

(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2015-504420

(P2015-504420A)

(43) 公表日 平成27年2月12日(2015.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/20 (2006.01)	CO7K 14/20	ZNA 4H045
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569	F
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	N
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	SO1A
CO7K 17/00 (2006.01)	CO7K 17/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2014-540187 (P2014-540187)	(71) 出願人	505452771 アバクシス、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 587 ユニオンシティー ウィップル ロード 3240
(86) (22) 出願日	平成24年11月5日 (2012.11.5)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月3日 (2014.6.3)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/063594	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02013/067524	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成25年5月10日 (2013.5.10)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/556,061		
(32) 優先日	平成23年11月4日 (2011.11.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ライム病抗体の検出のためのペプチドおよび方法

(57) 【要約】

ボレリア抗原に結合する抗体の検出に有用な組成物（例えば、ペプチド組成物）を開示する。ペプチド組成物は、ボレリアVlsEタンパク質のIR6ドメインにおけるバリエーションを含むポリペプチド配列を含む。そのようなペプチド組成物を含み、かつボレリア抗原に結合する抗体の検出およびライム病の診断に有用な、装置、方法、およびキットも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G- X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A- X₂₄-X₂₅ (SEQ ID NO: 1)

の配列を含む、単離されたペプチドであって、ここで、X₁₁はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₆はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₇はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₁はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₄はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにX₂₅はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である、単離されたペプチド。

10

【請求項2】

付加的なN末端ペプチド配列を含む、単離されたペプチドであって、付加的なN末端ペプチド配列が天然VIsE配列または非VIsEボレリア (Borrelia) 抗原である、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項3】

付加的なN末端ペプチド配列がn₁-n₂-S-P-n₅-n₆-P (SEQ ID NO:149) の配列またはその断片である、単離されたペプチドであって、ここで、n₁はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、n₂はEおよびDからなる群より選択されるアミノ酸であり、n₅はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにn₆はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項2記載の単離されたペプチド。

20

【請求項4】

付加的なC末端ペプチド配列を含む、単離されたペプチドであって、付加的なC末端ペプチド配列が天然VIsE配列または非VIsEボレリア抗原である、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項5】

付加的なC末端ペプチド配列がV-c₂-E-G-c₅-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO: 150) の配列またはその断片である、単離されたペプチドであって、ここで、c₂はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにc₅はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項4記載の単離されたペプチド。

30

【請求項6】

付加的なC末端ペプチド配列がA-V-c₃-E-G-c₆-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S (SEQ ID NO: 151) の配列またはその断片である、単離されたペプチドであって、ここで、c₃はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにc₆はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項4記載の単離されたペプチド。

【請求項7】

少なくとも30個、35個、40個、または45個のアミノ酸を含む、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項8】

リガンドにコンジュゲートされている、請求項1記載の単離されたペプチド。

40

【請求項9】

ビオチン化されている、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項10】

ストレプトアビジンにコンジュゲートされている、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項11】

固体支持体に付着しているかまたは固定化されている、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項12】

50

ビーズ、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、マイクロタイタープレート中のウェル、またはローター中の流路に付着しているかまたは固定化されている、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項13】

SEQ ID NO:3~146からなる群より選択される配列を含む、請求項1記載の単離されたペプチド。

【請求項14】

n_1 - n_2 -S-P- n_5 - n_6 -P-L-K-K-D-D-

N-I-A-A-A- X_{18} -V-L-R-G- X_{23} - X_{24} -K-D-G- X_{28} -F-A- X_{31} - X_{32} -A-V- c_{35} -E-G- c_{38} -Q-Q-

E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO: 2)

の配列からの少なくとも30個、35個、40個、または45個の連続したアミノ酸を含む、単離されたペプチドであって、ここで、 n_1 はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_2 はEおよびDからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_5 はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_6 はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{18} はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{23} はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{24} はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{28} はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{31} はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{32} はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、 c_{35} はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに c_{38} はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項1記載の単離されたペプチド。

10

20

【請求項15】

第一の単離されたペプチドと第二の単離されたペプチドとを含む、単離されたペプチドの混合物であって、第一の単離されたペプチドが第二の単離されたペプチドとは異なり、第一および第二の単離されたペプチドが、

L-K-K-D-D-N-I-A-A-A- X_{11} -V-L-R-G- X_{16} - X_{17} -K-D-G- X_{21} -F-A- X_{24} - X_{25} (SEQ ID NO: 1)

の配列を各々含み、ここで、 X_{11} はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{16} はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{17} はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{21} はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{24} はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに X_{25} はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である、混合物。

30

【請求項16】

3種類またはそれ以上の異なる単離されたペプチドを含む、単離されたペプチドの混合物であって、単離されたペプチドの各々が、

L-K-K-D-D-N-I-A-A-A- X_{11} -V-L-R-G- X_{16} - X_{17} -K-D-G- X_{21} -F-A- X_{24} - X_{25} (SEQ ID NO: 1)

の配列を含み、ここで、 X_{11} はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{16} はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{17} はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{21} はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{24} はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに X_{25} はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である、混合物。

40

【請求項17】

単離されたペプチドの各々がリガンドにコンジュゲートされている、請求項15または16記載の混合物。

【請求項18】

単離されたペプチドのうちの1種類または複数種類がビオチン化されている、請求項15または16記載の混合物。

【請求項19】

単離されたペプチドのうちの1種類または複数種類がストレプトアビジンにコンジュゲートされている、請求項15または16記載の混合物。

50

【請求項20】

単離されたペプチドの各々が固体支持体に固定化されている、請求項15または16記載の混合物。

【請求項21】

以下の工程を含む、試料中の、ボレリア抗原のエピトープに対する抗体を検出するための方法：

試料を請求項1記載の単離されたペプチドと接触させる工程；および

該単離されたペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、ボレリア抗原のエピトープに対する抗体が該試料中に存在することを表す、工程。

【請求項22】

ボレリア抗原が、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 種、ボレリア・アフゼリ (*Borrelia afzelli*) 種、またはボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*) 種に由来する、請求項21記載の方法。

【請求項23】

単離されたペプチドが固体支持体に固定化されている、請求項21記載の方法。

【請求項24】

固体支持体が、ビーズ、ラテラルフローアッセイ装置中の流路、マイクロタイタープレート中のウェル、またはローター中の流路である、請求項23記載の方法。

【請求項25】

検出する工程が、(i) ELISAアッセイを実施すること、(ii) ラテラルフローアッセイを行うこと、(iii) 凝集アッセイを実施すること、(iv) ウエスタンブロット、スロットブロット、もしくはドットブロットを実施すること、または(v) 分析用ローターを通じて試料を流すことを含む、請求項21記載の方法。

【請求項26】

試料がヒト、イヌ、またはウマの対象に由来する、請求項21記載の方法。

【請求項27】

試料が血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液の試料である、請求項21記載の方法。

【請求項28】

試料を、2種類またはそれ以上の請求項1記載の単離されたペプチドと接触させる工程を含む、請求項21記載の方法。

【請求項29】

以下の工程を含む、対象においてライム病を診断するための方法：

対象由来の試料を請求項1記載の単離されたペプチドと接触させる工程；および

該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、対象がライム病を有することを表す、工程。

【請求項30】

1種類または複数種類の請求項1記載の単離されたペプチドと、該1種類または複数種類の単離されたペプチドのエピトープを認識する抗体に結合することができる標識試薬とを含む、キット。

【請求項31】

前記1種類または複数種類の単離されたペプチドが固体支持体に付着している、請求項30記載のキット。

【請求項32】

前記1種類または複数種類の単離されたペプチドが、ビーズ、チューブもしくはウェル、ラテラルフローアッセイ装置、または分析用ローターに付着している、請求項30記載のキット。

【請求項33】

標識試薬が、検出可能な標識にコンジュゲートされた抗ヒトIgG抗体または抗イヌIgG抗体である、請求項30記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項34】

検出可能な標識がコロイド金粒子である、請求項33記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる2011年11月4日出願の米国仮出願第61/556,061号の恩典を主張する。

【0002】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる：配列表のコンピューター読取り可能なフォーマットコピー（ファイル名：ABAX_039_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2012年11月2日、ファイルサイズ45キロバイト）。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ライム病は、重大な公衆衛生問題となっている衰弱性状態である。この疾患は、病原性ボレリア（*Borrelia*）細菌（スピロヘータ）による感染によって引き起こされ、ボレリア感染したマダニ属（*Ixodes*）マダニの様々な種の刺咬によって伝搬される。ライム病の正確な早期の検出は、効果的な処置にとって重要である。ライム病の診断のために十分な唯一の臨床症状は、独特の環状（bull's-eye）外観を有する紅斑である遊走性紅斑の存在である。しかしながら、遊走性紅斑は、感染初期にのみ存在し、その時期ですら、全ての感染個体に出現するわけではない。ベル麻痺のようなライム病に関連している他の臨床症状は、単独でも、組み合わせても、遊走性紅斑が存在しない場合に、臨床的診断を決定するために十分に特異的ではない。

【0004】

遊走性紅斑が存在しない場合、ライム病の診断のための基本は、ボレリア・ブルグドルフェリ（*Borrelia burgdorferi*）、ボレリア・アフゼリ（*Borrelia afzelli*）、またはボレリア・ガリニ（*Borrelia garinii*）のような病原性ボレリア種に対する抗体応答である。北米において、アメリカ疾病管理センター（CDC）は、ELISAのような高感度の第一段階アッセイと、第一段階アッセイが陽性または不確かであった場合のウエスタンブロットとからなる、ライム病の血清診断のための二段階アプローチを推奨している。第一段階アッセイは、伝統的に、完全細胞ボレリア・ブルグドルフェリ抗原または組換えボレリアタンパク質を利用している。しかし、そのようなアッセイは、解釈が困難であり得、感染ではなく予防接種から発生するボレリア抗体によって複雑になる。さらに、いくつかのボレリアアッセイにおいて使用される完全細胞超音波処理物は、トレポネーマ（*Treponema*）抗体と反応する。

【0005】

より最近では、ボレリアの可変表面抗原（VlsE）の保存されたIR6ドメインに基づくC6ペプチドアッセイが、播種性遅発型ライム病についての高感度を有する第一段階アッセイとして広く認められるようになってきている。C6ペプチドアッセイは、試験抗原としてボレリア・ブルグドルフェリVlsEタンパク質の単一の25アミノ酸配列を使用する。C6ペプチドアッセイは、ライム病の診断のための第一段階アプローチのために適当であり得ることが示唆されているが、C6アッセイは、感染性ボレリアのある種の株を検出し得ないため、そのような目的のために十分に高感度ではないことが明白になりつつある。

【0006】

従って、ボレリア抗原の検出およびライム病の血清診断のための付加的なアッセイが、当技術分野において依然として必要とされている。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【0007】

本発明は、ボレリアVIsEタンパク質のIR6ドメインにおけるある配列バリエーションが、広範囲のボレリア種に対する抗体応答のロバストな検出を提供するという発見に一部基づく。従って、本発明は、ボレリア抗原に結合する抗体の検出およびライム病の診断に有用な組成物、装置、方法、およびキットを提供する。

【0008】

一つの局面において、本発明は、ボレリア抗原を認識する抗体に結合することができるペプチドを提供する。ある態様において、ペプチドは、VIsE IR6ドメインと、少なくとも1種類（例えば、2種類、3種類等）の他のボレリア抗原に由来する配列とを含む。ある態様において、少なくとも1種類の他のボレリア抗原は、表面抗原（例えば、OspC、p41、またはそれらの組み合わせ）である。

10

【0009】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1の配列
L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅ (SEQ ID NO: 1)

を含み、ここで、X₁₁はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₆はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₇はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₁はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₄はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにX₂₅はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である。

20

【0010】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1の配列を含み、付加的なN末端ペプチド配列をさらに含む。付加的なN末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができ、天然配列または非天然配列のいずれかであり得る。ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1によって定義される配列を含み、付加的なC末端ペプチド配列をさらに含む。付加的なC末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができ、天然配列または非天然配列のいずれかであり得る。ある態様において、非天然配列は、非VIsEボレリア抗原（例えば、ボレリアOspC抗原またはp41抗原）を含む。

30

【0011】

他の態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:2の配列
n₁-n₂-S-P-n₅-n₆-P-L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₈-V-L-R-G-X₂₃-X₂₄-K-D-G-X₂₈-F-A-X₃₁-X₃₂-A-V-c₃₅-E-G-c₃₈-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO: 2)

を含み、ここで、n₁はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、n₂はEおよびDからなる群より選択されるアミノ酸であり、n₅はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、n₆はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₈はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₃はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₄はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₈はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₃₁はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₃₂はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、c₃₅はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにc₃₈はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である。

40

【0012】

ある態様において、本発明のペプチドは、少なくとも25個、30個、35個、40個、45個、またはそれ以上のアミノ酸を含む。ある態様において、本発明のペプチドは、単離された（例えば、合成のかつ/または精製された）ペプチドである。ある態様において、本発明のペプチドは、リガンドにコンジュゲートされている。例えば、ある態様において、ペプチドはビオチン化されている。他の態様において、ペプチドは、アビジン、ストレプトア

50

ビジン、またはニュートラアビジンにコンジュゲートされている。他の態様において、ペプチドは、担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、または免疫グロブリンFcドメイン）にコンジュゲートされている。さらに他の態様において、ペプチドは、デンドリマーおよび/または多重抗原性ペプチド系（MAPS）の一部にコンジュゲートされている。

【0013】

ある態様において、本発明のペプチドは、固体支持体に付着しているかまたは固定化されている。ある態様において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析用ローター中の流路、またはチューブもしくは（例えば、ELISAアッセイに適したプレート中の）ウェルである。

10

【0014】

別の局面において、本発明は、1種類または複数種類の本発明のペプチドを含む組成物を提供する。例えば、ある態様において、本発明は、SEQ ID NO:1の配列を含むペプチド、SEQ ID NO:2の配列を含むペプチド、またはそれらの混合物を含む、組成物を提供する。ある態様において、組成物は、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物を含み、ここで、各ペプチドはSEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2の配列を含む。

【0015】

ある態様において、ペプチドは、リガンドまたはシグナリングモエティにコンジュゲートされている。例えば、ある態様において、ペプチドはビオチン化されている。他の態様において、ペプチドは、アビジン、ストレプトアビジン、またはニュートラアビジンにコンジュゲートされている。他の態様において、ペプチドは、担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、または免疫グロブリンFcドメイン）にコンジュゲートされている。さらに他の態様において、ペプチドは、デンドリマーおよび/または多重抗原性ペプチド系（MAPS）の一部にコンジュゲートされている。

20

【0016】

別の局面において、本発明は、本発明のペプチドをコードする配列を含む核酸を提供する。さらに、本発明は、そのような核酸を含むベクター、およびそのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。ある態様において、ベクターはシャトルベクターである。他の態様において、ベクターは、発現ベクター（例えば、細菌発現ベクターまたは真核生物発現ベクター）である。ある態様において、宿主細胞は細菌細胞である。他の態様において、宿主細胞は真核細胞である。

30

【0017】

別の局面において、本発明は装置を提供する。ある態様において、装置は、イムノアッセイを実施するために有用である。例えば、ある態様において、装置は、ラテラルフローイムノアッセイ装置である。他の態様において、装置は、分析用ローターである。他の態様において、装置は、チューブ、またはウェル、例えば、ELISAアッセイに適したプレート中のウェルである。さらに他の態様において、装置は、電気化学センサー、光学センサー、または光電子センサーである。

40

【0018】

ある態様において、装置は本発明のペプチドを含む。他の態様において、装置は、異なる本発明のペプチドの混合物を含む。例えば、ある態様において、装置は、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ある態様において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2の配列を含む。ある態様において、ペプチドは、装置に付着しているかまたは固定化されている。

【0019】

別の局面において、本発明は、試料中の、ボレリア抗原のエピトープに対する抗体を検出する方法を提供する。ある態様において、方法は、試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、

50

該複合体の形成が、ボレリア抗原のエピトープに対する抗体が該試料中に存在することを表す、工程を含む。ある態様において、ボレリア抗原は、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、またはボレリア・ガリニのような感染性ボレリア種に由来する。ある態様において、方法は、試料を、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。

【0020】

ある態様において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成のかつ／または精製された）ペプチドである。ある態様において、ペプチドまたはペプチドの混合物は、固体支持体に付着しているかまたは固定化されている。ある態様において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析用ローター中の流路、またはチューブもしくは（例えば、ELISAアッセイに適したプレート中の）ウェルである。ある態様において、固体支持体には、金属、ガラス、セルロースに基づく材料（例えば、ニトロセルロース）、または重合体（例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリスルホン等）が含まれる。ある態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、デンドリマーに付着しかつ／またはMAPS系に組み入れられている。ある他の態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、BSAに付着している。

10

【0021】

ある態様において、検出する工程は、ELISAアッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、ラテラルフローイムノアッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、凝集アッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、分析用ローター中で試料を回転させることを含む。他の態様において、検出する工程は、ウエスタンブロット、スロットブロット、またはドットブロットを使用して試料を分析することを含む。さらに他の態様において、検出する工程は、電気化学センサー、光学センサー、または光電子センサーにより試料を分析することを含む。

20

【0022】

ある態様において、試料は、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、粘液、または唾液のような体液である。他の態様において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。ある態様において、試料は、野生動物（例えば、シカ、またはマウス、シマリス、リス等のようなげっ歯類）に由来する。他の態様において、試料は、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等）に由来する。他の態様において、試料は、家畜化されたまたは野生化された動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）に由来する。さらに他の態様において、試料はヒトに由来する。

30

【0023】

別の局面において、本発明は、対象においてライム病を診断する方法を提供する。ある態様において、方法は、対象由来の試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、対象がライム病を有することを表す、工程を含む。ある態様において、方法は、試料を、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。

40

【0024】

ある態様において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成のかつ／または精製された）ペプチドである。ある態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、固体支持体に付着しているかまたは固定化されている。例えば、ある態様において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズ等）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析用ローター中の流路、またはチューブもしくは（例えば、ELISAアッセイに適したプレート中の）ウェルである。ある態様において、固体支持体には、金属、ガラス、セルロースに基づく材料（例えば、ニトロセルロース）、または重合体（例えば、ポリスチレン、ポ

50

リエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリスルホン等)が含まれる。ある態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、デンドリマーに付着しかつ/またはMAPS系に組み入れられている。ある他の態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、BSAに付着している。

【0025】

ある態様において、検出する工程は、ELISAアッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、ラテラルフローイムノアッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、凝集アッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、分析用ローター中で試料を回転させることを含む。他の態様において、検出する工程は、ウエスタンブロット、スロットブロット、またはドットブロットを使用して試料を分析することを含む。さらに他の態様において、検出する工程は、電気化学センサー、光学センサー、または光電子センサーにより試料を分析することを含む。

10

【0026】

ある態様において、試料は、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、または唾液のような体液である。他の態様において、試料は、組織(例えば、組織ホモジネート)または細胞溶解物である。ある態様において、対象は、野生動物(例えば、シカ、またはマウス、シマリス、リス等のようなげっ歯類)である。他の態様において、対象は、実験動物(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等)である。他の態様において、対象は、家畜化されたまたは野生化された動物(例えば、イヌ、ネコ、ウマ)である。さらに他の態様において、対象はヒトである。

20

【0027】

さらに別の局面において、本発明はキットを提供する。ある態様において、キットは本発明のペプチドを含む。ある態様において、キットは、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ペプチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2の配列を含み得る。ある態様において、ペプチドは、固体支持体に付着しているかまたは固定化されている。例えば、ある態様において、固体支持体は、ビーズ(例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズ等)、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、分析用ローター中の流路、またはチューブもしくは(例えば、プレート中の)ウェルである。ある態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、デンドリマーに付着しかつ/またはMAPS系に組み入れられている。ある他の態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、BSAに付着している。

30

【0028】

ある態様において、キットは、ビーズの集団またはプレート(例えば、ELISAアッセイに適したプレート)をさらに含む。他の態様において、キットは、ラテラルフローイムノアッセイ装置、分析用ローター、ウエスタンブロット、ドットブロット、スロットブロット、電気化学センサー、光学センサー、または光電子センサーのような装置をさらに含む。ある態様において、ビーズの集団、プレート、または装置は、イムノアッセイを実施するために有用である。例えば、ある態様において、ビーズの集団、プレート、または装置は、試料由来の抗体と本発明のペプチドとを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するために有用である。ある態様において、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、ビーズ、プレート、または装置に付着しているかまたは固定化されている。

40

【0029】

ある態様において、キットは説明書をさらに含む。例えば、ある態様において、キットは、ボレリア抗原に対する抗体を検出するためまたはライム病を診断するために、本発明のペプチドを使用する方法を示す説明書を含む。ある態様において、キットは、ボレリア抗原に対する抗体を検出するためまたはライム病を診断するために、(例えば、本発明のペプチドもしくは異なるペプチドの混合物を含む)ビーズの集団、プレート、または装置を使用する方法を示す説明書を含む。

【0030】

本発明のさらなる局面および態様は、以下の詳細な説明から明白になるであろう。

50

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】ボレリア抗原に対する抗体を検出するために使用され得る間接サンドイッチアッセイの図である。この態様においては、抗ヒトIgG/IgM抗体または抗イヌIgG/IgM抗体が、適当な基質（例えば、ニトロセルロース膜）の試験部位に固定化される。試験試料中の抗体に、固定化された抗体が結合する。次いで、適切なボレリア抗原に対する試験試料抗体が、本発明のペプチドに結合するであろう。本発明のペプチドが、ビオチンにコンジュゲートされている時、試験部位におけるペプチドの存在を検出するため、コロイド金標識ストレプトアビジンを使用することができる。間接サンドイッチアッセイを逆に操作してもよいこと、即ち、試験試料中の抗ボレリア抗体を捕獲するため、本発明のペプチドを基質に固定化し、試験部位に固定化されたペプチドと結合した抗体の存在を検出するため、標識（例えば、コロイド金）にコンジュゲートされた抗ヒトIgG/IgM抗体または抗イヌIgG/IgM抗体を使用してもよいことが認識され得る。

10

【図2】図1の間接サンドイッチアッセイに基づくラテラルフローイムノアッセイ装置の図である。ラテラルフローイムノアッセイ装置のこの態様において、試料は、サンプルローディングパッドに適用され、次いで、コンジュゲートパッドを通して試験膜へ流れる。試料がコンジュゲートパッドを通ると、ペプチド-ビオチン-ストレプトアビジン-金複合体が可溶化され、次いで、本発明のペプチドと適切な抗ボレリア抗原抗体との間の複合体が形成される。試験部位は、試料中の全抗体に結合する、試料に適した抗IgG抗体または抗IgM抗体を含む。例えば、プロテインLを、抗IgG抗体または抗IgM抗体の代わりに使用してもよい。試料中の十分な抗体が本発明のペプチドに結合した場合には、陽性シグナルが試験部位に出現するであろう。ラテラルフローイムノアッセイ装置の別の態様において、本発明のペプチドは試験部位（T）に固定化され、検出可能な標識（例えば、コロイド金粒子）にコンジュゲートされた試料に適した抗IgG抗体または抗IgM抗体（例えば、抗ヒトまたは抗イヌ）がコンジュゲートパッドに存在する。コンジュゲートパッドを通る試料が、標識された抗体を可溶化し、試験試料中に存在する抗ボレリア抗原抗体が、標識された抗体に結合し、そのような抗体複合体が、試験部位に固定化された本発明のボレリアペプチドによって捕獲され、それによって、陽性シグナルを生ずる。いずれの態様においても、装置は、コンジュゲートパッド中の標識されたペプチドまたは標識された抗体を認識する結合パートナーが固定化された対照部位（C）をさらに含むことができる。

20

30

【図3】ボレリア抗原に対する抗体を検出するために使用され得る二重抗原サンドイッチアッセイの図である。この態様において、本発明のペプチドは、適当な基質（例えば、ニトロセルロース膜、ELISAプレートのウェル）の試験部位に固定化される。試験試料中の抗体に、固定化された本発明のペプチドが結合する。次いで、適切なボレリア抗原に対する試験試料抗体が、検出分子（例えば、コロイド金、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP））にコンジュゲートされた第二の本発明のペプチドのセットに結合し、それが、試験部位に固定化された第一のペプチドのセットに結合した抗体の存在を検出する。

【図4】ボレリア抗原に対する抗体を検出するために使用され得るラテラルフローイムノアッセイ装置の図である。ラテラルフローイムノアッセイ装置のこの態様において、本発明のペプチドは、適当な基質（例えば、ニトロセルロース膜）の試験部位に固定化される。試験試料中の抗ボレリア抗体に、固定化された本発明のペプチドが結合する。金にコンジュゲートされたプロテインAおよび/または金にコンジュゲートされたプロテインGが、系に添加され、捕獲された抗ボレリア抗体のFc部分に結合し、それによって、陽性シグナルを生ずる。この態様において、装置は、金にコンジュゲートされたプロテインAおよび/または金にコンジュゲートされたプロテインGを認識する結合パートナーが固定化された対照部位をさらに含むことができる。そのような結合パートナーには、抗プロテインA、抗プロテインG、マウスIgG、および/またはその他の類似したIgG分子が含まれ得るが、これらに限定されない。

40

【図5】ボレリア抗原に対する抗体を検出するために使用され得るラテラルフローイムノ

50

アッセイ装置の図である。ラテラルフローイムノアッセイ装置のこの態様において、本発明のペプチドは、適当な基質（例えば、ニトロセルロース膜）の試験部位に固定化される。試験試料中の抗ボレリア抗体に、固定化された本発明のペプチドが結合する。抗ボレリア抗体が、金にコンジュゲートされた本発明のペプチドによって検出され、それによって、陽性シグナルを生ずることができる。捕獲された抗ボレリア抗体のFc部分に結合することによって、シグナルを増強するため、金にコンジュゲートされたプロテインAおよび/または金にコンジュゲートされたプロテインGが、系に添加されてもよい。この態様において、装置は、金にコンジュゲートされたプロテインAおよび/または金にコンジュゲートされたプロテインGを認識する結合パートナーが固定化された対照部位をさらに含むことができる。そのような結合パートナーには、抗プロテインA、抗プロテインG、マウスIgG、および/またはその他の類似したIgG分子が含まれ得るが、これらに限定されない。

10

【発明を実施するための形態】

【0032】

詳細な説明

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

【0033】

「抗原」という用語は、本明細書において使用されるように、抗体によって認識され得る分子をさす。抗原は、例えば、ペプチドまたはその修飾型であり得る。抗原は1つまたは複数のエピトープを含み得る。

【0034】

「エピトープ」という用語は、本明細書において使用されるように、抗体によって特異的に認識される抗原の部分である。エピトープは、例えば、ペプチド（例えば、本発明のペプチド）の一部を含むかまたはそれからなることができる。エピトープは、直鎖状エピトープ、連続エピトープ、または立体エピトープであり得る。ある態様において、エピトープは不連続の領域を含み得る。

20

【0035】

「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、一本鎖であってもよいし二本鎖であってもよいDNA、RNA、cDNAを包含し、それらの化学的修飾も包含する。

【0036】

本明細書において使用される一文字アミノ酸略号は、当技術分野における標準的な意味を有し、本明細書に記載されるペプチド配列は、全て、慣習に従い、N末端を左に、C末端を右に記される。

30

【0037】

さらなる用語は、必要に応じて、以下の詳細な説明において定義されるものとする。

【0038】

組成物および装置

本発明は、ボレリアVlsEタンパク質のIR6ドメインにおけるある配列バリエーションが、広範囲のボレリア種に対する抗体応答のロバストな検出を提供するという発見に一部分基づく。従って、一つの局面において、本発明は、ボレリア抗原を認識する抗体に結合することができるペプチドを提供する。

40

【0039】

ある態様において、本発明のペプチドは、VlsE IR6ドメインまたはその断片と、少なくとも1種類（例えば、2種類、3種類等）の他のボレリア抗原に由来する配列（例えば、エピトープを含む配列）とを含む。ある態様において、少なくとも1種類の他のボレリア抗原は、表面抗原、またはOspA、OspB、OspC、p41、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される抗原である。従って、例えば、ある態様において、本発明のペプチドは、(i) VlsE IR6ドメインまたはその断片と、(ii) OspAタンパク質のエピトープを含む配列、OspBタンパク質のエピトープを含む配列、OspCタンパク質のエピトープを含む配列、p41タンパク質のエピトープを含む配列、またはそのような配列の組み合わせとを含む。

50

他の態様において、本発明のペプチドは、(i) VlsE IR6ドメインまたはその断片と、(ii) OspCタンパク質のエピトープを含む配列と、(iii) p41タンパク質のエピトープを含む配列とを含む。

【0040】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1の配列

L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅ (SEQ ID NO: 1)

を含むかまたはそれからなり、ここで、X₁₁はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₆はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₁₇はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₁はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、X₂₄はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびにX₂₅はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である。

10

【0041】

ある態様において、本発明のペプチドは、配列

L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ ID NO: 3); L-
 K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ ID NO: 4); L-K-K-D-D-N-
 I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ ID NO: 5); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-
 L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ ID NO: 6); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-
 K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ ID NO: 7); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-
 A-I-K (SEQ ID NO: 8); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ
 ID NO: 9); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-K (SEQ ID NO: 10);
 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO: 11); L-K-K-D-
 D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO: 12); L-K-K-D-D-N-I-A-A-
 A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO: 13); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-
 G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO: 14); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-
 G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO: 15); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-
 K (SEQ ID NO: 16); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID
 NO: 17); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO: 18);
 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO: 19); L-K-K-D-D-
 N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO: 20); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-
 V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO: 21); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-
 I-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO: 22); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-
 N-F-A-I-K (SEQ ID NO: 23); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-K
 (SEQ ID NO: 24); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID
 NO: 25); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO: 26); L-
 K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO: 27); L-K-K-D-D-
 N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO: 28); L-K-K-D-D-N-I-A-A-
 A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO: 29); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-
 R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO: 30); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-
 K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO: 31); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-
 F-A-W-K (SEQ ID NO: 32); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-K
 (SEQ ID NO: 33); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID

10

20

30

40

NO: 34); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 35);
L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 36); L-K-K-D-
D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 37); L-K-K-D-D-N-I-A-
A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 38); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-
L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 39); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-
V-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 40); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-
D-F-A-W-K (SEQ ID NO: 41); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-
K (SEQ ID NO: 42); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ
ID NO: 43); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:
44); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO: 45); L-K-
K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO: 46); L-K-K-D-D-N-
I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO: 47); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-
L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO: 48); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-
G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO: 49); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-
D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO: 50); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-
A-Y-K (SEQ ID NO: 51); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-K
(SEQ ID NO: 52); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID
NO: 53); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 54); L-
K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 55); L-K-K-D-D-
N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 56); L-K-K-D-D-N-I-A-A-
A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 57); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-
R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 58); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-
K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 59); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-
F-A-Y-K (SEQ ID NO: 60); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-K
(SEQ ID NO: 61); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID
NO: 62); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 63);
L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 64); L-K-K-D-
D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 65); L-K-K-D-D-N-I-A-A-
A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 66); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-
R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 67); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-
K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 68); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-
F-A-Y-K (SEQ ID NO: 69); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-K
(SEQ ID NO: 70); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID

10

20

30

40

NO: 71); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 72);
 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 73); L-K-K-D-
 D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO: 74); L-K-K-D-D-N-I-A-A-
 A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO: 75); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-
 G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO: 76); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-
 G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO: 77); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-R
 (SEQ ID NO: 78); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID
 NO: 79); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO: 80); L-
 K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO: 81); L-K-K-D-D-N-
 I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO: 82); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-
 V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO: 83); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-
 A-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO: 84); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-
 F-A-I-R (SEQ ID NO: 85); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-R
 (SEQ ID NO: 86); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID
 NO: 87); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO: 88); L-
 K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO: 89); L-K-K-D-D-N-
 I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO: 90); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-
 V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO: 91); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-
 A-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO: 92); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-
 F-A-I-R (SEQ ID NO: 93); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-I-R
 (SEQ ID NO: 94); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID
 NO: 95); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO: 96); L-
 K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO: 97); L-K-K-D-D-N-
 I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO: 98); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-
 V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO: 99); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-
 L-A-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO: 100); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-
 G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO: 101); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-
 W-R (SEQ ID NO: 102); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-W-R
 (SEQ ID NO: 103); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID
 NO: 104); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO: 105);
 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO: 106); L-K-K-D-
 D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 107); L-K-K-D-D-N-I-A-
 A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 108); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-

10

20

30

40

V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 109); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 110); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 111); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 112); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 113); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-R (SEQ ID NO: 114); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 115); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 116); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 117); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 118); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 119); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 120); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 121); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-R (SEQ ID NO: 122); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 123); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 124); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 125); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 126); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 127); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 128); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 129); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 130); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 131); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 132); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 133); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 134); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 135); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 136); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 137); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 138); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 139); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 140); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 141); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 142); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 143); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 144); L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 145); または L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-R (SEQ ID NO: 146) を含むかまたはそれからなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1の配列と付加的なN末端ペプチド配列（例えば、N末端伸張）とを含む。付加的なN末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、またはそれ以上のアミノ酸を含み得る。ある態様において、N末端ペプチド配列は、約5～約10アミノ酸、約10～約15アミノ酸、約15～約20アミノ酸、約20～約25アミノ酸、約25～約30アミノ酸、約30～約40アミノ酸、または約40～約50アミノ酸の長さを有する。付加的なN末端ペプチド配列は天然配列であり得る。本明細書において使用されるように、「天然」配列とは、天然に存在するボレリアVlsE配列に由来するペプチド配列またはそのバリエーションである。ある態様において、ペプチド配列は、天然に存在するボレリアVlsE配列の断片である。ペプチド配列は、例えば、VlsEの保存領域または非保存領域に由来し得る。ペプチド配列には、例えば、免疫優性エピトープまたは宿主（例えば、ヒト、イヌ等）の免疫系によって認識され得るその他のエピトープのようなエピトープが含まれ得る。VlsEタンパク質およびそのペプチドは、例えば、米国特許第6,475,492号、第6,660,274号、第6,719,983号、第6,740,744号、および第7,887,815号、ならびに欧州特許第0894143号、第1012181号、第1171605号、および第1589109号（これらの内容は、参照によって本明細書に組み入れられる）に記載されている。

10

【0043】

バリエーションポリペプチドは、SEQ ID NO:1～146に示されたペプチドと少なくとも約80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であり、やはり本発明のポリペプチドである。配列同一率とは、当技術分野において認識されている意味を有し、2つのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の間の同一性を測定する多数の方法が存在する。例えば、Lesk,Ed.,Computational Molecular Biology,Oxford University Press,New York,(1988);Smith,Ed.,Biocomputing:Informatics And Genome Projects,Academic Press,New York,(1993);Griffin & Griffin,Eds.,Computer Analysis Of Sequence Data,Part I,Humana Press,New Jersey,(1994);von Heinje,Sequence Analysis In Molecular Biology,Academic Press,(1987);およびGribskov & Devereux,Eds.,Sequence Analysis Primer,McGraw-Hill,New York,(1991)を参照のこと。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを整理化する方法は、GCGプログラムパッケージ（Devereux et al.,Nuc.Acids Res.12:387(1984)）、BLASTP、BLASTN、FASTA（Atschul et al.,J Molec.Biol.215:403(1990)）、ならびにSmithおよびWaterman（Adv.App.Math.,2:482-489(1981)）のローカルホモロジーアルゴリズムを使用するBestfitプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package,Version 8 for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,575 Science Drive,Madison,Wis.53711）を含むコンピュータプログラムにおいて体系化されている。例えば、FASTAアルゴリズムを利用するコンピュータプログラムALIGNは、-12のギャップオープンペナルティおよび-2のギャップエクステンションペナルティで、アフラインギャップ検索と共に使用され得る。

20

30

【0044】

特定の配列が、参照配列と、例えば、約95%同一であるか否かを決定するため、配列ライメントプログラムのいずれかを使用する時、パラメータは、同一率が参照ポリヌクレオチドの全長において計算され、参照ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの総数の5%以内の同一性のギャップが許容されるよう、設定される。

40

【0045】

ペプチド配列のバリエーションは、配列の既知の特性に一部分基づき、当業者によって容易に選択され得る。例えば、バリエーションペプチドは、アミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）および/または欠失（例えば、小さいアミノ酸欠失、もしくは2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、またはそれ以上の連続アミノ酸を包含する欠失）を含むことができる。従って、ある態様において、天然ペプチド配列のバリエーションは、(i)1個もしくは複数（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、もしくはそれ以上）の保存的アミノ酸置換、(ii)1個もしくは複数（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、もしくはそれ以上）のアミノ酸の欠失、または(iii)それらの組み合わせによって、天然に存在する配列と異

50

なっているものである。欠失したアミノ酸は、連続していてもよいしまたは不連続であってもよい。保存的アミノ酸置換とは、側鎖および化学的特性が関連しているアミノ酸のファミリーの中でなされるものである。これらには、例えば、(1) 酸性アミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸；(2) 塩基性アミノ酸：リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3) 非極性アミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；(4) 電荷を有しない極性アミノ酸：グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン；(5) 脂肪族アミノ酸：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン（任意で、セリンおよびトレオニンは脂肪族ヒドロキシルとして別に分類される）；(6) 芳香族アミノ酸：フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；(7) アミドアミノ酸：アスパラギン、グルタミン；および(9) 硫黄含有アミノ酸：システインおよびメチオニンが含まれる。例えば、Biochemistry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, W H Freeman and Co.: 1981を参照のこと。バリエーションペプチドが適当であることを確認する方法は、慣習的でありルーチンである。

10

20

30

40

50

【0046】

ペプチド配列のバリエーションには、以前に定義されたペプチド配列における変動が包含される。例えば、公知のエピトープを含む、以前に記載されたペプチド配列を、一端もしくは両端で（例えば、約1~3アミノ酸だけ）延長するかもしくは短縮することができ、かつ/または1個、2個、3個、4個、もしくはそれ以上のアミノ酸を、保存的アミノ酸に置換すること等ができる。さらに、タンパク質のある領域が関心対象のエピトープを含有していることが同定された場合、研究者は、活性を最適化するため、最初のおよその領域の終点から（例えば、いずれかの方向に約5アミノ酸だけ）関心対象の領域を「シフト」させることができる。

【0047】

ある態様において、付加的なN末端ペプチド配列は、別のIR6ドメインペプチドを含むかまたはそれからなることができる。他の態様において、天然配列は、VI₁S₁E IR6ドメインのN末端に天然に隣接しているVI₁S₁E配列である。

【0048】

ある態様において、付加的なN末端ペプチド配列は非天然配列である。本明細書において使用されるように、「非天然」配列とは、天然VI₁S₁Eペプチド配列以外の、ボレリアタンパク質由来であってもよいしまたはそうでなくてもよい任意のタンパク質配列である。ある態様において、付加的なN末端ペプチド配列は、OspA、OspB、DbpA、鞭毛関連タンパク質FlaA (p37) およびFlaB (p41)、OspC (25kd)、BBK32、BmpA (p39)、p21、p39、p66、またはp83のようなボレリア抗原のエピトープを含む。他の微生物に由来するポリペプチドまたはペプチドも使用され得る。

【0049】

付加的なN末端ペプチド配列を含む本発明のペプチドを、感染後の初期（例えば、感染開始後1~2週間以内）にボレリア感染を診断するため、設計することができる。感染の初期に発現が認識されている（例えば、感染後初期にIgM抗体が出現する）病原性ボレリアタンパク質には、OspC、BBK32、鞭毛関連タンパク質FlaB (p41) が含まれ、程度はより低い、BmpA (p39) および鞭毛関連タンパク質FlaA (p37) も含まれる。ポリペプチドまたはそれらのポリペプチドに由来するペプチドは、初期感染についてのアッセイのために適当である。例えば、初期感染の診断のために使用され得る適当な直鎖状エピトープには、OspC中のペプチド

PVVAESPCKP (SEQ ID NO: 147), ILMTLFLFISCNNS (SEQ ID NO: 148)

、およびJobe et al. (2003) Clin Diagn Lab Immunol 10, 573-8（その内容は参照によって本明細書に組み入れられる）によって報告されたような、アミノ酸161~210に含有されている1つまたは複数のエピトープが含まれる。米国特許第6,716,574号（その内容は参照によって本明細書に組み入れられる）に記載されたOspCペプチドも使用され得る。FlaB (p4

1) においては、残基120~235のような、主要な交差反応性エピトープを含有しないことが示された他の適当な領域が、同定されている。例えば、Crother et al.((2003)Infect. Immun.71,3419-3428 ; Wang et al.(1999)Clin Microbial Rev 12,633-653 ; ならびに米国特許第5,618,533号、第5,643,733号、第5,643,751号、第5,932,220号、および第6,617,441号(各々の内容は、参照によって本明細書に組み入れられる)を参照のこと。直鎖状エピトープまたは立体エピトープのいずれかを保持するその他のペプチドは、当技術分野において公知である。具体的には、例えば、OspC、BBK32、またはDbpAの可変領域から、付加的な非天然エピトープ配列を同定する方法は、例えば、米国特許第7,887,815号に記載されている。

【0050】

ある態様において、付加的なN末端ペプチド配列はOspCに由来する。例えば、ある態様において、付加的なN末端ペプチド配列は、SEQ ID NO:149の配列

n_1 - n_2 -S-P- n_5 - n_6 -P (SEQ ID NO:149)

またはその断片(例えば、C末端断片)であり、ここで、 n_1 はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_2 はEおよびDからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_5 はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに n_6 はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸である。

【0051】

ある態様において、付加的なN末端ペプチド配列は、配列の組み合わせである。例えば、付加的なN末端ペプチド配列は、天然配列、非天然配列、またはそのような配列の任意の組み合わせ(例えば、2つ以上の天然配列、2つ以上の非天然配列、天然配列と非天然配列等)を含むことができる。

【0052】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1によって定義された配列を含み、付加的なC末端配列をさらに含む。付加的なC末端ペプチド配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。付加的なC末端ペプチド配列は、天然配列であり得る。例えば、ある態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、別のIR6ドメインペプチドを含むかまたはそれからなることができる。他の態様において、天然配列は、VI sE IR6ドメインのC末端に天然に隣接しているVI sE配列である。

【0053】

ある態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、非天然配列である。ある態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、前述のようなOspA、OspB、DbpA、鞭毛関連タンパク質FlaA (p37) およびFlaB (p41)、OspC (25kd)、BBK32、BmpA (p39)、p21、p39、p66、またはp83のようなボレリア抗原のエピトープを含む。他の微生物に由来するポリペプチドまたはペプチドも使用され得る。

【0054】

ある態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、FlaB (p41) に由来する。例えば、ある態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、SEQ ID NO:150の配列

V- c_2 -E-G- c_5 -Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO: 150)

またはその断片(例えば、N末端断片)であり、ここで、 c_2 はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに c_5 はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である。他の態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、SEQ ID NO:151の配列

A-V- c_3 -E-G- c_6 -Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO: 151)

またはその断片(例えば、N末端断片)であり、ここで、 c_3 はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに c_6 はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である。

【0055】

ある態様において、付加的なC末端ペプチド配列は、配列の組み合わせである。例えば、付加的なC末端ペプチド配列は、天然配列、非天然配列、またはそのような配列の任意

10

20

30

40

50

の組み合わせ（例えば、2つ以上の天然配列、2つ以上の非天然配列、天然配列と非天然配列等）を含むことができる。

【0056】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1によって定義された配列を含み、付加的なN末端ペプチド配列および付加的なC末端ペプチド配列をさらに含む。付加的なN末端ペプチド配列およびC末端ペプチド配列は、前記のようなものであり得る。本発明のペプチドは、全長VIsEタンパク質からなっていない。しかしながら、ある態様において、本発明のペプチドは、全長VIsEタンパク質を含み得る。他の態様において、本発明のペプチドは、全長VIsEタンパク質を含まない。

【0057】

上記の配列に加えて、付加的なN末端配列およびC末端配列は、イムノアッセイ（例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローイムノアッセイ、凝集アッセイ等）における検出のため、本発明のペプチドをよりよく提示するために設計されたフレキシブル配列を含むかまたはそれからなることができる。そのようなフレキシブル配列は、当業者によって容易に同定され得る。

【0058】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:2の配列

n_1 - n_2 -S-P- n_5 - n_6 -P-L-K-K-D-D-N-I-A-A-A- X_{18} -V-L-R-G- X_{23} -

X_{24} -K-D-G- X_{28} -F-A- X_{31} - X_{32} -A-V- c_{35} -E-G- c_{38} -Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO: 2)

を含むかまたはそれからなり、ここで、 n_1 はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_2 はEおよびDからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_5 はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、 n_6 はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{18} はVおよびLからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{23} はLおよびIからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{24} はAおよびVからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{28} はR、D、およびNからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{31} はI、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸であり、 X_{32} はKおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、 c_{35} はQおよびRからなる群より選択されるアミノ酸であり、ならびに c_{38} はVおよびAからなる群より選択されるアミノ酸である。

【0059】

ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:2によって定義された配列を含み、付加的なN末端ペプチド配列、付加的なC末端ペプチド配列、またはそれらの組み合わせをさらに含む。付加的なN末端ペプチド配列およびC末端ペプチド配列は、前記のようなものであり得る。

【0060】

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

【0061】

ある態様において、本発明のペプチドは、本明細書に記載されたペプチド配列のエピト

10

20

30

40

50

ープを含む。例えば、ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1~146からなる群より選択される配列のエピトープを含む。

【0062】

ある態様において、本発明のペプチドは、本明細書に記載されたペプチド配列の断片を含む。例えば、ある態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:1~146からなる群より選択される配列の断片を含む。断片は、例えば、少なくとも5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸、43アミノ酸、または44アミノ酸の長さを有し得る。断片は、連続していてもよいし、または1個以上の欠失（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、もしくはそれ以上のアミノ酸残基の欠失）を含んでいてもよい。ある態様において、断片は、米国特許第6,475,492号、第6,660,274号、第6,719,983号、第6,740,744号、もしくは第7,887,815号、または欧州特許第0894143号、第1012181号、第1171605号、もしくは第1589109号に示された配列を含む。ある態様において、断片は、米国特許第6,475,492号、第6,660,274号、第6,719,983号、第6,740,744号、および第7,887,815号、ならびに欧州特許第0894143号、第1012181号、第1171605号、および第1589109号のうちの一つまたは複数に示された配列からなっていない。本明細書に記載されたペプチド配列の断片を含む本発明のペプチドは、付加的なN末端ペプチド配列、付加的なC末端ペプチド配列、またはそれらの組み合わせをさらに含むことができる。付加的なN末端ペプチド配列およびC末端ペプチド配列は、前記のようなものであり得る。

10
20

【0063】

付加的なN末端ペプチド配列またはC末端ペプチド配列を含む本発明のペプチドは、ペプチド（例えば、SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2のペプチドまたはそれらの断片）を、付加的なN末端ペプチド配列またはC末端ペプチド配列と接続するリンカーをさらに含むことができる。リンカーは、例えば、ペプチドスペーサーであり得る。そのようなスペーサーは、例えば、約1~5個（例えば、約3個）のアミノ酸残基、好ましくは、電荷を有しないアミノ酸、例えば、グリシンまたはアラニンのような脂肪族残基からなることができる。一つの態様において、スペーサーは三重グリシンスペーサーである。別の態様において、スペーサーは三重アラニンスペーサーである。さらに別の態様において、スペーサーはグリシン残基およびアラニン残基の両方を含む。あるいは、リンカーは化学的（即ち、非ペプチド）リンカーであってもよい。

30

【0064】

ある態様において、本発明のペプチドは、合成化学によって作製される（即ち、「合成ペプチド」）。他の態様において、本発明のペプチドは、生物学的に（即ち、リボソームのような細胞機構によって）作製される。ある態様において、本発明のペプチドは、単離されている。本明細書において使用されるように、「単離された」ペプチドとは、合成的にまたは生物学的に作製され、次いで、ペプチドを作製するために使用された化学物質および/または細胞機構から、少なくとも部分的に、精製されたペプチドである。ある態様において、本発明の単離されたペプチドは、実質的に精製されている。「実質的に精製された」という用語は、本明細書において使用されるように、細胞材料（タンパク質、脂質、炭水化物、核酸等）、培養培地、化学的前駆物質、ペプチドの合成において使用された化学物質、またはそれらの組み合わせを実質的に含まない、ペプチドのような分子をさす。実質的に精製されたペプチドは、細胞材料、培養培地、他のポリペプチド、化学的前駆物質、および/またはペプチドの合成において使用された化学物質の約40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%、またはそれ未満を有している。従って、実質的に純粋な、ペプチドのような分子は、乾重量で、少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%、関心対象の分子であり得る。本発明の単離されたペ

40
50

プチドは、例えば、キットの一部として、水、緩衝液に含まれていてもよいし、または再生のため乾燥形態をとっていてもよい。本発明の単離されたペプチドは、薬学的に許容される塩の形態をとっていてもよい。本発明のペプチドと塩を形成することができる適当な酸および塩基は、当業者に周知であり、無機および有機の酸および塩基を含む。

【0065】

ある態様において、本発明のペプチドは、アフィニティ精製されている。例えば、ある態様において、本発明のペプチドは、ペプチド-抗体複合体が形成されるよう、そのような抗体を本発明のペプチドと接触させ、不純物を除去するため、ペプチド-抗体複合体を洗浄し、次いで、抗体からペプチドを溶出させることによって、抗ボレリア抗体（例えば、VlsEタンパク質および任意でその他のボレリア抗原に対する抗体）と結合する能力によ

10

【0066】

ある態様において、本発明のペプチドは、修飾されている。本発明のペプチドは、熱および/または界面活性剤（例えば、SDS）による変性のような、多様な技術によって修飾されていてよい。あるいは、本発明のペプチドは、1つまたは複数のさらなるモエティとの会合によって修飾されていてよい。会合は、共有結合性であってもよいしまたは非共有結合性であってもよく、例えば、リジンもしくはシステインのような末端アミノ酸リンカー、化学的カップリング剤、またはペプチド結合を介していてもよい。付加的なモエティは、例えば、リガンド、リガンド受容体、融合パートナー、検出可能な標識、酵素、ま

20

【0067】

本発明のペプチドは、（例えば、システイン残基もしくはリジン残基を介して）ビオチン、（例えば、システイン残基を介して）脂質分子、または（例えば、システイン残基もしくはリジン残基を介して）担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、キーホールリンベットヘモシアニン（KLH）、免疫グロブリンFcドメイン）のようなりガンドにコンジュゲートされていてよい。ビオチンのようなりガンドへの付着は、アビジン、ストレプトアビジン、重合ストレプトアビジン（例えば、いずれも参照によって本明細書に組み入れられるUS2010/0081125およびUS2010/0267166を参照のこと）、またはニュートラアビジンのようなりガンド受容体と、ペプチドを会合させるために有用であり得る。アビジン、ス

30

40

【0068】

本発明のペプチドは、融合パートナー（例えば、ペプチドまたはその他のモエティ）に融合しているかまたはコンジュゲートされていてよい。いくつかの態様において、融合パートナーは、精製、宿主細胞におけるペプチドの発現、検出、ペプチドの安定化、表面またはその他の実体へのペプチドの接続等を容易にすることができる。融合パートナーのための適当な化合物の例には、担体タンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリンFcドメイン、 dendリマー等）、ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジントグ等が含まれる。融合は、例えば、ペプチド結合によって達成され得る。例えば、本発明のペプチドおよび融合パートナーは、融合タンパク質であつてもよ

50

く、インフレームで直接融合していてもよいし、または付加的なN末端ペプチド配列およびC末端ペプチド配列に関して前述されたようなペプチドリンカーを含んでいてもよい。ある態様において、本発明のペプチドの混合物は、例えば、MAPS構造のように、デンドリマーによって連結されていてもよい。

【0069】

さらに、本発明のペプチドは、多様な公知の化学基または分子を含むよう修飾されていてもよい。そのような修飾には、グリコシル化、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、ポリエチレングリコールへの共有結合性の付着（例えば、PEG化）、フラビンの共有結合性の付着、ヘムモエティの共有結合性の付着、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合性の付着、脂質または脂質誘導体の共有結合性の付着、ホスファチジルイノシトールの共有結合性の付着、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル、共有結合性の架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解加工、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、ユビキチン化、脂肪酸による修飾、アルギニル化のような転移RNAによって媒介されるタンパク質へのアミノ酸の付加等が含まれるが、これらに限定されない。（非天然アミノ酸を含む）アミノ酸の類似体、および置換された結合を有するペプチドも、含まれる。本明細書に記述された配列のうちの任意のものからなる本発明のペプチドが、記述された修飾のうちの任意のものによって修飾されていてもよい。そのようなペプチドであっても、アミノ酸「からなる」。

10

20

【0070】

上に示されたような修飾は、当業者に周知であって、科学文献に極めて詳細に記載されている。いくつかの特に一般的な修飾、例えば、グリコシル化、脂質付着、硫酸化、グルタミン酸残基のカルボキシル化、水酸化、およびADPリボシル化は、Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993) のような多くの基礎的な教科書に記載されている。Wold, F., Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983); Seifter et al. (1990) Meth. Enzymol. 182:626-646、および Rattan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 のような、この主題に関する多くの詳細な概説が、入手可能である。

30

【0071】

ある態様において、本発明のペプチドは、固体または半固体の支持体のような基質に付着しているかまたは固定化されている。付着は、共有結合性または非共有結合性であり得、担体、支持体、または表面に付着した成分に対する高い親和性を有するモエティのような、共有結合性または非共有結合性の結合を可能にするペプチドと会合したモエティによって容易にされ得る。例えば、ペプチドは、ビオチンのようなリガンドと会合していてもよく、表面に会合した成分は、アビジンのような対応するリガンド受容体であり得る。いくつかの態様において、ペプチドは、ペプチドの基質への付着を容易にする融合パートナー、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）に会合していてもよい。ペプチドは、イムノアッセイにおける、抗体を含有している試料の添加の前または後に、基質に付着させられるかまたは固定化される。

40

【0072】

ある態様において、基質は、コロイド粒子（例えば、金、銀、白金、銅、金属複合材、その他の軟金属から作成されたコロイドナノ粒子、コアシェル構造粒子、もしくは中空金ナノスフェア）、またはその他の型の粒子（例えば、磁気ビーズ、もしくはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、もしくはPVDFを含む粒子もしくはナノ粒子）のようなビーズである。そのような粒子は、標識（例えば、発色標識、化学発光標識、または蛍光標識）を含むことができ、イムノアッセイにおいてペプチドの位置を可視化するために有用であり得る。ある態様において、本発明のペプチドの末端システインが、金、銀、白金、銅、金属複合材、その他の軟金属等から作成されたナノ粒

50

ドもしくは抗原のような1種類または複数種類の付加的なペプチドとを含む。ボレリアペプチドまたはボレリア抗原は、本明細書に記載された任意のボレリアペプチドもしくはボレリア抗原（例えば、OspA、OspB、DbpA、鞭毛関連タンパク質FlaA（p37）およびFlaB（p41）、OspC（25kd）、BBK32、BmpA（p39）、p21、p39、p66、p83、もしくはVlsEタンパク質）、またはそれらの任意の断片もしくはエピトープであり得る。いくつかの適当なボレリアペプチドは、例えば、米国特許第7,887,815号に記載されている。組み合わせは、個々のペプチドもしくはポリペプチドのカクテル（単純な混合物）を含んでいてもよいし、融合ペプチドもしくは融合ポリペプチド（例えば、多量体ペプチド）の形態をとっていてもよいし、またはペプチドが、任意で、連結残基（例えば、リジン残基）によって、（例えば、MAPS構造のように）デンドリマーによって連結されていてもよい。本発明のペプチドは、別の適当なペプチドと、N末端またはC末端で融合していてもよい。2コピーまたはそれ以上の本発明のペプチドが、単独で、または1つもしくは複数の付加的なペプチドと組み合わせられて、相互に接合されていてもよい。融合型および非融合型のペプチドまたはポリペプチドの組み合わせが使用されてもよい。一つの態様において、付加的なペプチドは、ボレリアペプチドもしくはボレリア抗原に由来するB細胞エピトープおよび/もしくはT細胞エピトープ、感染性ボレリア種に由来するペプチドもしくは抗原、またはライム病の病原体に由来するペプチドもしくは抗原を含有している。

10

【0079】

別の局面において、本発明は、本発明のペプチドをコードする配列を含む核酸を提供する。本発明の核酸は、微生物ゲノムの一部を含有し、一本鎖または二本鎖であり得る。核酸は、RNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成されたRNAもしくはDNA、またはそれらの組み合わせであり得る。核酸は、タンパク質、脂質、およびその他のポリヌクレオチドのような他の成分から精製されてよい。例えば、核酸は、50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%精製されている。本発明の核酸は、本明細書に記載されたペプチドをコードする。ある態様において、核酸は、SEQ ID NO:1~146の配列を有するペプチド、またはそれらの組み合わせをコードする。本発明の核酸は、リンカーをコードする配列、シグナル配列、TMR輸送停止配列、膜貫通ドメイン、またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジントグ、およびブドウ球菌プロテインAのようなタンパク質精製において有用なリガンドのような他のヌクレオチド配列を含むことができる。

20

【0080】

本発明の核酸は単離されていてよい。「単離された」核酸とは、それが天然に会合している5'および3'の隣接ゲノム配列の一方または両方と直接連続していないものである。天然に存在するゲノムにおいてその組換えDNA分子に天然に直接隣接して見出される核酸配列が除去されているかまたは存在しないのであれば、単離された核酸は、例えば、任意の長さの組換えDNA分子であり得る。単離された核酸には、天然に存在しない核酸分子も含まれ得る。本発明の核酸には、免疫原性ペプチドをコードする断片も含まれ得る。本発明の核酸は、全長ポリペプチド、ペプチド断片、およびバリエーションペプチドまたは融合ペプチドをコードすることができる。

30

【0081】

本発明の核酸は、例えば、感染個体に由来する血液、血清、唾液、または組織のような生物学的試料の中に存在する核酸配列から、少なくとも一部分、単離されていてよい。例えば、自動合成装置を使用して、実験室において核酸を合成することもできる。ポリペプチドをコードするゲノムDNAまたはcDNAのいずれかから、少なくとも一部分、核酸を増幅するため、PCRのような増幅法を使用することができる。

40

【0082】

本発明の核酸は、天然に存在するポリペプチドをコードする配列を含んでいてもよいし、または自然界には存在しない改変された配列をコードしてもよい。所望によって、核酸は、宿主細胞における本発明のポリヌクレオチドの発現を駆動する、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、またはその他の制御要素を含む発現調節要素を含む発現ベクターへクローニングされ得る。発現ベクターは、例えば、pBR322、pUC、もしくはColE1

50

のようなプラスミド、またはアデノウイルス2型ベクターもしくは5型ベクターのようなアデノウイルスベクターであり得る。任意で、シンドビスウイルスベクター、サルウイルス40ベクター、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、およびサイトメガロウイルスベクター、ならびにマウス肉腫ウイルス、マウス乳癌ウイルス、モロニーマウス白血球ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルスベクターを含むが、これらに限定されない、他のベクターが使用されてもよい。MCおよびMC1のようなミニ染色体、バクテリオファージ、ファージミド、酵母人工染色体、細菌人工染色体、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、コスミド（ファージラムダcos部位が挿入されたプラスミド）、ならびにレプリコン（細胞において自己の調節下で複製可能な遺伝要素）も使用され得る。

10

【0083】

発現調節配列に機能的に連結されたポリヌクレオチドを調製し、宿主細胞において発現させる方法は、当技術分野において周知である。例えば、米国特許第4,366,246号を参照のこと。本発明の核酸は、ポリヌクレオチドの転写および/または翻訳を指図する1つまたは複数の発現調節要素に隣接してまたは近傍に位置する時、機能的に連結されている。

【0084】

従って、例えば、従来の遺伝子工学技術に従い、本発明のペプチドを組換え作製することができる。本発明の組換えペプチドを作製するためには、ペプチドをコードする核酸を、適当な発現系に挿入する。一般に、選択されたペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、そのペプチドの発現を可能にする発現調節配列に機能的に連結された、組換え分子またはベクターを構築する。例えば、細菌、ウイルス、酵母、真菌、昆虫、または哺乳動物の発現系を含有しているベクターを含む、多数の型の適切な発現ベクターが、当技術分野において公知である。そのような発現ベクターを入手し使用する方法は周知である。本発明の組成物または方法のために使用されるこの技術およびその他の分子生物学技術に関する案内については、例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, current edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Miller et al., *Genetic Engineering*, 8:277-298 (Plenum Press, current edition)、Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, N.Y., current edition)、Recombinant Gene Expression Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, N.J., current edition)、および *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausabel et al, Eds.,) John Wiley & Sons, NY (current edition)、ならびにそれらに引用された参照を参照のこと。

20

30

【0085】

従って、本発明は、本発明の核酸を含むベクター、およびそのようなベクターを含む宿主細胞も提供する。ある態様において、ベクターはシャトルベクターである。他の態様において、ベクターは発現ベクター（例えば、細菌発現ベクターまたは真核生物発現ベクター）である。ある態様において、宿主細胞は細菌細胞である。他の態様において、宿主細胞は真核細胞である。

【0086】

この方法による本発明の組換え核酸またはベクターのトランスフェクションのために適当な宿主細胞または細胞株には、細菌細胞が含まれる。例えば、大腸菌 (*E. coli*) の様々な株（例えば、HB101、MC1061）は、バイオテクノロジーの領域において宿主細胞として周知である。枯草菌 (*B. subtilis*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、およびその他の桿菌等の様々な株も、この方法において利用される。あるいは、従来の手法を使用して、酵母、昆虫、哺乳動物、またはその他の細胞型において、本発明のペプチドを発現させることもできる。無細胞インビトロ合成および/または酵素によって媒介される合成機構を使用してもよい。

40

【0087】

本発明は、発現調節配列（例えば、転写制御配列）の調節下で本発明のポリヌクレオチドを含有している少なくとも1つの発現ベクターによって、例えば、電気穿孔のような従

50

来の手段によって、宿主細胞をトランスフェクトするかまたは形質転換する工程を含む、組換えペプチドまたは組換えポリペプチドを作製する方法も提供する。トランスフェクトされたまたは形質転換された宿主細胞は、次いで、ペプチドまたはポリペプチドの発現を可能にする条件の下で培養される。発現されたペプチドまたはポリペプチドは、回収され、単離され、HPLC、FPLC等を使用した順相または逆相のような液体クロマトグラフィ、無機リガンドまたはモノクローナル抗体によるもののようなアフィニティクロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、固定化金属キレートクロマトグラフィ、ゲル電気泳動等を含む、当業者に公知の適切な手段によって、細胞から（または細胞外に発現された場合、培養培地から）任意で精製される。当業者は、本発明の範囲を逸脱することなく、最も適切な単離および精製の技術を選択し得る。当業者は、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、キャピラリー電気泳動、カラムクロマトグラフィ（例えば、高速液体クロマトグラフィ（HPLC））、アミノ末端アミノ酸分析、および定量的アミノ酸分析を含む、標準的な方法を使用することによって、ペプチドまたはポリペプチドの純度を決定することができる。

【0088】

方法

別の局面において、本発明は、試料中のボレリア抗原のエピトープに対する抗体を検出する方法を提供する。ある態様において、方法は、試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、ボレリア抗原のエピトープに対する抗体が試料中に存在することを表す、工程を含む。ある態様において、ボレリア抗原は、感染性ボレリア種に由来する。ある態様において、ボレリア抗原は、狭義のボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・アフゼリ、またはボレリア・ガリニのような病原性ボレリア種に由来する。B. ルシタニエ (*B. lusitaniae*) およびB. バライシヤネ (*B. valaisianae*) のようなライム病に関連付けられているボレリアのその他の種も、本発明のペプチドと特異的に反応することができる抗体を誘導するのであれば、本発明の方法を使用して検出され得る。従って、「病原性ボレリア」という用語は、本明細書において使用されるように、ライム病を引き起こす任意のそのようなボレリア種をさすことが理解されるべきである。

【0089】

ある態様において、方法は、試料を、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上（例えば、5種類、6種類、7種類、8種類、9種類、10種類、15種類、20種類、25種類、30種類、40種類、50種類、60種類、70種類、80種類、90種類、100種類、150種類、200種類、250種類、300種類、400種類、500種類、またはそれ以上）の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。ある態様において、方法は、試料を、1種類または複数種類の本発明のペプチドと1種類または複数種類の他のペプチド（例えば、OspA、OspB、DbpA、鞭毛関連タンパク質FlaA (p37) およびFlaB (p41)、OspC (25kd)、BBK32、BmpA (p39)、p21、p39、p66、p83、またはVisEタンパク質のようなボレリアペプチドまたはその抗原性断片もしくはエピトープ）との混合物と接触させる工程を含む。

【0090】

ある態様において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された（例えば、合成のかつ/または精製された）ペプチドである。ある態様において、ペプチドまたはペプチドの混合物は、固体支持体に付着しているかまたは固定化されている。ある態様において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子、ナノ粒子、ラテックスビーズ等）、ラテラルフロー免疫アッセイ装置中の流路（例えば、多孔質膜）、分析用ローター中の流路、プロット（ウエスタンプロット、ドットプロット、もしくはスロットプロット）、チューブもしくは（例えば、ELISAアッセイに適したプレート中の）ウェル、またはセンサー（例えば、電気化学センサー、光学センサー、もしくは光電子センサー）である。

【0091】

ある態様において、検出する工程は、ELISAアッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、ラテラルフロー免疫アッセイを実施することを含む。他の

10

20

30

40

50

態様において、検出する工程は、凝集アッセイを実施することを含む。他の態様において、検出する工程は、分析用ローター中で試料を回転させることを含む。さらに他の態様において、検出する工程は、電気化学センサー、光学センサー、または光電子センサーにより試料を分析することを含む。

【0092】

本発明のペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するための多数の異なる従来のアッセイが存在する。例えば、検出する工程は、ELISAアッセイを実施すること、ラテラルフローイムノアッセイを実施すること、凝集アッセイを実施すること、ウエスタンブロット、スロットブロット、もしくはドットブロットを実施すること、分析用ローターにおいて試料を分析すること、または電気化学センサー、光学センサー、もしくは光電子センサーにより試料を分析することを含み得る。これらの異なるアッセイは、上に記載されておりかつ/または当業者に周知である。

10

【0093】

一つの態様において、方法は、感染した対象の免疫系によって生物学的液体または組織へ産生され、かつ本発明のペプチドまたは本発明のペプチドの組み合わせと、および任意で、1種類または複数種類の適当な付加的な抗原性ポリペプチドまたは抗原性ペプチドと特異的に結合することができる、ボレリア抗原（例えば、B.ブルグドルフェリのような病原性ボレリアの抗原）に対する天然に存在する抗体の存在を検出する工程を含む。

【0094】

適当なイムノアッセイ法は、典型的には、以下の工程を含む：抗体を含有している可能性が高い体液または組織の試料を（例えば、患者から）受容するかまたは入手する工程；特異的なペプチド-抗体複合体の形成のために（例えば、抗体へのペプチドの特異的な結合のために）有効な条件の下で、アッセイされる試料を本発明のペプチドと接触させる（例えば、インキュベートするかまたは反応させる）工程；および接触させられた（反応させられた）試料を抗体-ペプチド反応の存在についてアッセイする（例えば、抗体-ペプチド複合体の量を決定する）工程。上昇した量の抗体-ペプチド複合体の存在は、対象が感染性ボレリア種に曝され感染したことを示す。ボレリア抗原に対する抗体に「特異的に結合する」（例えば、「特異的である」または「優先的に」結合する）その修飾型を含むペプチドは、抗体の検出を可能にするために十分な量および時間で、抗体と相互作用するか、または物理的会合を形成するかもしくは受ける。「特異的に」または「優先的に」とは、ペプチドが、試料中の他の抗体に対するものより高い親和性（例えば、より高度の選択性）をそのような抗体に対して有することを意味する。例えば、ペプチドは、試料中の他の抗体より少なくとも約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、またはそれ以上高い抗体に対する親和性を有し得る。例えば、競合的結合研究を含む、多様なルーチンの手法によって、そのような親和性または特異性の程度を決定することができる。ELISAアッセイにおいて、陽性応答は、健常対照群の平均値より2または3標準偏差大きい値として定義される。いくつかの態様において、第二段階アッセイが、ライム病の明確な血清診断を提供するために必要とされる。

20

30

【0095】

「抗体を含有している試料」または「試料中の抗体を検出する」のような語句は、抗体が含有されていないかまたは検出されない試料または決定（例えば、検出の試み）を除外することを意味しない。一般的な意味において、本発明は、検出されるか否かに関係なく、感染性ボレリアによる感染に応答して産生された抗体が試料中に存在するか否かを決定するためのアッセイを含む。

40

【0096】

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

【0097】

方法は、抗体を含有している可能性が高い体液または組織の試料を対象から受容するか

50

または入手する工程を含む。抗体は、例えば、IgG型、IgE型、IgD型、IgM型、またはIgA型であり得る。一般には、例えば、感染の初期段階での検出のため、IgM抗体および/またはIgA抗体を検出する。しかしながら、ボレリア感染の場合には、IgM抗体が長時間存続し得る。上述の付加的なペプチドのうちいくつか（例えば、鞭毛タンパク質の検出のためのペプチド）が、方法において使用される時には、IgG抗体を検出することができる。試料は、好ましくは、入手が容易なものであり、静脈血試料に由来する血清もしくは血漿であり得、または指穿刺に由来するものであってもよい。その他の身体部分に由来する組織、または脳脊髄液（CSF）、唾液、胃分泌液、粘液、尿等のようなその他の体液も、抗体を含有していることが公知であり、試料の起源として使用され得る。

【0098】

ペプチド抗原および試料抗体を適当な媒体において反応させた後、抗体-ペプチド反応の存在または非存在を決定するため、アッセイを実施する。当業者に明らかであろう多くの型の適当なアッセイには、免疫沈降アッセイおよび凝集アッセイが含まれる。

【0099】

本発明のある態様において、アッセイは以下の工程を含む：例えば、直接、または本発明のペプチドとの結合を介して間接的に、試料中の抗体を固定化する工程；本発明のペプチドを添加する工程；および、例えば、標識されたペプチドによって、または標識された結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン-コロイド金複合体）のような標識された物質もしくはペプチドを特異的に認識する標識された抗体を添加することによって、ペプチドと結合した抗体の程度を検出する工程。例えば、図1を参照のこと。他の態様において、アッセイは以下の工程を含む：本発明のペプチドを固定化する工程；抗体を含有している試料を添加する工程；および、例えば、標識（例えば、コロイド金複合体、蛍光標識、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ））に直接もしくは間接的にコンジュゲートされた別の本発明のペプチドを添加することによって、または結合パートナーのような標識された物質、もしくは試料抗体を特異的に認識する標識された抗体（例えば、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgM抗体、抗イヌIgG抗体、抗イヌIgM抗体、プロテインA、プロテインG、プロテインL等）、もしくはそれらの組み合わせを添加することによって、ペプチドと結合した抗体の量を検出する工程。例えば、図3を参照のこと。他の態様において、アッセイは以下の工程を含む：本発明のペプチドを固定化する工程；抗体を含有している試料を添加する工程；および、例えば、試料抗体を特異的に認識する第一の結合パートナー（例えば、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgM抗体、抗イヌIgG抗体、抗イヌIgM抗体、プロテインA、プロテインG、プロテインL等）を添加し、第一の結合パートナーを認識する標識された第二の結合パートナー（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインL等）をさらに添加することによって、ペプチドと結合した抗体の量を検出する工程。さらに他の態様において、アッセイは以下の工程を含む：反応物を固定化することなく、ペプチドと抗体を含有している試料とを反応させ、次いで、例えば、標識されたペプチドによって、または標識された結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン-コロイド金複合体）もしくはペプチドを特異的に認識する標識された抗体のような標識された物質を添加することによって、抗体とペプチドとの複合体の量を検出する工程。

【0100】

本発明のペプチドの固定化は、共有結合性または非共有結合性であり得、非共有結合性の固定化は、非特異的（例えば、ポリスチレン表面、例えば、マイクロタイターウェル内のポリスチレン表面との非特異的結合）であってもよい。固体または半固体の担体、支持体、または表面との特異的または半特異的な結合は、固体または半固体の担体、支持体、または表面との共有結合性または非共有結合性の結合を可能にするモエティと会合したペプチドによって達成され得る。例えば、モエティは、担体、支持体、または表面に付着した成分に対する親和性を有し得る。この場合、モエティは、例えば、6-アミノヘキサミン酸のようなペプチドのアミノ酸基と結合したビオチンまたはビオチニル基またはそれらの類似体であり得、その場合、成分は、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、またはそれらの類似体である。代替法は、モエティがアミノ酸配列His-His-His-His-Hi

10

20

30

40

50

s-His (SEQ ID NO:152) を有し、担体がNi⁺⁺イオンまたはCo⁺⁺イオンによる電荷を有するニトリロ三酢酸 (NTA) 誘導体を含む状況である。ある態様において、モエティは、融合パートナー、例えば、BSAである。例示的な態様において、本発明のペプチドは、ペプチドのN末端および/またはC末端の残基を介してBSAにコンジュゲートされていてよい。一つの態様において、1種類、2種類、3種類、4種類、5種類、10種類、15種類、20種類、25種類、30種類、またはそれ以上の本発明のペプチドが、BSAに置換されていてよく、例えば、BSAにコンジュゲートされていてよい。当業者に理解されるように、置換レベルは、アッセイの感度に影響し得る。より少数のペプチド分子を含有している高濃度のBSAペプチドによって提示される感度を達成するため、より低い濃度の、高度に置換されたBSAが必要とされる。ある他の態様において、融合パートナーはMAPSであり得る。ある例示的な態様において、MAPSは、4本、8本、またはそれ以上の非対称分枝からなっていてよい。

10

【0101】

適当な担体、支持体、および表面には、ビーズ (例えば、磁気ビーズ、コロイド金のようなコロイド粒子もしくはコロイドナノ粒子、もしくはシリカ、ラテックス、ポリスチレン、ポリカーボネート、もしくはPDVFを含むナノ粒子)、スチレンジビニルベンゼン、水酸化スチレンジビニルベンゼン、ポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレンのような共重合体のラテックス、カーボンブラック、活性化されていないガラスもしくはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニルによって活性化されたガラス、エポキシによって活性化された多孔質磁気ガラス、ゼラチンのビーズ、または多糖粒子、またはその他のタンパク質粒子、赤血球、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体もしくはそのような抗体のFab断片が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0102】

特異的抗体の検出のための抗原を使用したイムノアッセイのためのプロトコルは、当技術分野において周知である。例えば、従来サンドイッチアッセイを使用してもよいし、または従来競合アッセイフォーマットを使用してもよい。いくつかの適当な型のアッセイの考察に関しては、Current Protocols in Immunology (前記) を参照のこと。ある態様において、本発明のペプチドは、抗体を含有している試料の添加の前または後に、共有結合性または非共有結合性の結合によって、固体または半固体の表面または担体に固定化される。

【0103】

特異的結合アッセイ、具体的には、イムノアッセイを実施するための装置は、公知であり、本発明の方法において使用するために容易に適応し得る。固相アッセイは、一般に、試薬の分離がより迅速で、より単純であるため、沈殿、遠心分離、ろ過、クロマトグラフィ、または磁気のような分離工程を必要とする不均一アッセイ法より、実施が容易である。固相アッセイ装置には、マイクロタイタープレート、フロースルーアッセイ装置 (例えば、ラテラルフローイムノアッセイ装置)、ディップスティック、およびイムノキャピラリーイムノアッセイ装置またはイムノクロマトグラフィイムノアッセイ装置が含まれる。

30

【0104】

本発明の態様において、固体または半固体の表面または担体は、マイクロタイターウェルの底面もしくは壁面、フィルタ表面もしくは膜 (例えば、ニトロセルロース膜もしくはImmobilon (商標) 膜のようなPVDF (フッ化ポリビニリデン) 膜)、中空繊維、ビーズクロマトグラフィ媒体 (例えば、アガロースゲルもしくはポリアクリルアミドゲル)、磁気ビーズ、繊維性セルロースマトリックス、HPLCマトリックス、FPLCマトリックス、ペプチドが結合している分子が、液相に溶解もしくは分散した時、フィルタによって保持されるようなサイズの分子を有する物質、ミセルを同伴させずに、液相を変更もしくは交換することを可能にする、ミセルを形成するかもしくはミセルの形成に参加することができる物質、水溶性重合体、またはその他の適当な担体、支持体、もしくは表面である。

40

【0105】

本発明のいくつかの態様において、ペプチドには、検出を可能にする適当な標識が提供される。単独で、または他の組成物もしくは化合物と協力して、検出可能なシグナルを提

50

供することができる従来の標識が使用され得る。適当な検出法には、例えば、蛍光標識によって直接または間接的にタグ付けされた薬剤の、共焦点顕微鏡検を含む免疫蛍光顕微鏡検による、またはフローサイトメトリー（FACS）による検出、放射標識された薬剤のオートラジオグラフィによる検出、電子顕微鏡検、免疫染色、細胞分画等が含まれる。一つの態様において、放射性元素（例えば、放射性アミノ酸）が、ペプチド鎖に直接組み入れられ；別の態様において、蛍光標識が、ビオチン/アビジン相互作用、フルオレセインにコンジュゲートされた抗体との会合等を介してペプチドと会合させられる。一つの態様において、抗体に対する検出可能な特異的結合パートナーが、混合物に添加される。例えば、結合パートナーは、一次抗体に結合する検出可能な二次抗体またはその他の結合剤（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインL）であり得る。この二次抗体またはその他の結合剤は、例えば、放射標識、酵素標識、蛍光標識、発光標識、またはアビジン/ビオチン系のようなその他の検出可能な標識によって標識され得る。別の態様において、結合パートナーは、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのような酵素またはその他のシグナリングモエティに直接または間接的に（例えば、ビオチン/アビジン相互作用を介して）コンジュゲートされていてもよい本発明のペプチドである。酵素の場合、検出可能なシグナルは、発色基質、蛍光発生基質、または化学発光基質のような、検出可能なシグナルを生ずる酵素の基質を添加することによって生成される。

【0106】

結合したペプチドを検出するための「検出系」には、本明細書において使用されるように、ペプチドに特異的な抗体のような検出可能な結合パートナーが含まれ得る。一つの態様において、結合パートナーは直接標識される。別の態様において、結合パートナーは、適当な基質の存在下で検出可能なシグナルを生ずることができる酵素のようなシグナル生成試薬に付着している。ペプチドを固定化するための表面が、任意で、検出系に付随していてもよい。

【0107】

本発明の態様において、検出手法は、抗体-ペプチド複合体を色の変化について視覚的に調査する工程、または抗体-ペプチド複合体を物理化学的变化について調査する工程を含む。物理化学的变化は、酸化反応またはその他の化学反応によって起こり得る。それらは、分光光度計等を使用して、目によって検出され得る。

【0108】

特に有用なアッセイフォーマットは、ラテラルフローイムノアッセイフォーマットである。ヒトもしくは動物（例えば、イヌ、マウス、シカ等）の免疫グロブリンに対する抗体、またはブドウ球菌プロテインAもしくはプロテインGに対する抗体を、シグナル生成剤またはレポーター（例えば、コロイド金）によって標識し、それを、乾燥させ、ガラスファイバーパッド（サンプルアプリケーションパッドまたはコンジュゲートパッド）に置くことができる。診断用ペプチドを、ニトロセルロースまたはPVDF（フッ化ポリビニリデン）膜（例えば、Immobilon（商標）膜）のような膜に固定化する。試料の溶液（血液、血清等）が、サンプルアプリケーションパッドに適用された（またはコンジュゲートパッドに流れた）時、標識されたレポーターを溶解させ、次いで、それが試料中の全抗体に結合する。次いで、生じた複合体が、毛管作用によって、次の膜（診断用ペプチドを含有しているPVDFまたはニトロセルロース）へ輸送される。診断用ペプチドに対する抗体が存在する場合、それらは、膜上の診断用ペプチドのストライプに結合し、それによって、シグナル（例えば、可視であるかまたは可視化可能であるバンド）を生成する。標識された抗体に対して特異的な付加的な抗体または標識された二次抗体を、対照シグナルを生ずるために使用することができる。

【0109】

ラテラルフローイムノアッセイのための代替フォーマットは、リガンド（例えば、ビオチン）にコンジュゲートされ、標識されたリガンド受容体（例えば、ストレプトアビジンコロイド金）と複合体化された本発明のペプチドまたは組成物を含む。標識されたペプチド複合体を、サンプルアプリケーションパッドまたはコンジュゲートパッドに置くことが

10

20

30

40

50

できる。抗ヒトIgG/IgM抗体もしくは抗動物（例えば、イヌ、マウス、シカ）IgG/IgM抗体、またはその他の本発明のペプチドを、ニトロセルロースまたはPVDFのような膜上の試験部位（例えば、試験ライン）に固定化する。試料をサンプルアプリケーションパッドに添加した時、試料中の抗体が、本発明のペプチドに結合する抗体が間接的に標識されるよう、標識されたペプチド複合体と反応する。次いで、試料中の抗体は、毛管作用によって、次の膜（診断用ペプチドを含有しているPVDFまたはニトロセルロース）へ輸送され、固定化された抗ヒトIgG/IgM抗体もしくは抗動物IgG/IgM抗体（もしくはプロテインA、プロテインG、プロテインL、もしくはそれらの組み合わせ）、または固定化された本発明のペプチドに結合する。試料抗体のいずれかが標識された本発明のペプチドに結合している場合、ペプチドと会合した標識が、試験部位に、可視であるかまたは可視化可能である。この型のラテラルフロー装置の一つの態様は、図2に示される。試験部位に固定化される捕獲剤としても、試料中の抗体と反応する可溶性の標識された複合体としても、本発明のペプチドが使用される、この型のラテラルフロー装置の別の態様は、図3に示される。このアッセイのための適当な対照には、例えば、サンプルアプリケーションパッドまたはコンジュゲートパッドに位置するニワトリIgY-コロイド金コンジュゲート、および試験部位の近傍に位置する対照部位に固定化された抗ニワトリIgY抗体が含まれ得る。

10

【0110】

上記のラテラルフロー免疫アッセイフォーマットを利用する態様において、ラテラルフロー装置は、2個のポート：（標識されたアナライト結合パートナーを含有している）コンジュゲートパッドと（固定化されたアナライト結合パートナーを含有している）試験部位または試験ラインとの間に位置するサンプルポート、およびコンジュゲートパッドの上流（例えば、試験部位から装置の末端方向）に位置するチェースポートを含み得る。2個のポートを含むそのような装置において、試料は、サンプルポートを介して試験部位の上流に置かれ、コンジュゲートパッドへの液体の流動は、チェースポートを介して溶液（例えば、希釈剤、緩衝液等）を置くことによって開始される。「チェース」溶液が、コンジュゲートパッドにおいて標識された試薬を溶解させ、流動し、試験部位において同試薬および固定化された試薬と相互作用する。

20

【0111】

血液製剤またはその他の生理学的もしくは生物学的な液体のスクリーニングのための別のアッセイは、酵素連結免疫吸着アッセイ、即ち、ELISAである。ELISAにおいては、典型的には、本発明の単離されたペプチドまたは組成物を、マイクロタイターウェルの表面に直接または捕獲マトリックス（例えば、抗体）を通して吸着させる。次いで、表面上の残余の非特異的タンパク質結合部位を、ウシ血清アルブミン（BSA）、熱不活化正常ヤギ血清（NGS）、またはBLOTTO（保存剤、塩、および消泡剤も含有している無脂肪粉乳の緩衝溶液）のような適切な薬剤によってブロッキングする。次いで、ウェルを、特異的な抗ボレリア（例えば、B.ブルグドルフェリ）抗体を含有していると推測される生物学的試料と共にインキュベートする。試料は、未希釈で適用されてもよいし、または、よりしばしば、一般的には、BSA、NGS、もしくはBLOTTOのような少量（0.1~5.0重量%）のタンパク質を含有している緩衝溶液で、希釈されてもよい。特異的な結合が起こることを可能にするために十分な長さの時間、インキュベートした後、ウェルを、未結合のタンパク質を除去するために洗浄し、次いで、最適濃度の適切な抗免疫グロブリン抗体（例えば、ヒト対象のため、イヌ、マウス、ウシ等のような別の動物に由来する抗ヒト免疫グロブリン（Hu Ig））、または標準的な手法によって酵素もしくはその他の標識にコンジュゲートされ、ブロッキング緩衝液に溶解させられた別の本発明のペプチドと共にインキュベートする。標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等を含む多様な酵素から選ばれ得る。特異的な結合が起こることを可能にするために十分な時間を再び置き、次いで、ウェルを、未結合のコンジュゲートを除去するために再び洗浄し、酵素の適当な基質を添加する。発色させ、ウェルの内容物の光学濃度を、視覚的にまたは機器によって決定する（適切な波長において測定する）。カットオフOD値を、ライム病が流行していない地域からの、またはその他のその

30

40

50

ような従来の定義による個体から収集された、少なくとも50の血清試料の平均OD + 3標準偏差 (SD) として定義することができる。極めて特異的なアッセイの場合には、OD + 2SD をカットオフ値として使用することができる。

【0112】

ELISAの一つの態様において、ストレプトアビジンまたはアビジンもしくはニュートラアビジンのような等価なビオチン結合化合物によってコーティングされた96穴ELISAプレートまたは等価な固相のような表面に、アルカリ性コーティング緩衝液で、最適濃度で、本発明のペプチドまたはペプチドの混合物を固定化し、4 で一夜インキュベートする。適当な回数、標準的な洗浄緩衝液によって洗浄した後、従来のブロッキング緩衝液に溶解した、最適濃度のビオチン化型の本発明のペプチドまたは組成物を、各ウェルに適用する。次いで、試料を添加し、アッセイを上記のように進める。ELISAアッセイを実施するための条件は、当技術分野において周知である。

10

【0113】

ELISAの別の態様において、融合パートナー、例えば、BSAまたはMAPSを介して、96穴ELISAプレートまたは等価な固相のような表面に、本発明のペプチドまたはペプチドの混合物を固定化する。次いで、試料を添加し、アッセイを上記のように進める。

【0114】

別の態様において、方法は凝集アッセイを含む。例えば、ある態様において、コロイド粒子 (例えば、コロイド金等) またはラテックスビーズを、本発明のペプチドまたは組成物にコンジュゲートする。続いて、生物学的液体をビーズ/ペプチドコンジュゲートと共にインキュベートし、それによって、反応混合物を形成させる。次いで、抗体の存在を決定するため、反応混合物を分析する。ある態様において、凝集アッセイは、(1) 競合アッセイの場合、本発明のペプチドもしくは組成物に特異的な抗体、または(2) サンドイッチアッセイの場合、試料抗体を検出することができる抗体 (例えば、抗ヒトIgG抗体もしくはIgM抗体、抗イヌIgG抗体もしくはIgM抗体等) にコンジュゲートされた、コロイド粒子 (例えば、コロイド金等) またはラテックスビーズのような第二の粒子集団の使用を含む。適当な凝集法は、凝集の程度を査定する手段として、遠心分離を含むことができる。

20

【0115】

さらに他の態様において、本発明のペプチドまたは組成物を、ニトロセルロースペーパーへエレクトロプロットするかまたはドットプロットする。続いて、生物学的液体 (例えば、血清または血漿) のような試料を、プロットされた抗原と共にインキュベートし、生物学的液体の中の抗体を抗原に結合させる。次いで、結合した抗体を、例えば、標準的な免疫酵素法によって、または二次抗体もしくはプロテインA、プロテインG、プロテインL、もしくはそれらの組み合わせのようなその他の抗体結合剤にカップリングされたコロイドナノ粒子を使用した可視化によって検出することができる。

30

【0116】

対象におけるボレリア抗体および病原性ボレリア (例えば、B.ブルグドルフェリ) による感染の検出のために、本発明の単離されたペプチドを利用するため、多数の従来のタンパク質アッセイフォーマット、具体的には、イムノアッセイフォーマットを設計し得ることが、当業者には理解されるはずである。従って、本発明は、具体的なアッセイフォーマットの選択によって限定されず、当業者に公知であるアッセイフォーマットを包含すると考えられる。

40

【0117】

ある態様において、方法において使用される試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液のような体液である。他の態様において、試料は、組織 (例えば、組織ホモジネート) または細胞溶解物である。ある態様において、試料は、野生動物 (例えば、シカ、またはマウス、シマリス、リス等のようなげっ歯類) に由来する。他の態様において、試料は、実験動物 (例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等) に由来する。他の態様において、試料は、家畜化されたまたは野生化された動物 (例えば、イヌ

50

、ネコ、ウマ)に由来する。さらに他の態様において、試料はヒトに由来する。

【0118】

前記考察の多くは、病原性ボレリアに対する抗体の検出に関する。しかしながら、考察は、インビトロまたはインビボでの感作T細胞の検出にも当てはまることが理解されるべきである。

【0119】

IgGが産生されるため、細胞性免疫応答(例えば、Tヘルパー応答)が生成されることが予想される。従って、感作T細胞と本発明のペプチドとの間の免疫学的反応性を決定することが可能であるかと予想される。インビトロでは、対象から単離されたT細胞を本発明のペプチドと共にインキュベートし、例えば、その後のT細胞増殖の測定によって、またはIFN- γ のようなサイトカインのT細胞からの放出の測定によって、免疫反応性を測定することによって、これを行うことができる。これらの方法は、当技術分野において周知である。

10

【0120】

本発明の方法をインビボで実施する時、多様な従来のアッセイのうちの任意のものを使用することができる。例えば、本発明のペプチドを対象へ皮内注射することによって、例えば、皮膚試験の形態でアッセイを実施することができる。注射の位置における陽性皮膚反応は、対象が、ライム病を引き起こすことができる病原性ボレリアに曝され感染したことを示し、注射の位置における陰性皮膚反応は、対象が、そのような曝露/感染を受けていないことを示す。この試験またはその他のインビボ試験は、対象におけるT細胞応答の検出に頼る。

20

【0121】

別の局面において、本発明は、対象におけるライム病を診断する方法を提供する。対象は、ライム病の病原体に対する抗体を有すると推測される対象であり得る。診断法は、ライム病の臨床症状を示す対象を診断するために有用である。

【0122】

ある態様において、方法は、対象由来の試料を本発明のペプチドと接触させる工程、および該ペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、対象がライム病を有することを表す、工程を含む。ある態様において、方法は、試料を、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上(例えば、5種類、6種類、7種類、8種類、9種類、10種類、15種類、20種類、25種類、30種類、40種類、50種類、60種類、70種類、80種類、90種類、100種類、150種類、200種類、250種類、300種類、400種類、500種類、またはそれ以上)の異なる本発明のペプチドの混合物と接触させる工程を含む。ある態様において、方法は、試料を、1種類または複数種類の本発明のペプチドと1種類または複数種類の他のペプチド(例えば、OspA、OspB、DbpA、鞭毛関連タンパク質FlaA(p37)およびFlaB(p41)、OspC(25kd)、BBK32、BmpA(p39)、p21、p39、p66、p83、もしくはVlsEタンパク質のようなボレリアペプチドまたはそれらの抗原性断片もしくはエピトープ)との混合物と接触させる工程を含む。

30

【0123】

ある態様において、ペプチドまたは混合物中の各ペプチドは、単離された(例えば、合成のおよび/または精製された)ペプチドである。ある態様において、ペプチドまたは異なるペプチドの混合物は、基質(例えば、固体または半固体の支持体)に付着しているかまたは固定化されている。例えば、ある態様において、基質は、ビーズ(例えば、コロイドもしくはその他の型の粒子もしくはナノ粒子)、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路(例えば、多孔質膜)、プロット(例えば、ウエスタンプロット、ドットプロット、もしくはスロットプロット)、分析用ローター中の流路、またはチューブもしくは(例えば、ELISAアッセイに適したプレート中の)ウェルである。

40

【0124】

本発明のペプチドを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するための多数の異なる従来のアッセイが存在する。例えば、検出する工程は、ELISAアッセイを実施すること、ラ

50

テラルフローイムノアッセイを実施すること、凝集アッセイを実施すること、ウエスタンブロット、スロットブロット、もしくはドットブロットを使用して試料を分析すること、分析用ローターにおいて試料を分析すること、または電気化学センサー、光学センサー、もしくは光電子センサーにより試料を分析することを含み得る。これらの異なるアッセイは、上に記載されておりかつ/または当業者に周知である。

【0125】

ある態様において、試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、または唾液のような体液である。他の態様において、試料は、組織（例えば、組織ホモジネート）または細胞溶解物である。ある態様において、対象は、野生動物（例えば、シカ、またはマウス、シマリス、リス等のようなげっ歯類）である。他の態様において、対象は、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、霊長類等）である。他の態様において、対象は、家畜化されたまたは野生化された動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）である。さらに他の態様において、対象はヒトである。

10

【0126】

キット

さらに別の局面において、本発明はキットを提供する。ある態様において、キットは、本発明のペプチドを含む。ある態様において、キットは、2種類、3種類、4種類、またはそれ以上の異なる本発明のペプチドを含む。ペプチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2の配列を含むことができる。ある態様において、ペプチドは、固体支持体に付着しているかまたは固定化されている。例えば、ある態様において、固体支持体は、ビーズ（例えば、コロイド粒子もしくはコロイドナノ粒子）、ラテラルフローイムノアッセイ装置中の流路、分析用ローター中の流路、またはチューブもしくは（例えば、プレート中の）ウェルである。

20

【0127】

具体的な型のアッセイのための試薬も、本発明のキットに提供され得る。従って、キットは、（例えば、凝集アッセイまたはラテラルフローアッセイに適した）ビーズの集団、またはプレート（例えば、ELISAアッセイに適したプレート）を含むことができる。他の態様において、キットは、ラテラルフローイムノアッセイ装置、分析用ローター、ウエスタンブロット、ドットブロット、スロットブロット、または電気化学センサー、光学センサー、もしくは光電子センサーのような装置を含む。ビーズの集団、プレート、および装置は、イムノアッセイを実施するために有用である。例えば、それらは、試料からの抗体と本発明のペプチドとを含む抗体-ペプチド複合体の形成を検出するために有用であり得る。ある態様において、本発明のペプチド、異なるペプチドの混合物、または本発明のペプチド組成物は、ビーズ、プレート、または装置に付着しているかまたは固定化されている。

30

【0128】

さらに、キットは、様々な希釈剤および緩衝液、特異的に結合した抗原または抗体の検出のための標識されたコンジュゲートまたはその他の薬剤、ならびに酵素基質、補因子、および色素原のようなその他のシグナル生成試薬を含むことができる。キットのその他の成分は、当業者によって容易に決定され得る。そのような成分には、コーティング試薬、本発明のペプチドに特異的なポリクローナル捕獲抗体もしくはモノクローナル捕獲抗体、または2種類以上の抗体のカクテル、標準物としてのこれらの抗原の精製されたまたは半精製された抽出物、モノクローナル抗体検出抗体、指示分子がコンジュゲートされた抗マウス抗体、抗イヌ抗体、抗ニワトリ抗体、または抗ヒト抗体、比色定量比較のための指示図、使い捨て手袋、除染説明書、アプリケーションスティックまたはコンテナ、試料調製カップ等が含まれ得る。一つの態様において、キットは、ペプチド-抗体複合体の形成を可能にする反応媒体の構成のために適切な緩衝液またはその他の試薬を含む。

40

【0129】

そのようなキットは、臨床実験室が、B.ブルグドルフェリのような病原性ボレリアによる感染を診断するための便利な効率的な方式を提供する。従って、ある態様において、キ

50

ットはさらに説明書を含む。例えば、ある態様において、キットは、ボレリア抗原に対する抗体を検出するためまたはライム病を診断するために、本発明のペプチドを使用する方法を示す説明書を含む。ある態様において、キットは、ボレリア抗原に対する抗体を検出するためまたはライム病を診断するために、（例えば、本発明のペプチドまたは異なるペプチドの混合物を含む）ビーズの集団、プレート、または装置を使用する方法を示す説明書を含む。

【0130】

本発明のペプチド、ペプチドを含む組成物および装置、キット、および方法には、多数の利点がある。例えば、それらは、ライム病の単純な、安価な、迅速な、高感度の、正確な検出を可能にし、梅毒、慢性関節炎、および多発性硬化症のような状態を含む、筋肉痛、関節痛、倦怠感、または発熱のような「ライム様」症状を有する他の状態との血清学的交差反応性を回避する。これは正確な診断を可能にする。さらに、本発明の診断試験（例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローイムノアッセイ、または凝集アッセイ）は、ボレリアの外表面タンパク質に基づくワクチンに応答して産生された抗OspA抗体またはその他の抗体を含有している血清試料において有用である。本発明のVlsE IR6ペプチドは、そのような抗体と交差反応せず、それによって、予防接種を受けた個体と、B.ブルグドルフェリに天然に感染した個体との区別を可能にする。

10

【0131】

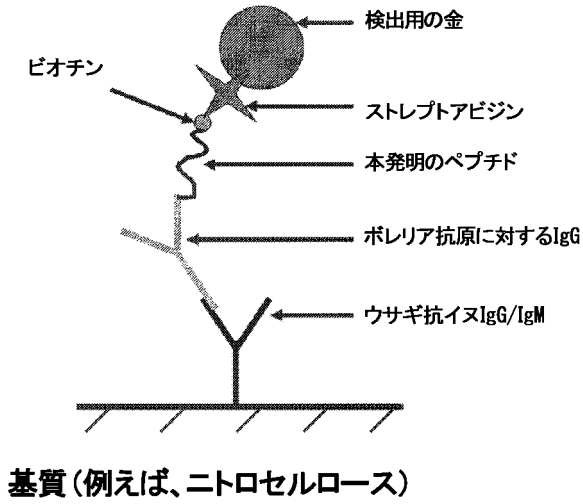
参照によって組み入れられる文書における定義が、本明細書に提供された定義と一致しない場合、本明細書に提供された定義が優先される。現時点で好ましい態様に関して本発明を説明したが、当業者に明白であろう様々な変化および修飾が、本発明の本旨を逸脱することなく成され得ることが理解されるべきである。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

20

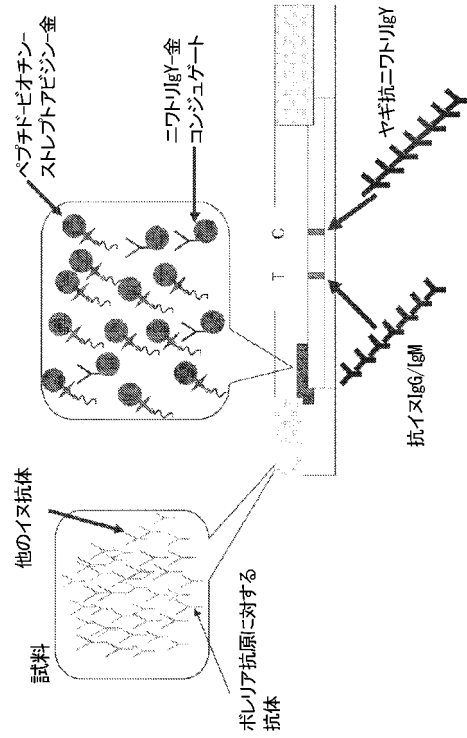
【0132】

本明細書に引用された全ての特許、特許出願、および刊行物の各々の特許請求の範囲、図面、および/または図を含む開示は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

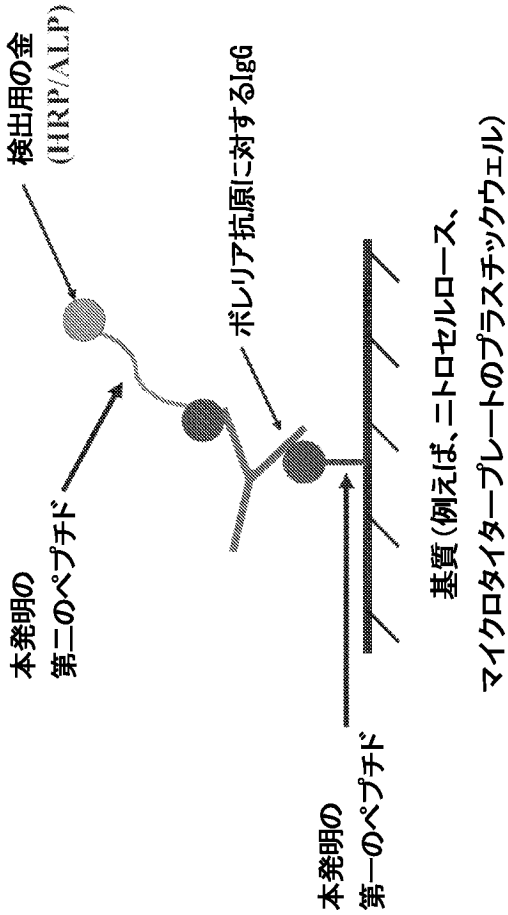
【 図 1 】



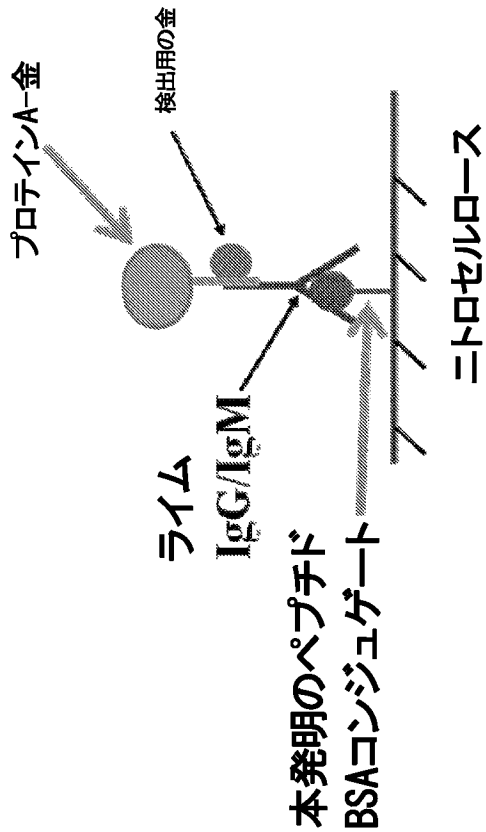
【 図 2 】



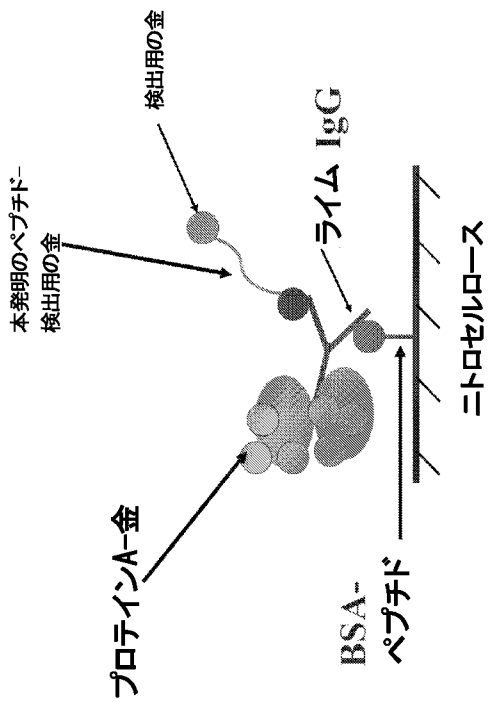
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配 列 表 】

2015504420000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/63594
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/00; G01N 33/53, 33/543 (2013.01) USPC - 530/324; 436/518; 435/7.1 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) USPC: 530/324; 436/518; 435/7.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/324; 436/518; 435/7.1 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase, Google Scholar, GenCore sequence search (AA) Search terms: Lyme's disease, Borrelia, VlsE protein, IR6 domain, antibody, antigen, synthetic peptide variants, detection of antibodies		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/0129680 A1 (O'CONNOR) 10 July 2003 (10.07.2003). Especially SEQ ID NO: 1	1-27, 29-34
A	US 2011/0136155 A1 (MEHRA et al.) 09 June 2011 (09.06.2011). Especially para [0007]-[0031].	1-27, 29-34
A	O'CONNOR et al. "Dogs Vaccinated with Common Lyme Disease Vaccines Do Not Respond to IR6, the Conserved Immunodominant Region of the VlsE Surface Protein of Borrelia burgdorferi" Clin. Diagn. Lab Immunol. May 2004; Vol. 11, No. 3; Pages 458-462. Especially abstract.	1-27, 29-34
A	WAGNER et al. "A fluorescent bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies to B. burgdorferi outer surface proteins in canine serum" Vet. Immunol. Immunopathol.; 15 April 2011; Vol. 140, No. 3-4; Pages 190-198. [online]; downloaded from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208663 on 24 January 2013; Abstract Only.	1-27, 29-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 24 January 2013 (24.01.2013)		Date of mailing of the international search report 15 FEB 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/63594

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 28
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.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 メフラ ラジェシュ ケイ .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ハイワード サウスウィック ドライブ 25410 #1
09

(72)発明者 アロン ケネス ピー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ フェア オークス ストリート 201

(72)発明者 ブレイル デニス エム .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ラモン ウィンターサイド サークル 800

(72)発明者 ウォルカー ジェレミー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カストロ バレー センター ストリート 22120

(72)発明者 クエシコ クリスティーナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント アルハンブラ ドライブ 4587

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA60 CA11 DA86 EA52 FA10 FA80

专利名称(译)	肽和用于检测莱姆病抗体的方法		
公开(公告)号	JP2015504420A	公开(公告)日	2015-02-12
申请号	JP2014540187	申请日	2012-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	艾巴希斯公司		
申请(专利权)人(译)	Abakushisu公司		
[标]发明人	メフララジェシユケイ アロンケネスピー ブレイルデニスエム ウォルカージェレミー クエシコクリスティーナ		
发明人	メフラ ラジェシユ ケイ. アロン ケネス ピー. ブレイル デニス エム. ウォルカー ジェレミー クエシコ クリスティーナ		
IPC分类号	C07K14/20 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C07K17/00		
CPC分类号	C07K14/20 G01N33/56911 G01N2333/20 G01N2469/20 Y02A50/57		
FI分类号	C07K14/20.ZNA G01N33/569.F G01N33/53.N G01N33/543.501.A C07K17/00		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA10 4H045/FA80		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/556061 2011-11-04 US		
其他公开文献	JP2015504420A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测结合疏螺旋体抗原的抗体的组合物(例如肽组合物)。肽组合物包含包含疏螺旋体VlsE蛋白的IR6结构域中的变体的多肽序列。本发明还提供包含此类肽组合物并可用于检测与疏螺旋体属抗原结合的抗体和诊断莱姆病的装置,方法和试剂盒。

本発明の
第二のペプチド

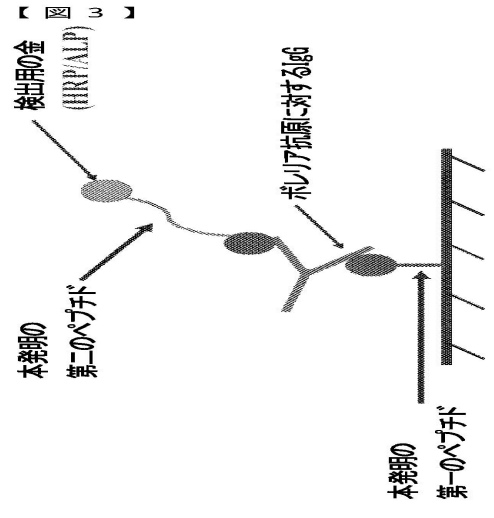
検出用の金
(HRP/ALP)

ポリマー抗原に対する抗体

本発明の
第一のペプチド

基質(例えば、ニトロセルロース、

マイクロタイタープレートのプラスチックウェル)



【 図 3 】