(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-505438
(P2024-505438A)
(43)公表日　令和6年2月6日(2024.2.6)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｇ０１Ｎ　33/53　(2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/53	ＮＺＮＡ	４Ｈ０４５
Ｇ０１Ｎ　33/569 (2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/569	Ａ	
Ｇ０１Ｎ　33/543 (2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/543	５４１Ａ	
Ｇ０１Ｎ　33/545 (2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/543	５７５	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全30頁）　最終頁に続く

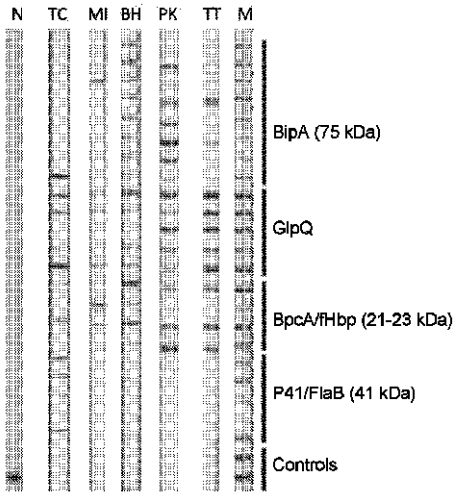
(21)出願番号　特願2023-543104(P2023-543104)
(86)(22)出願日　令和4年1月13日(2022.1.13)
(85)翻訳文提出日　令和5年8月31日(2023.8.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/012229
(87)国際公開番号　WO2022/155279
(87)国際公開日　令和4年7月21日(2022.7.21)
(31)優先権主張番号　17/248,236
(32)優先日　令和3年1月15日(2021.1.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　508027752
アイデイー－フイツシユ・テクノロジー・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９５０３５，ミルピタス，ジブラルタルドライブ　５５６
(74)代理人　110000741
弁理士法人小田島特許事務所
(72)発明者　シャー，ジョツナ・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５０５４サンタクララ・イーストリバーパークウェイ９２６
(72)発明者　リウ，ソン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５１２７サンノゼ・ジェニーンドライブ６６
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ダニ媒介性回帰熱（ＴＢＲＦ）の種特異的抗原配列及び利用法

(57)【要約】
本開示は、一部の態様において、ダニ媒介性回帰熱ボレリア種の抗原特異的アミノ酸配列を提供する。
【選択図】図１

Fig. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列を含む組成物であって、前記１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、前記組成物。
【請求項２】
前記アミノ酸配列は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）、磁気ビーズ、及びアガロースからなる群より選択される物質に結合されている、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記１種又は複数のアミノ酸配列のそれぞれは、前記アミノ酸配列に対する特異性を持つ抗体でタグ付けされている、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
回帰熱（ＴＢＲＦ）ボレリア属の１種又は複数のメンバーによる感染から生じる抗体を検出する方法であって、前記属は、ダニ媒介性回帰熱（ＴＢＲＦ）を有することが疑われる対象由来の試料中に存在する場合、Ｂ．ハームシー、Ｂ．ツリカタエ、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．デュトニイ、及びＢ．パルケリを含み、前記方法は、以下：
ＴＢＲＦを有することが疑われる対象から得られる生体試料を用意することと、
前記生体試料を、請求項１に記載の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列のうち１種又は複数と混合することと、並びに
前記試料中にＴＢＲＦ特異的抗体が存在することを示す陽性免疫結合反応を検出すること、
を含む、前記方法。
【請求項５】
前記標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列のうち２種以上が前記生体試料と混合され、及び少なくとも２種のアミノ酸配列が検出される場合に試料はＴＢＲＦ陽性と見なされる、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、検出可能部分を連結した抗ヒトＩｇＧ抗体又は抗ヒトＩｇＭ抗体で検出される、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記検出可能部分は、発色団、放射性部分、及び酵素からなる群より選択される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記検出可能部分は、アルカリホスファターゼを含む、請求項６に記載の方法。
【請求項９】
前記検出可能部分は、ビオチンを含む、請求項６に記載の方法。
【請求項１０】
配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列と、異種核酸配列とを含む、ベクター。
【請求項１１】
前記核酸配列は、プロモーター配列が作動的に連結されている、請求項１０に記載のベクター。
【請求項１２】
前記ベクターは、原核生物ベクターである、請求項１０に記載のベクター。

【請求項１３】
請求項１０から１２のいずれか１項に記載のベクターを含む、細胞。
【請求項１４】
前記細胞は、細菌細胞である、請求項１３に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明の態様は、多様なダニ媒介性回帰熱（ＴＢＲＦ）ボレリア（Ｂｏｒｒｅｌｉａ）種による感染から生じるＴＢＲＦを診断するための新規組成物及び方法を提供する。
【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩテキストファイルの配列表を参照として組み込み、このファイルは、ファイル名が０１５３－２０１５ＷＯ０１＿ＳＬ．ｔｘｔ、作成日が２０２２年６月１７日、及びファイルサイズが２７，３４９バイトである。
【背景技術】
【０００３】
ボレリア症は、ボレリア属の２つの群、Ｂ．ブルグドルフェリ（ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）群及びダニ媒介性回帰熱（ＴＢＲＦ）ボレリア群（本明細書中、ＲＦＢ（回帰熱ボレリア）とも称する）により引き起こされる。Ｂ．ブルグドルフェリ群は、一度は、感染した対象においてライム様症候を引き起こす唯一の群であると考えられていたが、現在は、ＴＢＲＦボレリアもライム様症候を引き起こすことが知られている。複数のボレリア種がＴＢＲＦを引き起こし、これらは、通常、特定種のマダニとの関連性がある。例えば、Ｂ．ハームシー（ｈｅｒｍｓｉｉ）は、オルニソドラス・ヘルムシ（Ｏｒｎｉｔｈｏｄｏｒｕｓ　ｈｅｒｍｓｉ）マダニにより伝播し、Ｂ．パルケリ（ｐａｒｋｅｒｉｉ）はＯ．パルケリ（ｐａｒｋｅｒｉ）マダニにより伝播し、Ｂ．ツリカタエ（ｔｕｒｉｃａｔａｅ）はＯ．ツリカタ（ｔｕｒｉｃａｔａ）マダニにより伝播する。各マダニ種には、主要生息地及び主要なホストセットがある。典型的には、カタダニ（マダニ属（Ｉｘｏｄｅｓ））は、ライム病病原を伝播し、一方軟ダニ（ヒメダニ属（Ｏｒｎｉｔｈｏｄｏｒｕｓ））は、ＴＢＲＦ病原を伝播するが、そこにはこの規則が存在すると予想される：一部のＲＦＢ病原体は、カタダニ（例えば、Ｂ．ミヤモトイ（ｍｉｙａｍｏｔｏｉ））によってのみ伝播し、１つの種、Ｂ．レカレンティス（ｒｅｃｕｒｒｅｎｔｉｓ）は、シラミ媒介性である。
【０００４】
ＴＢＲＦの主な症候は、高熱（例えば、１０３°Ｆ）、頭痛、並びに筋肉痛及び関節痛である。症候は再発する可能性があり、おおよそ３日間続く発熱、続いて発熱のない７日間、続いて別の３日間の発熱という表示パターンをもたらす。抗生物質治療がなければ、この過程は、複数回繰り返される可能性がある。
【０００５】
現在、検出基準は、ＴＢＲＦに一致する症候を呈している対象の血液スメアでのＴＢＲＦスピロヘータの同定によるものである。血液を採取した後、試料は、同定を促進するために少なくとも２４時間培養しなければならない。しかしながら、スピロヘータが最も多い疾患初期においてさえ、陽性の同定は、約７０％の確率でしかなされない。（非特許文献１を参照）。すなわち、当該分野の現状の材料及び方法は、診断の遅れをもたらしており、提供する感度及び特異性も比較的低レベルである。アッセイ時間が短縮されており感度及び特異性が向上した、ＴＢＲＦ原因病原体を同定するのに適した新規材料及び方法が必要とされている。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】ｗｗｗ．ｃｄｃ．ｇｏｖ／ｒｅｌａｐｓｉｎｇ－ｆｅｖｅｒ／ｃｌｉｎ

ｉｃｉａｎｓ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ
【発明の概要】
【０００７】
本発明は、部分的には、ＴＢＲＦを有することが疑われる対象由来の試料において、１種又は複数のＴＢＲＦボレリア種による感染に対する抗体を同定するのに使用可能な、組成物及び方法に関する。本発明の組成物及び方法を用いることで、対象試料中のＴＢＲＦボレリアの同定を、既存の組成物及び方法を用いるよりも高い速度、感度、及び特異性で行うことが可能である。本発明の抗原特異的アミノ酸配列は、診断アッセイ及び学術アッセイにおいて使用可能である。適切なアッセイの限定ではなく例として、免疫ブロット、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定法）等が挙げられる。本発明のアミノ酸配列は、ＴＢＲＦボレリア特異的Ｔ細胞の検出（例えば、ＩｇＸＳＰＯＴ試験；ＩＧｅｎｅＸ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）に使用することができる。
【０００８】
本発明のある態様に従って、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列（ｂｏｕｎｄ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を含む組成物が提供され、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、組成物は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）、磁気ビーズ、及びアガロースからなる群より選択される物質に結合させたアミノ酸配列も含む。一部の実施形態において、上記１種又は複数のアミノ酸配列はそれぞれ、上記アミノ酸配列に対する特異性を持つ抗体でタグ付けされる。
【０００９】
本発明のある態様に従って、回帰熱（ＴＢＲＦ）ボレリア属の１種又は複数のメンバーによる感染から生じる抗体を検出する方法が提供され、このボレリア属は、ダニ媒介性回帰熱（ＴＢＲＦ）を有することが疑われる対象由来の試料中に存在する場合には、Ｂ．ハームシー、Ｂ．ツリカタエ、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．デュトニイ（ｄｕｔｔｏｎｉｉ）、及びＢ．パルケリ（ｐａｒｋｅｒｉ）、を含み、本方法は以下：ＴＢＲＦを有することが疑われる対象由来の生体試料を用意することと；生体試料を、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択される標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列のうち１種又は複数と混合することと；並びに、試料中にＴＢＲＦ特異的抗体が存在することを示す陽性の免疫結合反応を検出することと、を含む。一部の実施形態において、標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列のうち２種以上が、生体試料と混合され、試料は、少なくとも２種のアミノ酸配列が検出される場合に、陽性と判断される。一部の実施形態において、標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、検出可能部分を連結した抗ヒトＩｇＧ又は抗ヒトＩｇＭ抗体で検出される。一部の実施形態において、検出可能部分は、発色団、放射性部分、及び酵素からなる群より選択される。一部の実施形態において、検出可能部分は、アルカリホスファターゼを含む。一部の実施形態において、検出可能部分は、ビオチンを含む。
【００１０】
本発明のある態様に従って、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列と、並びに異種核酸配列と、を含むベクターが提供される。一部の実施形態において、核酸配列は、プロモーター配列に作動的に連結されている。一部の実施形態において、ベクターは、原核生物ベクターである。一部の実施形態において、細胞は、ベクターを含む。一部の実施形態において、細胞は、

細菌細胞である。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】ラインイムノブロット（ｌｉｎｅ　ｉｍｍｕｎｏｂｌｏｔ）の顕微鏡撮影画像を示す図である。ＴＢＲＦ免疫ブロットストリップを、ウサギ抗ＴＢＲＦボレリア血清試料を用いて試験した。ＴＢＲＦボレリア種Ｂ．ツルシカ（ｔｕｒｃｉｃａ）、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．ハームシー、Ｂ．パルケリ、及びＢ．ツリカタエに対する抗体が、これら５種全てに由来する組換え抗原から調製したＴＢＲＦ免疫ブロットストリップにより検出された。これにより、ＴＢＲＦ免疫ブロットが、ＴＢＲＦボレリア群の抗体を検出したことが実証された。Ｎ、陰性対照；ＴＣ、Ｂ．ツルシカ；ＭＩ、Ｂ．ミヤモトイ；ＢＨ、Ｂ．ハームシー；ＰＫ、Ｂ．パルケリ、ＴＴ、Ｂ．ツリカタエ；及びＭ、陽性対照。
【図２】代表的な患者血清試料のＴＢＲＦ免疫ブロットの顕微鏡撮影画像を示す図である。患者血清試料を、ダニ媒介性回帰熱（ＴＢＲＦ）ＩｇＭ及びＩｇＧ免疫ブロットで試験した。これらの結果は、ＴＢＲＦボレリア種に対する抗体の検出が、ボレリア・ブルグドルフェリ種の抗原について試験するだけでは見過ごされてしまった可能性のある慢性ライム病症候を持つ患者をどのように同定したかを解説する。Ｐ、陽性対照；Ｎ、陰性対照；Ｇ、ＴＢＲＦ免疫ブロットＩｇＧ；Ｍ、ＴＢＲＦ免疫ブロットＩｇＭ；１、Ｂ．ハームシー陽性ＩｇＭ；２、Ｂ．ツリカタエ陽性ＩｇＧ；３、Ｂ．ミヤモトイ陽性ＩｇＭ；４、Ｂ．ツルシカ陽性ＩｇＧ；５、Ｂ．パルケリ陽性ＩｇＭ及びＩｇＧ。
【図３】患者血清試料での、配列番号１～１１を用いたＴＢＲＦ免疫ブロットＩｇＭ及びＩｇＧ試験の代表的な結果を示す表である。Ｐｏｓ、陽性；Ｉ、不明；Ｔｔ、Ｂ．ツリカタエ；Ｐｋ、Ｂ．パルケリ；Ｍｉａ、Ｂ．ミヤモトイ；Ｄｕ、Ｂ．デュトニイ；Ｂｈ、Ｂ．ハームシー；
【００１２】
配列の記載
配列番号１、Ｂ．ハームシーＶｌｐ７
ＭＱＱＰＥＡＧＫＴＧＶＳＧＧＶＮＧＮＬＧＮＳＬＭＥＬＧＲＳＡＥＮＡＦＹＡＦＩＥＬ
ＶＳＤＶＬＧＦＴＡＫＳＤＴＴＫＱＥＶＧＧＹＦＮＳＬＧＡＫＬＧＥＡＳＮＤＬＥＱＶＡ
ＶＫＡＥＴＧＶＤＫＳＤＳＳＫＮＰＩＲＥＡＶＮＥＡＫＥＶＬＧＴＬＫＧＹＶＥＳＬＧＴ
ＩＧＤＳＮＰＶＧＹＡＮＮＡＡＧＳＧＴＴＡＡＤＤＥＬＲＫＡＦＫＡＬＱＥＩＶＫＡＡＴ
ＤＡＧＶＫＡＬＫＩＧＡＴＴＬＱＡＮＧＧＡＤＮＫＥＧＡＫＩＬＡＴＳＧＧＮＰＡＡＡＤ
ＶＡＫＡＡＡＩＬＳＳＶＳＧＥＥＭＬＳＳＩＶＫＳＧＥＮＤＡＱＬＡＡＡＡＤＧＮＴＳＡ
ＩＳＦＡＫＧＧＳＤＡＨＬＡＧＡＮＴＰＫＡＡＡＶＡＧＧＩＡＬＲＳＬＶＫＴＧＫＬＡＡ
ＧＡＡＤＮＡＴＧＧＧＫＥＶＱＧＶＧＶＡＡＡＮＫＬＬＲＡＶＥＤＶＩＫＫＴＶＫＮＶＬ
ＥＫＡＫＥＫＩＤＫＡＲＧＳＱＥＰＶＳＥＳＳＫ
【００１３】
配列番号２、Ｂ．ツリカタエＢｉｐＡ－２Ｈ
ＭＤＮＶＭＳＧＩＤＮＶＩＱＧＡＧＴＦＡＴＡＡＭＱＧＶＧＴＶＩＤＶＬＱＤＶＧＴＦＶ
ＩＳＤＩＱＮＭＧＡＲＭＬＦＧＴＧＥＮＳＳＶＡＳＥＧＳＥＳＶＭＳＬＳＳＮＤＳＳＥＡ
ＫＤＶＴＶＶＬＳＳＤＶＴＳＫＧＮＤＶＡＶＧＬＳＳＤＥＴＱＶＩＧＲＬＥＫＹＬＱＳＡ
ＩＫＩＮＧＲＳＤＳＤＱＳＮＬＥＳＧＲＫＫＦＦＮＷＬＫＴＳＤＴＮＡＳＫＲＫＥＬＶＱ
ＤＬＱＫＶＦＤＬＩＫＥＫＳＳＤＳＴＥＬＫＨＷＶＱＳＩＶＤＲＩＥＤＫＳＴＩＶＤＩＤ
ＳＤＤＥＬＮＮＤＫＥＶＤＦＬＩＥＮＴＬＡＳＲＤＹＳＧＦＡＶＳＬＬＦＱＳＬＡＤＴＬ
ＹＤＳＤＮＮＲＤＫＳＥＥＱＩＦＱＤＬＲＫＶＦＳＤＳＳＤＫＳＥＧＶＬＧＦＫＳＫＩＥ
ＡＴＮ
【００１４】
配列番号３、Ｂ．ツリカタエＢｐｃＡ／ｆＨｂｐ
ＭＳＥＴＳＬＬＮＩＥＴＮＬＬＮＴＬＤＤＮＱＫＱＡＬＩＴＦＫＤＬＬＱＤＫＫＨＬＳＩ
ＬＥＫＱＱＫＳＩＬＥＤＬＫＡＮＱＫＮＹＮＬＱＤＫＬＫＫＴＬＮＳＥＹＤＫＮＱＬＮＫ
ＬＦＤＥＬＧＮＩＫＴＫＱＦＬＱＱＬＨＩＩＬＱＳＩＫＤＧＫＰＴＮＦＡＳＳＮＦＮＮＬ

ＮＱＴＬＥＱＫＫＥＱＡＬＫＹＩＫＤＫＬＹＴＤＹＹＬＹＩＮＧＩＱＤＡＮＹＦＦＥＲＩ
ＭＳＬＬＥ
【００１５】
配列番号４、Ｂ．ツリカタエＰ４１／ＦｌａＢ
ＭＲＮＮＳＩＮＡＡＮＬＳＫＴＱＥＫＬＳＳＧＨＲＩＮＲＡＳＤＤＡＡＧＭＧＶＡＧＫＩ
ＮＡＱＩＲＧＬＳＱＡＳＲＮＴＳＫＡＩＮＦＩＱＴＴＥＧＮＬＮＥＶＥＫＶＬＶＲＭＫＥ
ＬＡＶＱＳＧＮＧＴＹＳＤＡＤＲＧＳＩＱＩＥＩＥＱＬＴＤＥＩＮＲＩＡＤＱＡＱＹＮＱ
ＭＨＭＬＳＮＫＳＡＡＱＮＩＫＴＡＥＥＬＧＭＱＰＡＫＩＮＴＰＡＳＬＡＧＳＱＡＳＷＴ
ＬＲＶＨＶＧＡＮＱＤＥＡＩＡＶＮＩＹＡＡＮＶＡＮＬＦＡＧＥＧＡＱＶＳＰＡＱＥＧＡ
ＱＱＥＧＶＱＡＡＰＡＰＡＡＡＰＡＱＧＧＶＮＳＰＶＮＶＴＴＴＩＤＡＮＭＳＬＳＫＩＥ
ＮＡＩＲＭＶＳＤＱＲＡＮＬＧＡＦＱＮＲＬＥＳＩＫＡＳＴＥＹＡＩＥＮＬＫＳＳＹＡＱ
ＩＱＤＡＴＭＴＤＥＩＶＡＳＴＴＮＳＩＬＴＱＳＡＭＡＭＩＡＱＡＮＱＶＰＱＹＶＬＳＬ
ＬＲ
【００１６】
配列番号５、Ｂ．パルケリＢｉｐＡ－１Ｈ
ＭＤＭＧＳＴＲＤＷＬＴＮＤＤＧＦＶＲＧＴＫＧＦＤＤＳＰＦＲＲＰＤＲＶＤＫＥＶＳＡ
ＧＧＲＥＩＥＫＡＦＳＲＮＬＧＶＡＧＧＱＲＫＧＴＤＤＶＫＮＧＩＡＧＡＲＥＳＧＧＶＬ
ＫＥＡＥＮＡＧＱＲＤＶＤＤＳＧＥＧＩＫＮＤＶＩＱＮＬＧＳＶＧＶＱＶＡＶＧＳＥＮＮ
ＧＤＤＳＧＱＥＡＥＫＧＳＱＮＬＧＤＴＧＴＱＲＶＶＳＴＳＤＬＮＳＨＬＧＶＥＳＫＧＧ
ＭＳＴＮＫＥＧＩＳＴＮＨＶＴＥＮＲＮＳＩＮＳＩＴＳＴＳＳＧＬＳＴＡＬＱＩＡＧＴＳ
ＴＲＡＳＧＹＥＧＥＶＴＴＮＡＱＤＲＳＦＩＤＴＫＴＱＤＳＫＫＱＹＳＤＦＳＤＱＤＩＲ
ＤＫＩＬＧＮＶＶＧＧＶＶ
【００１７】
配列番号６、Ｂ．パルケリＢｉｐＡ－２Ｈ
ＭＧＮＶＭＳＧＩＤＮＶＩＱＧＡＧＴＦＡＴＡＡＭＱＧＶＧＴＶＩＤＶＬＱＤＶＧＴＦＶ
ＩＳＤＩＱＮＭＧＡＲＭＦＦＧＴＧＥＳＳＳＶＡＳＥＤＳＥＳＶＭＳＬＳＳＫＡＳＳＥＡ
ＫＤＴＴＶＧＬＳＳＤＶＴＳＫＧＮＮＶＡＶＧＬＳＳＤＥＩＱＩＩＧＲＬＥＫＹＬＫＳＡ
ＩＫＩＮＧＲＳＤＳＤＱＳＫＬＥＳＧＨＫＫＦＦＱＷＬＫＴＳＤＴＮＡＳＫＲＫＥＬＶＱ
ＮＬＱＲＶＦＮＬＩＫＥＫＳＳＤＳＴＥＬＫＫＷＭＱＳＩＶＤＤＩＥＮＫＳＴＩＩＤＩＮ
ＳＤＤＫＬＮＮＤＫＥＶＤＦＬＩＥＫＴＬＧＳＳＤＹＳＧＦＡＶＳＬＬＦＱＡＬＡＤＴＬ
ＹＤＳＥＮＳＲＤＫＳＥＥＱＩＦＫＤＬＲＫＶＦＳＤＫＳＥＧＶＬＥＦＫＳＫＩＥＡＴＮ
【００１８】
配列番号７、Ｂ．パルケリＧｌｐＱ
ＭＣＱＮＥＫＭＳＭＴＮＫＫＳＰＬＴＩＡＨＲＧＡＳＧＹＬＰＥＨＴＬＥＳＫＡＦＡＹＡ
ＬＧＡＤＹＬＥＱＤＩＶＬＴＫＤＮＶＰＩＩＭＨＤＰＥＬＤＴＴＴＮＶＡＫＬＦＰＥＲＡ
ＲＥＮＧＲＹＹＳＶＤＦＴＬＤＥＬＫＳＬＳＬＳＥＲＦＤＬＥＴＲＫＰＩＹＰＫＲＦＰＬ
ＮＥＹＮＦＫＩＰＴＬＥＥＥＩＱＦＩＱＧＬＮＫＳＴＧＲＮＶＧＩＹＰＥＩＫＫＰＬＷＨ
ＫＱＱＧＫＤＩＳＫＩＶＩＥＩＬＮＫＹＧＹＫＳＫＥＤＫＩＹＬＱＴＦＤＦＤＥＬＫＲＩ
ＲＥＥＬＧＹＱＧＫＬＩＭＬＶＧＥＮＤＷＮＥＡＰＴＤＹＥＹＩＫＳＱＥＧＭＴＥＶＡＫ
ＹＡＤＧＩＧＰＷＩＰＱＩＩＩＤＧＫＩＴＤＬＴＳＬＡＨＫＹＮＭＥＶＨＡＹＴＦＲＩＤ
ＳＬＰＳＹＶＫＤＡＮＥＬＬＤＬＬＦＮＱＡＫＩＤＧＬＦＴＤＦＴＤＴＶＶＫＦＩＫＱ
【００１９】
配列番号８、Ｂ．パルケリＢｐｃＡ／ｆＨｂｐ
ＭＳＥＴＳＬＬＮＴＬＤＮＮＱＫＱＡＬＩＴＦＫＤＬＬＱＤＫＮＨＲＳＩＬＥＫＱＱＫＳ
ＩＬＫＤＬＥＫＨＱＥＮＳＮＬＱＤＫＬＫＫＴＬＮＳＥＹＤＫＴＱＬＮＫＬＦＤＥＬＧＮ
ＩＫＴＫＱＦＬＱＫＬＨＩＭＬＫＳＩＮＮＧＴＬＴＳＦＳＳＳＮＦＫＤＳＮＱＴＬＥＱＫ
ＫＥＱＡＬＱＹＩＫＧＱＬＹＴＤＹＹＬＹＩＮＧＩＱＤＡＮＹＦＦＥＲＩＭＳＶＬＥＩ
【００２０】
配列番号９、Ｂ．パルケリＰ４１／ＦｌａＢ
ＭＲＮＮＳＩＮＡＡＮＬＲＫＴＱＥＫＬＳＳＧＨＲＩＮＲＡＳＤＤＡＡＧＭＧＶＡＧＫＩ

ＮＡＱＩＲＧＬＳＱＡＳＲＮＴＳＫＡＩＮＦＩＱＴＴＥＧＮＬＮＥＶＥＫＶＬＶＲＭＫＥ
ＬＡＶＱＳＧＮＧＴＹＳＤＡＤＲＧＳＩＱＩＥＩＥＱＬＴＤＥＩＮＲＩＡＤＱＡＱＹＮＱ
ＭＨＭＬＳＮＫＳＡＡＱＮＩＫＴＡＥＥＬＧＭＱＰＡＫＩＮＴＰＡＳＬＡＧＡＱＡＳＷＴ
ＬＲＶＨＶＧＡＮＱＤＥＡＩＡＶＮＩＹＡＳＮＶＡＮＬＦＡＧＥＧＡＱＶＳＰＡＱＥＧＡ
ＱＱＥＧＶＱＡＡＰＡＰＡＡＡＰＡＱＧＧＶＮＳＰＶＮＶＴＴＴＶＤＡＮＭＳＬＳＫＩＥ
ＮＡＩＲＭＶＳＤＱＲＡＮＬＧＡＦＱＮＲＬＥＳＩＫＡＳＴＥＹＡＩＥＮＬＫＳＳＹＡＱ
ＩＫＤＡＴＭＴＤＥＩＶＡＳＴＴＮＳＩＬＴＱＳＡＭＡＭＩＡＱＡＮＱＶＰＱＹＶＬＳＬ
ＬＲ

【００２１】

配列番号１０、Ｂ．デュトニイＧｌｐＱ

ＭＥＮＡＫＩＮＫＫＳＡＬＩＩＡＨＲＧＡＳＧＹＬＰＥＨＴＬＥＡＫＡＹＡＨＡＬＧＡＤ
ＹＩＥＱＤＩＶＬＴＫＤＤＩＰＩＶＭＨＤＰＥＬＤＴＴＴＮＶＡＫＬＦＰＧＲＡＲＥＮＧ
ＫＹＹＳＶＤＦＴＬＡＥＩＫＳＬＳＬＳＥＲＦＤＰＥＴＱＱＰＩＹＰＮＲＦＰＡＴＥＹＤ
ＦＫＩＰＴＬＥＥＥＩＫＦＩＱＧＬＮＫＳＴＧＫＮＩＧＩＹＰＥＩＫＫＰＬＷＨＫＱＱＧ
ＫＤＩＳＫＩＶＩＤＩＬＮＫＹＧＹＫＳＫＥＤＫＩＹＬＱＴＦＤＦＤＥＩＫＲＩＲＥＥＬ
ＧＹＱＧＫＬＩＭＬＶＧＥＮＤＷＥＥＡＰＴＤＹＥＹＩＫＳＥＥＧＭＡＥＶＡＫＹＡＤＧ
ＩＧＰＷＩＰＱＩＩＩＮＧＱＩＴＧＬＩＳＬＡＨＫＹＮＭＱＶＨＰＹＴＦＲＩＤＡＬＰＳ
ＹＶＫＤＰＮＥＬＬＥＬＬＦＩＫＡＫＶＤＧＬＦＴＤＦＶＤＩＳＩＫＦＭＱ

【００２２】

配列番号１１、Ｂ．ミヤモトイＧｌｐＱ

ＭＡＳＭＴＧＧＱＱＭＧＲＧＳＥＭＧＥＮＫＫＳＰＬＩＩＡＨＲＧＡＳＧＹＬＰＥＨＴＬ
ＥＡＫＡＹＡＹＡＬＧＡＤＹＬＥＱＤＩＶＬＴＫＤＮＩＰＶＩＭＨＤＰＥＩＤＴＴＴＮＶ
ＡＱＬＦＰＮＲＡＲＥＮＧＲＹＹＡＴＤＦＴＬＴＥＬＫＳＬＮＬＳＥＲＦＤＰＥＮＫＫＰ
ＩＹＰＮＲＦＰＬＮＥＹＮＦＫＩＰＴＬＥＥＥＩＱＦＩＱＧＬＮＫＳＴＧＫＮＶＧＩＹＰ
ＥＩＫＫＰＦＷＨＫＱＱＧＫＤＩＳＫＩＶＩＥＩＬＮＫＹＧＹＫＳＫＥＤＫＩＹＬＱＴＦ
ＤＦＤＥＬＫＲＩＲＫＥＬＧＹＱＧＫＬＩＭＬＶＧＥＮＤＷＮＥＡＰＴＤＹＥＹＩＫＳＥ
ＥＧＩＡＥＶＡＫＹＳＤＧＩＧＰＷＩＰＱＩＩＩＤＧＫＩＴＥＬＴＮＬＡＨＫＹＮＩＥＶ
ＨＰＹＴＦＲＴＤＡＬＰＳＹＶＫＮＥＮＥＬＬＤＬＬＦＮＫＡＫＶＤＧＩＦＴＤＦＴＤＴ
ＶＭＮＦＩＫＫ

【発明を実施するための形態】

【００２３】

アメリカ合衆国（ＵＳＡ）においてＴＢＲＦを引き起こすとして最もよく知られているＲＦＢ種は、Ｂ．ハームシー、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．パルケリ、及びＢ．ツリカタエである。しかしながら、ＴＢＲＦを引き起こすＲＦＢ種は他にも同定が続いている。例えば、Ｂ．ジョンソニイ（ｊｏｈｎｓｏｎｉｉ）様種は、以前にコウモリダニでのみ見つかっていたが、これに感染した患者が、ウィスコンシン州で同定された。そのうえさらに、ＴＢＲＦは、中央アメリカ及び南アメリカでも報告されている。Ｂ．ヒスパニカ（ｈｉｓｐａｎｉｃａ）、Ｂ．ペルシカ（ｐｅｒｓｉｃａ）、及びＢ．ミヤモトイは、欧州及びアジアにおけるＴＢＲＦの重要な原因であり、Ｂ．ヒスパニカ、Ｂ．クロシデュラエ（ｃｒｏｃｉｄｕｒａｅ）、及びＢ．デュトニイは、アフリカにおけるＴＢＲＦの重要な原因である。ほとんどのＲＦＢ種は、ヒメダニ属の軟ダニにより伝播するものの、Ｂ．ミヤモトイは、ライム病ボレリア（ＬＤＢ）種を伝播するマダニ属の同じカタダニにより伝播する可能性がある。他のＲＦＢ種、Ｂ．ロネスタリ（ｌｏｎｅｓｔａｒｉ）、最近記載されたＢ．ツルシシア（ｔｕｒｃｉｃｉａ）、及びＢ．タキグロッシ（ｔａｃｈｙｇｌｏｓｓｉ）は、爬虫類（Ｂ．ツルシカ）又はハリモグラ属（Ｂ．タキグロッシ）宿主に関連した急速に拡大しているボレリア系統群のメンバーであり、これらもカタダニによって伝播する。時宜を得た治療を提供する目的で、臨床医は、ダニ媒介疾患の症候を呈する患者がＴＢＲＦ種に曝露したことがあるかどうかを迅速かつ正確に同定することが可能でなければならない。

【００２４】

本発明の態様は、ＴＢＲＦを有することが疑われる対象由来の試料において、ボレリア抗血清を迅速かつ正確に検出する方法を提供する。ＴＢＲＦを有することが疑われる対象は、高熱（例えば、１０３°Ｆ）、頭痛、並びに筋肉痛及び関節痛等の症候を有することで同定可能である。症候は、典型的には再発し、おおよそ３日間続く発熱、続いて発熱のない７日間、続いて別の３日間の発熱という表示パターンをもたらす。適正な抗生物質治療がなければ、この過程は、複数回繰り返される可能性がある。ＴＢＲＦの症候は、例えば、ウイルス性インフルエンザ様症候に類似する可能性があるため、対象に有効な治療を提供するためにはＴＢＲＦの正確な診断が重要である。本発明は、原因ボレリア種に特異的な抗体の存在を検出する迅速かつ簡便な診断試験を提供し、それにより、そのような試験への需要を満たす。

【００２５】

ＴＢＲＦは複数のＲＦＢ種により引き起こされる可能性があるため、及びＲＦＢ種の地理的範囲は重なり合う可能性があるため、ＲＦＢ種の試験は、包括的である必要がある、すなわち、試験は、複数種に対して同時に抗体を検出することが可能である必要がある。本発明は、様々なＴＢＲＦボレリア種に特異的な抗原アミノ酸配列を提供する。本発明のアミノ酸配列は、指示される属に対して高い特異性及び／又は感度を有する抗原ペプチドをコードする。ボレリア種の境界にまたがり交差反応性を示す抗原ペプチドを含有することもまた、目的が感染症を検出することであり、感染症の原因である特定種を同定する必要がない場合の包括的血清学的アッセイ、又は他の免疫学に基づくアッセイの開発に関して重要である。例えば、本開示は、マルチパネル免疫アッセイを含み、この場合、単一試験スクリーンの状況で、複数のＲＦＢ種が検出可能である。

【００２６】

本発明は、ＴＢＲＦボレリア種による感染症を診断する新規組成物及び方法を提供する。本発明は、部分的に、本明細書中記載されるとおり、抗原ペプチド（これは、当該分野において、ペプチド抗原又は抗原とも称する場合がある）をコードする種特異的アミノ酸配列の発見に基づく。

【００２７】

本発明は、１つの態様において、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列を含む組成物であり、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１と少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％、９９．５％、又は１００％相同性を有する。１００％未満の相同性を持つ配列は、本明細書中提供されるアミノ酸配列を基準にして１つ又は複数の置換、削除、挿入、又は他の修飾で修飾されている可能性がある。修飾の例として、保存的アミノ酸置換が挙げられるが、これに限定されない。保存的アミノ酸置換は、そのような修飾がなされる分子のものと類似した機能的特徴を有する分子をもたらすことになる。保存的アミノ酸置換は、選択されたポリペプチド又はタンパク質の活性又は立体構造に顕著な変化をもたらさない置換である。そのような置換は、典型的には、選択したアミノ酸残基を、類似の物理化学的特性を有する異なる残基で置き換えることを含む。例えば、ＧｌｕとＡｓｐの置換は、どちらも類似したサイズの負電荷を帯びたアミノ酸であることから、保存的置換と見なされる。物理化学的特性によるアミノ酸のグループ分けは、当業者に既知である。以下のグループはそれぞれ、互いに保存的置換となるアミノ酸を含む：１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；４）アルギニン（Ｒ）、リシン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；７）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；及び８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（１９８４）を参照）。当業者なら、１００％未満の相同性を持つ配列が天然に生じる又は天然に生じないＴＢＲＦ関連抗体と結合することができるかどうか、並びに修飾配列に対する抗体の感度及び特異性を特定することができ

る。当業者なら、本明細書の教示に照らして、必要以上の実験を行わずに本発明の方法において許容可能な又は等価な反応を与える、本発明の配列番号１～１１と顕著な相同性を持つ配列を同定することができる。

【００２８】

一部の実施形態において、本発明は、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列を含む組成物であり、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。本明細書中使用される場合、「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」は、アミノ酸配列に言及するクレーム移行句として使用される場合、指定されるアミノ酸配列（すなわち、配列番号１～１１）と１００％相同性を有するアミノ酸配列を指す。

【００２９】

本発明の態様は、ＴＢＲＦボレリアの特定種に対する抗原特異的アミノ酸配列を提供する。これらの新規アミノ酸配列は、ＴＢＲＦを有することが疑われる対象由来の試料においてＴＢＲＦの特定ボレリアを同定するためにアッセイで使用することができる。本発明のアミノ酸配列を用いることで、対象試料におけるＴＢＲＦボレリアの同定が、他の現行法よりも高い速度、感度、及び特異性で行われる。本発明のアミノ酸配列は、診断アッセイ及び学術アッセイにおいて使用可能である。適切なアッセイの限定ではなく例として、免疫ブロット、ラインイムノブロット、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定法）等が挙げられる。本発明のアミノ酸配列は、例えば、ＩｇＸＳＰＯＴ試験（ＩＧｅｎｅＸ、Ｍｉｌｐｉｔａｓ、ＣＡ）を用いた、ＴＢＲＦボレリア特異的Ｔ細胞の検出に使用可能である。

【００３０】

一部の実施形態において、本発明は、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列を含む組成物であり、１種又は複数の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びにそれら配列のバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。「バリアント」という表現は、指定されるアミノ酸配列（すなわち、配列番号１～１１）の任意の修飾物（複数可）であって図３の免疫学的結合プロファイルを保持するものを包含する。そのような修飾は、挿入及び削除（内部又はＮ末端若しくはＣ末端での、あるいはその両方）を含むことができる。

【００３１】

本発明のアミノ酸配列及びその一部分をコードする核酸配列は、ポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドも含めて、本発明のアミノ酸配列がコードする抗原ペプチドの生物学的（例えば、免疫学的）特性を提示するペプチドを単離可能な量で提供するために、培養細胞で発現させることができる。遺伝暗号の重複性により、複数の核酸配列が、本発明のペプチド配列の生成に適切である可能性がある。当業者なら、本発明のペプチド配列の生成用に１種又は複数の核酸配列を特定することができる。本発明のアミノ酸配列をコードする核酸配列は、当業者に既知である任意の適切な標識により標識化可能である。

【００３２】

これに関して、本発明のアミノ酸配列の生成に適切な核酸配列は、天然に生じる配列と実質的に相同である可能性がある。核酸配列の実質的相同性とは、本明細書中使用される場合、以下を意味する：（ａ）天然に生じる配列との６５％、７５％、８５％、９５％、９８％、又は９９％超の相同性が存在すること、あるいは（ｂ）相同核酸配列が、温度及び塩濃度のストリンジェントな条件下、比較される配列又はその相補鎖とハイブリダイズすること。このようなストリンジェントな条件は、一般に、約２２℃超、通常は約３０℃超、より一般的には約４５℃超の温度、及び一般的には約１Ｍ未満、通常は約５００ｍＭ未満、好ましくは約２００ｍＭ未満の塩濃度になる。温度と塩濃度の組み合わせは、スト

リンジェンシーの定義において、温度又は塩濃度いずれか単独よりも重要である。ストリンジェンシーに影響を及ぼす他の条件として、比較される配列のＧＣ含有量、配列の相補性の度合い、及びハイブリダイゼーションに関与する配列の長さ、並びにハイブリダイゼーション混合物に使用される緩衝液（複数可）の組成が挙げられる。ストリンジェンシーに影響を及ぼすこれら及び他の要因は、学術文献及び特許文献において十分に記載されている。当業者なら、本発明の抗原ペプチドをコードする核酸配列の相同性を特定するのに適切な条件を決定することができる。

【００３３】

相同核酸配列は、核酸配列中のヌクレオチド置換の性質に基づき特定することができる。例えば、同義ヌクレオチド置換、すなわち、コードされるアミノ酸配列を改変しない核酸配列内でのヌクレオチド変更は、非同義ヌクレオチド置換よりも許容性が良くなり、したがって、特定の核酸配列においてより多く存在する可能性がある。当業者なら、必要以上の実験を行わずに、コードされる抗原ペプチドの抗原性に悪影響を及ぼすことのない、本発明のアミノ酸配列をコードする核酸配列に許容することができる、置換の適切な数及び位置を特定することができる。

【００３４】

標識及びタグ

本発明の１種又は複数のアミノ酸配列は、標識化及び／又はタグ付及び／又は結合させることができる。本明細書中使用される場合、「標識」又は「タグ」とは、本発明のアミノ酸配列に付着させることが可能な検出可能部分である。標識又はタグは、本発明のアミノ酸配列に共有結合で付着させることも非共有結合で付着させることもできる。そのような「タグ」の限定ではなく例として、天然及び合成の（すなわち、天然に生じない）核酸及びアミノ酸配列（例えば、ポリＡＡＡタグ）、抗体、並びに標識等の検出可能部分（本明細書中いずれかの箇所で検討される）がある。すなわち、「標識化」及び「タグ付」という語句の定義は、タグが、場合によっては、標識としても機能し得るという点で、重複している場合がある。そのうえさらに、本発明で有用なタグは、標識と連結させることができる。

【００３５】

本発明のアミノ酸配列、又は本発明のアミノ酸配列に付着させた任意のタグは、当業者に既知である任意の適切な標識で標識化することができる。そのような標識として、ビオチン／ストレプトアビジン、酵素複合体（例えば、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（ＡＰ）、グルコースオキシダーゼ、及びβ－ガラクトシダーゼ）、蛍光部分（例えば、ＦＩＴＣ、フルオレセイン、ローダミン等）、生物学的フルオロフォア（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、Ｒ－フィコエリトリン）、又は他の発光タンパク質等を挙げることができるが、これらに限定されない。当業者に既知である任意の適切な標識を、本発明で使用することができる。

【００３６】

一部の実施形態において、本発明のアミノ酸配列は、「結合」されていることが可能である。「結合」アミノ酸配列とは、例えば、免疫アッセイ等の生物学的試験において、アミノ酸配列の使用を可能にする目的で、固定されてしまったアミノ酸配列である。本発明の文脈において、「結合」アミノ酸配列とは、非天然の表面又は物質に直接又は間接的に付着させた（例えば、共有結合又は非共有結合等）アミノ酸配列である。これに加えて又はこれに換えて、本発明の「結合」アミノ酸配列は、天然の表面又は物質に直接又は間接的に付着させることができ、天然の表面又は物質はいずれも、そのアミノ酸配列とは天然に関連しない。本発明のアミノ酸配列を結合させることができる物質の限定ではなく例として、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）プラスチック、金属、磁気ビーズ、及びアガロース（例えば、ビーズ）が可能である。本発明のアミノ酸配列が表面又は物質に結合することを補助する又は促進するために、当業者に既知である連結剤を使用することができる。

【００３７】

アミノ酸配列の生成
一部の実施形態において、本発明のアミノ酸配列は、非天然の合成配列、例えば、組換え技術により生成した配列又はタンパク質合成装置により合成された配列等が可能である。そのため、本発明のアミノ酸配列は、文献に記載されるとおり及び可能であるとおりに、並びに一般的にマニュアル、例えば、Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｅｄ．，ａｌｌ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ & Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．，ｅｄｉｔｉｏｎ ａｓ ｏｆ ２００８；及びＳａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，２００１等で言及されるとおりに、並びに当業者に周知であるとおりに、組換え技術により生成することができる。１つの実施形態において、本発明のアミノ酸配列は、組換えによりＥ．コリ（ｃｏｌｉ）において作られる。

【００３８】
本明細書中使用される場合、「ベクター」という用語は、核酸分子であって、その核酸分子が作動的に連結された別の核酸を異なる遺伝子環境間で輸送することができる核酸分子を指す。配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、及び配列番号１１、並びに図３の免疫学的結合プロファイルを保持するそれらのバリアントからなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列に加えて、本発明のベクターは、異種核酸配列も含有する。本明細書中使用される場合、異種は、マーカッシュグループ配列の由来元である生物中には天然に生じない核酸配列を指す。「ベクター」という用語は、核酸分子を輸送することができるウイルス又は生物も指すことができる。ベクターの１つの種類は、プラスミド、すなわち、染色体ＤＮＡとは物理的に分離しており染色体ＤＮＡから独立して自己複製することが可能な、小さな円形二本鎖染色体外ＤＮＡ分子である。一部の有用なベクターとして、ベクターに連結させた核酸の自律増殖及び／又は発現を可能にするものがある。作動的に連結された核酸の発現を指示することができるベクターは、本明細書中、「発現ベクター」と称する。他の有用なベクターとして、細菌プラスミド及び細菌人工染色体（ＢＡＣ）、コスミド、並びにウイルス、例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びファージが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３９】
本発明の方法において有用なベクターは、追加の配列を含むことができ、追加の配列として、１つ又は複数のシグナル配列及び／又はプロモーター配列、あるいはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法及びベクターに使用可能なプロモーターとして、細胞特異的プロモーター又は普遍的プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のベクターに使用可能なプロモーターの限定ではなく例として、以下がある：偏在性プロモーター、例えば、ＣＭＶプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ＣＢＡプロモーター、及びＥＦ１ａプロモーター等であるが、これらに限定されない。適切なプロモーターの選択法及び使用法は、当該分野で周知である。

【００４０】
本発明の方法で有用なベクターは、細胞中で、本発明の配列を含む融合タンパク質を発現させるのに使用することができる。発現ベクター並びにそれらの調製法及び使用法は、当該分野で周知である。本発明の一部の実施形態において、発現ベクターの核酸配列は、本発明のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする。ポリペプチド配列を含む融合タンパク質の調製の仕方及び利用の仕方は、当該分野で周知である。一部の実施形態において、本発明のアミノ酸配列を含む融合タンパク質は、融合タンパク質の精製に使用可能な又は本発明の方法で使用可能なエピトープタグも含むことができる。エピトープタグの限定ではなく例として、ＦＬＡＧタグ、蛍光タグ（緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）が挙げられるが、これに限定されない）、ＧＳＴタグ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ポリヒスチジ

ン（ポリＨｉｓ）タグ、Ｍｙｃタグ、ＭＢＰタグ、又はＶ５タグがある。一部の実施形態において、本発明のアミノ酸配列を含む融合タンパク質は、本明細書中いずれかの箇所で記載されるとおりに、検出可能な標識も含むことができる。

【００４１】

対象及び細胞

本明細書中使用される場合、対象は、動物、例えば、哺乳類又は非哺乳類等が可能である。哺乳類対象の限定ではなく例として、霊長類（ヒトが挙げられるが、これに限定されない）、齧歯類（マウス、ラット、リス、シマリス、プレーリードッグが挙げられるが、これらに限定されない）、ウサギ類、シカ、イヌ属（イヌ、キツネ、コヨーテ、及びオオカミが挙げられるが、これらに限定されない）、ネコ科（イエネコ、ボブキャット、クーガー、及び他の野生ネコが挙げられるが、これらに限定されない）、クマ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、及びブタが挙げられる。非哺乳類対象の限定ではなく例として、鳥類、両生類、トカゲ、昆虫、及び節足動物が挙げられる。本明細書中使用される場合、細胞は、Ｅ．コリに限定されないがそれをはじめとする細菌細胞、又は哺乳類若しくは非哺乳類いずれかである動物細胞が可能である。

【００４２】

アッセイ及び検出法

本発明のアミノ酸配列は、当該アミノ酸配列のいずれかに対して特異性を持つ抗体でタグ付けすることができる。当該アミノ酸配列に対する特異性、すなわち、抗体特異性は、抗体が一部の抗原決定基と優先的に反応して他とは反応しないことを可能にする、抗体の特性である。特異性は、化学組成、物理的力、及び結合部位での分子構造に依存する。感度は、抗体が抗原決定基とどのくら強く結合するかである。当業者なら、標準の親和性アッセイ、例えば、免疫ブロット法、オークタロニーアッセイ、力価アッセイ等を用いて、特定のアミノ酸配列に対する抗体の特異性及び感度を特定することができる。別の態様において、本発明は、ＴＢＲＦを有することが疑われる対象由来の試料中のＴＢＲＦボレリア抗血清を迅速かつ正確に検出する方法を提供する。ＴＢＲＦを有することが疑われる対象由来の試料中のＴＢＲＦボレリア抗血清を検出する本発明の方法は、例えば、ＴＢＲＦを有することが疑われる対象から得られる生体試料（血液、唾液が挙げられるが、これらに限定されない）を用意することと、生体試料を本発明の標識化及び／又はタグ付及び／又は結合アミノ酸配列のうち１種又は複数と混合することと、並びに試料中にライム病抗血清が存在することを示す陽性反応を検出することと、を含むことができる。抗血清は、例えば、免疫ブロット法、ＥＬＩＳＰＯＴ、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロット法、ラテラルフローアッセイ、又は当業者に既知の任意の他の適切な免疫アッセイにより検出することができる。これらの技法は、当業者に既知であり、一般的な技術参照において見つけることができる。これらの技法は、類似しているものの、それぞれに一長一短がある。他の適切な技法も、当業者に既知である可能性があり、本明細書に組み込まれる。

【００４３】

試験限界の影響を評価するため、及びＴＢＲＦボレリアに対する曝露レベルを特定するため、改変ウエスタンブロット手法、すなわちラインイムノブロットが開発され、本明細書中記載される本発明の態様に採用された。ラインイムノブロットは、ダニ媒介疾患の疑われる患者由来の血清において、ＴＢＲＦを血清学的に同定及び診断するため、ＴＢＲＦボレリア複合体の共通株及び種由来の組換え抗原を使用する。本明細書中いずれかの箇所で記載されるとおり、ＴＢＲＦボレリア曝露の血清型構成（ｓｅｒｏｔｙｐｅ ｍａｋｅ ｕｐ）は、以前に認められていたよりも複雑である可能性があり、１種を超えるＴＢＲＦボレリア種による感染が起こり得る。

【００４４】

ウエスタンブロット法は、電気泳動によりタンパク質を分離することと、次いでニトロセルロース又は他の固形媒体（例えば、ポリビニリデンフルオリドすなわちＰＶＤＦ膜及びナイロン膜）に移すことと、を含むことができ、これについては、以下により詳細に記載する。免疫ブロット法も、タンパク質を固形媒体に、手作業で又は機械により添加する

ことを含むことができる。好ましくは、タンパク質は、直線で又はスポットで添加されて乾燥され、それらは、固形支持媒体、例えば、ニトロセルロースに結合する。免疫ブロットで使用するタンパク質は、当業者に周知であるとおり、生体試料から単離されたものでも組み換え技術により生成したものでも可能である。次いで、結合したタンパク質を、標的タンパク質に対して特異的である抗体を有することが疑われる試料（単数又は複数）と接触させる。この手法を用いることで、既知の抗体を使用して、例えば、溶解細胞のタンパク質を電気泳動により分離させて固形媒体に移した場合等に、試料中にタンパク質が存在するかどうかを特定することができる。ウエスタンブロット法は、サイズにより、並びに特定抗体に対する特異性によりタンパク質を同定することを可能にする。

【００４５】

同様に、免疫ブロット法と呼ばれる手法を用いることで、既知のタンパク質を固形媒体に結合させることができ、及び試料、例えば感染症を有することが疑われる対象由来の試料等を、結合タンパク質を試料と接触させることにより、試料中の特異的抗体の存在について試験することができる。標的タンパク質に結合する抗体は、通常、一次抗体と称する。二次抗体は、一次抗体の保存領域に対して特異的であり（例えば、ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体は、一次ヒト抗体を検出するのに使用可能である）、これは、結合した一次抗体をどれでも検出するのに使用される。二次抗体は、通常、視覚化のため、検出可能部分で標識される。適切な標識の限定ではなく例として、例えば、ビオチン等の発色団、放射性部分、及びアルカリホスファターゼ等の酵素等が挙げられる。抗体視覚化のためのこれら及び他の材料の使用は、当業者に周知である。

【００４６】

酵素免疫スポット（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ　ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ、ＥＬＩＳＰＯＴ）法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ライム特異的抗原に反応するヒトＴ細胞を検出することができる。ＥＬＩＳＰＯＴアッセイでは、９６ウェルマイクロタイタープレートのＰＶＤＦ膜の表面を、例えば、抗インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）又は他のサイトカイン特異的抗体に結合する捕捉抗体でコートする。細胞インキュベーション及び刺激工程の間、患者全血から単離したＴ細胞を、プレートのウェルに、上記配列（複数可）と一緒に播種し、ウェルの膜表面上に実質的に単層を形成させる。任意の抗原特異的細胞を本発明の配列のうち１種又は複数で刺激することで、それら細胞は活性化されて、ＩＦＮγを放出する。このＩＦＮγが、固定化抗体により、膜表面で直接捕捉される。すなわち、ＩＦＮγは、培養培地中に拡散する、又はプロテアーゼにより分解されバイスタンダー細胞の受容体に結合する機会を得る前に、分泌細胞を直接取り囲む範囲で「捕捉される」。引き続いての検出工程は、固定化ＩＦＮγを免疫スポットとして視覚化する。免疫スポットは、本質的に、活性化細胞の分泌の足跡である。

【００４７】

ＥＬＩＳＰＯＴ試験の具体例に関して、プレートの各ウェルを、試験又は検出される細胞に特異的な精製サイトカイン特異的抗体でコートする。Ｔ細胞を、対象（例えば、ライム病又はＴＢＲＦを有することが疑われる対象）から単離し、各ウェルで培養し、本発明の１種又は複数の配列の組換え抗原で刺激する。ライム陽性患者細胞は、刺激に反応してサイトカインを分泌し、これが、ウェルにコートした抗体により捕捉され、ＥＬＩＳＡで更に検出される。

【００４８】

ＥＬＩＳＡアッセイも、抗原の検出に使用することができる。ＥＬＩＳＡアッセイは、タンパク質混合物（例えば、ライセート）中の特定タンパク質を定量することを可能にする、又は試料中にあるペプチドが存在するかどうか特定するのに使用することができる。同様に、ＥＬＩＳＡアッセイは、標的として特定抗原を使用することにより、特異的抗体が存在するかどうか特定するのに使用することができる。本発明で使用する場合、標的アミノ酸配列（複数可）を、表面に付着させる。そうすると、試験される試料中に存在する場合、活性抗体は、抗原に結合することができる。酵素を連結した二次抗体を加え、最終工程で、酵素の基質を含有する物質を加える。続く反応工程により、検出可能なシグナル

が生成する。このシグナルは、最も一般的には基質の変色である。

【００４９】

ラテラルフローアッセイは、他にも様々な名前で称し、そのような名前として、ラテラルフロー試験、ラテラルフロー装置、ラテラルフロー免疫アッセイ、ラテラルフロー免疫クロマトグラフィーアッセイ、及び迅速検査（ｒａｐｉｄ　ｔｅｓｔ）が挙げられるが、これらに限定されない。ラテラルフローアッセイは、混合物、例えば液体試料中の１種又は複数の分析物、例えば抗原等の存在を検出及び／又は定量する、簡便で万能な、紙を利用したプラットフォームである。ラテラルフローアッセイは、定性的であることも定量的であることも可能である。ラテラルフローアッセイでは、関心対象の１種又は複数の分析物を含有する試料を、試料吸着パッドに添加すると、試料は、分析物（複数可）と相互作用することができる分子が付着している様々な重合体試験ストリップゾーンを通じて毛細管作用により吸引される。試料は、複合体放出パッドへと遊走するが、このパッドは、関心対象の分析物（複数可）に特異的に結合する、蛍光、有色、又はそれ以外で検出可能な粒子と複合した分子を含有している。最後に、試料は、結合した分析物（複数可）も含めて、検出ゾーンへと遊走する。検出ゾーンの多孔質膜内には、抗体又は抗原等の生物学的成分があり、これらは、列になって固定されており、検出可能な粒子と反応することになる。ラテラルフローアッセイは、典型的には、試料がストリップを通じて流れていることを確認する対照ラインと、及び関心対象の分析物（複数可）の存在を検出するための１つ又は複数の試験ラインと、を有する。結果は、目で読むことも可能であるし、結果を読んで解釈することができる機械で読むことも可能である。ラテラルフローアッセイは、直接アッセイとして設計することも、「サンドイッチ」アッセイとして設計する（その場合、試験ライン位置の着色ラインの存在が、試験陽性を示す）ことも、競合アッセイとして設計する（その場合、着色ラインの不在が試験陽性を示す）ことも可能である。直接アッセイ及び競合アッセイは、多重化可能である。

【００５０】

本発明の方法の１つの態様において、本発明の標識化及び／又は結合アミノ酸配列のうち２種以上が生体試料と混合される場合、少なくとも２種のアミノ酸配列が検出される場合に陽性結果が示されている。本発明の別の態様において、本発明の標識化及び／又は結合アミノ酸配列のうち少なくとも１種が生体試料と混合される場合、少なくとも１種のアミノ酸配列が検出される場合に陽性結果が示されている。

【００５１】

本発明の方法において、本発明のアミノ酸配列がコードするペプチドに結合した任意の一次抗体が、検出可能部分と複合体形成した二次抗体として使用される抗ヒト抗体、例えば、ＩｇＧ又はＩｇＭ等を用いて検出可能である。本明細書中いずれかの箇所で記載されるとおり、検出可能部分は、発色団、放射性部分、及び酵素からなる群より選択することが可能であるか、又は当業者に既知である他の検出可能部分であることが可能である。１つの実施形態において、検出可能部分は、アルカリホスファターゼを含む。別の実施形態において、検出可能部分は、ビオチンを含む。

【００５２】

本発明の別の態様において、試料中の様々なボレリア種を検出及び識別する方法が提供される。試料は、ライム病を有することが疑われる対象に由来するものが可能である。本方法は、例えば、試料、例えば、ＴＢＲＦを有することが疑われる対象から得られる生体試料を用意することと、及び生体試料を本発明の標識化及び／又は結合アミノ酸配列のうち１種又は複数と混合又は接触させることと、を含むことができる。アミノ酸は、アッセイで陽性結果が得られない場合に、それらの存在を確認するために標識化することができる。

【００５３】

本発明の一部の実施形態において、少なくとも１種のアミノ酸配列が検出される場合に、試料を、ＴＢＲＦボレリアの複数種パネルアッセイにおいて陽性であると見なすことができる。本発明の一部の実施形態において、少なくとも２種のアミノ酸配列が検出される

場合に、試料を、ＴＢＲＦボレリアの複数種パネルアッセイにおいて陽性であると見なすことができる。本発明の一部の実施形態において、種が同定される少なくとも２種のアミノ酸配列が検出される場合に、試料を、ＴＢＲＦボレリアの複数種パネルアッセイにおいて陽性であると見なすことができる。

【００５４】

等価物

本発明の複数の実施形態を、本明細書中、記載及び解説してきたものの、当業者なら、本明細書中記載される、機能を実行するための及び／又は結果及び／又は１つ又は複数の利点を得るための、様々な他の手段及び／又は構造を、すぐに企図するだろうし、そのような改変及び／又は修飾はそれぞれが、本発明の範囲内にあると見なされる。より一般的には、当業者なら、本明細書中記載される全てのパラメーター、寸法、材料、及び構成が、例示を意味していること、及び現実のパラメーター、寸法、材料、及び／又は構成が、本発明の教示を利用する具体的応用（単数又は複数）に依存することになることを、すぐに認めるだろう。当業者なら、本明細書中記載される本発明の具体的実施形態の等価物を数多く、認識するだろう、又は常用実験にすぎないものを用いて確定することができるだろう。したがって、当然のことながら、上記実施形態は、例としてのみ、提示されるものであり、添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物の範囲内において、本発明は、具体的に記載されるとおり及び特許請求されるとおり以外のやり方で実施することができる。本発明は、本明細書中記載される個別の特長、システム、物品、材料、及び／又は方法のそれぞれに関する。また、そのような特長、システム、物品、材料、及び／又は方法が、相互に矛盾するのではない場合、そのような特長、システム、物品、材料、及び／又は方法の２つ以上の任意の組み合わせが、本発明の範囲内に含まれる。

【００５５】

本明細書中定義及び使用されるとおりの全ての定義は、定義される用語の、辞書での定義、参照として援用される文書での定義、及び／又は通常の意味よりも優先されると解釈されなければならない。

【００５６】

不定冠詞の「ａ」及び「ａｎ」は、明細書及び特許請求の範囲において本明細書中使用される場合、明確に否定が示されない限り、「少なくとも１つ」を意味すると解釈されなければならない。「及び／又は」という語句は、明細書及び特許請求の範囲において本明細書中使用される場合、そのように結合されている要素の「いずれか又は両方」、すなわち、複数の要素が、ある場合には共同して存在し、別の場合には分離して存在することを意味すると解釈されなければならない。「及び／又は」節により具体的に特定される要素以外の他の要素は、明確に否定が示されない限り、そのような具体的に特定される要素に関連するか否かに関わらず、任意選択で存在することができる。

【００５７】

本出願において引用又は言及される全ての参照、特許、及び特許出願、並びに刊行物は、本明細書中そのまま全体が参照として援用される。

【実施例】

【００５８】

実施例１．ＴＢＲＦ免疫ブロット抗原包括性試験

ＴＢＲＦ免疫ブロットＩｇＧ及びＩｇＭ試験、すなわち定性的免疫ブロットアッセイを、設計及び実行して、回帰熱又はライム様症候を有することが疑われる血清試料中のＴＢＲＦボレリア種に対するＩｇＧ抗体及びＩｇＭ抗体を検出した。組換えＴＢＲＦボレリア抗原を、ニトロセルロースストリップに直線状に噴射し、次いで、これをＴＢＲＦ免疫ブロット試験に使用した。実験を行って、ＴＢＲＦ免疫ブロット試験の特異性を特定した。

【００５９】

方法

抗原の調製

以前に記載されたとおり［Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　（２０１

８）　６（３）　ｐｉｉ：　Ｅ９９；　Ｓｈａｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（２０１９）　７：１２１］、ハイブリッド遺伝子構築物又は遺伝子の一部分をｐＥＴベクターにクローン導入し、エシェリキア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）で遺伝子産物を発現させ、次いで、タンパク質を純度＞９０％で単離することにより、組換え標的タンパク質を得た。以前に記載されたとおり［Ｓｈａｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（２０１９）　７：１２１］、組換えタンパク質は、４種の標的抗原、ＢｉｐＡ、ＧｌｐＱ、ＢｐｃＡ／ｆＨｂｐ、及びＰ４１／ＦｌａＢを検出するため、複数のＴＢＲＦボレリア種（Ｂ．ハームシー、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．ツリカタエ、及びＢ．ツルシカ）に由来した。

【００６０】

抗原ストリップの調製

以前に記載されたとおり［Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（２０１８）　６（３）　ｐｉｉ：　Ｅ９９；　Ｓｈａｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（２０１９）　７：１２１］、ＴＢＲＦ免疫ブロット用の抗原ストリップを調製した。精製タンパク質及び対照タンパク質を希釈し（７～１９ｎｇタンパク質／ライン）、ＢｉｏＤｏｔ液体ディスペンサー（ＢｉｏＤｏｔ、Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ）を用いて、ニトロセルロースシート（Ｃｙｔｉｖａ、Ｍａｒｌｂｏｒｏｕｇｈ、ＭＡ）に直線状に噴射した。次いで、シートを５％脱脂粉乳でブロックし、スライスして３ｍｍ幅のストリップにした。

【００６１】

抗体反応性の検出

血清学的免疫ブロット試験は、臨床検査室改善修正法（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔ　Ａｍｅｎｄｍｅｎｔｓ、ＣＬＩＡ）認定を受けた高度複雑性試験を行う施設であるＩＧｅｎｅＸ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙで行った。

【００６２】

以前に記載されたとおり［Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（２０１８）　６（３）　ｐｉｉ：　Ｅ９９；　Ｓｈａｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（２０１９）　７：１２１］、試験血清のＴＢＲＦボレリア特異的抗体と免疫ブロットのＴＢＲＦボレリア抗原の間の反応性を検出した。ストリップを標識化し、槽中の希釈剤（１００ｍＭのＴｒｉｓ、０．９％ＮａＣｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、及び１％脱脂粉乳）に５分間（ｍｉｎ）浸漬した。次いで、試験血清又は対照血清いずれかを分取量１０μＬで、ストリップに加えた。ストリップを、血清とともに室温で１時間インキュベートし、室温で洗浄緩衝液（ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）で３回洗い、次いで、最終洗浄液を吸引した。ＩｇＧ及びＩｇＭ反応性を検出するため、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトＩｇＧを１：１０，０００希釈で又はアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトＩｇＭを１：６，０００希釈でそれぞれ用いて（ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）、１時間ストリップとともにインキュベートし、次いで、３回洗った。抗体／抗原反応性のバンドを視覚化するため、ストリップを、発色基質である、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウム（ＢＣＩＰ／ＮＢＴ、ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）と反応させ、較正対照が３９ｋＤａに視認可能なバンドを生成した後、蒸留水で洗うことにより、反応を終了させた。較正対照のものより低い強度を示すバンドを、陰性として記録した。ボレリア感染症であることが確認されている患者由来のヒト血清を陽性対照として用い、未感染の個人由来の血清を陰性対照として用いた。患者試料の免疫ブロット試験は全て、陽性及び陰性対照血清試料の試験と同時進行で行った。

【００６３】

免疫ブロットのスコアリング

ＴＢＲＦボレリア免疫ブロットの場合、Ｐ４１／ＦｌａＢ（４１ｋＤａ）、並びに４種の抗原、ＢｉｐＡ（７５ｋＤａ）、ＧｌｐＱ、ＢｐｃＡ／ｆＨｂｐ（２１～２３ｋＤａ）のうちいずれか２種に対するＩｇＧ抗体又はＩｇＭ抗体いずれかの検出が、ＴＢＲＦ種に

関する最良の特異性を与えた。
【００６４】
各抗原型内の２種以上のタンパク質に対するＩｇＧ抗体又はＩｇＭ抗体いずれかの検出を、その抗原型の陽性反応と見なした。以前に記載されたとおり［Ｓｈａｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　（２０１９）　７：１２１］、４種のＴＢＲＦボレリア抗原に対するＩｇＧ抗体又はＩｇＭ抗体いずれかの反応性について同じ基準を適用することで、最適な検出感度が導かれた。
【００６５】
結果
図１に示すとおり、ＴＢＲＦボレリア種、Ｂ．ツリシカ、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．ハームシー、Ｂ．パルケリ、及びＢ．ツリカタエ種に対する抗体が、５種全てに由来する組換え抗原から調製したＴＢＲＦ免疫ブロットストリップにより検出された。このことは、ＴＢＲＦ免疫ブロットがＴＢＲＦボレリアグループ抗体を検出したことを示す。
【００６６】
実施例２．ダニ媒介疾患が疑われる患者のＴＢＲＦ免疫ブロット臨床試験
慢性ライム病（ＣＬＤ）の症例定義に当てはまる患者の試験を行なって、試験限界の影響を評価し、及びＴＢＲＦボレリアに対する曝露レベルを特定した。結果は、全員が、Ｂ．ブルグドルフェリ種に曝露していたことも明らかにした。
【００６７】
方法
使用した方法は、実施例１及び本明細書中いずれかの箇所で記載したとおりであった。
【００６８】
抗原調製及び抗原ストリップの調製
標的抗原ＢｉｐＡ、ＧｌｐＱ、ＢｐｃＡ／ｆＨｂｐ、Ｐ４１／ＦｌａＢ、及びＶｌｐ７を検出するため、追加の組換えタンパク質は、本明細書中いずれかの箇所で記載のとおり複数のＴＢＲＦボレリア種（Ｂ．ハームシー、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．ツリカタエ、Ｂ．パルケリ、及びＢ．デュトニイ）に由来した。配列番号１～１１のアミノ酸配列を含むこれらの組換えタンパク質を、ＴＢＲＦ免疫ブロットストリップに含ませた。
【００６９】
臨床試験
合計２６５の患者血清試料を、ＴＢＲＦ免疫ブロットＩｇＭ及びＩｇＧにより試験した。これには、ＣＬＤ症候の患者９０人、及びＴＢＲＦ陰性であった患者２１２人の血清試料が含まれた。
【００７０】
慢性ライム病患者コホート（ｎ＝９０）
ＣＬＤ患者９０人の患者コホートを、ダニ媒介疾患の診断及び治療を専門とする、Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡに所在する医療機関から採用した。西部治験審査委員会（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　Ｂｏａｒｄ（ＷＩＲＢ）、Ｐｕｙａｌｌｕｐ、ＷＡ）により、無記名後向きデータ収集プロトコル及び同意書式が承認された。患者は、どちらの性別であっても、患者が少なくとも年齢１８歳であり、ＬＤに一致する筋骨格系症候、精神神経系症候、及び／又は心臓系症候の病歴を有し、データ収集に関して説明と同意の文書を提出することを条件に、本試験に認定された。対象が、６ヶ月超続く症候を持つ未処置の又は以前に処置されたＣＬＤの症例定義に当てはまる場合、その対象を本試験に含めた。これは、いずれかの箇所で詳細に記載されるとおりであった［Ｃａｍｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｅｘｐｅｒｔ　Ｒｅｖ　Ａｎｔｉ　Ｉｎｆｅｃｔ　Ｔｈｅｒ．　（２０１４）　１２：１１０３－１１３５；　Ｓｔｒｉｃｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｍ　Ｊ　Ｉｎｆｅｃｔ　Ｄｉｓ　（２０１８）　１４：１－４４］。本試験への参加に関して、患者は、文書化されたダニ咬傷又は遊走性紅斑発疹を有していることを求められなかった。なぜなら、血清学的試験は、活動性感染症ではなく曝露を検出するために用いられたからである。非特定化された患者試料を、患者の居住場所に従ってコ

ード付けした。血液を採取し、血清を、独立研究施設（ＢｉｏＲｅｆｅｒｅｎｃｅ（登録商標）、ＬａｂＣｏｒｐ（登録商標）、及びＡｎｙＬａｂＴｅｓｔＮｏｗ（登録商標）を含む）で分離し、血清試料を、免疫ブロット試験を行うためリファレンス研究施設に移送した。

【００７１】

対照患者（ｎ＝１７５）

Ｂ．ブルグドルフェリ種及びＴＢＲＦボレリア種について陰性であることが予想される合計１７５のヒト血清を、疾病管理予防センター（ＣＤＣ、Ａｔｌａｎｔａ、ＧＡ）、米国病理医協会、ニューヨーク州保険省、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ、ＮＹ、ＵＳＡ）、及びＩＧｅｎｅＸ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｍｉｌｐｉｔａｓ、ＣＡ、ＵＳＡ）から得た。ＩＧｅｎｅＸ試料は、ダニ媒介疾患のルーチン検査用に受理された血清の残部であって、この試験で使用しなければ廃棄されていたと思われる。患者血清及び対照血清の免疫ブロットＩｇＭ及びＩｇＧ試験は、検査技師により、ＴＢＲＦ患者由来の臨床試料の試験と同じ様式で、盲検式に行われた。結果を表１～２及び図２～３に示す。

【００７２】

結果

代表的な患者血清試料でのＴＢＲＦボレリアの免疫ブロット反応性を、図２に示す。これは、ＴＢＲＦ免疫ブロットが、血清試料中のＴＢＲＦボレリアグループ抗体の検出に成功していることを実証する。

【００７３】

Ｂ．ブルグドルフェリ種及びＲＦＢについて陰性であることが予想される１７５の対照血清で得られた結果は、Ｂ．ブルグドルフェリ種免疫ブロットで２．３％（４／１７５試料）及びＲＦＢ免疫ブロットで２．９％（５／１７５試料）という偽陽性率をもたらした（表１）。ＲＦＢの試験偽陽性は、アレルギー患者血清（１つの対照）、多発性硬化症（１つの対照）、ウイルス感染（１つの対照）、及び梅毒（２つの対照）で見られた。

【００７４】

配列番号１～１１を含む実施例１に記載のＴＢＲＦ免疫ブロットを用いることで、ＣＬＤ症例定義に当てはまる患者の試験から、全員が、Ｂ．ブルグドルフェリ種に曝露しており、６２％はＴＢＲＦ種に曝露していたことが明らかとなった。ＣＬＤコホートにおいて（表２）、免疫ブロット試験から、ＬＤが疑われる対象９０人のうち、合計４８人の患者（５３％）は、ＴＢＲＦについてのみ血清反応陽性であり、８人の患者（９％）は、ＴＢＲＦボレリア種とＢ．ブルグドルフェリ種に混合感染していた。図２は、代表的な患者血清試料のＴＢＲＦ免疫ブロットを示す。陽性免疫ブロットを、１種又は複数のＲＦＢ種に対する抗体の存在について更に特性分析し、１種より多いＲＦＢ種に感染している例を同定した（表２）。対照血清の免疫ブロット試験から、ＴＢＲＦアッセイに関して９７．１％という優れた特異性が実証された（表２）。図３に示すとおり、配列番号１～１１の様々な組み合わせが患者血清試料で同定された。このことから、包括的試験には、複数種由来の抗原が必要とされることが実証された。

【００７５】

これらの結果は、ボレリア・ブルグドルフェリ抗原について試験するだけでは見逃されてしまうと思われる慢性ライム病症候を持つ患者を、ＴＢＲＦボレリア種に対する抗体の検出がどのようにして同定したかについて解説した。これらの結果は、ＴＢＲＦボレリア曝露の血清型構成が複雑であることも裏付けたものであり、それにより、ＴＢＲＦ試験における包括性、すなわち複数のＴＢＲＦ種由来の抗原を同時試験することの威力及び重要性を示すものである。

【００７６】

【表１－１】

表１．Ｂ．ブルグドルフェリ種及びＲＦＢ種の免疫ブロットの特異性を特定するための基準ヒト血清

原料	特徴	血清の合計数	Ｂｂｓｌ免疫ブロット（＋）	ＲＦＢ免疫ブロット（＋）
ＣＤＣ基準セット（ｎ＝２５）	線維筋痛症	2	0	0
	健康、風土病あり	7	1	0
	健康、風土病なし	6	0	0
	単核球症	2	0	0
	多発性硬化症	2	0	1
	関節リウマチ	2	0	0
	重篤な歯肉炎	2	0	0
	梅毒	2	0	1
ＣＡＰ及びＮＹＳＨＤ（ｎ＝４２）自己免疫性及びアレルギー	自己免疫性			
	ＡＮＡ（＋）	3	2	0
	ＡＮＡ（－）	2	0	0
	ＤＮＡ（＋）	1	0	0
	リウマチ因子（＋）	9	0	0
	リウマチ因子（－）	8	0	0
	アレルギー（ｎ＝１９）			
	ＩｇＧ（＋）	１３	0	1
	特異的ＩｇＥ（＋）	4	0	0
	特異的ＩｇＥ（－）	2	0	0
ＮＹＢ（ｎ＝２１）ウイルス及びＲＰＲ（＋）	エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）	4	1	0
	ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）	4	0	0
	サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）	5	0	1
	Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）	0	0	0
	ＲＰＲ（＋）	8	2	1
ＩＧｅｎｅＸ（ｎ＝８７）	バルトネラ・ヘンセラエ（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｈｅｎｓｅｌａｅ）感染症	7	0	0

【表１－２】

	ヒト顆粒球性アナプラズマ症	１６	０	０
	バベシア・ミクロチ（Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ）感染症	１４	０	０
	バベシア・ジュンカニ（Ｂａｂｅｓｉａ ｄｕｎｃａｎｉ）感染症	４１	０	０
	ヒト単核球エールリヒア症	５	０	０
	陰性対照	４	０	０
偽陽性		１７５	４	５
特異性			９７．７％	９７．１％

ＡＮＡ－抗核抗体；ＣＡＰ－米国病理医協会；ＣＤＣ－疾病管理センター；ＮＹＢ－Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ、Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ、ＮＹ；ＮＹＳＨ－ニューヨーク州保険省；ＲＦ－リウマチ因子；ＲＰＲ－梅毒の血漿レアギン迅速試験

【００７７】

【表２】

表２．グループ１（Ｂ．ブルグドルフェリ種)、グループ２（ＲＦＢ種)、又は両方に含まれる対象の血清反応性のまとめ

免疫ブロット	合計
グループ１　Ｂｂｓｌ陽性	４２
グループ２　ＲＦＢ陽性	５６
グループ１及びグループ２二重陽性	８
グループ２　ＲＦＢ陽性試料	４８（５３％）
ＲＦＢ単独	２５
Ｂ．ハームシー単独	７
Ｂ．ミヤモトイ単独	４
Ｂ．ツリカタエ単独	８
Ｂ．ツルシカ単独	２
Ｂ．ハームシー＋Ｂ．ツルシカ	１
Ｂ．ハームシー＋Ｂ．ミヤモトイ	１
グループ１及びグループ２二重	８（９％）
Ｂｂ＋ＲＦＢ	２
Ｂｂ＋Ｂ．ハームシー	１
Ｂ．カリフォルニエンシス＋ＲＦＢ	２
Ｂ．スピエルマニイ（ｓｐｉｅｌｍａｎｉｉ）＋ＲＦＢ	１
Ｂ．アフゼリイ（ａｆｚｅｌｉｉ）／ガリニイ（ｇａｒｉｎｉｉ）＋ＲＦＢ	１
Ｂ．アフゼリイ／ガリニイ＋Ｂ．ツリカタエ	１
合計症例数	５６

【００７８】

実施例１～２の考察

ＴＢＲＦは、世界中で見つかり、特に原因不明の発熱症例に関して、罹患率及び死亡率の大きな原因である。分子試験の進歩は、ヒト検体におけるボレリア種の幅広い同定をもたらしてきたが、その結果、ＲＦＢ感染症の地理的分布及び有病率に関する支配的な考えに異議が唱えられている。ＲＦＢは、米国西部、中央アメリカ、及び南アメリカにおいて増大しつつある懸念であるが、ＴＢＲＦは、米国では全国的に報告義務はなく、標準の症例定義が存在しない。２０１１年に、ＴＢＲＦは、西部の１２州で報告が義務づけられ、症例数は５０４であった。報告された症例のうち７０％は、３つの州に含まれていた：カリフォルニア州（３３％）、ワシントン州（２５％）、及びコロラド州（１１％）である

。米国において、病原となる種には、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．ハームシー、Ｂ．ロネスタリ、Ｂ．パルケリ、Ｂ．ツリカタエ、及びＢ．マツォッティイ（ｍａｚｚｏｔｉｉ）が含まれる。米国における大部分の症例は、オルニソドラス・ヘルムシ（Ｏｒｎｉｔｈｏｄｏｒｏｓ　ｈｅｒｍｓｉ）マダニにより伝播するＢ．ハームシーによるものであるが、Ｂ．ミヤモトイ、Ｂ．ハームシー、及びＢ．パルケリのヒト感染が、カリフォルニアで報告されており、ヒト感染は確認されていないものの、マダニにおいてＢ．コリアセアエ（ｃｏｒｉａｃｅａｅ）が検出された［Ｆｅｓｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　８（２）：　９７－１１２　（２０２０）］。

【００７９】

ボレリアスピロヘータの遺伝子多様性、並びに感染症を引き起こす生物と同じぐらい多様である感染症症候は、ボレリア関連疾患の診断を困難なものにしている。まとめると、ＴＢＲＦボレリアへの曝露が懸念の原因であり、ＴＢＲＦボレリアは、広義のＢ．ブルゴドルフェリ種の血清反応陰性である患者のライム病症候を説明できる。本明細書中示すとおり、一部の患者で、Ｂ．ブルゴドルフェリ種及びＴＢＲＦ種両方に対する二重曝露を実証することができるが、このことは、診断及び治療を更に複雑にするものである。本発明の方法及び組成物を用いたＲＦＢ種の免疫ブロット試験は、多様なＴＢＲＦボレリア血清型のグループの検出を可能にし、病原性ボレリアに対するヒト曝露についてのより深い理解をもたらす。

【００８０】

等価物

本発明の複数の実施形態を、本明細書中、記載及び解説してきたものの、当業者なら、本明細書中記載される、機能を実行するための及び／又は結果及び／又は１つ又は複数の利点を得るための、様々な他の手段及び／又は構造を、すぐに企図するだろうし、そのような改変及び／又は修飾はそれぞれが、本発明の範囲内にあると見なされる。より一般的には、当業者なら、本明細書中記載される全てのパラメーター、寸法、材料、及び構成が、例示を意味していること、及び現実のパラメーター、寸法、材料、及び／又は構成が、本発明の教示を利用する具体的応用（単数又は複数）に依存することになることを、すぐに認めるだろう。当業者なら、本明細書中記載される本発明の具体的実施形態の等価物を数多く、認識するだろう、又は常用実験にすぎないものを用いて確定することができるだろう。したがって、当然のことながら、上記実施形態は、例としてのみ、提示されるものであり、添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物の範囲内において、本発明は、具体的に記載されるとおり及び特許請求されるとおり以外のやり方で実施することができる。本発明は、本明細書中記載される個別の特長、システム、物品、材料、及び／又は方法のそれぞれに関する。また、そのような特長、システム、物品、材料、及び／又は方法が、相互に矛盾するのではない場合、そのような特長、システム、物品、材料、及び／又は方法の２つ以上の任意の組み合わせが、本発明の範囲内に含まれる。

【００８１】

本明細書中定義及び使用されるとおりの全ての定義は、定義される用語の、辞書での定義、参照として援用される文書での定義、及び／又は通常の意味よりも優先されると解釈されなければならない。

【００８２】

不定冠詞の「ａ」及び「ａｎ」は、明細書及び特許請求の範囲において本明細書中使用される場合、明確に否定が示されない限り、「少なくとも１つ」を意味すると解釈されなければならない。「及び／又は」という語句は、明細書及び特許請求の範囲において本明細書中使用される場合、そのように結合されている要素の「いずれか又は両方」、すなわち、複数の要素が、ある場合には共同して存在し、別の場合には分離して存在することを意味すると解釈されなければならない。「及び／又は」節により具体的に特定される要素以外の他の要素は、明確に否定が示されない限り、そのような具体的に特定される要素に関連するか否かに関わらず、任意選択で存在することができる。

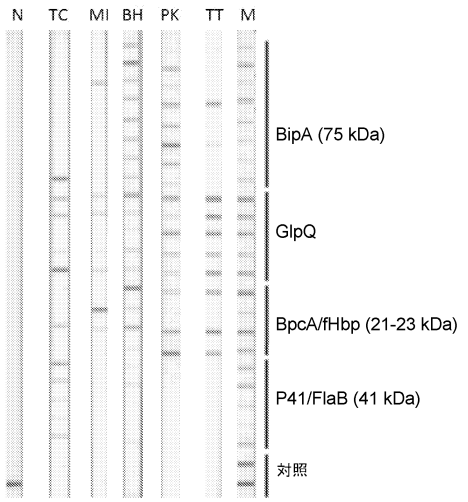
【００８３】

本出願において引用又は言及される全ての参照、特許、及び特許出願、並びに刊行物は、本明細書中そのまま全体が参照として援用される。

【図面】

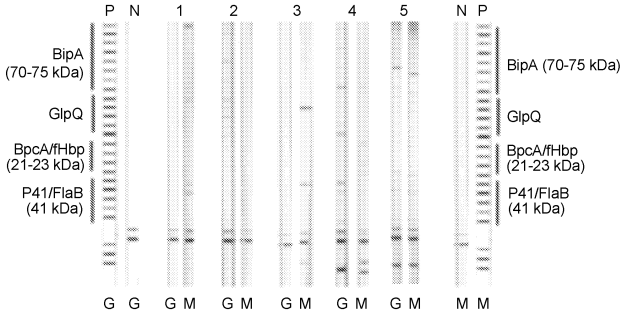
【図１】

図1



【図２】

図２



【図３】

図３

TBRF IgM及びIgGブロット－患者血清試料での成績

TBRF免疫ブロットIgM														TBRF免疫ブロットIgG												
抗原	Bip A (70-75kDa)				GlpQ			BpcA/fHbp			P41/FlaB		Vlp7	結果	抗原	Bip A (70-75kDa)				GlpQ			BpcA/fHbp			P41/FlaB		Vlp7	結果
配列番号	2	5	6	11	7	10	3	8	4	9	1				配列番号	2	5	6	11	7	10	3	8	4	9	1	
試料番号	Tt-2	Pk-1	Pk-2	Mia	Pk	Du	Tt	Pk	Tt	Pk	Bh				試料番号	Tt-2	Pk-1	Pk-2	Mia	Pk	Du	Tt	Pk	Tt	Pk	Bh		
1													陰性		1									I	I			陰性
2	陽性	陽性	陽性			陽性							陽性		2													陰性
3				I									陰性		3		陽性											陰性
4											陽性		陽性		4				I							I		陰性
5	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性		陽性		陽性	I	陽性		陽性		5	I					陽性			I	I			陰性
6						I		陽性							6													陰性
7						陽性				陽性					7					陽性			陽性					陰性
8															8	陽性												陰性
9															9								陽性					陰性
10			陽性												10								I					陰性

【配列表】

<u>20245054380000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/12229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - G01N 33/00; G01N 33/53; G01N 33/554 (see supplemental sheet)

CPC - C07K 16/18; G01N 33/5436; G01N 33/543; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/58; G01N 33/56911; C07K 2319/40; C07K 2319/00; C07K 14/195; C12N 15/00; C07K 2319/60; C07H 21/00; G01N 33/6893

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0277847 A1 (ID-FISH TECHNOLOGIES, INC.) 12 September 2019 (12.09.2019), para [0002], [0005], [0010], [0011], [0012], [0013], [0014], [0015], [0016], [0046], and SEQ ID NO: 1	1-9
A	FESLER et al., Lyme Disease: Diversity of Borrelia Species in California and Mexico Detected Using a Novel Immunoblot Assay. Healthcare (Basel). 2020, Vol. 8(2): 97. Epub 2020 Apr 14. PDF File: pg 1-16. Entire documentation especially Abstract; pg 3, last para; pg 4, para 2, and last para; and pg 9-12, Table 1	1-9
A	LIU et al., Pilot Study of Immunoblots with Recombinant Borrelia burgdorferi Antigens for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease. Healthcare (Basel). 2018, Vol. 6(3): 99. PDF File: pg 1-15. Entire documentation especially Abstract; pg 2, para 3; and pg 8, Table 2	1-9
A	US 2020/0255889 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 13 August 2020 (13.08.2020), para [0004], [0006], [0010], [0012], and [0019]	1-9
A	SHAH et al., Line Immunoblot Assay for Tick-Borne Relapsing Fever and Findings in Patient Sera from Australia, Ukraine and the USA. Healthcare (Basel). 2019, Vol. 7(4): 121. PDF File: pg 1-17. Entire documentation especially Abstract	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
08 April 2022	MAY 11 2022
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. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/12229

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/12229

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.: 13-14
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups I+, claims 1-9, directed to a composition comprising one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences, wherein the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences comprise amino acid sequences; or a method for detecting antibodies resulting from infection by one or more members of Relapsing Fever (TBRF) Borrelia genus, comprising mixing the biological sample with one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences. The one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences will be searched to the extent that the one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences encompasses SEQ ID NO: 1. It is believed that claims 1 (in part) and 2-9 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences encompasses SEQ ID NO: 1.

**********Continued in the extra sheet**********

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.:
1 (in part) and 2-9, limited to SEQ ID NO: 1

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/12229

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of Groups I+)
Additional the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences encompasses SEQ ID NO: 2 [claims 1 (in part), (2-9)].

Group II, claims 10-12, directed to a vector.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Feature
Groups I+ includes the special technical feature of one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences, not required by Group II.

Group II includes the special technical feature of a vector comprising a nucleic acid sequence, not required by Groups I+.

Among Groups I+, each SEQ ID NO represents a structurally different protein sequence.

Common Technical Features
The inventions of Groups I+ and Group II share the technical feature of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1; and
--the inventions of Groups I+ further share the technical feature of a composition comprising one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences, wherein the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences comprise amino acid sequences specified (part of claim 1); and
--a method for detecting antibodies resulting from infection by one or more members of Relapsing Fever (TBRF) Borrelia genus, wherein the genus comprises B. hermsii, B. Turicatae, B. miyamotoi, B. duttonii, and B. parker', if present in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), said method comprising: providing a biological sample obtained from a subject suspected of having TBRF; mixing the biological sample with one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences of Claim 1; and detecting a positive immunobinding reaction which indicates the presence of TBRF specific antibodies in the sample (claim 4; for claims 4-9 of Groups 1+).

Therefore, the common technical features shared by Inventions of Groups I+ and Group II can be covered by:

A composition comprising one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences, wherein the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences comprise amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1 (part of claim 1); and
--a method for detecting antibodies resulting from infection by one or more members of Relapsing Fever (TBRF) Borrelia genus, wherein the genus comprises B. hermsii, B. Turicatae, B. miyamotoi, B. duttonii, and B. parker', if present in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), said method comprising: providing a biological sample obtained from a subject suspected of having TBRF; mixing the biological sample with one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences; and detecting a positive immunobinding reaction which indicates the presence of TBRF specific antibodies in the sample (claim 4).

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2019/0277847 A1 to ID-FISH TECHNOLOGIES, INC. (hereinafter 'ID-Fish') as follows:

ID-Fish discloses a composition comprising one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences (para [0010] - 'a composition comprising one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences'),
--wherein the one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences comprise amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1 (para [0010] - 'a composition comprising one or more labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences, said amino acid sequences consisting of SEQ ID NO: 1', wherein SEQ ID NO: 1 is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 1).

ID-Fish further discloses a method for detecting antibodies resulting from infection by one or more members of Relapsing Fever (TBRF) Borrelia genus (para [0013] - 'detecting Borrelia antisera in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF)', wherein 'antisera' are 'antibodies'; Abstract - 'the detection and identification of Tick-Borne Relapsing Fever Borrelia sp. antibodies'),
--wherein the genus is selected from the group consisting of comprises B. hermsii, B. turicatae, B. miyamotoi, and B. parkeri, if present in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF) (para [0013] - 'detecting Borrelia antisera in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF)'; para [0002] - 'Borrelia bacteria that cause TBRF are typically transmitted to humans through the bite of infected "soft ticks" of the genus Ornithodorus'; para [0005] - 'Borrelia species that cause TBRF,... specific species of ticks... B. Hermsii ...B. parkerii by O. parkeri ticks, and B. Turicatae ... Each tick species has a preferred habitat and preferred set of hosts'; para [0016] - 'detecting and distinguishing various species of Borrelia in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF),... B. Hermsii, ... B. miyamotoi in the subject; ...detection of B. turicatae in the sample'), said method comprising:

**********Continued in the next extra sheet**********

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/12229

Continuation of:
The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

--providing a biological sample obtained from a subject suspected of having TBRF (para [0013] - 'detecting Borrelia antisera in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), ...providing a biological sample obtained from a subject suspected of having TBRF'; para [0016] - 'detecting and distinguishing various species of Borrelia in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), ... providing a biological sample obtained from a subject suspected of having TBRF');
--mixing the biological sample with one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences (para [0013] - 'detecting Borrelia antisera in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), ... providing a biological sample obtained from a subject ... mixing the biological sample with one or more of the labeled, tagged and/or bound amino acid sequences of the present invention'; para [0016] - 'detecting and distinguishing various species of Borrelia in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), ... providing a biological sample ... mixing the biological sample with one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences of the present invention"); and
--detecting a positive immunobinding reaction which indicates the presence of TBRF specific antibodies in the sample (para [0013] - 'detecting Borrelia antisera in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), ...providing a biological sample ... mixing the biological sample with one or more of the labeled, tagged and/or bound amino acid sequences ... detecting a positive immunobinding reaction which indicates the presence of TBRF antisera in the sample'; para [0014] - 'a sample is considered positive for TBRF if at least one amino acid sequences is detected'; para [0016] - 'detecting and distinguishing various species of Borrelia in a sample from a subject suspected of having tick-borne relapsing fever (TBRF), ... providing a biological sample obtained from a subject suspected of having TBRF, mixing the biological sample with one or more of the labeled and/or tagged and/or bound amino acid sequences of the present invention and detecting a positive immunobinding reaction which indicates the presence of Borrelia in the subject, wherein detection of SEQ ID NO: 1, ... indicates the presence of B. hermsii, in the subject').

Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4: Claims 13-14 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

Note:

I) Each of Claims 1 and 10 is partially omnibus type claim, and is not drafted in accordance with PCT Rule 6.2(a). Each of the claims is partially indefinite as it is unclear what is included or excluded with the limitation "variants thereof which retain the immunological binding profile of Fig. 3", because Fig 3 shows each different SEQ ID NOs is associated with different profiles, and it is impossible for this ISR to test each sequence with unknown serum samples. For the purposes of this ISR, the limitation "and variants thereof which retain the immunological binding profile of Fig. 3" is removed from each of claims 1 and 10.

II) Claim 4 is using an improper Markush group. For the purposes of this ISR, the limitation "the genus comprises B. hermsii, B. turicatae, B. miyamotoi, B. duttonii, and B. parkeri" in claim 4 is assumed to read as "the genus is selected from the group consisting of B. hermsii, B. turicatae, B. miyamotoi, B. duttonii, and B. Parkeri".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/12229

Continuation of:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00; C12N 15/00; C07K 16/00; C07H 21/04 (2022.01)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/195	*(2006.01)*	G01N	33/545	A	
C07K 17/08	*(2006.01)*	G01N	33/543	545A	
C07K 17/10	*(2006.01)*	C07K	14/195		
C12N 1/21	*(2006.01)*	C07K	17/08		
C07K 16/12	*(2006.01)*	C07K	17/10		
		C12N	1/21		
		C07K	16/12		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ
７

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA46
4H045 AA10 AA11 AA30 BA70 BA71 CA11 CA40 DA75 DA86 DA89