

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7399865号

(P7399865)

(45)発行日 令和5年12月18日(2023.12.18)

(24)登録日 令和5年12月8日(2023.12.8)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	1 7 1
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	1 7 1
A 6 1 K	39/245	(2006.01)	A 6 1 K	39/245	
A 6 1 K	39/205	(2006.01)	A 6 1 K	39/205	

請求項の数 16 (全46頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-545447(P2020-545447)
 (86)(22)出願日 平成30年11月16日(2018.11.16)
 (65)公表番号 特表2021-503509(P2021-503509 A)
 (43)公表日 令和3年2月12日(2021.2.12)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2018/081601
 (87)国際公開番号 WO2019/097009
 (87)国際公開日 令和1年5月23日(2019.5.23)
 審査請求日 令和3年11月16日(2021.11.16)
 (31)優先権主張番号 17382781.7
 (32)優先日 平成29年11月17日(2017.11.17)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)
 微生物の受託番号 DSM DSM 32663
 DSM DSM 32950

(73)特許権者 515009893
 ヒブラ サイエнтиフィック, エセ.
 エレ. ウ.
 スペイン国 エ - 1 7 1 7 0 アマール,
 アベニーダ デ ラ セルヴァ 1 3 5
 (74)代理人 110000796
 弁理士法人三枝国際特許事務所
 (72)発明者 フォア プレト アントニ
 スペイン国 1 7 1 7 0 アメール (ジ
 ローナ) アベニダ ラ セルバ 1 3 5
 ヒブラ サイエнтиフィック エセ. エ
 レ. ウ.
 (72)発明者 セラ ハルトマン ハビエル
 スペイン国 0 8 1 7 2 サン クガ ダル
 バリエス シーノエリゼンダ リバタリャ
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳動物における趾皮膚炎に使用されるワクチン組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫原的有効量の、トレポネマ属の複数種のバクテリアのうち少なくとも1種を含み、前記トレポネマ属の複数種が、トレポネマ・ペディス及びトレポネマ・ファゲデニスである、ワクチン。

【請求項 2】

トレポネマ属の複数種、及び/又はディケロバクター・ノドーサスに由来する1種以上の単離された抗原をさらに含む、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

前記単離された抗原は、以下の群：M S P、P r t P、P r t P M、T y l C、O r f C、溶血素 I I I、P r c B、P r c A、C y s ペプチダーゼ、溶血素赤血球溶解タンパク質 2、表面抗原 B s p A、フィラメントタンパク質、鞭毛フックタンパク質、オリゴペプチダーゼ B、プロリルエンドペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼ若しくはオリゴペプチダーゼ F のいずれかから選択されるトレポネマ属の複数種の抗原、及び/又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原 A p r 2 (例えば A p r 2 B M)、A p r 5 (例えば A p r 5 M) 及び B p r (例えば B p r M)、又はそれらの任意の組み合わせであり、任意に前記抗原は、組み換え的に産生される、請求項 2 に記載のワクチン。

【請求項 4】

前記トレポネマ属の複数種のバクテリアは、死滅細菌の懸濁液の形で存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のワクチン。

10

20

【請求項 5】

前記単離された抗原は、アドヘシン、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、表面抗原、運動性に関するタンパク質及び溶血素からなる群より選択される、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 6】

前記単離された抗原は、トレポネーマ・ペディス由来の M S P、P r t P（例えば P r t P M）、T l y C 及び O r f C、及び / 又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原 M S P 及び溶血素 I I I、及び / 又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原 P r t P（例えば P r t P M）、及び / 又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原 A p r 2（例えば A p r 2 B M）、A p r 5（例えば A p r 5 M）及び B p r（例えば B p r M）、又はそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される抗原であり、任意に前記抗原は、組み換え的に産生される、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

10

【請求項 7】

前記単離された抗原は、トレポネーマ・ペディス由来の M S P、P r t P（例えば P r t P M）、T l y C 及び O r f C、並びにディケロバクター・ノドーサス由来の抗原 A p r 2（例えば A p r 2 B M）、A p r 5（例えば A p r 5 M）及び B p r（例えば B p r M）からなる群より選択され、任意に前記抗原は、組み換え的に産生される、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 8】

免疫原的有効量のトレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ペディス、トレポネーマ・レフリンゲンズ、トレポネーマ・カリギラム、トレポネーマ・マルトフィラム及び / 又はトレポネーマ・ブレナボレンス又はそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるバクテリアを更に含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のワクチン。

20

【請求項 9】

ウシ呼吸器合胞体ウイルス抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、レプトスピラ抗原、ウシ下痢ウイルス抗原、ウシパラインフルエンザウイルス抗原、水疱性口内炎ウイルス抗原、悪性カタル熱ウイルス抗原、ブルータングウイルス抗原、仮性狂犬病ウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、牛疫ウイルス抗原、グッゲンハイメラ抗原、ボルフィロモナス抗原、バクテロイデス抗原、プレボテラ抗原、ペプトストレプトコッカス抗原、カンピロバクター抗原、マイコプラズマ抗原、コリネバクテリウム / アクチノマイセス抗原、クリプトスポリジウム抗原、ロタウイルス抗原、コロナウイルス抗原、フソバクテリウム・ネクロフォーラム抗原、ディケロバクター・ノドーサス抗原又はクロストリジウム属の複数種の抗原を更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のワクチン。

30

【請求項 10】

薬学的に許容可能な担体を更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 11】

哺乳動物における趾皮膚炎の処置又は未然防止の方法に使用される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 12】

前記趾皮膚炎は、牛趾皮膚炎、伝染性羊趾皮膚炎及び / 又は腐蹄病である、請求項 1 ~ 11 に記載のワクチン又はワクチン。

40

【請求項 13】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のワクチンを含む容器を含むことを特徴とする、ワクチン接種キット。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の前記ワクチンの投与についての情報を含む情報マニュアル又はリーフレットを更に含むことを特徴とする、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

HIPRA SCIENTIFIC S.L.U. 社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り，135

50

）によりライプニッツ研究所 D S M Z（ドイツ微生物細胞培養コレクション）においてアクセッション番号 D S M 3 2 9 5 0 として 2 0 1 8 年 1 1 月 7 日にブタペスト条約に基づき寄託された T . ファゲデニス株。

【請求項 1 6】

HIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り，1 3 5）によりライプニッツ研究所 D S M Z（ドイツ微生物細胞培養コレクション）においてアクセッション番号 D S M 3 2 6 6 3 として 2 0 1 7 年 1 0 月 1 0 日にブタペスト条約に基づき寄託された T . ペディス株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

本発明は、トレポネーマ属のスピロヘータ細菌が関与する有蹄動物疾患の診断及び未然防止又は処置、特に哺乳動物における趾皮膚炎、更に特に牛趾皮膚炎の予防的処置に関する。さらに、本発明は、免疫原性組成物、診断用組成物、治療用組成物の開発並びに哺乳動物における趾皮膚炎に対するワクチンの作製及び投与に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

趾皮膚炎（D D）は、主に牛の蹄踵の皮膚を冒す細菌性疾患である。感染は炎症及び皮膚損傷を引き起こし、痛み及び不快感をもたらされる。D Dは牛の跛行の主な原因であり、最も一般的には集約的な乳牛に見られる。したがって、D Dは多くの国々の乳業にとって重大な問題であり、動物福祉の低下及び経済的損失を引き起こしている。D Dは英国の肉牛において新たに発生した問題として特定されており、D Dを引き起こすと考えられている細菌は、羊（伝染性羊趾皮膚炎として知られている）、乳用山羊及び更には野生の北米エルクでの同様の病変で同定されている。これに加えて、これらのD D関連細菌は、過去15年間に発生した3種類の重症のウシ蹄病変、つまり蹄尖壊死、非治癒性白帯病及び非治癒性蹄底潰瘍において検出されている。これらの展開は、家畜及び野生動物、そして農家及び獣医師にとってD Dの重要性が高まることを浮き彫りにしている。

20

【0 0 0 3】

この疾患が経済的及び福祉的に重要であるにもかかわらず、その病因、伝染、未然防止及び処置に関して多くの疑問が残されている。その疾患の対処が困難であると分かっている理由は数多く存在し、第一にその感染は、病変から単離される、様々な細菌、特にトレポネーマ属の細菌による多微生物性のものであると思われる。さらに、D Dに関与する細菌のほとんどは、最初に培養で増殖することが困難であることが判明し、実験的な感染モデルを開発することが困難であるため、疾患伝染のメカニズムはかなり謎のままであるだけでなく、抗生物質で治癒した症例における再発率も高い。近年の実験室法の進歩により、最も重要な病原性細菌の同定並びに動物及び流行性D Dを伴う農場の環境におけるこれらの細菌の検出において幾らかの進展がもたらされた。

30

【0 0 0 4】

感染した農場では広範囲の感染レベルが見られたことから、D Dの出現率についての農場／群レベルの危険因子及び動物レベルの危険因子（例えば、経産回数及び授乳の段階）の両方の調査が促される。農場レベル及び動物レベルの両方の危険因子は、D Dの感染レベルの最小化を試みるときに有用な情報を提供することができ、感染のリスクが最も高い時期を理解することができる。関心が持たれているが、ほとんど調査されていないD Dの側面は、疾患に対する易罹患性に動物間で個体差があるように思われることである。この意味では、従来技術の一部を構成する幾つかの科学出版物では全て、群内の一部の動物が繰り返し感染している一方で、同じ品種及び経産回数の同じ条件下で飼育されている他の動物は一切感染しないことが見出された。この易罹患性における個体差の理由を特定することができれば、それらは本発明者らが疾患を理解する一助となり、効果的な未然防止方法及び処置方法の探求に寄与し得る。

40

【0 0 0 5】

50

DD病変に関連するトレポネーマの型又は種の決定は、DNA配列分析及び分類を基礎としている。Evansら（非特許文献1）により、16S rDNAホモロジー及びflaB2ホモロジーに対してクラスター化されたT. ヴィンセンティ（*T. vincentii*）/ T. メディウム（*T. medium*）様、T. ファゲデニス（*T. phagedenis*）様、及びT. デンティコラ（*T. denticola*）/ T. プチダム（*T. putidum*）様の3種の最も一般的な系統型が確立された。系統型（PT）は、16S rDNA配列が既知の種とは約2%だけ異なり、それらのクラスターの他の成員と99%以上類似しているトレポネーマのクラスターとして規定される（非特許文献2）。他に、系統型の数は、T. ブレナボレンス（*T. brennaborense*）、T. マルトフィラム（*T. maltophilum*）様（T. マルトフィラム及びT. レシチノリティカム（*T. lecithinolyticum*）を含む）、T. レフリングス（*T. refringens*）/ T. カリギラム（*T. calligyrum*）様と共にT. デンティコラ/T. プチダムとクラスター化するT. ペディス（*T. pedis*）を含む7つにまで拡張された。

10

【0006】

トレポネーマ属の複数種以外の種々の属の多くの細菌、例えばフソバクテリウム・ネクロフォーラム（*Fusobacterium necrophorum*）、ディケロバクター・ノドーサス（*Dichelobacter nodosus*）、プレボテラ属の複数種、及びポルフィロモナス属の複数種もDD病変から分離されている。

【0007】

以前はバクテロイデス（*Bacteroides*）として知られていたディケロバクター・ノドーサスは、病原性で嫌気性の非芽胞形成性グラム陰性細菌である。ディケロバクター・ノドーサスは、種々の地理的位置から多くのDD病変において検出されている。病変におけるD. ノドーサスの発見は、D. ノドーサスがDDの病因に関与することを示唆している。羊での腐蹄病に関与する主要な作用因子としても認識されている。

20

【0008】

フソバクテリウム・ネクロフォーラムは、牛、羊及び他の反芻動物における跛行の原因でもある。フソバクテリウム・ネクロフォーラムは嫌気性細菌である。フソバクテリウム・ネクロフォーラムは、主として表皮の表層の角質溶解層において検出されている。フソバクテリウム・ネクロフォーラムは、DD病変及び腐蹄病の2次性侵襲菌であることが示唆される。

【0009】

DDに関与する病原体について、幾つかの病原性因子が記載されている。例えば、非特許文献3では、アドヘシン、表面抗原及び運動性に関与するタンパク質等のトレポネーマ属の複数種の病原性因子が検出された。記載されているその他のトレポネーマ属の複数種の病原性因子は、ペプチダーゼ、プロテアーゼ及び溶血素である。D. ノドーサス等のその他のDD関連病原体について、同じ種類の病原性因子が記載されている（非特許文献4）。

30

【0010】

DDの処置には、全身性抗生物質及び局所性抗生物質が含まれる。高い割合の動物がDDに感染している群では、個別の処置に非常に時間がかかるため、多くの農家はその代わりに足洗場を使用して群全体を処置している。残念ながら、DDの排除はめったに見られないため、感染の再発を防ぐために処置を繰り返し適用する必要がある。DDに感染すると、乳牛は抗体応答を生ずるが、一部の動物は繰り返し感染するので、この応答は更なる感染を防ぐには十分でないと思われる。DDを処置して再発を防ぐことを試みる場合に直面する困難に関して示唆される1つの理由は、DDに関与していると考えられている多くのトレポネーマが螺旋形だけでなく、被嚢形を有することが分かったということである。これらの被嚢形の細菌は病変内深くに存続し、後日に臨床疾患の再発を引き起こし得る可能性があるが、被嚢形の細菌及びそのDD処置への応答の重要性を調べるには、より多くの調査が必要である。

40

【0011】

DDに対するワクチンを開発するために過去何年にもわたって多くの努力が払われてき

50

たが、これらのワクチンはいずれも現在利用することができない。この意味で、Berryら（非特許文献5）は、TrepShield（商標）（Novartis Animal Health社）として市販される種々のトレポネーマのバクテリアが試験されたネブラスカ州での2つの乳牛群での研究を報告した。この研究では、トレポネーマのバクテリアが、ワクチン接種された動物に有意な予防的効果又は治療的効果をもたらさないと結論づけられた。そのワクチン（TrepShield（商標））はその後撤退した。

【0012】

Fiddlerら（非特許文献6）により、民間企業によって開発されたセルペンス（Serpens）属の一種のバクテリアを含むワクチンを評価した研究の調査結果が報告された。Fiddlerらは、試験に關与した乳牛はバクテリアに対する免疫応答を生じたが、コントロールと比較した場合に、ワクチン接種された牛の間でDD感染の有病率又は重症度の低下は見られないことを見出した。したがって、Fiddlerらは、そのワクチンはDD未然防止に関して臨床的有効性を一切示さないと結論づけた。

10

【0013】

それに対して、本発明は初めて、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物をDDに対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化する、トレポネーマ属の複数種のバクテリアを含み、好ましくはトレポネーマ属の複数種由来の又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の抗原が補充された新規のワクチン組成物を提供する。

【先行技術文献】

20

【非特許文献】

【0014】

【文献】Evans N.J., Brown J.M., Demirkan I., Murray R.D., Vink W.D., Blowey R.W., Hart C.A., Carter S.D. Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. Vet. Microbiol. 2008;130:141-150

【文献】Klitgaard K., Foix Breto A., Boye M., Jensen T.K. Targeting the treponemal microbiome of digital dermatitis infections by high-resolution phylogenetic analyses and comparison with fluorescent in situ hybridization. J. Clin. Microbiol. 2013;51:2212-2219

【文献】Nielsen M.W. et al., 2016

30

【文献】Kennan, R.M., Dhungyel, O. P., Whittington, R. J., Egerton, J. R., & Rod, J. I. The Type IV Fimbrial Subunit Gene (fimA) of Dichelobacter nodosus Is Essential for Virulence, Protease Secretion, and Natural Competence. Journal of bacteriology, 2001, 183.15: 4451-4458.

【文献】Berry S L, Ertze R A, Read D H, Hird D W. Field evaluation of prophylactic and therapeutic effects of a vaccine against (papillomatous) digital dermatitis of dairy cattle in 2 California dairies. Proc 16th Intl Symp Lameness in Ruminants, Slovenia, 2004

【文献】Fidler A.P., Alley M.L., Smith G.W. Evaluation of a Serpens species bacterin for treatment of digital dermatitis in dairy cattle. Res. Vet. Sci. 2012; 93:1258-1260. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.002

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物をDDに対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化するための、トレポネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくは、限定されるものではないが、トレポネーマ・ペディスのバクテリアを含み、任意にトレポネーマ属の複数種由来の又は限定されるものではないが、D・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の抗原が補充された新規のワクチン組成物を提供する。

50

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、トレポネーマ・ペディスを、哺乳動物における趾皮膚炎（DD）、特に有蹄動物の趾皮膚炎の病因因子の1つとして特定している。したがって、本発明はまた、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物をDDに対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化するためのトレポネーマ・ペディスの分離培養物を提供する。さらに、本発明は、一連の特異的トレポネーマ抗原により感染を検出することによってDDを診断する方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

こうして、一態様では、本発明は、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物をDDに対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化するための、好ましくはトレポネーマ属の複数種由来の又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の抗原が補充された、トレポネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくはトレポネーマ・ペディスのバクテリアの生物学的培養物、好ましくは生物学的に純粋な培養物を提供する。

10

【 0 0 1 8 】

別の態様では、本発明は、好ましくは有蹄動物のトレポネーマ・ペディスのバクテリアの、好ましくは生物学的に純粋な培養物を提供する。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物をDDに対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化するための、免疫原的有効量のトレポネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくはトレポネーマ・ペディスのバクテリアを含み、任意にトレポネーマ属の複数種由来の又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の抗原、好ましくは組み換え抗原が補充された医薬組成物を提供する。好ましくは、上記抗原は、MS P（主要外鞘タンパク質（Major Outer Sheath Protein））、Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体Pr t P様タンパク質）、T l y C（溶血素C）、O r f C（表面抗原O r f Cリポタンパク質）及び溶血素I I Iからなる群より選択されるトレポネーマ抗原である。これらの抗原の全ては、限定されるものではないが、T・ペディス、T・ファゲデニス又はT・ヴィンセンティ等のトレポネーマ属の複数種から得ることができることに留意する。本発明において有用な追加の抗原は、D・ノドーサス又はF・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子から選択され得る。これらの抗原の全ては、本発明の医薬組成物において組み合わせて使用することができ、好ましくは組み換え的に産生される。

20

30

【 0 0 2 0 】

より好ましくは、限定されるものではないが、本発明において有用な上記タンパク質、上記ポリペプチド又は上記抗原は、アドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関与するタンパク質及び溶血素等の病原性因子から選択される。更により好ましくは、本発明において有用な上記タンパク質、上記ポリペプチド又は上記抗原は、以下の群：

MS P（主要外鞘タンパク質）；

Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体Pr t P様タンパク質）及びPr t P M（Pr t P成熟タンパク質）；

40

T y l C（溶血素C）；

O r f C（表面抗原O r f Cリポタンパク質）；

溶血素I I I；

A p r 2（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼA p r 2）及びA p r 2 B M（A p r 2 良性成熟タンパク質）；

A p r 5（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼA p r 5）及びA p r 5 M（A p r 5 成熟タンパク質）；

B p r（塩基性細胞外サブチリシン様プロテアーゼB p r及びB p r M（B p r 成熟タンパク質）；

50

P r c B (セリン - プロテアーゼ複合体 P r c B 様タンパク質) ;
 P r c A (セリン - プロテアーゼ複合体 P r c A 様タンパク質) ;
 C y s ペプチダーゼ ;
 溶血素赤血球溶解タンパク質 2 ;
 表面抗原 B s p A ;
 フィラメントタンパク質 ;
 鞭毛フックタンパク質 ;
 プロリルエンドペプチダーゼ ;
 オリゴペプチダーゼ ;
 オリゴペプチダーゼ B ; 並びに、
 オリゴペプチダーゼ F ;
 のいずれかから選択される。

10

【 0 0 2 1 】

更により好ましくは、上記抗原は、M S P、P r t P、好ましくは P r t P M、T l y C 及び O r f C からなる群より選択されるトレポネーマ・ペディス由来の抗原、及び / 又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原 M S P 及び溶血素 I I I、及び / 又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原 P r t P、好ましくは P r t P M、及び / 又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原 A p r 2、好ましくは A p r 2 B M、A p r 5、好ましくは A p r 5 M 及び B p r、好ましくは B p r M、又はそれらの任意の組み合わせであり、任意に前記抗原は、組み換え的に産生される。

20

【 0 0 2 2 】

さらに、上記医薬組成物は、免疫原的有効量のトレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ファゲデニス、トレポネーマ・レフリンゲンス、トレポネーマ・ブレナボレンス、トレポネーマ・カリギラム及びトレポネーマ・マルトフィラムからなる群より選択されるバクテリアを更に含む。

【 0 0 2 3 】

別の態様では、本発明は、哺乳動物における趾皮膚炎 (D D)、特に有蹄動物の趾皮膚炎の病因因子に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。この方法は、哺乳動物、好ましくは有蹄動物に上記段落で規定された医薬組成物を投与する工程を含む。

30

【 0 0 2 4 】

一実施の形態では、医薬組成物は、フソバクテリウム・ネクロフォーラム、ボルフィロモナス・レヴィ (Porphyromonas levii) 及びディケロバクター・ノドーサスからなる群より選択される有蹄動物の腐蹄病を引き起こす生物由来の抗原を更に含む。別の実施の形態では、医薬組成物は、ウシ呼吸器合胞体ウイルス抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、レプトスピラ抗原、ウシ下痢ウイルス抗原、ウシパラインフルエンザウイルス抗原、水疱性口内炎ウイルス抗原、悪性カタル熱ウイルス抗原、ブルータングウイルス抗原、仮性狂犬病ウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、牛疫ウイルス抗原、フソバクテリウム・ネクロフォーラム抗原、ディケロバクター・ノドーサス抗原、グッゲンハイメラ抗原、ボルフィロモナス抗原、バクテロイデス抗原、プレボテラ抗原、ペプトストレプトコッカス抗原、カンピロバクター抗原、マイコプラズマ抗原、コリネバクテリウム / アクチノマイセス抗原、クリプトスポリジウム抗原、ロタウイルス抗原、コロナウイルス抗原又はクロストリジウム属の複数種の抗原等の追加の抗原を更に含む。

40

【 0 0 2 5 】

また更なる態様では、医薬組成物のトレポネーマ属の複数種のバクテリアは、死滅細菌又は弱毒化細菌の懸濁液の形で存在する。好ましくは、トレポネーマのバクテリアは、死滅細菌又は弱毒化細菌の懸濁液の形の T . ペディスのバクテリアである。好ましくは、T . ペディスのバクテリアは、死滅細菌の懸濁液の形で存在する。

【 0 0 2 6 】

別の実施の形態では、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体を更に含む。

50

【 0 0 2 7 】

別の実施の形態では、本発明の医薬組成物は、ワクチンである。

【 0 0 2 8 】

別の実施の形態では、本発明の医薬組成物又はワクチンは、非経口投与される。

【 0 0 2 9 】

別の実施の形態では、本発明の医薬組成物又はワクチンは、趾皮膚炎、好ましくは、牛趾皮膚炎、伝染性羊趾皮膚炎及び／又は腐蹄病、より好ましくは、牛趾皮膚炎の処置方法又は未然防止方法で使用される。

【 0 0 3 0 】

別の態様では、本発明は、本発明の医薬組成物又はワクチンを含む容器を含むことを特徴とするワクチン接種キットを提供する。

10

【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明は、本発明の上記医薬組成物又は上記ワクチンの投与についての情報を含む情報マニュアル又はリーフレットを含むことを特徴とするワクチン接種キットを提供する。

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、生体試料中のトレポネーマ抗原又はD．ノドーサス若しくはF．ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子と特異的に免疫反応性である抗体の存在を検出する方法であって、上記試料を、トレポネーマ属の複数種の抗原：MS P（主要外鞘タンパク質）、Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体Pr t P様タンパク質）、T l y C（溶血素C）、O r f C（表面抗原O r f Cリポタンパク質）又は溶血素I I Iから選択される抗原と接触させることを含む、方法を提供する。これらの抗原の全ては、限定されるものではないが、T．ペディス、T．ファゲデニス又はT．ヴィンセンティ等のトレポネーマ属の複数種から得ることができ、及び／又は抗原はD．ノドーサス若しくはF．ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子から選択され、それにより抗原／抗体複合体が形成され、該複合体の存在又は不存在が検出されることに留意する。より好ましくは、限定されるものではないが、本方法論において有用な上記タンパク質、上記ポリペプチド又は上記抗原は、アドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関与するタンパク質及び溶血素等の病原性因子から選択される。更により好ましくは、本方法論において有用な上記抗原は、以下の群：

20

MS P（主要外鞘タンパク質）；

Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体Pr t P様タンパク質）及びPr t P M（Pr t P成熟タンパク質）；

T y l C（溶血素C）；

O r f C（表面抗原O r f Cリポタンパク質）；

溶血素I I I；

A p r 2（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼA p r 2）及びA p r 2 B M（A p r 2 良性成熟タンパク質）；

A p r 5（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼA p r 5）及びA p r 5 M（A p r 5 成熟タンパク質）；

40

B p r（塩基性細胞外サブチリシン様プロテアーゼB p r）及びB p r M（B p r 成熟タンパク質）；

P r c B（セリン - プロテアーゼ複合体P r c B様タンパク質）；

P r c A（セリン - プロテアーゼ複合体P r c A様タンパク質）；

C y s ペプチダーゼ；

溶血素赤血球溶解タンパク質 2；

表面抗原B s p A；

フィラメントタンパク質；

鞭毛フックタンパク質；

プロリルエンドペプチダーゼ；

50

オリゴペプチダーゼ；
オリゴペプチダーゼ B；並びに、
オリゴペプチダーゼ F；
から選択される。

【0033】

更により好ましくは、上記抗原は、MSP、PrtP、好ましくはPrtPM、TlyC及びOrfCからなる群より選択されるトレポネーマ・ペディス由来の抗原、及び／又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原MSP及び溶血素III、及び／又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原PrtP、好ましくはPrtPM、及び／又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原Apr2、好ましくはApr2BM、Apr5、好ましくはApr5M及びBpr、好ましくはBprM、又はそれらの任意の組み合わせであり、これらの抗原の全ては、抗原／抗体複合体の形成のために特に有用であり、したがって、複合体の存在又は不存在の検出のために特に有用である。

10

【0034】

一実施の形態では、生体試料はウシ血清である。別の実施の形態では、抗原は固体表面上に固定化されている。別の実施の形態では、複合体は、標識された抗ウシ抗体を使用して検出される。

【0035】

別の態様では、本発明は、生体試料中の有蹄動物のトレポネーマの存在又はD．ノドーサス若しくはF．ネクロフォーラム等の他の有蹄動物の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子の存在を検出する方法を提供する。この方法は、試料を上記の特定された抗原のいずれかから選択される抗原と特異的に免疫反応性である抗体と接触させることにより、抗原／抗体複合体を形成させる工程と、上記複合体の存在又は不存在を検出する工程を含む。生体試料中の有蹄動物のトレポネーマの存在を検出する上記方法は、診断目的又は予後診断目的のために、例えば、DDの診断、特に牛趾皮膚炎の診断のために有用である。

20

【0036】

別の実施の形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。別の実施の形態では、抗体は固体表面上に固定化されている。別の実施の形態では、複合体は、標識された二次抗体を使用して検出される。別の実施の形態では、生体試料は有蹄動物の蹄組織である。

【図面の簡単な説明】

30

【0037】

【図1】ワクチン接種後47日目に牛から得られた血清のT．ペディスに対する阻害アッセイ及び間接ELISA（1群当たり5頭の動物）を示す図である。A）マイクロプレート中での1/32希釈でのT．ペディスの阻害アッセイ（ワクチン接種後47日目）。横軸としての種々の試験されたワクチンに対して、縦軸として螺旋形の量（0から3まで）が示される。B）ワクチン接種後47日目のT．ペディスに対する間接ELISA。横軸としての種々の試験されたワクチンに対して、縦軸として405nmでの光学密度（OD）が示される。各ワクチンは実施例1に示されている。ワクチンA（トレポネーマ・ペディスのバクテリン＋4種の組み換えタンパク質）、ワクチンB（トレポネーマのバクテリンを有さず4種の組み換えタンパク質だけ）、ワクチンC（トレポネーマ・ペディスのバクテリンだけ）、ワクチンD（プラセボ）。

40

【図2】ワクチン接種後0日目、21日目及び35日目に牛から得られた血清のT．ペディス分離株に対するELISAを示す図である。横軸としての種々の試験されたワクチンに対して、縦軸として405nmでの光学密度（OD）の平均が示される。各ワクチンは実施例1に示されている。

【図3】ワクチン接種後0日目、21日目及び35日目に牛から得られた血清のT．ファゲデニス分離株に対するELISAを示す図である。横軸としての種々の試験されたワクチンに対して、縦軸として405nmでの光学密度（OD）の平均が示される。各ワクチンは実施例1に示されている。

【図4】種々の病変の重症度及びそれらの対応するスコアを示す画像である。A）DDの

50

スコア = 10 及び感染後 32 日目、B) D D のスコア = 5 及び感染後 32 日目、C) D D のスコア = 0 及び感染後 32 日目。実施例 1。

【図 5】感染後 32 日目のアイオワスコア (Iowa score) 及びウィスコンシンスコア (Wisconsin score) による病変スコア及び B D D 病変を伴う動物のパーセンテージを表す図である。A) 感染後 32 日目の最終的な肉眼的病変の評価 (アイオワスコア)。横軸として示される種々のアッセイされるワクチンに対して、それぞれ左側の縦軸及び右側の縦軸に全アイオワスコア群 (0 ~ 50) 及び趾皮膚炎を伴う仔牛のパーセンテージが示される。B) 感染後 32 日目の全病変のパーセンテージ (ウィスコンシンスコア)。横軸としての種々の試験されたワクチンに対して、縦軸として全病変スコアのパーセンテージが示される。各ワクチンは、実施例 1 に示されている。

10

【図 6】暗視野顕微鏡法を使用した、ワクチン接種後 35 日目の血清からの *in vitro* の T . ペディスの増殖アッセイ及び形態阻害アッセイを示す図である。A) 血清 1 (1 / 16) ワクチン接種後 0 日目 (ワクチン 1)、B) 血清 1 (1 / 16) ワクチン接種後 35 日目 (ワクチン 1)。実施例 2。

【図 7】ワクチン接種後 0 日目、21 日目及び 35 日目に牛から得られた血清の T . ペディス (A)、T . ファゲデニス (B) 及び T . メディウム (C) に対する血清学 / E L I S A (I g G 2) を示す図である。横軸としての種々の試験されたワクチンに対して、縦軸として 405 nm での光学密度 (O D) の平均が示される。各ワクチンは実施例 2 に示されている。

【図 8】仔牛の各群についての感染後 32 日目の病変スコアの箱ひげ図である。縦軸としての種々の試験されたワクチンに対して、横軸として趾皮膚炎の病変スコア (0 から 10 まで) が示される。実施例 2。

20

【図 9】ウサギにおける 2 種の異なる T . ペディス株に対する免疫原性アッセイ (ワクチン接種後 0 日目、14 日目及び 35 日目に得られた血清の E L I S A) を示す図である。群 1 及び群 2 について、横軸としてのワクチン接種後の種々の日数で、縦軸として 405 nm での光学密度 (O D) の平均が示される。各群は実施例 3 に示されている。

【図 10】T . ファゲデニスのバクテリンでワクチン接種された牛から 0 日目、21 日目、35 日目、48 日目及び 69 日目に得られた血清の T . ペディス (A)、T . ファゲデニス (B) 及び T . メディウム (C) に対する血清学 / E L I S A を示す図である。横軸としての種々の群に対して、縦軸として I R P C (相対指数百分率) の平均が示される。各群は実施例 4 に示されている。

30

【図 11】ワクチン接種された牛から 0 日目、21 日目、35 日目、48 日目及び 69 日目に得られた血清の T . ペディスの P r t P M タンパク質 (A)、D . ノドーサスの A p r 2 タンパク質 (B) 及び T . ファゲデニスの M S P タンパク質 (C) に対する血清学 / E L I S A を示す図である。横軸としての種々の群に対して、縦軸として I R P C (相対指数百分率) の平均が示される。各群は実施例 5 に示されている。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明は、活性成分として少なくともトレポネーマ属の複数種のバクテリン、好ましくは、免疫原的有効量のトレポネーマ・ペディス、トレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ファゲデニス、トレポネーマ・レフリンゲンス、トレポネーマ・ブレナボレンス、トレポネーマ・カリギラム及び / 又はトレポネーマ・マルトフィラムからなる群より選択されるバクテリン、より好ましくは、免疫原的有効量のトレポネーマ・ペディス及びトレポネーマ・ファゲデニスから選択されるバクテリンを有する、趾皮膚炎用、好ましくは牛趾皮膚炎用の医薬組成物又はワクチン組成物を提供する。さらに、本発明は、趾皮膚炎の診断アッセイのための核酸及びタンパク質の産生並びに趾皮膚炎用のワクチン組成物で使用する免疫原性タンパク質及び組成物の調製を含む様々な用途におけるトレポネーマ属の複数種由来の又は D . ノドーサス若しくは F . ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の単離された抗原、好ましくは組み換え抗原であって、これらの組成物において、上記抗原は、免疫原的有効量のト

40

50

レボネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくは免疫原的有効量のトレポネーマ・ペディスのバクテリア又は好ましくは免疫原的有効量のトレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ファゲデニス、トレポネーマ・レフリンゲンス、トレポネーマ・ブレナボレンス、トレポネーマ・カリギラム及びトレポネーマ・マルトフィラムからなる群より選択されるバクテリアと組み合わせ使用される、抗原を提供する。さらに、本発明の好ましい実施形態では、上記単離された抗原は、アドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関するタンパク質及び溶血素等の病原性因子から選択される。より好ましくは、上記単離された抗原は、以下の群：M S P（主要外鞘タンパク質）、P r t P（セリン - プロテアーゼ複合体 P r t P 様タンパク質）及び P r t P M（P r t P 成熟タンパク質）、T y l C（溶血素 C）、O r f C（表面抗原 O r f C リポタンパク質）、溶血素 I I I、A p r 2（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ A p r 2）及び A p r 2 B M（A p r 2 良性成熟タンパク質）、A p r 5（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ A p r 5）及び A p r 5 M（A p r 5 成熟タンパク質）、B p r（塩基性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ B p r）及び B p r M（B p r 成熟タンパク質）、P r c B（セリン - プロテアーゼ複合体 P r c B 様タンパク質）、P r c A（セリン - プロテアーゼ複合体 P r c A 様タンパク質）、C y s ペプチダーゼ、溶血素赤血球溶解タンパク質 2、表面抗原 B s p A、フィラメントタンパク質、鞭毛フックタンパク質、プロリルエンドペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼ B 並びにオリゴペプチダーゼ F から選択される。更により好ましくは、上記単離された抗原は、トレポネーマ・ペディス由来の M S P、P r t P、好ましくは P r t P M、T l y C 及び O r f C、及び / 又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原 M S P 及び溶血素 I I I、及び / 又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原 P r t P、好ましくは P r t P M、及び / 又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原 A p r 2、好ましくは A p r 2 B M、A p r 5、好ましくは A p r 5 M 及び B p r、好ましくは B p r M からなる群より選択される。既に述べたように、上記抗原は、趾皮膚炎の診断アッセイのための核酸及びタンパク質の製造、並びに任意にトレポネーマ属の複数種に属する細菌を含む趾皮膚炎用のワクチン組成物で使用される免疫原性タンパク質及び組成物の調製を含む様々な用途で使用され得る。

【 0 0 3 9 】

定義

本明細書で使用される場合に、以下の用語は、別段の定めがない限り、それらに与えられた意味を有する。

【 0 0 4 0 】

「トレポネーマ」、「有蹄動物のトレポネーマ」、及び「ウシトレポネーマ」は、有蹄動物及びウシの生体試料、特に蹄足組織及び蹄組織に同定された又はそこから分離されたトレポネーマ属の柔軟な螺旋形のスピロヘータ細菌を指す。その定義はまた、趾皮膚炎の未然防止及び / 又は処置に有用である反芻動物、ブタ、ヒツジ及び / 又はヒト等の他の起源由来のトレポネーマ様種の分離株に関連する。

【 0 0 4 1 】

「有蹄動物」とは、牛、馬、羊及び山羊等の蹄を持つ動物を指す。

【 0 0 4 2 】

「ウシ」とは、牛（雄牛、雌牛、仔牛）を指す。典型的には、トレポネーマ属のスピロヘータは、D D（趾皮膚炎）に感染した蹄を持つ動物の蹄組織又は蹄足組織から分離され得る。

【 0 0 4 3 】

「バクテリア」は、ワクチンとして使用するのに適した不活化された全体的な細菌細胞又は部分的な細菌細胞の調製物を指す。

【 0 0 4 4 】

「トレポネーマ・ペディス」は、ホルスタイン・フリーシアン牛における牛趾皮膚炎病変において初めて記載され、トレポネーマ・ペディス Evans et al. 2009（D S M 番号

10

20

30

40

50

：18691、基準株T3552B）として初めて寄託された。本発明において、「トレポネマ・ペディス」という用語は、T. ペディス種、特に少なくとも90%、好ましくは少なくとも99%の全16S rRNA遺伝子EF061268（genebankアクセッション番号）に対する配列同一性を有する細菌株に属する任意の株を指す。他のトレポネマ起源もその定義に含まれる。したがって、全16S rRNA遺伝子に対して配列同一性を有する任意の特定のトレポネマ株も本発明に含まれる。T. ペディス株の幾つかの例は、T3552B、G819CB、T18B、T354Aである。あらゆるT. ペディス株が、本発明で使用するのに適している。好ましくは、使用される株は、HIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り（Avda. La Selva）, 135）によりライプニッツ研究所DSMZ（ドイツ微生物細胞培養コレクション（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH））（ドイツ、ブラウンシュバイク、インホッフェン通り7 B 38124）においてアクセッション番号DSMZ 32663として2017年10月10日に寄託されたT. ペディスである。
【0045】

10

「トレポネマ・メディウム」は、Umemoto T, Nakazawa F, Hoshino E, Okada K, Fukunaga M, Namikawa I. *Treponema medium* sp. nov., isolated from human subgingival dental plaque. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Jan;47(1):67-72において規定される細菌種を指す。その定義には、反芻動物、ブタ、ヒツジ、ヒト等のような他の起源由来のトレポネマ・メディウム様種からの分離株も含まれる。T. メディウム株の幾つかの例は、T18A、T19、T35B1、3C14、B-8307である。あらゆるT. メディウム株が、本発明で使用するのに適している。

20

【0046】

「トレポネマ・ファゲデニス」は、Standards in Genomic Sciences 2015; <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0059-0>, Mushtaq et al. 2015に記載されている。本発明において、「トレポネマ・ファゲデニス」という用語は、T. ファゲデニス種、特に少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%のトレポネマ・ファゲデニスのV1株の全16S rRNA遺伝子に対する配列同一性を有する細菌株に属する任意の株を指す。T. ファゲデニス株の幾つかの例は、V1、V2、T413、T551B、T603、B-7330である。あらゆるT. ファゲデニス株が、本発明で使用するのに適している。好ましくは、使用される株は、HIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り, 135）によりライプニッツ研究所DSMZ（ドイツ微生物細胞培養コレクション）（ドイツ、ブラウンシュバイク、インホッフェン通り7 B 38124）においてアクセッション番号DSMZ 32950として2018年11月7日に寄託されたT. ファゲデニスである。

30

【0047】

トレポネマ又は他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子の「タンパク質」又は「ポリペプチド」又は「抗原」は、アミノ酸残基の重合体を指し、産物の最小長さに限定されない。ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体はその定義に含まれる。それは、天然の集団に通常見られるアレル変異及び組み換え技術により導入される変化を含む。当業者であれば、アミノ酸の付加、欠失及び置換を含む様々な方法でタンパク質が修飾され得ることを認識している。本発明で有用な特定のトレポネマ又は他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子のタンパク質、ポリペプチド又は抗原は、限定されるものではないが、以下の通りである。

40

【0048】

T. ペディスの「Pr t P」（セリン-プロテアーゼ複合体Pr t P様タンパク質）及び「Pr t P M」（Pr t P成熟タンパク質）タンパク質は、それぞれ配列番号1若しくは配列番号2又はその免疫原性断片に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【0049】

50

配列番号 1 (P r t P、T . ペディス) :

MKKILVLSAVLAILAGSCSFNIDPQNISSNEQRVQSMEALYGNSSSVIPYAPKDEDTVDF
FIVKTKDGFDKTAFEKGFVKGALPLTGTGFTYWYLNKEGNDKKNLSVISSVKGVISAES
DYKVEPPDGIKVAKTVDGGGLVDISRLINGDYSGDPIANNSDYGLSITEALKAYKEIGYGD
KTVVAGIATGINMTHKDFKDENGNSIVLYAKSCVKSNGGTYIGNGNPFTEIPIGENWDKG
AAGTHCSGTICARGDNNAGIAGVAWKNTKLISYQSLDVDGGGSAWAVYGALADLTRTVN
ILRKP KSDRTL DENNALPSYLKNEDEFQITQKTVPVNMSLGGSYGTEFAFSVLTA AVKNNIL
PVIAMGNEGRYTAAYPAAFPGLAVGATNGKDKKVHFSNKGAWISISAPGDGIKSCGISG
DDDYETMSGTAMATPFVTGVISYLLSFNNAHNLTPYQIKSLLEKTADKVDGAVSFTEGYG
HGRVNVYNAAKAIRENSIPQVNEIYSEGSVYVEVKNNNEVIASKISLVDEETKVPLAYVAG
LGNNPVVEFKGLVKGKSYSVYASLLKYAKKETFTADGSDKTVTIQFNKNLAWVSTVPSLH
YNGGNEQPDTKIIVFKADSSGNLSRSPSPILIYDKDYLDTAYFEYESGAEYAEITGLKDEQ
GIFRGGNYVVKIGLTPDLN GEDIIDGSRVASDNDTHEDDDEPKAKLKGN AWEKKYACN
LAAHGTNNEDIDFFYIKMP

【 0 0 5 0 】

配列番号 2 (P r t P 成熟タンパク質 (P r t P M)、T . ペディス) :

GDPIANNSDYGLSITEALKAYKEIGYGDKTVVAGIATGINMTHKDFKDENGNSIVLYAKS
CVKSNGGTYIGNGNPFTEIPIGENWDKGAAGTHCSGTICARGDNNAGIAGVAWKNTKLIS
YQSLDVDGGGSAWAVYGALADLTRTVNILRKP KSDRTL DENNALPSYLKNEDEFQITQKT
VPVNMSLGGSYGTEFAFSVLTA AVKNNILPVIAMGNEGRYTAAYPAAFPGLAVGATNG
KDKKVHFSNKGAWISISAPGDGIKSCGISGDDDYETMSGTAMATPFVTGVISYLLSFNNA
HNLTPYQIKSLLEKTADKVDGAVSFTEGYGHGRVNVYNAAKAIRENS

【 0 0 5 1 】

T . ペディスの「 T l y C 」 (溶血素 C) タンパク質は、配列番号 3 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【 0 0 5 2 】

配列番号 3 (T l y C、T . ペディス) :

MGLFDKFKKKPNVSQILKNGLNDEKRD MIRGIVDLSDTAVKEVMIPRIDVDFLSLDTPGN
EILDKISESGHSRFPVYEDSIDNVIGILYVKDILKLLPKNEKIDLKKVVRKAFFVPESKRIDD
LLREFKRRHLHIAIAVDEYGGTSGIVCMEDIIEEIVGDIQDEFDNEGEDITKIGEGVWLCD
RIDLDDLKEAIDAEDLPADEFETLGGFVFDLFGKIPVKYEKAVWQNYDFIVQDMDGHKVK
TVKIILNKEALKPEAE

【 0 0 5 3 】

T . ペディスの「 M S P 」 (主要外鞘タンパク質) は、配列番号 4 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【 0 0 5 4 】

配列番号 4 (M S P、T . ペディス) :

MKKILSILIALVLVGGAVFAQDAPEMPAPVFKGSATLSWGIDLGYGTDKYGSALISHGFLN
EATASVSLPFVKSGSKKGEADVYALINLDGVKLGLEADLKEAKATGKIDKVEAKIVFYGAY
ITVYNAPEMKTKYAADATSLINDNFGIFNSGFGGYGTKIGYANPDLMDLDVGKFTSNG
SWKDRDGS LGAEYVKTVTVKANRVNGTGT VHLEDGQELRDM SGKVVERGPGWKRVPSG
QYMIYRSAYYRYRMNGHYGLGIDFHMAPVDKYLTVDANFNMTFDTAGSYRTDVESNFD
DMRVMNVGAMIKSEPIDGLMFKLGFDDGGHAFKKASDASAPLFAWALGFGTEYKDSRAGT
INAGLYVSSDGTPTYGNAGIFDPYKLNFPDVGKGGFKEEKRPDGT RPGRGITDIAFTVGYSG
LPAVEGLDLHARLNVFGLLSKISKEERAMGELIPLGLNVGAGYKAMLTDSIWIKPYADLW
GETNSDIYSDDTPKSKQKLYFGLAYKVGLSVSPMERLTIDLNWSHGKAFNPDLVLMGTGS

10

20

30

40

50

MFGLGQWRSTPFQHKADNGRFVVSAKITY

【 0 0 5 5 】

T . ペディスの「 O r f C 」(表面抗原 O r f C リポタンパク質) は、配列番号 5 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【 0 0 5 6 】

配列番号 5 (O r f C、T . ペディス) :

MQKIKKKLSFVFFLFTFSVFAEFNFDLIVQPFTGTEFFVDGKTVKPLVLEKDNTLAKVRLI
LKDSASAIEVKNKGFRTVNLTDELIRLKNNDVGKTADLKAPFSIKALAILSRKESKFDTKAFF
PTGRQPKSVTFVNSDTVAVALLDGNGADIINIETGEKKRISPPKEYAEKLGFEALVLKNK
NELWISQMPTALIHVFNLTTFEYKTAVKTSKGWSKVMAYNPLTDRVYLSNWQTFDISVI
NTETYSEEKKIKTKAVPRGMAFSEDGKFIYCAQFEDAAGNSNCRVLVKKELDTFKTVSESG
MKGAKRHIVTDYKQGRLYVSDMLNAVIEVYSLKDESLIKTVKVFShpntiQLSPDGKFLY
VSCRGPNPDKGYLYKGYVMGRLDIIDTETLTriesVEAGNQPTGLDISPDGKTIVLSDFL
DNRIRVFKKN

10

【 0 0 5 7 】

T . ヴインセンティの「 P r t P 」(セリン - プロテアーゼ複合体 P r t P 様タンパク質) は、配列番号 6 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なく

20

【 0 0 5 8 】

配列番号 6 (P r t P、T . ヴインセンティ) :

MIKQKKFRFTLFFITSALAAVFAGCAMGFVNNSAKSDGTGsvHGTADSNTVFNSKWIISQ
QERHDKGTVVREGYSIVKTVDSFNPDSTALNGSVAATQDLHDGylyFLIKTESDAAQFR
TAVRTLEGVLYAQPDYHYDAPAAMVDNTARPPVRNRGAAGKGTlGTADGNLDNDPKAA
LADWGLTATGALEAFKRYDAKYPVLAaiIDTGVNSLHEDFYDKNNKSiilyAKSSlHRGD
VTQYTNPIPIslDENWDNHGHGTHCSGTIAAVGNNGIGICGVSHANTKLITYRGLDASGG
DTYATYSCLGDlaeiITELRKEPGSRNSAVFAGLPPDVINYPQLRQKTVPVNLslGGPAGH
PYEVEMMNKALAAGVLPVIAMGNDGKTLAEYPAALQGILAVGATTMDDTraaFSNGGT
WMSVCAPGESIYSCGNGGQNWANSHSPDVkSSYRWMSGTSMATPFVTGVVtyLLSINP
DLSPYQIKALLENTADKIDRGSPYGYDSRGFSKwYGYGRVNVLKATEALVTGSNIPaEG
SVYSEKAVMITLKKAGAAQKKTPVWLYEKATGICAAVGLTDETNGIVRFYGLRTGLEYEI
GVNDAGTYKTYiITATNDSDIDYtFLL

30

【 0 0 5 9 】

T . ヴインセンティの「 P r t P M 」(P r t P 成熟タンパク質) は、配列番号 7 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【 0 0 6 0 】

配列番号 7 (P r t P 成熟タンパク質 (P r t P M)、T . ヴインセンティ) :

NDPKAALADWGLTATGALEAFKRYDAKYPVLAaiIDTGVNSLHEDFYDKNNKSiilyAKS
SLHRGDVTQYTNPIPIslDENWDNHGHGTHCSGTIAAVGNNGIGICGVSHANTKLITYRG
LDASGGDTYATYSCLGDlaeiITELRKEPGSRNSAVFAGLPPDVINYPQLRQKTVPVNLsl
GGPAGHPYEVEMMNKALAAGVLPVIAMGNDGKTLAEYPAALQGILAVGATTMDDTraa
FSNGGTWMSVCAPGESIYSCGNGGQNWANSHSPDVkSSYRWMSGTSMATPFVTGVVty
LLSINPDLSPYQIKALLENTADKIDRGSPYGYDSRGFSKwYGYGRVNVLKATEALVTGSN

40

【 0 0 6 1 】

T . ファゲデニスの「 溶血素 I I I 」は、配列番号 8 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも

50

90%、少なくとも95%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【0062】

配列番号8（溶血素III、T．ファゲデニス）：

MTNKKRRYTVGEEIANAITHGVGVGLSIAALVLLIVRANRYAPPELKAGYIVGFSIFGASL
IILYLFSTLYHALPLGAKKVFQIFDHCSIYILIAGTYTAFCLTALHGAIGWTIFGIIWGFAIA
GIVLYAIFQNKFPISLITYIVMGWIIIFAARPLKSQLPISFLFLILGGIVYTAGCIEFFALKKI
RWMHTIWFFFVLGGSILHFFSMYYSL

【0063】

D．ノドーサスの「Apr2」（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼApr2）は、配列番号9又はその免疫原性断片に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するタンパク質を指す。

10

【0064】

配列番号9（Apr2、D．ノドーサス）：

MKRFIMNKMALVVCAALVGQVASAETMVNYASAKAIGKQPAGSVRFIVKYKDNSQSSKD
LKNRSTTKVMANGMQVAGFNAQFVRMTGAGAGIFSVPDLKTTKEAHLVMDTIASNPDV
EFVEVDRIARPTAAPNDQHYREQWHYFDRYGVKADKVWDMGFTGQNVVVAVVDTGIL
HHRDLNANVLPGYDFISNSQISLDGDGRDADPFDEGDWFDNWACGGRPDPRKERSDSS
WHGSHVAGTIAAVTNNRIGVAGVAYGAKVVPVRALGRCGGYDSDISDGLYWAAGGRIAG
IPENRNPAKVINMSLGSDGQCSYNAQTMIDRATRLGALVVVAAGNENQNASNTWPTSCN
NVLSVGATTSRGIRASFSNYGVDVDLAAPGQDILSTVDSGTRRPVSDAYSFMAGTSMATP
HVSGVAALVISAANSVNKNLTPAELKDVLVSTTSPFNGLDRALGSGIVDAEAAVNSVLG
NEGNGRDDRDNVAPVENARNYANNSIKFIRDYRLTSSVIEVEGRSGAANGKINLALDI
RHGNRSQLSIQLTSPAGHVYHINHGDGARRPNLSGTVEIPVQNEQINGAWVLQVGDHGRG
ATGYIKSWSLTL

20

【0065】

D．ノドーサスの「Apr2BM」（Apr2 良性成熟タンパク質）は、配列番号10又はその免疫原性断片に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するタンパク質を指す。

30

【0066】

配列番号10（Apr2 良性成熟タンパク質（Apr2BM）、D．ノドーサス）：

AAPNDQHYREQWHYFDRYGVKADKVWDMGFTGQNVVVAVVATGILHHRDLNANVLPG
YDFISNSQISLDGDGRDADPFDEGDWFDNWACGGRPDPRKERSDSSWAGSHVAGTIAAV
TNNRIGVAGVAYGAKVVPVRALGRCGGYDSDISDGLYWAAGGRIAGIPENRNPAKVINMS
LGSDGQCSYNAQTMIDRATRLGALVVVAAGNENQNASNTWPTSCNNVLSVGATTSRGIR
ASFSNYGVDVDLAAPGQDILSTVDSGTRRPVSDAYSFMAGTAMATPHVSGVAALVISAA
NSVNKNLTPAELKDVLVSTTSPFNGLDRALGSGIVDAEAA

【0067】

D．ノドーサスの「Bpr」（塩基性細胞外サブチリシン様プロテアーゼBpr）は、配列番号11又はその免疫原性断片に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するタンパク質を指す。

40

【0068】

配列番号11（Bpr、D．ノドーサス）：

MNLSNISAVKVLTLVVSAAIAGQVCAAESIVNYESANAISKQPEGSVRFIVKYKDGTSSQ
GLKTRSTTKVMASGMQVAGFEAQFVRTTGLGAGIFAVPELKTTKEAHLVMDTIASNPDV
EFVEVDRLAYPKAAPNDPSYRQQWHYFSNYGVKADKVWDRGFTGQGVVSVVDTGILD
HVDLNGNMLPGYDFISSAPKARDGDQRDNNPADEGDWFDNWDCGGYPDPREKRFST

50

WHGSHVAGTIAAVTNNNGVGVAGVAYGAKVIPVRVLGKCGGYDSDITDGMYSAGGHID
GVPDNQNPAAQVINMSLGGDGDCSQSSQRIIDKTTNLGALIVIAAGNENQDASRTWPSSCN
NVLSVGATTPKGKRAPFSNYGARVHLAAPGTNILSTIDVGQAGPVRSSYGMKAGTSMAA
PHVSGVAALVISAANSIGKTLTPSELSDILVRTTSRFRNGRLDRGLGSGIVDANAANAVNLG
DQNRAQPRPPVNQPINSGNKVYRSDRRVAIRDLRSVTSGIRVNDQARVGSANITLTDIR
HGDRSQLAVELIAPSGRVYPIYHDGKRQPNIVGPATFSVKNERLQGTWTLKVTDKARGVT
GSIDSWSLTF

【 0 0 6 9 】

D . ノドーサスの「 B p r M 」 (B p r 成熟タンパク質) は、配列番号 1 2 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

10

【 0 0 7 0 】

配列番号 1 2 (B p r 成熟タンパク質 (B p r M)、D . ノドーサス) :

AAPNDPSYRQQWHYFSNYGVKADKVWDRGFTGQGVVSVVATGILDHVDLNGNMLPG
YDFISSAPKARDGDQRDNPADEGDWFDNWDCGGYPDPREKRFSTWAGSHVAGTIAA
VTNNGVGVAGVAYGAKVIPVRVLGKCGGYDSDITDGMYSAGGHIDGVPDNQNPAAQVI
NMSLGGDGDCSQSSQRIIDKTTNLGALIVIAAGNENQDASRTWPSSCNVLSVGATTPKG
KRAPFSNYGARVHLAAPGTNILSTIDVGQAGPVRSSYGMKAGTAMAAPHVSGVAALVISA
ANSIGKTLTPSELSDILVRTTSRFRNGRLDRGLGSGIVDANA

20

【 0 0 7 1 】

D . ノドーサスの「 A p r 5 」 (酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ A p r 5) は、配列番号 1 3 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【 0 0 7 2 】

配列番号 1 3 (A p r 5、D . ノドーサス) :

MKQSGINGVKTLTLVVCALASQAYAAVNYESANYIGSQPEGSVRFIKDYKDKSQSQMM
TNRSTTSVMNNNNITIAGFNAQFVRTMTIGAGIFAVPDLKTTKEAHLVMDTIASNPDVEY
VEVDRWLRPFAAPNDPFYNDQWHYYSEYGVKADKVWDRGITGKGVTVAVVDTGIVNHP
DLNANVIPGSGYDFIQEAEIAQDGDGRDSNPADAGDWHSNWACGKYPDPRIEKRNSW
HGSVHAGTIAAVTNNRIGVSGVAYDAKIVPVRVLGRCGGYNSDINEGMYWAAGGHIDGV
PDNKHPAQVINMSLGGPGVCGSTEQTILNRATQLGATIIVAAGNDNIDAYGVTPASCDNI
LTVGATTSSNGTRAYFSNHGSVVDISAPGAGITSTVDSGARYPSGPSYSLMDGTSMATPHV
AGVAALVISAANSVNKEMTPAQVRDVLVRTVSSFNGTPDRRIGAGIVDADAANAVNLG
NVVERPIDELKPQAEYRNPQIKLIRDYQMMFSEIKVNGRPGNTKFAVVKADIRHTDPSQL
KLRLVSPKGYEYAVHYDNIKNKSSELITFPRDEQMNGYWRLKIVDTKRGVTGYTRGWSV
AF

30

【 0 0 7 3 】

D . ノドーサスの「 A p r 5 M 」 (A p r 5 成熟タンパク質) は、配列番号 1 4 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

40

【 0 0 7 4 】

配列番号 1 4 (A p r 5 成熟タンパク質 (A p r 5 M)、D . ノドーサス) :

AAPNDPFYNDQWHYYSEYGVKADKVWDRGITGKGVTVAVVATGIVNHPDLNANVIPGS
GYDFIQEAEIAQDGDGRDSNPADAGDWHSNWACGKYPDPRIEKRNSWAGSHVAGTIA
AVTNNRIGVSGVAYDAKIVPVRVLGRCGGYNSDINEGMYWAAGGHIDGVPDNKHPAQVI
NMSLGGPGVCGSTEQTILNRATQLGATIIVAAGNDNIDAYGVTPASCDNILTVGATTSSNG
TRAYFSNHGSVVDISAPGAGITSTVDSGARYPSGPSYSLMDGTAMATPHVAGVAALVISA

50

ANSVNKEMTPAQVRDVLVRTVSSFNGTPDRRIGAGIVDADAA

【 0 0 7 5 】

配列番号 1 5 (主要外鞘タンパク質 (M S P) 、 T . ファゲデニス) :

MKKYLIASFIFAFALGIAFAQEAEAAEPAQKAAAAEPAQKAAAAEPAKEPEVYALTSGAKA
SIEGSTKLEWGLDLGAGKVTKDSIAHGFKNSGSWKVSFPLFEKKSFTSKADTPVYAEVIK
DVELGIQSKNKSKEKDFGFTGKVDEIVGTLYFYDAYLKIYKKPGFKVNYAQIWDPLKAD
DWDKSGYKFEPGFDIAGGTTTLGYKKDNIGNSGLDLDAGVKFGSNGNWELEGKSDYEGSP
QYALITGPATLAKGSTYVELEPVYVGKEAEKASYIMLDNQRFKITSNFKKVSPDKDLEVKE
GKYYAKIDGLTKKDTPATKNRYGMGFYTSVAYKPGDLKYIGFNFIDINTTFCSHKDWENN
TEKGNFYFNVSFGTKITSEPVKDLVLAFLDGEFPVNGEKKFAWDMFLDFTTYKWWGAGVY
VGNENTFYKSNKDKVDMSIYAKFETKGDKKKANFLVENLNAGAAIYVHHLLSKPVSPKT
VPIGLKVYADYKYDINDSMWLKPYASFYGETNHAEPKFGVYYNVGLTFSPLELRLTAD
WEQGVVKNKHGEGFIEKSAGKEHNGRFLGCKVVF

10

【 0 0 7 6 】

T . ファゲデニスの M S P (主要外鞘タンパク質) は、配列番号 1 5 又はその免疫原性断片に対して少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質を指す。

【 0 0 7 7 】

本発明において有用な他の候補タンパク質、ポリペプチド又は抗原は、アドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関するタンパク質及び溶血素等の既知の病原性因子から選択される。好ましくは、以下の群：

20

P c r B (セリン - プロテアーゼ複合体 P r c B 様タンパク質) ;

P c r A (セリン - プロテアーゼ複合体 P r c A 様タンパク質) ;

C y s ペプチダーゼ ;

溶血素赤血球溶解タンパク質 2 ;

表面抗原 B s p A ;

フィラメントタンパク質 ;

鞭毛フックタンパク質 ;

プロリルエンドペプチダーゼ ;

30

オリゴペプチダーゼ ;

オリゴペプチダーゼ B ; 並びに、

オリゴペプチダーゼ F ;

から選択される。

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用されるトレポネーマ又は他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子の「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、DNA 又は RNA であり得る。当業者であれば、トレポネーマのタンパク質の発現において又は診断プローブとして使用するために、ポリヌクレオチド配列は同一である必要はなく、本明細書に開示される配列と実質的に同一であり得ることを認識するであろう。特に、挿入されたポリヌクレオチド配列が転写及び翻訳されて機能的なポリペプチドが産生される場合に、当業者であれば、コドンの縮重のため、幾つかのポリヌクレオチド配列が同じポリペプチドをコードすることを認識するであろう。

40

【 0 0 7 9 】

「生体試料」は、生存生物又は死生物から得られるあらゆる試料を指す。生体試料の例には、生体液及び組織標本が含まれる。組織標本の例には、蹄足組織及び蹄組織も含まれる。そのような生体試料は、分析のために *in situ* 技術を使用して調製され得る。

【 0 0 8 0 】

「生物学的に純粋な培養物」又は「生物学的純粋な培養物」は、他の生物を実質的に含まない有蹄動物のトレポネーマの連続的な *in vitro* 培養物を指す。標準的な採取

50

手順（以下に説明する）により、少なくとも約 90 %、好ましくは 99 % 以上の生物、例えばトレポネマを含む調製物が得られる場合に、培養物は他の生物を実質的に含まない。

【0081】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドについての「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウに対して最適にアライメントされた 2 つの配列を比較することによって決定され、その際、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列の部分は、2 つの配列の最適なアライメントのために、参照配列（付加又は欠失を含まない）と比較して付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。そのパーセンテージは、両方の配列に同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、一致する位置の数を得て、その一致した位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数により割って、その結果に 100 を掛けて計算することで、配列同一性のパーセンテージが得られる。比較のための配列の最適なアラインメントは、既知のアルゴリズムのコンピュータ実装（アメリカ国立生物工学情報センターのリソースにおける BLAST、欧州バイオインフォマティクス研究所のリソースにおける CLUSTAL、Wisconsin Genetics Software Package の Genetics Computer Group（GCG）（ウィスコンシン州マジソン、サイエンスドライブ 575）における GAP、BESTFIT、FASTA 及び TFASTA）又は検分によって行うことができる。

10

【0082】

ポリヌクレオチド配列の実質的な同一性は、ポリヌクレオチドが、少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 90 %、最も好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。典型的には、2 つのポリペプチドは、少なくとも 40 %、好ましくは少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 90 %、最も好ましくは少なくとも 95 % が同一又は保存的置換であれば、実質的に同一であるとみなされる。配列は、好ましくは、デフォルトパラメーターを用いて GAP を使用して参照配列と比較される。

20

【0083】

ポリヌクレオチド配列が実質的に同一であることの別の指標は、2 つの分子がストリンジентな条件下で互いにハイブリダイズするかどうかである。ストリンジентな条件は配列に依存し、状況によって異なる。一般的に、ストリンジентな条件は、規定のイオン強度及び pH での特定の配列についての熱的融点（ T_m ）より約 5 °C 低くなるように選択される。 T_m は、標的配列の 50 % が完全一致したプローブにハイブリダイズする（規定のイオン強度及び pH 下での）温度である。典型的には、サザンブロットプロトコルのためのストリンジентな条件は、 $5 \times SSC$ 、0.1 % SDS 洗浄液で室温にて洗浄することを含む。

30

【0084】

「特異的又は選択的にハイブリダイズする」という語句は、標的がポリヌクレオチドと他の化合物との不均一混合物中にある場合に、プローブが実質的に標的配列にのみ結合してハイブリダイゼーション複合体が形成されるプローブと標的配列との間のハイブリダイゼーションを指す。そのようなハイブリダイゼーションは、標的配列の存在の決定因子である。プローブは他の無関係な配列と結合する場合があるが、形成されるハイブリダイゼーション複合体の少なくとも 90 %、好ましくは 95 % 以上が標的配列と結合する。

40

【0085】

「抗体」は、抗原上の特異的エピトープに結合することができる免疫グロブリン分子を指す。抗体はポリクローナルな混合物又はモノクローナルであり得る。抗体は、天然起源又は組み換え起源に由来するインタクトな免疫グロブリンであってもよく、インタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分であってもよい。抗体は、例えば、Fv、Fab 及び F(ab)₂ を含む様々な形態並びに一本鎖で存在し得る。重鎖及び軽鎖のための遺伝子が単一のコーディング配列へと結合されている一本鎖抗体を使用することもできる。

【0086】

50

「免疫原性組成物」又は「免疫学的組成物」は、ヒトを含む脊椎動物に投与することで、組成物に対する細胞性免疫応答型又は抗体媒介性免疫応答型の宿主における免疫学的応答を誘発する物質を指す。免疫原性組成物は、中でも死滅又は弱毒化させた細菌又はウイルス等の抗原性特性を有する分子、そしてまた免疫原性ポリペプチドを含む。免疫原性ポリペプチドは、一般的に抗原性とも呼ばれる。分子が免疫グロブリン（抗体）又はＴ細胞抗原受容体等の免疫系の抗原認識分子と特異的に相互作用することができる場合に、その分子は「抗原性」である。抗原性ポリペプチドは、少なくとも約５個、特に少なくとも約１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個又は少なくとも５０個のアミノ酸のエピトープを含む。エピトープとも呼ばれるポリペプチドの抗原性部分は、抗体又はＴ細胞受容体の認識に対して免疫優性である部分であってもよく、又は免疫化のために抗原性部分を担体ポリペプチドにコンジュゲートさせることによってその分子に対する抗体を作製するために使用される部分であってもよい。免疫原性組成物は、この記載によれば、活性分子、上記分子を含む組成物又は特定の免疫反応が望まれる２つ以上の抗原性分子を含む組成物に関連する。免疫原性組成物の例には、細菌、原生動物及びウイルスを含む微生物培養物の上清が含まれる。上記上清は、それに対する免疫応答を開始するための対象の抗原性分子を含み、それらの抗原性分子は、微生物細胞又は粒子（ウイルス）が分離された後に、微生物が増殖する培養培地に放出（外毒素）又は送達されている。その上清はまた、これにより無細胞調製物と呼ばれる。

10

【００８７】

「抗原」は、被験体が免疫応答、例えば体液性免疫応答及び／又は細胞性免疫応答を開始することができる分子を指す。組成物の意図される機能に応じて、１つ以上の抗原が含まれ得る。

20

【００８８】

「免疫学的有効量」又は「免疫学的有効用量」とは、疾患の処置又は未然防止のいずれかのために、動物における疾患の罹患率を減らし、又は感染若しくはその疾患罹患の重症度を下げる免疫応答を誘発する又は誘発することができる単回投与での又は連続投与の一部としての抗原の量又は用量の投与を意味する。免疫学的有効量又は免疫学的有効用量はまた、疾患の処置又は未然防止のいずれかのための抗体の産生を誘導することもできる。この量は、被験体の体調を含む様々な要因に応じて変動し、当業者によって容易に決定され得る。

30

【００８９】

本明細書で使用される「ワクチン」は、動物に投与されると、動物において免疫応答を直接的又は間接的に誘発する又は誘発することができる適切な添加剤及び／又は担体を伴う本発明の免疫原性組成物を意味する。特に、本発明のワクチンは、被験体に投与することで、細胞性又は抗体媒介性の宿主における防御的な免疫学的応答を誘発する。「混合ワクチン」という用語は、ワクチンが単一の製剤中に様々な抗原を含むことから、２つ以上の疾患又は２種以上の微生物によって引き起こされる１つの疾患から防御することを意味する。したがって、ワクチンは、本発明によれば「有効成分」として「免疫原性組成物」を含む。

【００９０】

40

本明細書で使用される「医薬品」は、広く受け入れられるように、ヒトを含む動物における疾患を治癒、処置又は未然防止するために使用される医薬品又は獣医薬（薬剤、薬物又は単に薬とも呼ばれる）と同義である。薬は様々な方法で分類される。１つの主な区別は、通常は化学合成から誘導される従来の低分子薬と、組み換えタンパク質、ワクチン、治療に使用される血液製剤（例えば、ＩＶＩＧ）、遺伝子治療、モノクローナル抗体及び細胞治療（例えば、幹細胞治療）を含む生物医薬品との間でなされる。本発明において、医薬は、好ましくは獣医学用医薬であり、更により好ましくは獣医学用途のワクチンである。

【００９１】

「と特異的に免疫反応性」という語句は、タンパク質又はペプチドに言及する場合に、

50

タンパク質と、タンパク質及び他の化合物の不均質な集団の存在下で該タンパク質の存在を決定する抗体との間の結合反応を指す。したがって、指定されたイムノアッセイ条件下では、特定された抗体は、特定のタンパク質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質にはあまり多量には結合しない。そのような条件下での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性のために選択された抗体を必要とし得る。様々なイムノアッセイ形式を使用して、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択することができ、それらは以下で詳細に記載される。

【 0 0 9 2 】

「実質的に純粋な」又は「単離された」という語句は、トレポネーマのペプチド又はタンパク質に言及する場合に、トレポネーマ生物の他の細胞内成分を含まない化学組成物を意味する。典型的には、試料の少なくとも約 85 % 以上が単一のポリペプチド骨格を示す場合に、単量体タンパク質は実質的に純粋である。マイナー変異体又は化学修飾は、典型的に、同じポリペプチド配列を共有し得る。精製手順に応じて、85 %、好ましくは 95 % を上回る純度が可能である。タンパク質の純度又は均質性は、当該技術分野でよく知られる多くの手段、例えばタンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動に続いての、銀染色又はクマシー染色によるポリアクリルアミドゲル上の単一のポリペプチドバンドの可視化によって示され得る。或る特定の目的のために、高分解能が必要となり、HPLC、FPLC 又は同様の手段が精製に利用される。

10

【 0 0 9 3 】

「標識」は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段又は化学的手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な標識には、 ^{32}P 、蛍光色素、電子密度の高い試薬、酵素（例えば、通常 ELISA で使用される）、ビオチン、ジオキシゲニン又はハプテン及び抗血清又はモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質が含まれる。

20

【 0 0 9 4 】

「組み換え」という用語は、細胞又は核酸又はベクターに関して使用される場合に、細胞又は核酸又はベクターが異種核酸の導入又は天然の核酸の改変によって修飾されていること、又は細胞がそのように修飾された細胞から誘導されることを示す。したがって、例えば、組み換え細胞は、細胞の天然（非組み換え）形態内に見られない遺伝子を発現する、又はそうでなければ異常発現される、過小発現される若しくは全く発現されない天然の遺伝子を発現する。

30

【 0 0 9 5 】

「薬学的に許容可能」とは、生物学的に又は他の点で不所望でない材料を意味し、すなわち、その材料は、不所望な生物学的効果を一切引き起こさず、又は医薬組成物の他の成分のいずれとも有害な相互作用を起こすことなく、トレポネーマ抗原と一緒に個体に投与することができる。

【 0 0 9 6 】

「未然防止する」、「未然防止すること」又は「未然防止」には、限定されるものではないが、症状、障害、状態又は疾患のリスクの減少、軽減又は改善、及び症状、障害、状態又は疾患からの動物の保護が含まれる。未然防止は、予防的に適用又は施与され得る。

40

【 0 0 9 7 】

「処置する」、「処置すること」又は「処置」は、限定されるものではないが、既存の症状、臨床徴候、障害、状態又は疾患の進行又は重症度の抑制、減速、停止、軽減、改善又は復帰を含む。処置は、治療的に適用又は施与され得る。

【 0 0 9 8 】

「被験体」とは、個体を意味する。一態様では、被験体は、哺乳動物、例えばヒトを含む霊長類である。別の態様では、哺乳動物は、中でも、マーモセット、サル、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、及びテナガザル等の非ヒト霊長類である。「被験体」という用語には、家庭動物、例えば猫、犬等、家畜、例えば牛、馬、豚、羊、山羊等、実験動物、例えばフェレット、チンチラ、マウス、ウサギ、ラット、アレチネズミ、モルモット

50

等、及び鳥類、例えば鶏、七面鳥、アヒル、キジ、ハト、コバト、オウム、バタン、ガチヨウ等も含まれる。被験体には、限定されるものではないが、魚（例えば、ゼブラフィッシュ、金魚、ティラピア、サケ、及びマス）、両生類及び爬虫類も含まれ得る。本明細書で使用される場合に、「被験体」は「患者、患者（patient）」又は「罹患した被験体」と同じであり、それら用語は、区別なく使用され得る。

【 0 0 9 9 】

発明の説明

本発明は、トレポネーマ属の複数種のバクテリアを含み、任意にトレポネーマ属の複数種由来の又は D・ノドーサス若しくは F・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の抗原が補充された新規の医薬組成物及び／又はワクチン組成物を提供する。上記ワクチン組成物は、好ましくは易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物を DD に対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫するためのものであり、その際、上記トレポネーマ属の複数種のバクテリアは、好ましくは T・ペディス、T・ファゲデニス、T・ヴィンセンティ、T・メディウム、T・レフリンゲンス、T・カリギラム、T・マルトフィラム及び／又は T・ブレナボレンス、好ましくは T・ペディス又は T・ファゲデニスから選択される。

【 0 1 0 0 】

さらに、本発明は、趾皮膚炎のための診断アッセイのための核酸及びタンパク質の産生並びに趾皮膚炎用のワクチン組成物で使用される免疫原性タンパク質及び組成物の調製を含む様々な用途におけるトレポネーマ属の複数種由来の又は D・ノドーサス若しくは F・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の単離された抗原、好ましくは組み換え抗原であって、これらの組成物において、上記抗原は、免疫原的有効量のトレポネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくは免疫原的有効量のトレポネーマ・ペディスのバクテリア又は好ましくは免疫原的有効量のトレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ファゲデニス、トレポネーマ・レフリンゲンス、トレポネーマ・ブレナボレンス、トレポネーマ・カリギラム及びトレポネーマ・マルトフィラム又はそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるバクテリアと組み合わせて使用される、抗原を提供する。好ましい実施形態では、上記抗原は、MS P（主要外鞘タンパク質）、Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体 Pr t P 様タンパク質）、T l y C（溶血素 C）、O r f C（表面抗原 O r f C リポタンパク質）及び溶血素 I I I からなる群より選択されるトレポネーマ属の複数種、例えば限定されるものではないが、T・ペディス由来の単離された抗原である。より好ましい実施形態では、上記抗原は、トレポネーマ・ペディス由来の単離された抗原であり、MS P（主要外鞘タンパク質）、Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体 Pr t P 様タンパク質）、好ましくは Pr t P M（Pr t P 成熟タンパク質）、T y l C（溶血素 C）及び O r f C（表面抗原 O r f C リポタンパク質）、及び／又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原 MS P 及び溶血素 I I I、及び／又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原 Pr t P、好ましくは Pr t P M、及び／又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原 A p r 2（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ A p r 2）、好ましくは A p r 2 B M（A p r 2 良性成熟タンパク質）、A p r 5（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ A p r 5）、好ましくは A p r 5 M（A p r 5 成熟タンパク質）及び B p r（塩基性細胞外サブチリシン様タンパク質 B p r）、好ましくは B p r M（B p r 成熟タンパク質）並びにアドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関与するタンパク質及び溶血素等の病原性因子から選択される本発明において有用な他の候補タンパク質、ポリペプチド又は抗原からなる群より選択される。更に別の好ましい実施形態では、本発明において有用な上記ポリペプチド又は上記抗原は、以下の群：

P c r B（セリン - プロテアーゼ複合体 P r c B 様タンパク質）；

P c r A（セリン - プロテアーゼ複合体 P r c A 様タンパク質）；

C y s ペプチダーゼ；

溶血素赤血球溶解タンパク質 2 ；

10

20

30

40

50

表面抗原 B s p A ;
フィラメントタンパク質 ;
鞭毛フックタンパク質 ;
プロリルエンドペプチダーゼ ;
オリゴペプチダーゼ ;
オリゴペプチダーゼ B ; 並びに、
オリゴペプチダーゼ F ;

から選択することができ、趾皮膚炎の診断アッセイのための核酸及びタンパク質の製造、並びに任意にトレポネーマ属の複数種に属する細菌を含む趾皮膚炎用のワクチン組成物で使用される免疫原性タンパク質及び組成物の調製を含む様々な用途で使用する事ができる。好ましくは、トレポネーマ属の複数種に属する細菌を含む上記趾皮膚炎用のワクチン組成物は、以下のトレポネーマ種：T．ペディス、T．ファゲデニス、T．ヴィンセンティ、T．メディウム、T．レフリングェス、T．カリギラム、T．マルトフィラム及び／又はT．ブレナボレンスの少なくとも1種以上を含む。

【0101】

一方、本発明は、トレポネーマ・ペディスを、哺乳動物における趾皮膚炎（DD）、特に有蹄動物の趾皮膚炎の病因因子の1つとして特定している。したがって、本発明はまた、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物をDDに対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化するためのトレポネーマ・ペディスの分離培養物、及び一連の特異的トレポネーマ抗原により感染を検出することによってDDを診断する方法を提供する。

【0102】

したがって、本発明は、任意にトレポネーマ属の複数種由来の又はD．ノドーサス若しくはF．ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の単離された1種以上の抗原が補充された又はそれらと組み合わせられた、ワクチンとして使用される、トレポネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくはトレポネーマ・ペディスのバクテリア又はT．ファゲデニス、T．ヴィンセンティ、T．メディウム、T．レフリングェス、T．カリギラム、T．マルトフィラム及び／又はT．ブレナボレンスの好ましくは生物学的に純粋な培養物を提供する。

【0103】

そのような抗原は、既に先に列記されている。

【0104】

本発明の先に特定された態様及び実施形態は全て、トレポネーマ属の複数種のバクテリアが、哺乳動物を趾皮膚炎、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫したという驚くべき知見に基づくものである。この意味で、実施例1で、BDDの実験的感染に対する実験的ワクチンのin vitro免疫原性を評価した。これらのワクチンについての仔牛におけるBDDの実験的感染に対するin vivo有効性も試験した。これらのワクチンに関連する材料及び方法、それらの調製並びに定性的組成及び定量的組成、使用されたワクチン接種プロトコル及び動物は、実施例の節に記載されている。

【0105】

実施例1に示される結果に例示されるように、ワクチンB（トレポネーマのバクテリアを有しない4種の組み換えタンパク質のみ）及びワクチンD（プラセボ）は明らかに有効ではなかった。それに対して、ワクチンA（トレポネーマ・ペディスのバクテリア+4種の組み換えタンパク質）及びワクチンC（トレポネーマ・ペディスのバクテリア単独）により、本発明の著者らは、T．ペディスに対して強い応答を得ただけでなく、T．ファゲデニスに対しても強い応答を得た。試験された製剤のいずれもT．ファゲデニスを含まなかったもので、これは、潜在的な交差反応性によるものとし説明することができない。さらに、アジュバントA又はアジュバントBの使用の間に違いはなかった。さらに、細菌単独を含むワクチンに対して、混合ワクチン（バクテリア+組み換え体）の免疫学的応答の増加が見られ（A対C）、ワクチン接種後47日目の血清力価で実証された。

【0106】

さらに、実施例 2 に示されるように、本発明の著者らは、仔牛での B D D の実験的感染に対する 2 種の実験的ワクチンの *i n v i v o* 有効性を評価したところ、上記の結果が確認される。この最後の実験から、ワクチン A 又はワクチン B のいずれかを、実施例 1 に示された先の一連の実験からのワクチン番号 C と比較すると、ほとんどの潜在的な治療効果がトレポネーマのバクテリアに起因することが明らかであり、一方で、先行する実験のワクチン A で使用された組み換え抗原が、不活化された T . ペディスのバクテリアを含むワクチンの免疫学的反応を増強するらしいことに注目すると非常に興味深い。

【 0 1 0 7 】

さらに、本出願は、特に実施例 4 において、B D D に対する実験的な T . ファゲデニスワクチンの免疫原性を更に開示しており、ここで、試験された種々のトレポネーマ属の複数種 (T . ペディス、T . ファゲデニス及び T . メディウム) に対する免疫学的応答が、群 2 の動物の血清から明らかに観察された。群 2 のワクチン製剤は T . ペディス又は T . メディウムのバクテリアを含まなかったため、ワクチン接種された動物に観察された免疫学的応答は、トレポネーマ属の複数種間の交差反応に起因し得る (図 1 0) 。さらに、T . ファゲデニスのバクテリアでワクチン接種された仔牛の血清 (群 2) に関して T . ファゲデニスの *i n v i t r o* 増殖に対する明らかな阻害効果が観察された。この阻害効果は、コントロール群には観察されなかった。

10

【 0 1 0 8 】

これらの結果は、ワクチン接種された動物に観察された免疫学的応答が、交差反応の原因となる幾つかのエピトープを共有するトレポネーマ種間の交差反応性に起因し得ることを示唆している。

20

【 0 1 0 9 】

さらに、本出願は、特に実施例 5 で、B D D に対する抗原が補充された実験的な T . ファゲデニスのワクチンの免疫原性を更に開示しており、ここで、ワクチン接種された群 2 の動物の血清におけるワクチン組成物中に存在する全ての抗原に対する免疫学的応答が明らかに観察された。さらに、バクテリアに組み換えタンパク質が補充された場合 (群 2) に T . ファゲデニスの M S P タンパク質に対する免疫学的応答が増加した。けれども、群 3 (バクテリア単独) も同様に明らかな免疫学的応答を生じた。それに対して、コントロール群 (群 1) は、試験された抗原のいずれに対しても免疫学的応答を生じなかった。

【 0 1 1 0 】

30

さらに、群 2 (バクテリア + 組み換えタンパク質) 及び群 3 (バクテリア単独) のワクチン接種された仔牛の血清において、T . ファゲデニスの *i n v i t r o* 増殖に対する明らかな阻害効果が観察された。これらの結果は、群 2 及び群 3 でのワクチン接種された動物における中和抗体の存在を裏付けている。

【 0 1 1 1 】

したがって、これらの知見は、トレポネーマ種が幾つかのエピトープ、おそらく外膜又は鞭毛のエピトープを共有し、それらが交差反応性の原因となり、トレポネーマ属の複数種の異なる種間で保存されていることを示している。2 種の異なる実験的なトレポネーマ属の複数種のワクチンを使用することによる仔牛での実験的感染においてこれまでにこうして得られてきた結果を考慮して、これらのエピトープは明らかに防御に関与する。

40

【 0 1 1 2 】

したがって、本明細書に示される結果により、任意のトレポネーマ属の複数種のワクチン組成物に対して同じことを推定することが可能であり、特に、本発明は、一態様では、免疫原的有効量の T . ペディス、T . ファゲデニス、T . ヴィンセンティ、T . メディウム、T . レフリゲンス、T . カリギラム、T . マルトフィラム及び / 又は T . プレナボレンスを含む医薬組成物を提供する。更に特に、これらの結果を考慮して、本発明は、トレポネーマ・ペディス及びトレポネーマ・ファゲデニスを、哺乳動物における趾皮膚炎 (D D) 、特に有蹄動物の趾皮膚炎の病因因子の 2 つとして特定している。したがって、本発明は、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物を D D に対して、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫化するためのトレポネーマ・ペディス及びトレポネーマ・ファゲデニス

50

のワクチンの分離培養物、並びに一連の特異的なトレポネーマ抗原により感染を検出することによるＤＤの診断方法を提供する。したがって、一態様では、本発明は、免疫原的有効量のトレポネーマ・ペディス及び／又はトレポネーマ・ファゲデニスのバクテリア、好ましくは任意のＴ．ペディス株、例えば、限定されるものではないが、Ｔ３５５２Ｂ、Ｇ８１９ＣＢ、Ｔ１８Ｂ若しくはＴ３５４Ａ、又はHIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り、１３５）によりライプニッツ研究所ＤＳＭＺ（ドイツ微生物細胞培養コレクション）（ドイツ、ブラウンシュバイク、インホッフエン通り７Ｂ３８１２４）においてアクセッション番号ＤＳＭ ３２６６３として２０１７年１０月１０日に寄託されたＴ．ペディス株、又は好ましくは任意のＴ．ファゲデニス株、例えば、限定されるものではないが、Ｖ１、Ｖ２、Ｔ４１３、Ｔ５５１Ｂ、Ｔ６０３、Ｂ－７３３０、若しくはHIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り、１３５）によりライプニッツ研究所ＤＳＭＺ（ドイツ微生物細胞培養コレクション）においてアクセッション番号ＤＳＭ ３２９５０として２０１８年１１月７日にブタペスト条約に基づき寄託されたＴ．ファゲデニス株を含む医薬組成物を提供する。好ましくは、上記医薬組成物は、トレポネーマ属の複数種由来の又はＤ．ノドーサス若しくはＦ．ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の単離された抗原、好ましくは組み換え抗原を更に含む。より好ましくは、上記医薬組成物は、ＭＳＰ（主要外鞘タンパク質）、ＰｒｔＰ（セリン－プロテアーゼ複合体ＰｒｔＰ様タンパク質）、ＴｌｙＣ（溶血素Ｃ）、ＯｒｆＣ（表面抗原ＯｒｆＣリポタンパク質）及び溶血素ⅠⅠⅠからなる群より選択されるトレポネーマ属の複数種由来の単離された抗原を更に含む。更により好ましくは、上記医薬組成物は、ＭＳＰ（主要外鞘タンパク質）、ＰｒｔＰ（セリン－プロテアーゼ複合体ＰｒｔＰ様タンパク質）、好ましくはＰｒｔＰＭ（ＰｒｔＰ成熟タンパク質）、ＴｙｌＣ（溶血素Ｃ）及びＯｒｆＣ（表面抗原ＯｒｆＣリポタンパク質）からなる群より選択されるトレポネーマ・ペディス由来の単離された抗原、及び／又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原ＭＳＰ及び溶血素ⅠⅠⅠ、及び／又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原ＰｒｔＰ、好ましくはＰｒｔＰＭ、及び／又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原Ａｐｒ２（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼＡｐｒ２）、好ましくはＡｐｒ２ＢＭ（Ａｐｒ２良性成熟タンパク質）、Ａｐｒ５（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼＡｐｒ５）、好ましくはＡｐｒ５Ｍ（Ａｐｒ５成熟タンパク質）及びＢｐｒ（塩基性細胞外サブチリシン様タンパク質Ｂｐｒ）、好ましくはＢｐｒＭ（Ｂｐｒ成熟タンパク質）、並びにアドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関与するタンパク質及び溶血素から選択される本発明において有用な他の候補タンパク質、ポリペプチド又は抗原を更に含む。本発明において有用な他のポリペプチド又は抗原は、好ましくは、以下の群：

ＰｃｒＢ（セリン－プロテアーゼ複合体ＰｒｃＢ様タンパク質）；

ＰｃｒＡ（セリン－プロテアーゼ複合体ＰｒｃＡ様タンパク質）；

Ｃｙｓペプチダーゼ；

溶血素赤血球溶解タンパク質２；

表面抗原ＢｓｐＡ；

フィラメントタンパク質；

鞭毛フックタンパク質；

プロリルエンドペプチダーゼ；

オリゴペプチダーゼ；

オリゴペプチダーゼＢ；並びに、

オリゴペプチダーゼＦ；

又はそれらの任意の組み合わせ；

から選択される。

【０１１３】

さらに、本発明で使用される組み換え抗原は、例示されたワクチン組成物の免疫学的応答を増強したので、したがって、本明細書に示される結果により、任意のトレポネーマ属

の複数種のワクチン組成物に対して同じことを推定することが可能である。したがって、更なる態様では、本発明は、免疫原的有効量のトレポネーマ属の複数種のバクテリアであって、好ましくは、*T. ペディス*、*T. ファゲデニス*、*T. ヴィンセンティ*、*T. メディウム*、*T. レフリングENS*、*T. カリギラム*、*T. マルトフィラム*及び/又は*T. プレナボレンス*、好ましくは*T. ペディス*又は*T. ファゲデニス*から選択される、トレポネーマ属の複数種のバクテリアと、トレポネーマ属の複数種由来の又は*D. ノドーサス*若しくは*F. ネクロフォーラム*等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の単離された1種以上の抗原とを含む医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、易罹患性の哺乳動物、好ましくは有蹄動物を*DD*、特に牛趾皮膚炎に対して効果的に免疫するために有用であり、ここで、そのような単離された抗原、好ましくは組み換え抗原は、トレポネーマ属の複数種又は*D. ノドーサス*若しくは*F. ネクロフォーラム*等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子から得られることが好ましい。より好ましくは、上記抗原は、*MSP*（主要外鞘タンパク質）、*Pr t P*（セリン - プロテアーゼ複合体 *Pr t P* 様タンパク質）、*T l y C*（溶血素C）、*O r f C*（表面抗原 *O r f C* リポタンパク質）及び溶血素 *I I I* からなる群より選択されるトレポネーマ抗原である。これらの抗原の全ては、限定されるものではないが、*T. ペディス*、*T. ファゲデニス*又は*T. ヴィンセンティ*等のトレポネーマ属の複数種から得ることができることに留意する。本発明において有用な追加の抗原は、*D. ノドーサス*又は*F. ネクロフォーラム*等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子から選択され得る。これらの抗原の全ては、本発明の医薬組成物において組み合わせて使用することができ、好ましくは組み換式的に産生される。より好ましくは、本発明において有用な上記タンパク質、上記ポリペプチド又は上記抗原は、アドヘシン、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、表面抗原、運動性に関与するタンパク質及び溶血素等の病原性因子から選択される。更により好ましくは、本発明において有用な上記タンパク質、上記ポリペプチド又は上記抗原は、以下の群：

MSP（主要外鞘タンパク質）；
Pr t P（セリン - プロテアーゼ複合体 *Pr t P* 様タンパク質）及び *Pr t P M*（*Pr t P* 成熟タンパク質）；
T y l C（溶血素C）；
O r f C（表面抗原 *O r f C* リポタンパク質）；
 溶血素 *I I I* ；
A p r 2（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ *A p r 2*）及び *A p r 2 B M*（*A p r 2* 良性成熟タンパク質）；
A p r 5（酸性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ *A p r 5*）及び *A p r 5 M*（*A p r 5* 成熟タンパク質）；
B p r（塩基性細胞外サブチリシン様プロテアーゼ *B p r*）及び *B p r M*（*B p r* 成熟タンパク質）；
P r c B（セリン - プロテアーゼ複合体 *P r c B* 様タンパク質）；
P r c A（セリン - プロテアーゼ複合体 *P r c A* 様タンパク質）；
C y s ペプチダーゼ；
 溶血素赤血球溶解タンパク質 2 ；
 表面抗原 *B s p A* ；
 フィラメントタンパク質；
 鞭毛フックタンパク質；
 プロリルエンドペプチダーゼ；
 オリゴペプチダーゼ；
 オリゴペプチダーゼ B ；並びに、
 オリゴペプチダーゼ F ；
 から選択される。

【0114】

更により好ましくは、上記抗原は、トレポネーマ・ペディス由来の *MSP*、*Pr t P*、

好ましくはPrtPM、TlyC及びOrfC、又はトレポネーマ・ファゲデニス由来の抗原MSP及び溶血素III、又はトレポネーマ・ヴィンセンティ由来の抗原PrtP、好ましくはPrtPM、又はディケロバクター・ノドーサス由来の抗原Apr2、好ましくはApr2BM、Apr5、好ましくはApr5M及びBpr、好ましくはBprM、又はそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される抗原であり、任意に前記抗原は、組み換え的に産生される。

【0115】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体を更に含み得る。ワクチンを液体形で調製するのに適した担体には、水、又は等張生理食塩液、すなわち生理学的な細胞培地と同じ塩濃度を有する等張生理食塩液、又は油、又は細菌が培養される培養液、又はそれらの混合物が含まれ得る。

10

【0116】

さらに、所望であれば、担体には、他の補助物質又は薬学的に許容可能な添加剤、例えば、湿潤剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝剤）、炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、デンプン又はデキストラン）又はタンパク質（例えば、アルブミン、カゼイン、ウシ血清又はスキムミルク）等の安定化剤が含まれ得る。

【0117】

添加剤の物理化学的特徴及び市販される商品名は、R.C. Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, Pharmaceutical Press, London, 2003 [ISBN: 0-85369-472-9]の書籍に見出すことができる。

20

【0118】

上記の医薬組成物、好ましくは、ワクチン組成物は、哺乳動物における趾皮膚炎（DD）、特に有蹄動物の趾皮膚炎の処置及び/又は未然防止のための様々な医薬調剤に使用することができる。本発明の医薬組成物は、典型的には、トレポネーマ属の複数種に感染した牛、羊、山羊等の蹄を持つ動物、及びヒトを含む他の動物にワクチン接種するために使用される。

【0119】

本ワクチンの活性成分として使用される免疫原性細胞生物は、弱毒化又は不活化されたDD関連のトレポネーマ属の複数種、好ましくは不活化されたトレポネーマ属の複数種のバクテリア、より好ましくは不活化されたトレポネーマ・ベディス又はトレポネーマ・ファゲデニスのバクテリアを含む。不活化は、すなわち化学的処理、分子的処理又は熱処理によって達成され得る。これらのスピロヘータは、DDに罹患した被験体から分離され得る。スピロヘータは、感染した被験体又は適切な栄養培地において維持され得る。免疫原性スピロヘータは、典型的には、罹患した動物の皮膚から分離され、規定の培地中で培養される。スピロヘータ培養物は、化学的処理、分子的処理又は熱処理のいずれかによって不活化され得る。スピロヘータは、培養物を好気性（酸素）条件下に曝すことによって不活化することもできる。不活化過程は、他の特性、典型的には免疫原性を維持しつつ培養物の毒性をなくす。

30

【0120】

ワクチンを調製するために、まずスピロヘータを遠心分離若しくは濾過により、又は選択培地等の使用により培地から分離する。スピロヘータは、化学的処理を含む多くの方法により処理して、上記説明のように不活化することができる。スピロヘータの懸濁液は、凍結乾燥によって乾燥させるか、又はその水性懸濁液中で凍結させることで、不活化された全細胞を得ることができる。

40

【0121】

次いで、乾燥又は培養された全細胞を、使用のために適切な濃度に調節し、任意に適切なアジュバントと組み合わせ、包装する。適切なアジュバントには、限定されるものではないが、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、ビタミンE、スクアレン、スクアレン、サポニン類、例えばQuil A、QS -

50

21、チョウセンニンジン、ザイモサン、グルカン類、非イオン性ブロックポリマー、モノホスホリルリピドA、植物油、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、油中水型、水中油型、水中油中水型のエマルジョン、Ribiaアジュバントシステム(Ribi Inc.社)、大腸菌由来の熱不安定性エンテロトキシン(組み換え又はその他)、コレラ毒素、ジメチルアミノエチルデキストラン、デキストラン類又はそれらの類似体若しくは混合物が含まれる。

【0122】

最後に、免疫原性産物は、ワクチン製剤で使用されるリポソーム中に組み込むことができ、又は多糖類若しくは他のポリマーにコンジュゲートさせることができる。

【0123】

本発明のワクチンは、典型的に、溶液、エマルジョン又は液体懸濁液の形で非経口ワクチンとして調製される。本発明のワクチンはまた、注射前に液体ビヒクル中に溶解又は懸濁するのに適した固体形で調製され得る。

【0124】

特に、ワクチンは、

(a) 液体形で、又は、

(b) 凍結乾燥、フリーズドライ、噴霧乾燥若しくは泡沫乾燥された乾燥粉末形で、存在する。

【0125】

本発明のワクチンの用量の典型的な容量は、0.1mlから5mlの間、特に0.15mlから3mlの間、更に特に0.2mlから2mlの間である。

【0126】

通常、筋肉内投与のためには、0.5mlから5mlの間、特に1mlから3mlの間、更に特に1mlから2mlの間で使用される。

【0127】

本発明のワクチンの調製に使用され得る液体ビヒクルには、例えば、水(特に、注射用水)、生理的塩濃度の生理食塩液、又は細菌が培養される培養液が含まれる。

【0128】

本発明のワクチンは、種々の投与経路によって投与され得る。特定の経路には、限定されるものではないが、経口経路、経皮経路、経粘膜経路、皮内経路、皮下経路、筋肉内経路、腹腔内経路又は静脈内経路が含まれる。特に、本発明のワクチンは、筋肉内経路によって投与される。処置の所望の期間及び有効性に従って、本発明による組成物は、例えば数日間、数週間又は数ヶ月間にわたって毎日、種々の投与量で1回又は数回、また断続的に投与され得る。特に、本発明の免疫原性組成物は数回投与される。更に特に、ワクチン接種計画は2回の用量を含み、2回目の用量は1回目の用量の3週間後に投与される。上記ワクチンは、例えばRemington The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000 [ISBN: 0-683-306472]のマニュアルに記載されているように、種々の投与形に適した医薬製剤の調製のために当業者により使用される通常の方法に従って調製され得る。更に特に、ワクチンは、筋肉内経路により使用される。

【0129】

非経口投与のために、抗原を適切な担体と組み合わせることができる。例えば、抗原は、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム(ミョウバン)、硫酸ベリリウム、シリカ、カオリン、炭素、油中水型エマルジョン、水中油型エマルジョン、ムラミルジペプチド、細菌性エンドトキシン、脂質、百日咳菌等のような様々なアジュバント又は免疫調節剤と一緒に又はそれらを伴わずに、水、生理食塩水又は緩衝化ビヒクル中で投与され得る。そのようなアジュバントは、様々な供給元から市販されており、例えばMerck Adjuvant 6(Merck and Company, Inc.社、ニュージャージー州ローウェイ)である。他の適切なアジュバントは、MPL+TDMエマルジョン(RIBBI Immunochem Research Inc.社、米国)である。他の免疫刺激剤には、インタ

10

20

30

40

50

ーロイキン 1、インターロイキン 2 及びインターフェロン - γ が含まれる。これらのタンパク質は、ワクチンと一緒に、又はワクシニアウイルス等の組み換えワクチン系で機能的オペロンとして提供されるそれらの対応する遺伝子配列と一緒に供給され得る。抗原とアジュバントとの割合は、両方が有効量で存在する限り、広範囲にわたって変動し得る。

【0130】

既に述べたように、トレポネーマ属の複数種のバクテリア、好ましくはトレポネーマ・ペディス又はトレポネーマ・ファゲデニスのバクテリアに加えて、ワクチンはまた、上述のようにトレポネーマ属の複数種由来の又は D・ノドーサス若しくは F・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の抗原を含み得る。さらに、他の有蹄動物疾患についての抗原がワクチンに含まれていてもよい。例えば、ワクチンは、有蹄動物のフソバクテリウム・ネクロフォーラム抗原、ポルフィロモナス・レヴィイ抗原及びディケロバクター・ノドーサス抗原（腐蹄病として一般的に知られる趾間壊死桿菌症を引き起こす生物）、レプトスピラ症細菌抗原、ウシ呼吸器合胞体ウイルス抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ウシ下痢ウイルス抗原、ウシパラインフルエンザウイルス抗原、水疱性口内炎ウイルス抗原、悪性カタル熱ウイルス抗原、ブルータングウイルス抗原、仮性狂犬病ウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、牛疫ウイルス抗原、グッゲンハイメラ抗原、ポルフィロモナス抗原、バクテロイデス抗原、プレボテラ抗原、ペプトストレプトコッカス抗原、カンピロバクター抗原、マイコプラズマ抗原、コリネバクテリウムノアクチノマイセス抗原、クリプトスポリジウム抗原、ロタウイルス抗原、コロナウイルス抗原及びクロストリジウム属の複数種の抗原を含み得る。

【0131】

さらに、ワクチンが少なくともトレポネーマ・ペディス又はトレポネーマ・ファゲデニスを含む場合に、該ワクチンは、免疫原的有効量のトレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ファゲデニス、トレポネーマ・ペディス、トレポネーマ・レフリングENS、トレポネーマ・カリギラム、トレポネーマ・マルトフィラム及びトレポネーマ・ブレナボレンス、好ましくは、トレポネーマ・メディウム、トレポネーマ・ヴィンセンティ、トレポネーマ・ペディス及びトレポネーマ・ファゲデニスからなる群より選択されるバクテリアを更に含み得る。実施例に示されるように、これらのバクテリアは、トレポネーマ・ペディスを含む本発明のワクチンの治療効果を改善した。

【0132】

さらに、本発明のワクチン組成物を、感染症に罹りやすい又はその他に感染のリスクにある牛、羊、馬又は山羊に投与することで、抗原に対する免疫応答が誘導され、したがって、患畜自身の免疫応答能力が増強されることに更に留意する。そのような量は、本明細書全体を通して既に述べられているように、「免疫原的有効量」であると規定される。この使用において、正確な量は、ワクチン製造業者及び処方する獣医師の判断に依存し、患畜の健康状態及び体重、投与方式、製剤の性質等の検討を含むこととなる。

【0133】

牛及び他の動物の免疫化において、様々なワクチン接種計画が有効であり得る。例えば、有蹄動物の幼体及び成体の両方に、好ましくは仔牛にワクチン接種することができる。1 回目の免疫化の 2 週間後～4 週間後に、2 回目の免疫化がなされる。予めトレポネーマに曝された動物は、ブースター注射を必要とし得る。ブースター注射は、好ましくは、最大負荷及び/又は流産のリスクの時期と一致するように時期が調整される。獣医師の判断に応じて、種々の免疫化計画が採用され得る。一般的に、1 用量当たりを基準に、トレポネーマ属の複数種のバクテリア、典型的には全細胞の濃度は、1 用量当たり約 10^6 個～約 10^9 個の細胞、又は 1 用量当たり $1 \mu\text{g}$ ～約 100 mg の抗原の範囲であり得る。牛に投与する場合に、好ましい範囲は、単位用量当たり約 10^3 個～ 10^9 個の細胞又は単位用量当たり $1 \mu\text{g}$ ～ 1 mg の抗原、好ましくは $10 \mu\text{g}$ ～ 1 mg 、より好ましくは $30 \mu\text{g}$ ～ 1 mg 、更により好ましくは $50 \mu\text{g}$ ～ 1 mg の抗原である。適切な用量の容量範囲は、 0.5 ml ～ 2.0 ml 、好ましくは約 2 ml である。したがって、例えば、筋肉内注射のために典型的な用量は、 10^9 個の細胞又は $50 \mu\text{g}$ の抗原を含む 2 ml を含むこ

となる。

【 0 1 3 4 】

本発明のワクチンは、トレポネーマ属の複数種、好ましくはトレポネーマ・ペディス若しくはトレポネーマ・ファゲデニス又は本明細書全体を通して例示された任意のその他のトレポネーマ属の複数種の粗製抽出物を含み得る。化学的に固定された細胞を使用することもできる。上記のように、好ましいワクチンは、部分的に又は完全に精製されたトレポネーマのタンパク質調製物を含む。組み換えDNA技術により産生された抗原は、それが他の起源よりも経済的であり、容易に多量に精製されるため好ましい（標準的組み換え技術は、例えばJ. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A laboratory manual, 4th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012のよ
10
うな当業者によく知られたマニュアルに記載されるように実施することができる）。組み換え発現系で使用する他に、単離されたトレポネーマ遺伝子配列を使用して、動物の宿主細胞にトランスフェクションするウイルスを形質転換することもできる。ワクシニア又はアデノウイルス等の弱毒化生ウイルスは、それらが廉価に産生され、輸送及び投与が容易であるため、ワクチンの簡便な代替物である。本発明の組み換え抗原を発現させるのに、細菌（例えば、大腸菌）又はピチア、サッカロマイセス等の酵母細胞のような他のタンパク質発現系も有用である。

【 0 1 3 5 】

本発明での使用に適したウイルスには、限定されるものではないが、バキュロウイルス、カナリア痘ウイルス及び牛痘ウイルス等のボックスウイルス、及びワクシニアウイルス、アルファウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス並びに他の動物ウイルスが含まれる。組み換えウイルスは、当該技術分野でよく知られる方法によって、例えば、相同組み換え又は2つのプラスミドのライゲーションを使用して産生することができる。組み換えカナリア痘ウイルス又は牛痘ウイルスは、例えば、トレポネーマのタンパク質又はその断片をコードするDNAをプラスミドへと、それらが両側でウイルス配列に隣接するように挿入することによって作製することができる。次いで、トレポネーマのポリペプチドをコードするDNAが、ウイルスゲノム中に相同組み換えによって挿入される。
20

【 0 1 3 6 】

本発明のワクチンは、哺乳動物、好ましくは有蹄動物における疾患の未然防止及び／又は処置の方法に、更に特に、被験体におけるトレポネーマ属のスピロヘータ細菌によって引き起こされる趾皮膚炎又は関連疾患を未然防止及び／又は処置するために使用される。したがって、本発明のワクチンは、それを必要とする被験体に、趾皮膚炎、特に牛趾皮膚炎、伝染性羊趾皮膚炎及び／又は腐蹄病、更に特に、牛趾皮膚炎を未然防止及び／又は処置する方法において免疫学的有効量で投与され得る。すなわち、上記規定の免疫原性組成物又はワクチンは、トレポネーマ属の複数種により引き起こされる趾皮膚炎又は関連疾患の処置及び／又は未然防止のための医薬の製造のためのものである。
30

【 0 1 3 7 】

さらに、既に上述したように、本発明は、既に先に特定された抗原の少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ又は3つから選択される、トレポネーマ属の複数種由来の又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の、好ましくはトレポネーマ・ペディス若しくはトレポネーマ・ファゲデニス由来の単離された抗原、好ましくは組み換え抗原を、趾皮膚炎用のワクチン組成物で使用される免疫原性タンパク質及び組成物の調製において提供する。そのような単離された抗原は、免疫学的有効量の、好ましくはT・ペディス、T・ファゲデニス、T・ヴィンセンティ、T・メディウム、T・レフリングENS、T・カリギラム、T・マルトフィラム及び／又はT・ブレナボレンス、好ましくはT・ペディス又はT・ファゲデニスからなる群より選択されるトレポネーマ属の複数種のバクテリアを含むあらゆるワクチンの免疫学的効果を増強することに留意する。そのようなワクチンは、哺乳動物、好ましくは有蹄動物における疾患の処置方法に、更に特に、被験体におけるトレポネーマ属のスピロヘータ細菌によって引き起こされる趾皮膚炎又は関連疾患を未然防止及び／又は処置するために使用
40
50

される。したがって、これらのワクチンは、それを必要とする被験体に、趾皮膚炎、特に牛趾皮膚炎を未然防止及び／又は処置する方法において免疫学的有効量で投与され得る。すなわち、これらの免疫原性組成物又はワクチンはまた、トレポネーマ属の複数種により引き起こされる趾皮膚炎又は関連疾患の処置及び／又は未然防止のための医薬の製造のためのものである。

【 0 1 3 8 】

さらに、本発明は、本発明の医薬組成物又はワクチンを含む容器を含むことを特徴とするワクチン接種キットも提供する。

【 0 1 3 9 】

別の態様では、本発明は、本発明の上記医薬組成物又は上記ワクチンの投与についての情報を含む情報マニュアル又はリーフレットを含むことを特徴とするワクチン接種キットを提供する。

【 0 1 4 0 】

さらに、本発明はまた、生体試料中のトレポネーマ属の複数種又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の任意の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子の存在又は不存在を検出する方法を提供する。例えば、任意のトレポネーマ属の複数種又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の任意の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子と特異的に反応性の抗体は、トレポネーマ又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子由来の任意の他の抗原のいずれかを使用して検出することができる。そのような抗原又はタンパク質は、本発明全体を通して記載されている。そのようなタンパク質又は抗原及び分離株を使用することで、試料中の抗原を検出する特異的抗体（モノクローナル又はポリクローナルのいずれか）を産生することができる。これらのアッセイの各々は以下に記載される。

【 0 1 4 1 】

免疫学的手法及びイムノアッセイ手順の概要については、一般にAntibodies: A Laboratory Manual (Greenfield E.A., 2nd ed. 2014)を参照のこと。本発明のイムノアッセイは、Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980); Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (1985)において広範囲に概説される幾つかの構成のいずれかで実施することができる。例えば、本明細書に開示されるタンパク質及び抗体は、ELISA、イムノブロット分析及び凝集アッセイで簡便に使用される。簡潔には、抗トレポネーマ抗体又はD・ノドーサス若しくはF・ネクロフォーラム等の任意の他の趾皮膚炎の原因となる病理学的作用因子若しくは抗原に対する抗体を測定するイムノアッセイは、競合的結合アッセイ又は非競合的結合アッセイのいずれかであり得る。競合的結合アッセイでは、試料分析物（例えば、抗トレポネーマ抗体）は、固体表面に結合された捕捉剤（例えば、単離されたトレポネーマのタンパク質）上の特異的な結合部位について、標識された分析物（例えば、抗トレポネーマモノクローナル抗体）と競合する。捕捉剤に結合された標識された分析物の濃度は、試料中に存在する遊離の分析物の量と反比例している。

【 0 1 4 2 】

非競合的アッセイは、典型的には、2つの分析物に特異的な結合試薬の間に試料分析物が結合されるサンドイッチ分析である。結合剤の1つは捕捉剤として使用され、固体表面に結合されている。二次結合剤は標識されており、得られた複合体を視覚的手段又は機器的手段により測定又は検出するために使用される。

【 0 1 4 3 】

捕捉剤と標識された結合剤との多くの組み合わせを使用することができる。例えば、MSP、PrtP、OrfC及びTlyC又はそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、好ましくはトレポネーマ・ペディス由来の単離されたトレポネーマ抗原を、捕捉剤として使用することができ、ウシ抗体の定常領域に特異的な標識された抗ウシ抗体を、標識された結合剤として使用することができる。ウシ免疫グロブリン定常領域（例えば、 γ 又は μ ）に特異的なヤギ抗体、ヒツジ抗体及び他の非ウシ抗体は、当該技術分野でよ

10

20

30

40

50

く知られている。あるいは抗ウシ抗体が捕捉剤であってもよく、抗原は標識されていてもよい。

【0144】

抗原、抗トレポネーマ抗体又は抗ウシ抗体を含むアッセイの様々な構成要素は、固体表面に結合され得る。生体分子を様々な固体表面に固定化するための多くの方法は、当該技術分野でよく知られている。例えば、固体表面は、膜（例えば、ニトロセルロース）、マイクロタイターディッシュ（例えば、PVC又はポリスチレン）又はビーズであり得る。所望の構成要素は、共有結合される、又は非特異的結合によって非共有結合的に結合され得る。

【0145】

あるいはイムノアッセイは液相中で行うことができ、結合された標識された構成要素と結合されていない標識された構成要素とを分離するために、様々な分離方法を使用することができる。これらの方法は当業者に知られており、免疫沈降、カラムクロマトグラフィー、吸着、結合剤で被覆された磁化可能な粒子の添加及び他の同様の手順を含む。

【0146】

イムノアッセイは、分離手順なくして液相中で実施することもできる。タンパク質分析物のためのイムノアッセイに、目下、様々な均一イムノアッセイ法が適用されている。これらの方法では、分析物への結合剤の結合により、標識によって発せられるシグナルに変化が生じるため、結合された標識された構成要素と結合されていない標識された構成要素とを分離せずに結合を測定することができる。

【0147】

ウエスタンブロット（イムノブロット）分析を使用して、試料中のトレポネーマに対する抗体の存在を検出することもできる。この技術は、試料中の特定のタンパク質に対する抗体の存在を確認するための信頼性のある方法である。その技術は一般に、分子量に基づくゲル電気泳動によりタンパク質を分離することと、分離されたタンパク質を適切な固体支持体（例えば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター又は誘導体化ナイロンフィルター）に転写することと、試料を分離されたタンパク質と一緒にインキュベートすることとを含む。これにより、試料中に存在する特異的な標的抗体がそれぞれのタンパク質に結合される。次いで、標識された抗ウシ抗体を使用して、標的抗体が検出される。

【0148】

上記のイムノアッセイの形式は、標識されたアッセイ構成要素を使用する。標識は、様々な形であり得る。標識は、当該技術分野でよく知られる方法に従って、アッセイの所望の構成要素に直接的又は間接的に結合され得る。広く様々な標識が使用され得る。構成要素は、幾つかの方法のいずれか1つにより標識され得る。従来は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 又は ^{32}P を含む放射性標識が使用された。非放射性標識には、標識された抗体に結合するリガンド、蛍光体、化学発光剤、酵素及び標識されたリガンドに対して特異的結合する相手の成員として機能し得る抗体が含まれる。標識の選択は、必要な感度、化合物とのコンジュゲートのし易さ、安定性の要件、及び利用可能な機器に依存する。

【0149】

標識として関心が持たれる酵素は、主にヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ又はオキシドレダクターゼ、特にペルオキシダーゼである。蛍光性化合物には、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン等が含まれる。化学発光性化合物には、ルシフェリン及び2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えばルミノールが含まれる。使用され得る様々な標識又はシグナル生成系の概要については、米国特許第4,391,904号（これは、引用することにより本明細書の一部をなす）を参照のこと。

【0150】

非放射性標識は、しばしば間接的手段により結合される。一般的に、リガンド分子（例えば、ビオチン）は、分子に共有結合される。次いで、リガンドは、もとより検出可能であるか、又は検出可能な酵素、蛍光性化合物若しくは化学発光性化合物等のシグナル系に

10

20

30

40

50

共有結合される抗リガンド（例えば、ストレプトアビジン）分子に結合する。多くのリガンド及び抗リガンドを使用することができる。リガンドが天然の抗リガンド、例えばビオチン、チロキシン及びコルチゾールを有する場合に、リガンドは、標識された天然に存在する抗リガンドと併せて使用することができる。あるいは任意のハプテン性化合物又は抗原性化合物を、抗体と組み合わせて使用することができる。

【0151】

幾つかのアッセイ形式は、標識された構成要素の使用を必要としない。例えば、凝集アッセイを使用して、標的抗体の存在を検出することができる。この場合に、抗原で被覆された粒子が、標的抗体を含む試料によって凝集される。この形式では、どの構成要素も標識されている必要はなく、標的抗体の存在は簡単な視覚的検査によって検出される。

10

【0152】

最後に、本発明は、HIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り、135）によりライプニッツ研究所DSMZ（ドイツ微生物細胞培養コレクション）（ドイツ、ブラウンシュバイク、インホッフエン通り7 B 38124）においてアクセッション番号DSMZ 32663として2017年10月10日に寄託されたT．ペディス株、又はHIPRA SCIENTIFIC S.L.U.社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り、135）によりライプニッツ研究所DSMZ（ドイツ微生物細胞培養コレクション）においてアクセッション番号DSMZ 32950として2018年11月7日にブタペスト条約に基づき寄託されたT．ファゲデニス株に関する。本発明の医薬組成物及びワクチンはまた、寄託された両方の株及び哺乳動物における趾皮膚炎の処置又は未然防止の方法におけるそれらの使用を包含し、ここで、趾皮膚炎は、好ましくは牛趾皮膚炎、伝染性羊趾皮膚炎及び／又は腐蹄病である。

20

【0153】

本発明を、以下の実施例に照らして更に示すが、実施例は本発明を例示するにすぎず、本発明を限定するものではない。さらに、本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態及び好ましい実施形態の全ての可能な組み合わせを対象に含める。

【実施例】

【0154】

実施例1：仔牛におけるBDDに対する実験的ワクチンの*in vitro*免疫原性及び*in vivo*有効性

30

この研究のために、T．ペディス及びT．ファゲデニスに対する抗体を持たずBDDの臨床徴候を有しない2ヶ月齢から4ヶ月齢の間の35頭の仔牛を選択した。これらの動物を、各群に5頭の仔牛の7群（A～G）に無作為に割り当てた。0日目に、群の割り当てに従って、仔牛に実験的ワクチンの1回目の用量を投与した。3週間後（21日目）に、仔牛にワクチンの2回目の用量を投与した。ワクチンは、各投与につき2mLで皮下経路により頸部に投与した。

【0155】

48日目に、自然発生したBDD病変から得られた浸軟された培養物を仔牛に負荷した。負荷接種物は、異なる牛からのBDDの活動的病変の23個の試料を均質化することにより得られた。浸軟された培養物は、T．ファゲデニス、T．メディウム／T．ヴィンセンティ及びT．ペディスからなっていた（BDD病変試料の92％がT．ファゲデニスに陽性、85％がT．メディウム／T．ヴィンセンティ様に陽性、13％がT．ペディスに陽性）。さらに、BDD病変試料の56％及び65％は、それぞれD．ノドーサス及びT．プラエアクタ（*T. praeacuta*）に陽性であった。

40

【0156】

群Aには、1用量当たり 10^9 個の細菌の不活化されたT．ペディス分離株（参照番号B-8308、HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U.社）及び1用量当たり70µgのそれぞれ精製されたT．ペディスの組み換えタンパク質MSP（配列番号4）、Pr tPM（配列番号2）及びOr fC（配列番号5）並びにD．ノドーサスのApr 2BM（配列番号10）を含むワクチンAを投与した。該ワクチンは、アジュバントMontanide Aを

50

用いて50%（重量/重量）で製剤化した。鉱物油と、脂肪酸及び糖アルコールから得られる生成物との組み合わせ物を基礎とするアジュバント、例えばSEPPIC社により商品名 Montanide（商標）として市販されるアジュバント。上記アジュバントを用いて、水中油中水型のエマルジョンを調製することができる。

【0157】

群Bには、1用量当たり70 μ gのそれぞれ精製されたT．ペディスの組み換えタンパク質MSP（配列番号4）、PrtPM（配列番号2）及びOrfC（配列番号5）並びにD．ノドーサスのApr2BM（配列番号10）を含むワクチンBを投与した。該ワクチンは、同じアジュバントMontanide Aを用いて50%（重量/重量）で製剤化した。

10

【0158】

群Cには、1用量当たり10⁹個の細菌の群Aの同じ不活化されたT．ペディス分離株を含むワクチンCを投与した。該ワクチンは、同じアジュバントMontanide Aを用いて50%（重量/重量）で製剤化した。

【0159】

群Dは、抗原を有しないPBS及び50%（容量/容量）の同じMontanide Aアジュバントを含むワクチンDを投与したコントロール群に相当した。

【0160】

群Eには、1用量当たり10⁹個の細菌の群Aと同じ不活化されたT．ペディス分離株及び1用量当たり70 μ gのそれぞれ精製されたT．ペディスの組み換えタンパク質MSP（配列番号4）、PrtPM（配列番号2）及びOrfC（配列番号5）並びにD．ノドーサスのApr2BM（配列番号10）を含むワクチンEを投与した。該ワクチンは、AlOH₃/AlPO₄を基礎とする25%（容量/容量）のアジュバントB及び2%（重量/容量）のDEAEデキストランを用いて製剤化した。

20

【0161】

群Fには、1用量当たり70 μ gのそれぞれ精製されたT．ペディスの組み換えタンパク質MSP（配列番号4）、PrtPM（配列番号2）及びOrfC（配列番号5）並びにD．ノドーサスのApr2BM（配列番号10）を含むワクチンFを投与した。該ワクチンは、AlOH₃/AlPO₄を基礎とする25%（容量/容量）のアジュバントB及び2%（重量/容量）のDEAEデキストランを用いて製剤化した。

30

【0162】

群Gには、1用量当たり10⁹個の細胞の群A、群C及び群Eと同じ不活化されたT．ペディス分離株を含むワクチンGを投与した。該ワクチンは、AlOH₃/AlPO₄を基礎とする25%（容量/容量）のアジュバントB及び2%（重量/容量）のDEAEデキストランを用いて製剤化した。

【0163】

種々の群及びワクチンの概要を以下の表に示す。

【0164】

40

50

【表 1】

表 1：実施例 1 で使用される群及びワクチンの概要

群	ワクチン	抗原	アジュバント
A (n = 5)	A	T. ペディスの不活化バクテリン + 4 種の組み換えタンパク質 (MSP、PrtPM、OrfC、Apr2BM)	A
B (n = 5)	B	4 種の組み換えタンパク質 (MSP、PrtPM、OrfC、Apr2BM)	A
C (n = 5)	C	T. ペディスの不活化バクテリン	A
D (n = 5)	D	プラセボ (PBS)	A
E (n = 5)	E	T. ペディスの不活化バクテリン + 4 種の組み換えタンパク質 (MSP、PrtPM、OrfC、Apr2BM)	B
F (n = 5)	F	4 種の組み換えタンパク質 (MSP、PrtPM、OrfC、Apr2BM)	B
G (n = 5)	G	T. ペディスの不活化バクテリン	B

10

【0165】

0 日目、21 日目、35 日目、47 日目、59 日目、80 日目、97 日目に全ての仔牛から血液試料を採集して、血清を得た。

【0166】

in vitro の結果

20

実験的ワクチンの *in vitro* 免疫原性を、ワクチン接種された動物からの血清の中和効果を 47 日目に T. ペディスの増殖において分析し、T. ペディスに対する間接 ELISA により動物の血清中の抗体の存在を検出することにより行った (図 1)。

【0167】

血清の阻害効果は、組み換えタンパク質を有する及び有しない T. ペディスのバクテリンを含む実験的ワクチン (ワクチン A、ワクチン C、ワクチン E 及びワクチン G) に対応した。アジュバント A 及びアジュバント B の両方を使用した場合に、同様の結果が得られた。

【0168】

ワクチン接種後の血清学を、ワクチン接種後の種々の日での全細菌 T. ペディス及び T. ファゲデニスに対する ELISA (IgG2) により分析することで (図 2 及び図 3)、抗体の体液性応答を評価した。

30

【0169】

単独で投与した場合 (ワクチン B) 及びコントロール群 (ワクチン D) における組み換えタンパク質の免疫学的応答は観察されなかった。混合ワクチン (バクテリン + 組み換えタンパク質; ワクチン A) を動物に投与した場合に、より良い免疫学的応答が観察された。単独で投与されたバクテリンを基礎とするワクチン (ワクチン C) と比較した場合に、混合ワクチンに対する免疫学的応答もより良好であった。

【0170】

アジュバント A 及びアジュバント B の両方で、同様の応答があった。

40

【0171】

T. ファゲデニスについて、T. ペディスよりも低い免疫学的応答が観察された。ワクチン製剤は T. ファゲデニス抗原を含まなかったため、交差反応性が想定された。

【0172】

注射後の *in vivo* 有効性の結果

実験的ワクチンの *in vivo* 有効性を評価するために、群 A、群 C 及び群 D へのワクチン接種後 48 日目に負荷を行った。組み換えタンパク質を単独でのみ含む実験的ワクチンを投与した群 B について *in vitro* 有効性が観察されなかったため、この群は負荷しないままにした。

【0173】

50

実験的ワクチンの感染後の有効性を評価するために、臨床的な肉眼的病変の重症度の評価を行った。評価は感染後32日目に行った。種々の方法を使用した。これらの方法は、疾患の事前に確立されたパラメーターを評価することにより、各動物にスコアを割り当てるに基づくものであった。2つの異なるスコアを使用した：アイオワスコア（Krull, A. C., Cooper, V. L., Coatney, J. W., Shearer, J. K., Gorden, P. J., & Plummer, P. J. A highly effective protocol for the rapid and consistent induction of digital dermatitis in Holstein calves. PloS one, 2016, 11.4: e0154481）及び Wisconsinスコア（Gomez, A., Cook, N. B., Bernardoni, N. D., Rieman, J., Dusick, A. F., Hartshorn, R., Socha M.T., Read D.H., Doepfer D. An experimental infection model to induce digital dermatitis infection in cattle. Journal of dairy science, 2012, 95.4: 1821-1830）。表2は、アイオワスコアをどのように得るかを示す（図4も同様に参照のこと）。

【0174】

【表2】

表2：アイオワスコアによるBDDの肉眼的病変の評価

病変のサイズ	病変の不存在	初期擦過傷面積より小さい	擦過傷面積に対する変化なし	初期擦過傷面積を超えて拡大
スコア	0	1	3	5
病変の色	正常な色、病変なし	白っぽい	ピンク色	赤色又は明赤色
スコア	0	1	2	3
病変の縁	病変の不存在	明確に画定された縁	境界は画定されない	
スコア	0	1	2	

*最終スコアが7以上の場合に、趾皮膚炎病変とみなした。

【0175】

群A及び群Cでは、1/5及び2/5の仔牛はそれぞれ臨床的病変を生じなかったが、群D（コントロール）の5/5の動物が病変を生じた。さらに、病変の重症度を評価すると、両方のスコア（アイオワ及びWisconsin）に関して、群A及び群Cは、コントロール群（D）に対して、より低い病変スコア及び牛趾皮膚炎病変を伴う仔牛のパーセンテージを示した。ワクチンA（バクテリア＋組み換えタンパク質）でワクチン接種した群では、DDの病変（アイオワスコア 7）を示す動物のパーセンテージも大幅に減少した（図5）。

【0176】

実施例1の結論

T. ペディスのバクテリア又はバクテリアと組み換えタンパク質との組み合わせでワクチン接種された仔牛の血清におけるT. ペディスのin vitro増殖に対する明らかな阻害効果が観察された。この効果は、組み換えタンパク質単独でワクチン接種された動物由来の血清では見られなかった。

【0177】

T. ペディスのバクテリアのワクチンを組み換えタンパク質と組み合わせた場合に、T. ペディスに対するより高い体液性応答が観察された。

【0178】

T. ファゲデニス、T. メディウム - ヴィンセンティ様、及びT. ペディスを含む接種物による実験的感染の後に、T. ペディス単独を有するワクチン又はT. ペディスと組み換えタンパク質とを組み合わせるワクチンは、コントロール群と比較して、DD病変の罹患率及び重症度を低下させることが観察された。混合ワクチン（バクテリア＋組み換えタンパク質）でワクチン接種された群が、より低いパーセンテージのDD病変を伴う

動物を示すことも観察された。

【 0 1 7 9 】

実施例 2：仔牛における B D D の実験的感染に対する実験的ワクチンの *i n v i v o* 有効性の評価

この研究のために、T．ペディス及びT．ファゲデニスに対する抗体を持たず B D D の臨床徴候を有しない 2 ヶ月齢から 3 ヶ月齢の間の 3 0 頭の仔牛を選択した。これらの動物を、各群に 1 0 頭の仔牛の 3 群（群 A ～群 C ）に無作為に割り当てた。0 日目に、群の割り当てに従って、仔牛にワクチンの 1 回の用量を投与した。3 週間後（2 1 日目）に、仔牛にワクチンの 2 回目の用量を投与した。ワクチンは、各投与につき 2 m L で筋肉内経路により頸部に投与した。

10

【 0 1 8 0 】

4 9 日目に、実施例 1 と同様に、自然発生した B D D 病変から得られた浸軟された培養物を仔牛に負荷した。浸軟物は、1 0 頭の種々の牛からの B D D の活動的病変の 1 3 個の試料の均質化物からなっていた。この場合に、試料の 1 0 0 % は T．ファゲデニス及び T．メディウム / T．ヴィンセンティ様に陽性であり、6 9 % は T．ペディスに陽性であった。したがって、浸軟物は、T．ファゲデニス、T．メディウム / ヴィンセンティ様及び T．ペディスからなっていた。さらに、B D D 試料の 2 3 % はまた、D．ノドーサスに陽性であった。

【 0 1 8 1 】

群 A には、不活化された T．ペディス（実施例 1 で使用されたのと同じ分離株）、不活化された T．ファゲデニス（分離株の参照番号 B - 7 3 3 0、HIPRA SCIENTIFIC, S.L. U.社）、不活化された T．メディウム（分離株の参照番号 B - 8 3 0 7、HIPRA SCIENTIFIC, S.L. U.社）と組み合わせて、T．ペディスの組み換えタンパク質 M S P（配列番号 4）、P r t P M（配列番号 2）及び T l y C（配列番号 3）並びに D．ノドーサス由来の A p r 2 B M（配列番号 1 0）を含むワクチン 1 を投与した。ワクチン 1 は、実施例 1 に記載されるアジュバント M o n t a n i d e A を 5 0 %（重量 / 重量）で含んでいた。力価は、2 m l の用量当たり 10^9 個の総細菌及び 2 m l の用量当たり 5 0 μ g の各組み換えタンパク質であった。

20

【 0 1 8 2 】

群 B には、不活化された T．ペディス分離株、不活化された T．ファゲデニス分離株、及び不活化された T．メディウム分離株（群 A と同じ分離株）を含むワクチン 2 を投与した。このワクチンは、組み換えタンパク質を含まなかった。該ワクチンは、実施例 1 に記載されるアジュバント M o n t a n i d e A を 5 0 %（重量 / 重量）で含んでいた。力価は、2 m l の用量当たり 10^9 個の総細菌であった。

30

【 0 1 8 3 】

群 C は、実施例 1 に記載されるアジュバント M o n t a n i d e A を 5 0 %（重量 / 重量）で用いて製剤化された抗原を有しない P B S 溶液からなるワクチン 3 を投与したコントロール群に相当した。

【 0 1 8 4 】

【表 3】

40

表 3：実施例 2 の処置群の概要

群	ワクチン	抗原	アジュバント
A (n = 1 0)	1	T．ペディス、T．メディウム及びT．ファゲデニスの不活化されたバクテリン + 4 種の組み換えタンパク質 (M S P、P r t P M、T l y C、A p r 2 B M)	A
B (n = 1 0)	2	T．ペディス、T．メディウム及びT．ファゲデニスの不活化されたバクテリン	A
C (n = 1 0)	3	プラセボ (P B S)	A

【 0 1 8 5 】

50

0 日目、2 1 日目、3 5 日目、4 6 日目、5 7 日目、6 4 日目、7 0 日目、8 1 日目及び9 5 日目に、全ての動物から血液を採取することで、血清を得た。

【0 1 8 6】

ワクチン接種後に得られた血清からのトレポネーマ属の複数種の増殖阻害の *in vitro* アッセイ

阻害アッセイは、ワクチン接種された動物からワクチン接種後3 5 日目に得られた血清を使用して実施した。増殖阻害アッセイは、T . ペディス及びT . ファゲデニスについて実施した。このアッセイにより、ワクチン接種された群A 及び群B に属する仔牛だけが両方の細菌の増殖を阻害することが裏付けられた。コントロール群に属する血清からは、増殖阻害に対する効果は観察されなかった（図6）。

10

【0 1 8 7】

ワクチン接種後の血清学的結果

ワクチン接種による体液性応答を評価するために、種々のELISAアッセイを実施した。ワクチン接種後0 日目、2 1 日目及び3 5 日目からの血清を用いてELISAアッセイを実施することで、T . ペディス、T . ファゲデニス、T . メディウム、D . ノーサスに対する抗体、及びT . ペディス由来の組み換えタンパク質MSP、Pr tPM、T l y C 及びD . ノーサス由来のApr 2 BMに対する抗体を検出した。種々の動物から得られた血清を1 / 4 0 0 に希釈して、ELISAアッセイを実施した。

【0 1 8 8】

この研究で存在する全ての抗原に対するIgG2抗体の良好な血清変換が観察された（図7）。ワクチン接種群とコントロール群との間の血清変換について有意差が示された。トレポネーマ属の複数種のバクテリアと組み換えタンパク質との組み合わせ（ワクチン1）でワクチン接種された動物では、ワクチン2（バクテリアを基礎とするワクチン）と比較して、より高いT . ペディス及びT . メディウムに対する体液性応答が得られた。

20

【0 1 8 9】

感染後の *in vivo* 有効性の結果

感染後3 2 日目（研究の8 1 日目）のBDD病変の最終評価を実施した。その評価は、実施例1で説明されたアイオワスコアを使用して実行した。

【0 1 9 0】

【表4】

30

表4：感染後3 2 日目のBDDの肉眼的病変の臨床的評価の概要

群、ワクチン	跛行を伴う仔牛の割合	DD（7以上のスコア）の病変を伴う仔牛の割合	MCP当たりの主要なスピロヘータを有する仔牛の割合
A, 1	2 / 1 0 （2 0 %）	4 / 1 0 （4 0 %）	5 / 1 0 （5 0 %）
B, 2	3 / 1 0 （3 0 %）	6 / 1 0 （6 0 %）	6 / 1 0 （6 0 %）
C, 3 （プラセボ）	5 / 9 （5 5 %）**	8 / 1 0 （8 0 %）	8 / 1 0 （8 0 %）

【0 1 9 1】

病変重症度のスコアに関して、群A（ワクチン1）及び群B（ワクチン2）では、重症度はより低く、更には群A及び群Bの1 / 1 0 及び3 / 1 0 はそれぞれ病変の徴候を現さなかったが、コントロール群の全ての動物は趾病変を生じた。

40

【0 1 9 2】

アイオワスコアに関して、最低7のスコアに至った仔牛のパーセンテージ（アイオワスコアは、少なくとも7のスコアを確立することで、BDD病変とみなされる）は、群A（ワクチン1）、群B（ワクチン2）及び群C（ワクチン3）についてそれぞれ4 0 %、6 0 % 及び8 0 %であった。群Aと群C（ワクチン3、プラセボ）との間に有意差が観察された（マン・ホイットニーの検定を使用してp値= 0 . 0 4）。

【0 1 9 3】

要約すると、両方のワクチン接種された群では、コントロール群に対して病変の罹患率

50

及び重症度が減少することが観察された。さらに、コントロール群に対する差は有意であったため、群 A（バクテリンと組み換えタンパク質との組み合わせを含むワクチン）でより高い防御が観察された（図 8）。

【0194】

概要

ワクチン接種された動物の血清において、T．ペディス及び T．ファゲデニスの明らかな *in vitro* 増殖阻害効果が観察された。したがって、これらのトレポネーマ属の複数種に対して産生された抗体は、明らかな阻害効果を示した。

【0195】

3 種のトレポネーマ属の複数種、すなわち T．ペディス、T．ファゲデニス及び T．メディウムに対して、ワクチン接種後の高い体液性応答が観察された。コントロール群に対する有意差も観察された。

10

【0196】

トレポネーマ属の複数種のバクテリンと組み換えタンパク質とを組み合わせたワクチンの場合に、T．ペディスに対してより高い体液性応答が観察された。

【0197】

感染後 32 日目の病変の重症度の評価により、コントロール群の全ての動物が趾の病変を生ずるが、ワクチン接種された幾つかの動物は病変を一切示さないことが裏付けられた。さらに、ワクチン接種により病変の重症度が軽減された。

【0198】

感染後 32 日目の最終評価において、BDD 病変（アイオワスコアによる 7 以上のグレード）を伴う動物の割合及び最終病変スコアの両方は、ワクチン接種された群 1（バクテリンと組み換えタンパク質との組み合わせ）とコントロール群との間に統計学的有意性を示した。

20

【0199】

実施例 3：種々の T．ペディス株間での免疫応答の同等性の実証

この研究では、少なくとも 3 週齢の 6 匹のニュージーランドウサギを、2 つの異なるトレポネーマ・ペディス株からのバクテリンに基づく 2 つの異なる製剤で各製剤につき 3 匹の動物で免疫した。群 1 は、実施例 1 及び実施例 2 に開示されるのと同じ T．ペディス株でワクチン接種し、群 2 は、HIPRA SCIENTIFIC S.L.U. 社（スペイン、ジローナ県アメール、セルバ通り、135）によりライブニッツ研究所 DSMZ（ドイツ微生物細胞培養コレクション）においてアクセッション番号 DSM 32663（2017 年 10 月 10 日）として寄託された T．ペディス株でワクチン接種した。

30

【0200】

ワクチン組成物は、フロイントアジュバントを用いて製剤化し、両方とも 1 用量当たり 10^9 個の細菌を含んでいた。動物に 2 回の 1 ml の用量を皮下投与した。1 回目の用量は、研究の 0 日目に FCA（フロイント完全アジュバント）においてアジュバント添加され、2 回目の用量は、2 週間後に研究の 14 日目に IFA（不完全フロイントアジュバント）においてアジュバント添加された。倫理上の理由から 1 ml の容量を頸部にそれぞれ 0.5 ml の 2 つの箇所に分けて投与した。

40

【0201】

研究の 0 日目、14 日目及び 35 日目に血液試料を収集した。次いで、この研究中に実施された採血から、血清学的応答を ELISA / ウエスタンブロットにより分析した。

【0202】

それらの結果により、両方の群について同種のトレポネーマ種に対して血清変換が示された。両方のワクチンについてワクチン接種後 0 日目と比較すると、ワクチン接種後 14 日目及び 35 日目の血清変換は有意であった。1 回の用量又は 2 回の用量のどちらでも、両方の群について応答は同等であった（図 9）。

【0203】

T．ファゲデニス及び T．メディウム等の異種のトレポネーマ種に対する血清学的応答

50

も分析した。両方の群について同等の応答が見られた。T．ファゲデニス及びT．メディウムの方について血清変換が観察されたことから、T．ペディス株の交差防御が裏付けられた。

【0204】

それらの結果から、異なる株が同等の血清学的応答を有したので、T．ペディスのバクテリンを含むワクチンの防御は特定の株に依存しないと結論づけることができる。さらに、T．ファゲデニス及びT．メディウム等の異種のトレポネーマ属の複数種に対して、T．ペディス株の交差防御が見られた。

【0205】

実施例4：BDDに対する実験的T．ファゲデニスのワクチンの免疫原性

10

この研究のために、T．ペディス、T．ファゲデニス及びT．メディウムに対する抗体を低いレベルで持つ又は該抗体を持たずBDDの臨床徴候を有しない2ヶ月齢から3ヶ月齢の間の20頭の仔牛を選択した。これらの動物を、各群に10頭の仔牛の2つの処置群（群1及び群2）に無作為に割り当てた。

【0206】

群1には、実施例1に記載されるアジュバントMontanide Aを50%（重量/重量）で用いて製剤化された抗原を有しないPBS滅菌溶液を含むワクチンを投与した。この群は、コントロール群に相当した。

【0207】

群2には、1用量当たり 10^9 個の総細菌の不活化されたT．ファゲデニス分離株（参照番号B-7330、HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U.社）を含むT．ファゲデニスのバクテリンを基礎とするワクチンを投与した。群2のワクチンは、実施例1に記載されるアジュバントMontanide Aを用いて50%（重量/重量）で製剤化した。

20

【0208】

ワクチンを、各投与につき2mLで筋肉内経路により頸部領域に投与した。両方の群に、0日目に1回目の用量のワクチンを投与した。3週間後（21日目）に、仔牛に反対側の頸部に2回目の用量のワクチンを投与した。

【0209】

実験的ワクチンの免疫原性を、ワクチン接種された動物からの血清をワクチン接種後0日目、21日目、35日目、48日目及び69日目に間接ELISAアッセイにより分析し、動物の血清中の抗体の存在を検出した。

30

【0210】

ワクチン接種後の血清学を、全細菌のT．ペディス、T．ファゲデニス及びT．メディウムに対するELISA（IgG2）により分析することで、そのトレポネーマ属の複数種に対する抗体の体液性応答を評価した。

【0211】

試験された種々のトレポネーマ属の複数種（T．ペディス、T．ファゲデニス及びT．メディウム）に対する免疫学的応答が、群2の動物の血清から明らかに観察された。群2のワクチン製剤はT．ペディス又はT．メディウムのバクテリンを含まなかったため、ワクチン接種された動物に観察された免疫学的応答は、トレポネーマ属の複数種間の交差反応に起因し得る（図10）。

40

【0212】

さらに、T．ファゲデニスのバクテリンでワクチン接種された仔牛の血清（群2）に関してT．ファゲデニスの*in vitro*増殖に対する明らかな阻害効果が観察された。この阻害効果は、コントロール群には観察されなかった。

【0213】

また、これらの結果は、ワクチン接種された動物に観察された免疫学的応答が、交差反応の原因となる幾つかのエピトープを共有するトレポネーマ種間の交差反応性に起因し得ることを示唆している。

【0214】

50

実施例 5：B D D に対する実験的ワクチンの免疫原性

この研究のために、T．ペディス、T．ファゲデニス及びT．メディウムに対する抗体を低いレベルで持つ又は該抗体を持たずB D Dの臨床徴候を有しない2ヶ月齢から3ヶ月齢の間の30頭の仔牛を選択した。これらの動物を、各群に10頭の仔牛の3つの処置群（群1、群2及び群3）に無作為に割り当てた。

【0215】

群1には、実施例1に記載されるアジュバントMontanide Aを50%（重量/重量）で用いて製剤化された抗原を有しないPBS滅菌溶液を含むワクチンを投与した。この群は、コントロール群に相当した。

【0216】

群2には、1用量当たり 10^9 個の総細菌の不活化されたT．ファゲデニス分離株（参照番号B-7330、HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U.社）と組み合わせて、以下の組み換えタンパク質：T．ファゲデニスのMSPタンパク質（配列番号15）、T．ペディスのPrtPMタンパク質（配列番号2）及びD．ノドーサスのApr2BMタンパク質（配列番号10）を1用量当たり50µgの各組み換えタンパク質で含むT．ファゲデニスのバクテリンを基礎とするワクチンを投与した。そのワクチンは、実施例1に記載されるアジュバントMontanide Aを50%（重量/重量）で用いて製剤化された。

【0217】

群3には、1用量当たり 10^9 個の総細菌の不活化されたT．ファゲデニス分離株（参照番号B-7330、HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U.社）を含む、T．ファゲデニスのバクテリンを基礎とするワクチンを投与した。このワクチンは、実施例1に記載されるアジュバントMontanide Aを用いて50%（重量/重量）で製剤化した。

【0218】

【表5】

群	抗原
1（n=10）	プラセボ（PBS溶液）
2（n=10）	T．ファゲデニスの不活化バクテリン+3種の組み換えタンパク質（T．ファゲデニス由来のMSP、T．ペディス由来のPrtPM、D．ノドーサス由来のApr2BM）
3（n=10）	T．ファゲデニスの不活化バクテリン

【0219】

全ての群における仔牛に、0日目に1回目の用量のワクチンを頸部領域で投与した。3週間後（21日目）に、仔牛に反対側の頸部に2回目の用量のワクチンを投与した。ワクチンは、各投与につき2mlで筋肉内経路により頸部領域に投与した。

【0220】

実験的ワクチンの免疫原性を、ワクチン接種された動物からの血清をワクチン接種後0日目、21日目、35日目、48日目及び69日目に間接ELISAアッセイにより分析し、動物の血清中の抗体の存在を検出した。

【0221】

ワクチン接種後の血清学を、T．ペディスのPrtPMタンパク質、D．ノドーサスのApr2タンパク質及びT．ファゲデニスのMSPタンパク質に対するELISA（IgG2）により分析することで（図11）、該タンパク質に対するワクチンにより授けられる抗体の体液性応答を評価した。

【0222】

ワクチン接種された群2の動物の血清におけるワクチン組成物中に存在する全ての抗原に対する免疫学的応答が明らかに観察された。さらに、バクテリンに組み換えタンパク質を補充した場合（群2）にT．ファゲデニスのMSPタンパク質に対する免疫学的応答が

増加した。けれども、群 3（バクテリン単独）も同様に明らかな免疫学的応答を生じた。

【 0 2 2 3 】

それに対して、コントロール群（群 1）は、試験された抗原のいずれに対しても免疫学的応答を生じなかった。

【 0 2 2 4 】

さらに、群 2（バクテリン＋組み換えタンパク質）及び群 3（バクテリン単独）のワクチン接種された仔牛の血清において、T．ファゲデニスの *i n v i t r o* 増殖に対する明らかな阻害効果が観察された。これらの結果は、群 2 及び群 3 のワクチン接種された動物における中和抗体の存在を裏付けている。

10

20

30

40

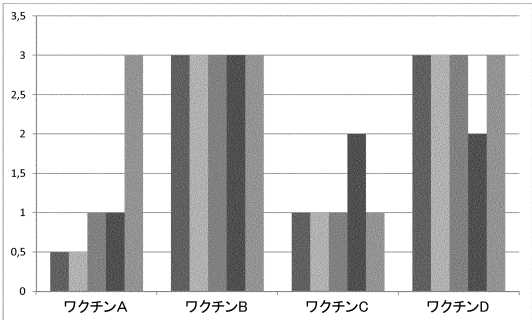
50

【図面】

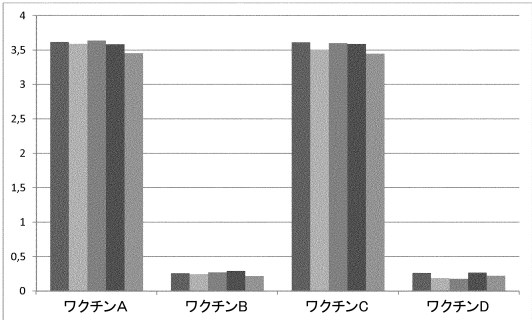
【図 1】

Figure 1

A

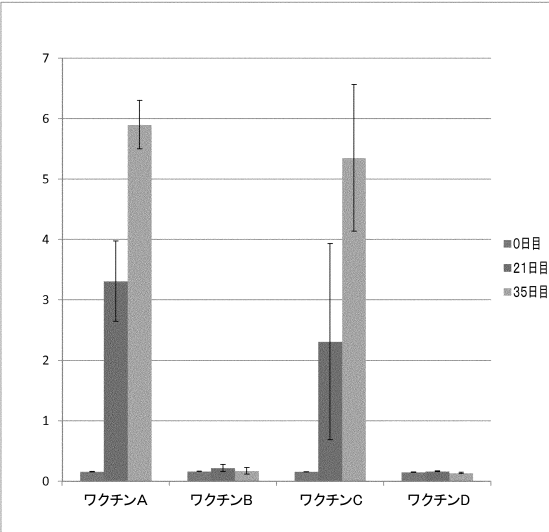


B



【図 2】

Figure 2

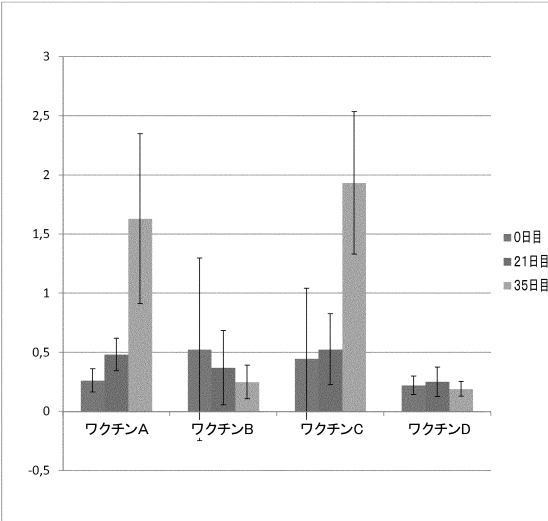


10

20

【図 3】

Figure 3



【図 4】

Figure 4



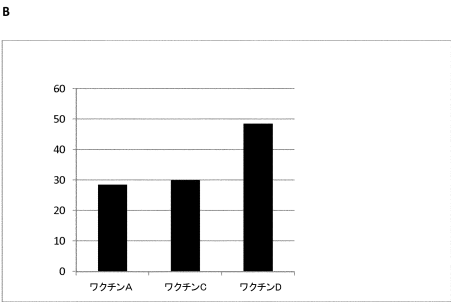
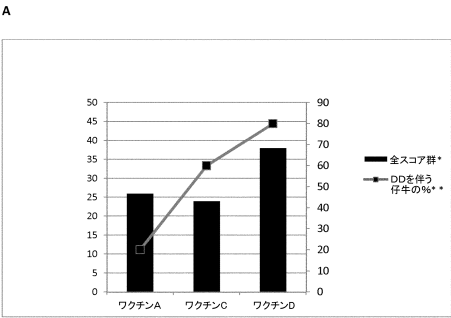
30

40

50

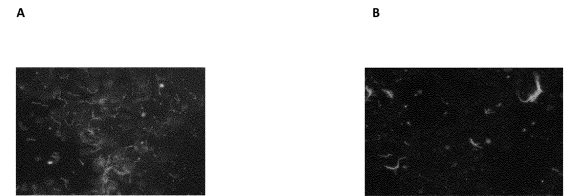
【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

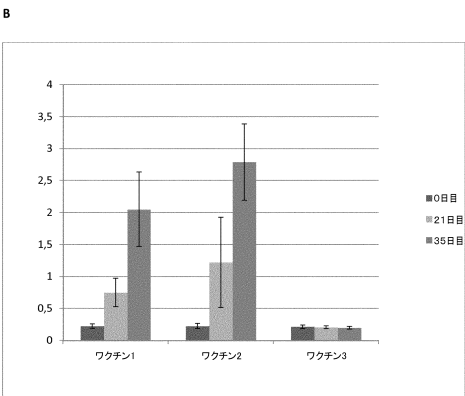
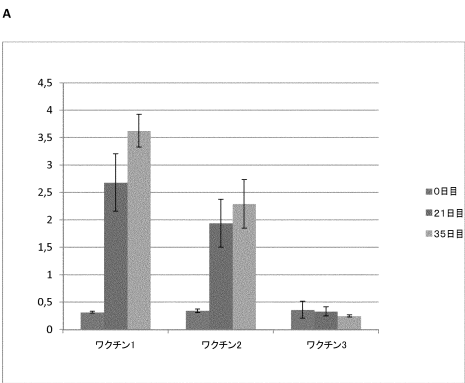
Figure 6



10

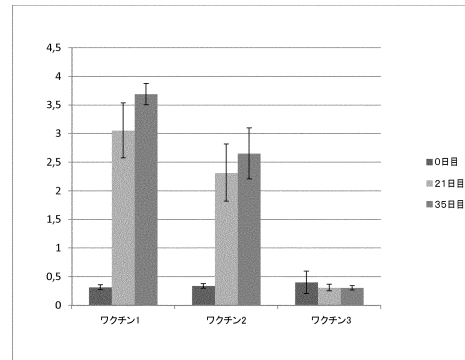
【 図 7 - 1 】

Figure 7



【 図 7 - 2 】

C



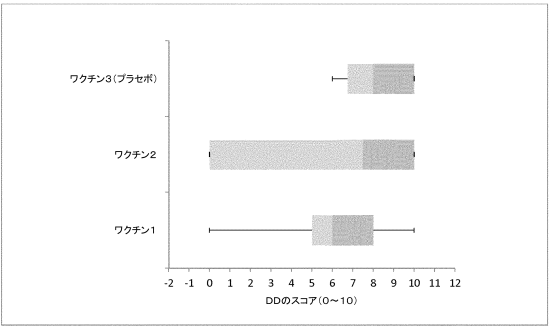
30

40

50

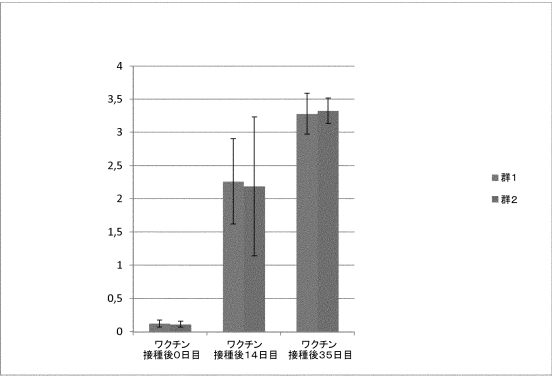
【図 8】

Figure 8



【図 9】

Figure 9

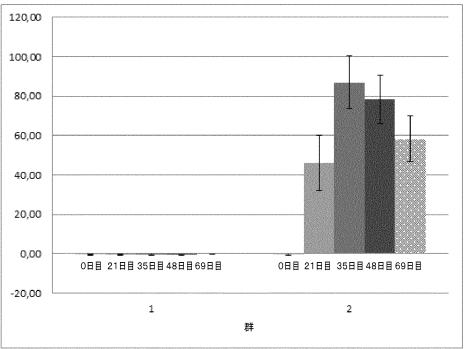


10

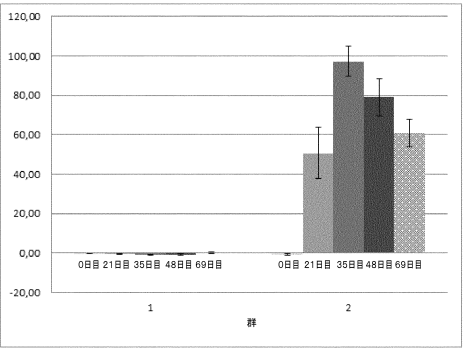
【図 10 - 1】

Figure 10

A

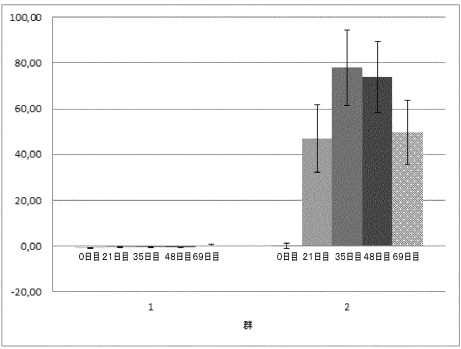


B



【図 10 - 2】

C



20

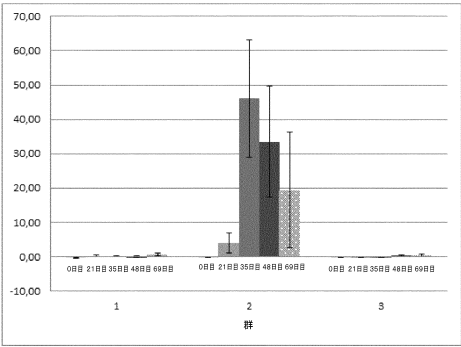
30

40

50

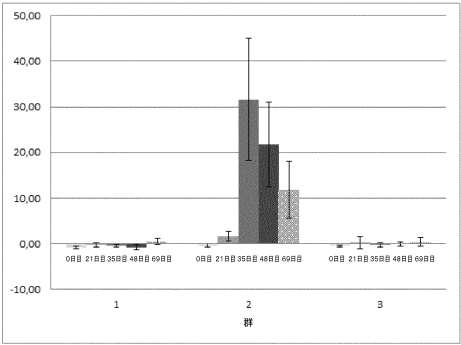
【 1 1 - 1 】

Figure 11
A



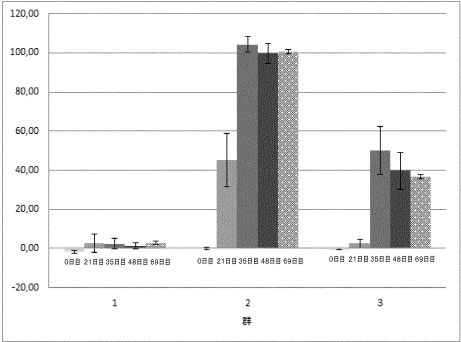
【 1 1 - 2 】

B



10

C



20

【 配列表 】

0007399865000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/215 (2006.01)

A 6 1 K 39/215

A 6 1 K 39/155 (2006.01)

A 6 1 K 39/155

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

A

ダ 1 8 2 エヌ 2 エー

(72)発明者 シティア アルナウ マルタ

スペイン国 1 7 1 7 0 アメール (ジローナ) アベニダ ラ セルバ 1 3 5 ヒブラ サイエント
ィフィック エセ . エレ . ウ .

(72)発明者 ビニョル リバス ハイメ

スペイン国 0 8 1 9 3 サルダニョーラ ダル バリエス キャンパス ウニベルシタ アウトノマ
デ バルセロナ インスティテュート デ ビオテクノロジー イ デ ビオメディシナ (アイビービー
ー - ユーイービー)

(72)発明者 ケロル ムリーリョ エンリケ

スペイン国 0 8 1 9 3 バルセロナ キャンパス ウニベルシタ アウトノマ デ バルセロナ イン
スティテュート デ ビオテクノロジー イ デ ビオメディシナ (アイビービー - ユーイービー)

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 2 5 6 5 7 5 (U S , A 1)

特表 2 0 0 2 - 5 2 9 0 6 3 (J P , A)

特表 2 0 1 3 - 5 1 8 5 6 3 (J P , A)

Keil, D.J., et al., Serological and clinical response of cattle to farm specific digital dermatitis
bacterins, Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants, Or
lando, FL, USA., 9-13 January 2002, (2002) p.385

Appl. Environ. Microbiol. (2014) vol.80, no.14, p.4427-4432

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 2

A 6 1 P 3 1 / 0 4

A 6 1 P 1 7 / 0 0

C 1 2 N 1 / 2 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)