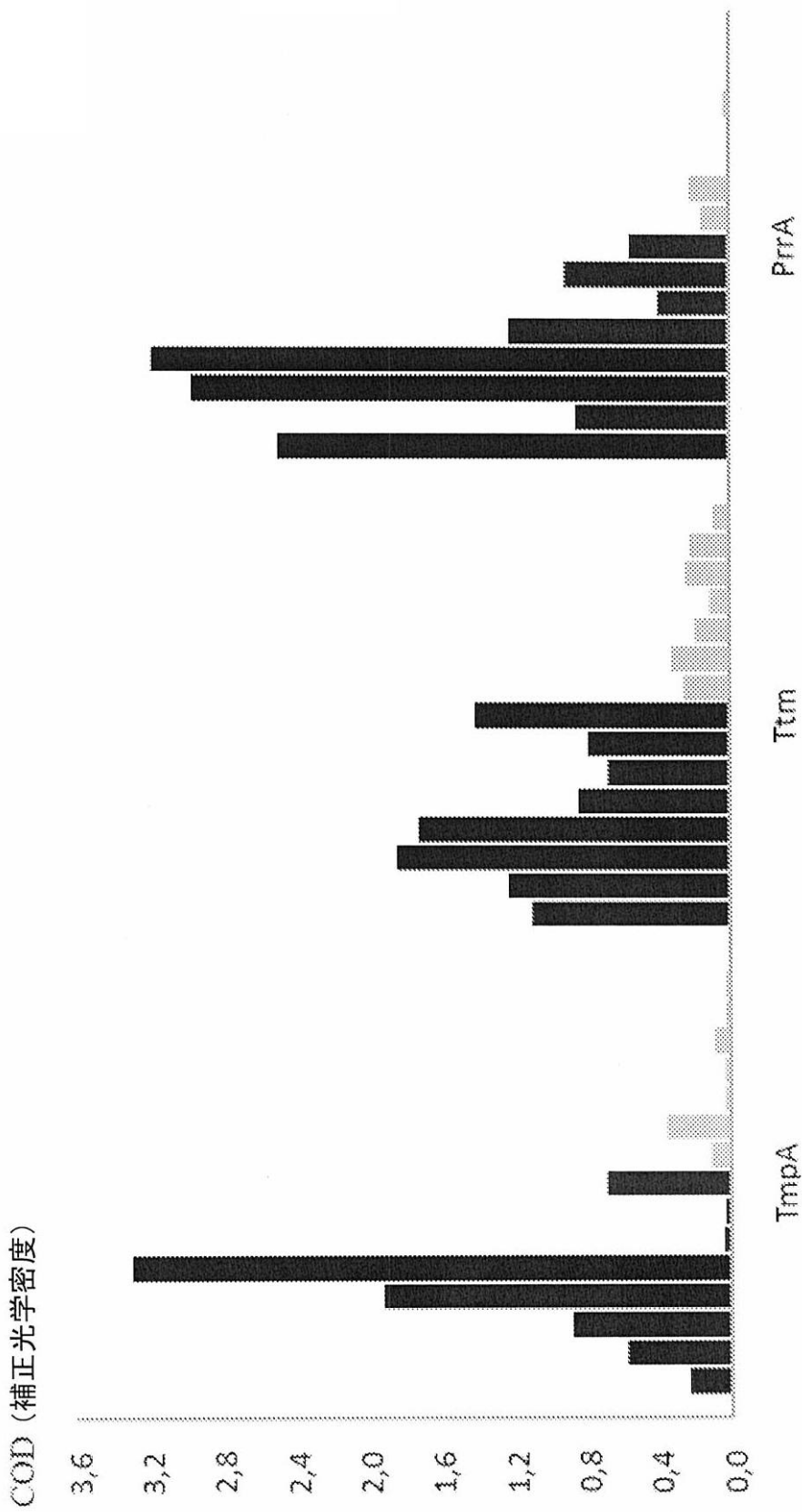
Walker, R.L., Read, D.H., Loretz, K.J., Hird, D.W., Berry, S.L., 1997. Humoral response of dairy cattle to spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions. *Am J Vet Res.* 58, 744-748.

Yano, T., Moe, K.K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., Misawa, N., 2009. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet Microbiol.* 23, 23.

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 配列表 】

2013518563000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE2011/050090
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet 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) IPC: A61K, A61P, C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EBI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6096323 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 1 August 2000 (2000-08-01); column 2, lines 32-37, 50-53; column 3, lines 40-47; column 14, line 52- column 15, line 39; column 18, lines 26-43 --	1-19
Y	US 6287575 B1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 11 September 2001 (2001-09-11); column 2, lines 31-56; column 3, lines 33-39; column 14, lines 26-49 --	1-19
<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 20-04-2011		Date of mailing of the international search report 27-04-2011
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 6055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86		Authorized officer Carolina Palmcrantz Telephone No. + 46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2011/050090

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

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

1.  Claims Nos.: 4-5, 11-12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 4-5 and 11-12 relate to a method for treatment of the human or animal body by
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2011/050090
--

**Continuation of:** Box No. II

therapy, see PCT rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been made for these claims. The search has been directed to the technical content of the claims.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2011/050090

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>Accession no. P29721, 1993-04-01[online][retrieved on 2011-03-30]Retrieved from EBI; Database Uniprot, 99,1% identity in 344 aa overlap with SEQ. ID.NO.2 &lt;URL:http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[uniprot-id:TMPA_TREPH]][uniprot-acc:TMPA_TREPH]+noSession&gt;; &amp;</p> <p>YELTON, DB. Et al., "Treponema phagedenis Encodes and Expresses Homologs of the Treponema pallidum TmpA and TmpB Proteins" In Infection and Immunity, Oct. 1991, Vol. 59, No.10, pp.3685-3693</p>	1, 15, 17-19
Y	--	2-9
X	<p>Accession no. M58475, 1991-08-01[online][retrieved on 2011-04-01] Retrieved from EBI; Database EM_PRO, 99,5% identity in 1050 nt overlap with SEQ. ID. NO.1 &lt;URL:http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/aligndisp.cgi tool=epoefasta&amp;jobid=fasta-20110401-07335774&amp;annot=yes&gt;</p> <p>--</p>	15, 17-19
Y	<p>PRINGLE M. et al., "Isolation and characterization of Treponema phagedenis-like spirochetes from digital dermatitis lesions in Swedish dairy cattle" In Acta Veterinaria Scandinavica, Oct. 2008, Vol. 50, No.40, pp. 1-8.; the abstract; table 1</p> <p>-- -----</p>	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2011/050090
--

**Continuation of:** second sheet

**International Patent Classification (IPC)**

***C07K 14/20*** (2006.01)

***A61K 39/02*** (2006.01)

***A61P 31/04*** (2006.01)

***C07K 16/12*** (2006.01)

***G01N 33/68*** (2006.01)

**Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)**

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at [www.prv.se](http://www.prv.se) (English version)
- From "Anförda dokument" found under "e-tjänster" at [www.prv.se](http://www.prv.se) (Swedish version)

Use the application number as username. The password is **DZNVZHCUBO**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/SE2011/050090

US	6096323 A	01/08/2000	US	6287575 B1	11/09/2001
US	6287575 B1	11/09/2001	US	6096323 A	01/08/2000

## 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 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 B	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04 1 7 1	
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 N	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569 F	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100092967

弁理士 星野 修

(74)代理人 100162455

弁理士 辻本 典子

(72)発明者 アンナ・ロサンデル

スウェーデン国 7 5 6 5 3 ウプサラ, オルスティゲン 1 0

(72)発明者 マリット・プリングル

スウェーデン国 7 4 1 9 2 クニヴスタ, ボエングスパーイェン, ハッセルバッシェン

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11

EA04 GA11 HA01 HA11

4B064 AG01 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA87X AB01 AC14 CA24 CA44 CA45

4C085 AA03 BA46 BB11 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA86 EA20 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	用于疫苗的重组蛋白，针对所述蛋白的抗体，以及包含所述蛋白的诊断方法和疗法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013518563A</a>	公开(公告)日	2013-05-23
申请号	JP2012551129	申请日	2011-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	安娜·洛德尔		
申请(专利权)人(译)	安娜Rosanderu 玛丽特普林格尔		
[标]发明人	アンナロサンデル マリットプリングル		
发明人	アンナ・ロサンデル マリット・プリングル		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/20 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N1/20 C12P21/02 A61P37/04 A61P17/00 A61P31/04 A61K39/002 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/0225 A61P17/00 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/195 G01N33/56911 G01N2333/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/20 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N1/20.B C12P21/02. C A61P37/04 A61P17/00 A61P31/04.171 A61K39/002 G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024 /DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065 /AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA46 4C085/BB11 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA11 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 星野 修		
优先权	61/360986 2010-07-02 US 61/298960 2010-01-28 US		
其他公开文献	JP2013518563A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及蛋白质和/或其片段和衍生物，以及它们作为疫苗和在生物技术方法中的用途。疫苗尤其包括从牛脚趾皮炎分离出的梅毒螺旋体中的免疫原性蛋白。本发明进一步涉及针对所述蛋白质或其片段产生的抗体，以及所述蛋白质在诊断方法中的用途，在该诊断方法中，检测到该抗体是牛中的数字性皮炎的迹象。[选择图] 无

配列番号	タイプ	説明
1	DNA	TmpA 相同体、完全コード配列
2	タンパク質	TmpA 相同体、タンパク質
3	DNA	推定上のテール・テープ測定タンパク質 (Ttm)、完全コード配列
4	タンパク質	推定上のテール・テープ測定タンパク質 (Ttm)、タンパク質
5	DNA	推定上のプロリンリッチ・リボタンパク質 (PrrA)、完全コード配列
6	タンパク質	推定上のプロリンリッチ・リボタンパク質 (PrrA)、タンパク質
7	DNA	GSTmpAF1 (順方向)
8	DNA	GSTmpAR1 (逆方向)
9	DNA	GSTkallaF1 (順方向)
10	DNA	GSTkallaR1 (逆方向)
11	DNA	GSTPGKEEF1 (順方向)
12	DNA	GSTPGKEER1 (逆方向)
13	DNA	ImpactPGKEEF1 (順方向)
14	DNA	ImpactPGKEER1 (逆方向)
15	DNA	ImpactkallaF1 (順方向)
16	DNA	ImpactkallaR1 (逆方向)
17	DNA	プライマーSasekv