

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-539032

(P2013-539032A)

(43) 公表日 平成25年10月17日 (2013. 10. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	4 H O 4 5
CO 7 K 16/12 (2006.01)	CO 7 K 16/12 Z N A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-530408 (P2013-530408)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月27日 (2011. 9. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月15日 (2013. 5. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/053359
 (87) 国際公開番号 W02012/047607
 (87) 国際公開日 平成24年4月12日 (2012. 4. 12)
 (31) 優先権主張番号 61/386, 694
 (32) 優先日 平成22年9月27日 (2010. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511040838
 コーネル ユニバーシティ
 CORNELL UNIVERSITY
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 148
 50、イサカ、スイート 310、パイン
 ツリー ロード 395、コーネル セ
 ンター フォー テクノロジー、エンター
 プライズ アンド コマーシャライゼーショ
 ン
 (74) 代理人 110000475
 特許業務法人みのり特許事務所
 (72) 発明者 ヴァグナー、ベッティーナ
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 148
 50、イサカ、ウエスト ジャージー ヒ
 ル ロード 180

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ライム病の診断方法

(57) 【要約】

哺乳類においてライム病の状態を診断するための方法を提供する。前記方法は、哺乳類から得られたあるいは派生した生体サンプルにおいて、ライム病菌 (*B. burgdorferi*) 細胞表層タンパク質 (Osp) OspA、OspC および OspF に対する抗体を測定することを伴う。前記 OspA、OspC および OspF 抗体の測定に基づいて、前記哺乳類が、ワクチン接種を受けているか、ワクチン接種を受けていないか、ライム病菌に感染しているかあるいは感染していないか診断できる。初期、中期あるいは慢性のライム病に罹患している哺乳類を特定することも可能である。前記方法は、特に馬および犬での使用に適している。単離されたあるいは組換えライム病菌抗原およびそれらを含む組成物も提供される。

【選択図】 図 7

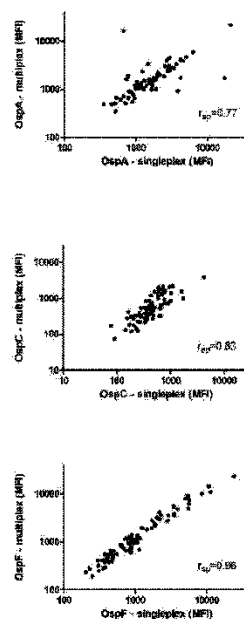


Figure 7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳類におけるライム病の状態を診断するための方法であって、

哺乳類から得られたあるいは派生した生体サンプルにおいて、ライム病菌(*B.burgdorferi*)細胞表層タンパク質(Osp) OspA、OspCおよびOspFに対する抗体の有無を決定し、前記抗体の有無に基づいて、前記哺乳類がライム病菌に感染しているか感染していないかを特定することを含む方法。

【請求項 2】

前記哺乳類が馬または犬である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記方法において測定されるライム病菌抗原に対する抗体が、ライム病菌OspA、OspCおよびOspFに対する抗体だけである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記OspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体の非存在の決定によって、前記哺乳類がライム病菌に感染していないことを特定する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体の有無の決定に基づいて、前記動物が初期、中期あるいは慢性のライム病に罹患していることを判定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体の有無の決定に基づいて、前記哺乳類がライム病に対するワクチン接種を受けているかどうかを判定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗体の有無の決定が、側方流装置を使用して決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体の有無の決定が、蛍光ビーズ-ベースのマルチプレックス解析を使用して決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

哺乳類におけるライム病の状態を診断するための方法であって、哺乳類から得られたあるいは派生した生体サンプルにおいて、ライム病菌(*B.burgdorferi*)細胞表層タンパク質(Osp) OspA、OspCおよびOspFに対する抗体のテストレベルを測定し、前記OspA、OspCおよびOspF抗体のテストレベルと基準の比較に基づいて、前記哺乳類がライム病菌に対するワクチン接種を受けているか及び / 又は初期、中期あるいは慢性のライム病に罹患しているかを特定することを含む方法。

【請求項 10】

前記方法において測定されるライム病菌タンパク質に対する抗体が、ライム病菌OspA、OspCおよびOspFに対する抗体だけである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

OspA、OspCおよびOspFタンパク質に対する抗体の非存在の決定によって、前記哺乳類がライム病菌に感染していないことを特定する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体の有無の決定が、蛍光ビーズ-ベースのマルチプレックス解析を使用して決定される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記基準が、蛍光強度中央値の値域である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

哺乳類におけるライム病の状態を診断するための方法であって、哺乳類から得られたあるいは派生した生体サンプルにおいて、ライム病菌(*B.burgdorferi*)細胞表層タンパク質(Osp) OspA、OspCおよびOspFに特異的な抗体の有無を決定すること、および：

i) OspAに対する抗体の存在、および、OspCあるいはOspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ワクチン接種を受けているが、ライム病菌に感染していないこ

10

20

30

40

50

とを特定する；

ii) OspCに対する抗体の存在、および、OspAおよびOspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、初期のライム病を有することを特定する；

iii) OspFに対する抗体の存在、および、OspAおよびOspCに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、慢性のライム病を有することを特定する；

iv) OspAおよびOspCに対する抗体の存在、および、OspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、初期のライム病を有することを特定する；

v) OspAおよびOspFに対する抗体の存在、および、OspCに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、慢性のライム病を有することを特定する；

vi) OspCおよびOspFに対する抗体の存在、および、OspAに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、中期のライム病を有することを特定する；または

vii) OspC、OspFおよびOspAに対する抗体の存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、中期のライム病を有することを特定する；
ことを含む方法。

【請求項 15】

配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19 の配列を含む単離されたタンパク質、あるいは前記タンパク質の組み合わせを含む組成物。

【請求項 16】

配列番号 15、配列番号 16 および配列番号 17 を含むタンパク質の組み合わせを含む、請求項 15 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、ライム病の診断に関し、より具体的には、ウマ科の動物やイヌ科の動物等の哺乳類におけるライム病の様々な段階の判定に関する。

【背景技術】

【0002】

ライム病は、広義のライム病菌(*Borrelia burgdorferi*)グループのスピロヘータによる感染によって起こる。それは、ヒト、犬、馬および他の哺乳類種を侵す人獣共通感染症である。前記バクテリアは、感染したマダニ(*Ixodes* spp.)によって哺乳類宿主に伝染する。ライム病は、米国、欧州およびアジアにおける最も一般的なベクター媒介疾患である。米国では、*B. burgdorferi* 狭義株が存在するが、欧州およびアジアでは、前記疾患はボレリア・ガリニ(*B. garinii*)およびボレリア・アフゼリ(*B. afzelii*)によって一般に起こる。ライム病診断のための現在の方法では、一般に、前記病原体に接触して発症のリスクのある犬および馬を確認するために、全ライム病菌溶解物に対するあるいはスピロヘータの個々の抗原に対する血清抗体が分析される。犬および馬において、ライム病菌に対する血清抗体の検出は、不十分な手段であるが、それにもかかわらず今なおヒトのライム病診断法のゴールド・スタンダードと考えられているELISAおよびそれに続くウエスタンブロット法(WB)によって行われる。いくつかのテストが利用できるが(犬および馬のライム病菌の可変表面抗原VlsEの不変ドメインIR6を検出するスナップテスト等)、それらは望ましいレベルの感度を有さず、疾患の様々な段階を見分けることができない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

したがって、哺乳類(馬および犬を含むが必ずしもそれらに限定されない)におけるライム病診断の改善された方法に対する継続した且つ満たされていないニーズが存在する。本発明は、これらおよび他のニーズを満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 4 】

本発明は、哺乳類においてライム病の状態を診断する方法を提供する。前記方法は、哺乳類から得られたまたは哺乳類から派生した(哺乳類に由来する)生体サンプルにおいて、ライム病菌(*B. burgdorferi*)細胞表面タンパク質(outer surface protein: Osp) OspA、OspC、およびOspFに対する抗体の有無を決定(測定)し、前記抗体の有無に基づいて、前記哺乳類がライム病菌に感染しているか否かを特定(同定)することを含む。前記方法は、前記動物がライム病菌に対するワクチン接種を受けたかどうかを判定することを含む。前記方法は、前記抗体の有無の決定に基づいて、ライム病の様々な段階、すなわち初期、中期あるいは慢性のライム病(ボレリア・ブルグドルフェリ感染症)を判別することを可能にする。一実施形態において、前記哺乳類は、OspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体の非存在の決定によって、ライム病菌に感染していないことが確認される。一実施形態において、前記方法において測定されるライム病菌抗原に対する抗体は、ライム病菌 OspA、OspCおよびOspFに対する抗体のみである。

【 0 0 0 5 】

前記方法は、適切なシステムまたは装置を使用して、前記抗体の有無を決定するのに適している。様々な実施形態において、前記抗体は、側方流装置(lateral flow device)または蛍光ビーズ-ベースのマルチプレックス解析(fluorescent bead-based multiplex assay)を使用して測定される。

【 0 0 0 6 】

本発明は、ライム病菌OspA、OspCおよびOspFに対する抗体のテストレベルを測定(決定)すること、および前記OspA、OspCおよびOspF抗体のテストレベルと基準との比較に基づき、前記哺乳類がライム病菌に対するワクチン接種(予防接種)を受けたか及び/又は初期、中期あるいは慢性のライム病に罹患しているかを特定することを含む。一実施形態において、前記基準は、蛍光強度中央値の値域である。

【 0 0 0 7 】

本発明の特定の態様において、前記方法は以下の工程を含む：

- i) OspAに対する抗体の存在の決定、および、OspCあるいはOspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ワクチン接種を受けているが、ライム病菌に感染していないことを確認する
- ii) OspCに対する抗体の存在の決定、および、OspAおよびOspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、初期のライム病を有することを確認する
- iii) OspFに対する抗体の存在の決定、および、OspAおよびOspCに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、慢性のライム病を有することを確認する
- iv) OspAおよびOspCに対する抗体の存在の決定、および、OspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、初期のライム病を有することを確認する
- v) OspAおよびOspFに対する抗体の存在の決定、および、OspCに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、慢性のライム病を有することを確認する
- vi) OspCおよびOspFに対する抗体の存在の決定、および、OspAに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、中期のライム病を有することを確認する、または、
- vii) OspC、OspFおよびOspAに対する抗体の存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、中期のライム病を有することを確認する

【 0 0 0 8 】

ライム病タンパク質を含む新規の単離されたタンパク質およびそれらをコードする単離された核酸を含む組成物およびキットも含まれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 9 】

【 図 1 】精製組換えライム病菌OspA(A)、OspC(B)およびOspF(C)タンパク質および免疫ブロット法によるワクチン接種したあるいは感染した犬の血清を使用した検出を示す。左バ

ネル：組換えタンパク質は、還元条件下15% SDS-PAGEによって分離され、クーマシーブリリアントブルー(Coomassie Brilliant Blue)で染色された(1 = 分子量マーカー；2 = 精製組換えライム病菌タンパク質)。右パネル：前記タンパク質はその後WBによってフッ化ボリビニリデン (PVDF)膜に転写され、従来の全ライム病菌細胞溶解物WBにてプレテストされたイヌ血清とともにインキュベートされた(3 = 陽性血清；4 = 陰性血清)。

【図2】ライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原に対する血清抗体の分析のためのシングルプレックス(single bead analysis)およびマルチプレックス解析結果の相関関係。計79のイヌ血清が比較のために使用された。データは、表3で決定された陰性(白丸)、曖昧(灰色の丸)および陽性(黒丸)の解釈範囲に従って、色分けされた。スピアマンの順位相関が、抗原のそれぞれに対し計算された。MFI = 蛍光強度中央値

【図3】イヌ血清中のライム病菌に対する抗体検出のための従来のWBを示す。全ライム病菌細胞溶解物は、還元条件下12% SDSゲル上で分離された。前記タンパク質はWBによって転写された。プロット膜は5%のミルクでブロックされ、その後異なるイヌ血清とともにインキュベートされた。ペルオキシダーゼ抱合-抗イヌ免疫グロブリン抗体(二次抗体)が検出のために使用され、その後発色基質が続いた。レーン1 = 分子量マーカー；レーン2 = 感染した犬の血清；レーン3 = ワクチン接種された犬の血清；レーン4 = 陰性のイヌ血清。細い矢印は、22, 28, 29, 30および39 kDaの感染の指標となるタンパク質をそれぞれ指し示す。太い矢印は、犬のワクチン接種を確認する31 kDaのタンパク質を示す。

【図4】ライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原のWB結果(全細菌溶解物)およびマルチプレックス解析の比較を示す。計188のイヌ血清が、WBによってテストされ、各抗原に対しWB陰性(neg)あるいはWB陽性(pos)として分類された。WBnegおよびWBpos群のマルチプレックス解析結果は、マンホイットニー検定を使用して比較された。MFI = 蛍光強度中央値

【図5】マルチプレックス解析によるライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原に対する血清抗体の検出用受信者動作曲線(ROC)を示す。マルチプレックス解析結果は、各抗原について、WBによって検出された対応するライム病菌タンパク質に対する血清抗体の有無と比較された。188のイヌ血清サンプルから得られた結果は、各ROC曲線と比較された。曲線(bold line)の下エリアは、OspAでは0.93、OspCでは0.82、OspFでは0.89である。点による曲線は、95%信頼区間を示す(太い線[bold line]を示す：太い線を囲む2つの線 = 点線)。

【図6】ウエスタンブロット法によるライム病菌タンパク質の検出のためのウマ血清中の抗体分析を示す。ライム病菌の全細胞溶解物は、SDS-PAGEによって分離され、タンパク質はウエスタンブロット法によってニトロセルロース膜に転写された。レーン(1)は分子量マーカーを示す。残りのレーンは、ライム病菌に感染した馬の血清(2)、非感染馬の血清(3)、あるいはライム病に対するワクチン接種を受けた馬の血清(4)で染色された。感染およびワクチン接種馬から得られた血清は、特徴的な検出パターンを示す。OspAはワクチン接種された馬のためのマーカーと見なされるが、OspC、OspF、並びに28、30および39 kDaの抗原に対する抗体は、感染の指標である。

【図7】81のウマ血清サンプル中で検出されたライム病菌のOspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体のためのシングルプレックスおよびマルチプレックス結果の比較を示す。マルチプレックス解析結果は、蛍光強度中央値(MFI)として表される。スピアマンの順位相関(r_{sp})は各比較のために計算された。

【図8】ライム病菌のOspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体のためのウエスタンブロット(WB)およびマルチプレックス結果(MFI)が562のウマ血清サンプルにおいて比較された。WB陰性サンプルと比べてWB陽性血清の使用により、MFI値の明確な増加が、全3つのビーズ-ベース解析(bead-based assay)で観察された(P値は<0.0001)。

【図9】ライム病菌に対する抗体の検出のためのマルチプレックス解析の一実施形態の図解である。(1)組換えライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原は蛍光ビーズに結合される。(2)サンプル(例えば、血清、CSFあるいは他の体液)が3つの蛍光ビーズ全てと同時にインキュベートされる。(3)ビオチン化抗-種特異的免疫グロブリン抗体が解析に加えられる。(4)ストレプトアビジン-フィコエリトリンがレポーター色素として添加される。前記解析は

10

20

30

40

50

その後、蛍光ビーズコードおよび個々のビーズ解析それぞれのレポーター色素を検出するマルチプレックス分析器において測定される。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、哺乳類におけるライム病の状態を診断するための方法を提供する。

一般に、前記方法は、哺乳類から得られたまたは派生した生体サンプルにおいて、ライム病菌(*B.burgdorferi*)細胞表層タンパク質(Osp) OspA、OspC、およびOspFに対する抗体を測定することを含む。OspA、OspCおよびOspF抗体の測定に基づき、前記哺乳類はライム病菌に感染しているか感染していないかを診断されることができる。様々な実施形態において、前記方法は、哺乳類がライム病菌に対するワクチン接種を受けたか及び/又は初期、中期あるいは慢性のライム病を有するかを同定することを提供する。本発明は、新規な単離されたライム病菌タンパク質およびそのフラグメントを含む組成物も提供する。

10

【0011】

本明細書で使用されるライム病の「状態(status)」は、ライム病菌 OspA、OspCおよびOspFを特異的に認識する抗体に関する哺乳類の抗体プロファイルに言及する。ライム病の状態を判定(決定)することは、前記哺乳類が以下のカテゴリーの一つに該当することの判定を含み得る；i) ライム病菌に対するワクチン接種を受けており、ライム病菌に感染していない；ii) 初期のライム病を有している；iii) 慢性のライム病を有している；iv) ライム病に対するワクチン接種を受けており、初期のライム病を有している；v) ライム病に対するワクチン接種を受けており、慢性のライム病を有している；vi) 中期のライム病を有している；vii) ライム病に対するワクチン接種を受けており、中期のライム病を有している；またはviii) ライム病菌に対するワクチン接種を受けておらず、ライム病を有していない。本明細書中で使用される「初期」感染は、2～6週間の感染を意味する。「慢性」あるいは「後期」感染は、5か月以上の感染を意味する。中期の感染は、6週～5か月の感染を意味する。

20

【0012】

本発明の方法は、哺乳類におけるライム病の状態の決定に有用である。ある特定の実施形態において、前記哺乳類はウマ科の動物、イヌ科の動物あるいはヒトである。ウマ科には、分類学的な科によるウマ科のメンバーが含まれる。ある実施形態において、本発明によって診断されるウマ科の動物は馬である。イヌ科には、分類学的な科によるイヌ科のメンバーが含まれる。ある実施形態によって、本発明によって診断されるイヌ科の動物は飼い犬等の犬である。

30

【0013】

前記方法においてテストされる生体サンプルは、抗体を含むことが予期される生体サンプルのいずれであってもよい。前記生体サンプルは好ましくは生体液体である。様々な実施形態において、前記生体サンプルは、血液、血清あるいは脳脊髄液(CSF)を含む。前記生体サンプルは、いずれかの適切な技術を用いて哺乳類から得ることができ、前記抗体の有無の決定に直接使用することができる。あるいは、前記サンプルは、生体サンプルを加工工程(血液、血清、CSFあるいはそのような生体液体の成分を単離あるいは精製するために行われる加工工程等)にかけることによって生体サンプルから得られた(生体サンプルから派生した)ものであってもよい。

40

【0014】

一般に、ライム病の状態は、表1に示すマトリクスを使用して本発明に従って確認することができる。表中において、「+」は、表示されたOsp抗原を特異的に認識する抗体の存在を意味し、「-」はそのような抗体の非存在を意味する。

【0015】

【表 1】

表1

Osp A	Osp C	Osp F	ライム病の状態
+	-	-	ワクチン接種されている
-	+	-	感染 - 初期 (2-3 週間)
-	-	+	感染 - 慢性
+	+	-	感染 - 初期 & ワクチン接種されている
+	-	+	感染 - 慢性 & ワクチン接種されている
-	+	+	感染 - 中期
+	+	+	感染 - 中期 & ワクチン接種されている
-	-	-	感染 - 無し & ワクチン接種されていない

10

【 0 0 1 6 】

以下の記述および実施例からより完全に理解されるように、表 1 に示されたマトリクスは、多数の馬および犬から得られた非常に多くの生体サンプルをテストし、検証して作成された。

【 0 0 1 7 】

20

表 1 は、本発明のいくつかの限定されない有用な態様を強調したデータの要約を説明する。例えば、OspA、OspCおよびOspFのそれぞれに対する抗体の有無が、ライム病の状態の最終的な評価を提供するのに重要であることが表 1 から明確である。特に、OspAのみに対する抗体の存在の決定(測定)は、ライム病菌感染に対する偽陽性を提供でき、また、初期および慢性の感染に対する偽陰性の結果も提供できることは明確である。同様に、OspAに対する抗体の非存在およびOspCに対する抗体の非存在のみの決定は、慢性の感染に対する偽陰性の結果をもたらす。さらに、感染していないことおよびワクチン接種されていないことの確定診断は、OspA、OspCおよびOspFのそれぞれに対する抗体の非存在を決定することによって、ライム病の他の抗体または指標を測定しなくても、行うことができる。このように、全 3 つのOspA、OspCおよびOspF抗原を対象とする抗体の状態を決定するという認識は、本発明の重要な特徴であり、従来の利用可能なテストを超える予期できない利益を提供する。これに関連し、本発明は、OspA、OspCおよびOspFのみに対する抗体を測定することによって、それゆえ他のライム病菌抗原に対する抗体を測定することなく、実施することができる。本発明の一実施形態において、BBK32タンパク質に対する抗体は測定されない。BBK32タンパク質は、米国特許公開公報20060034862号に記述されており、そのBBK32タンパク質の記述およびそのようなタンパク質を対象とする抗体の記述は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、前記方法は、OspA、OspCおよびOspFに特異的な抗体の有無(存在または非存在)を決定(測定)することによって、哺乳類におけるライム病の状態の診断を提供し、以下を含む：i) OspAに対する抗体の存在の決定、および、OspCあるいはOspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病菌に対するワクチン接種を受けているが、ライム病菌に感染していないことを確認する；ii) OspCに対する抗体の存在の決定、および、OspAおよびOspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、初期のライム病を有することを確認する；iii) OspFに対する抗体の存在の決定、および、OspAおよびOspCに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、慢性のライム病を有することを確認する；iv) OspAおよびOspCに対する抗体の存在の決定、および、OspFに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、初期のライム病を有することを確認する；v) OspAおよびOspFに対する抗体の存在の決定、および、OspCに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ラ

40

50

イム病に対するワクチン接種を受けており、慢性のライム病を有することを確認する；vi) OspCおよびOspFに対する抗体の存在の決定、および、OspAに対する抗体の非存在の決定に基づき、前記哺乳類が、中期のライム病を有することを確認する；vii) OspC、OspFおよびOspAに対する抗体の存在の決定に基づき、前記哺乳類が、ライム病に対するワクチン接種を受けており、中期のライム病を有することを確認する；またはviii) OspC、OspFおよびOspAに対する抗体の非存在に基づき、前記哺乳類が、ライム病菌に対するワクチン接種を受けておらず、ライム病を有していないことを確認する。

【0019】

本発明の様々な態様において、OspA、OspCおよびOspF抗体は、テスト抗体と考えることができる。ライム病の状態の判定のために、哺乳類から得られたまたは派生した生体サンプルから測定されたテスト抗体のレベルは、基準と比較されることができる。

10

【0020】

一実施形態において、本発明は、哺乳類から得られたまたは派生した生体サンプルにおいて、ライム病菌 OspA、OspCおよびOspFに対する抗体のテストレベルを測定(決定)すること、および前記OspA、OspCおよびOspF抗体のテストレベルと基準との比較に基づき、前記哺乳類がライム病菌に対するワクチン接種を受けたか及び/又は初期、中期あるいは慢性のライム病を有しているかを同定することを含む、哺乳類のライム病の状態を診断するための方法を提供する。

【0021】

一実施形態において、前記基準は、前記テストサンプルにおける抗体の有無を決定(判定)するために使用される。基準は、テスト抗体のレベルを推定するために使用することもできる。前記基準は、テストサンプルと同時に確立されてもよく、あらかじめ確立されても、後で確立されてもよい。

20

【0022】

一般に、基準値は、関心のあるもの(すなわち、場合によっては、抗体及び/又は抗原)の、異なるが既知の量の変数を使用することによって得られ、および当業者に既知の方法によって得ることができる。前記基準は、単一の値または範囲のある値であってもよい。例えば、基準はグラフ上の標準化曲線あるいはエリアであってもよい。ある特定の実施形態において、基準は、サンプル中の抗体が認識すると予期される既知の抗原を使用して得ることができる。前記抗原は好ましくは、テストサンプル中の抗体を測定するために使用される抗原である。一以上のレベルの前記抗原を、一以上のレベルのサンプル中に存在すると予想される抗体に暴露することによって、基準の単一値、値域、グラフ等を確立することができる。

30

【0023】

一実施形態において、前記基準は、ポジティブコントロールを含むことができる。一実施形態において、前記ポジティブコントロールは、前記テストサンプルのために使用されるのと同じプラットフォームの上または中に位置する。例えば、前記ポジティブコントロールは側方流装置上にあってもよく、その上に、異なる位置及び/又はレベルの一以上の異なる抗原も配置される。この配置は、分析されるサンプル中にテスト抗体が存在するかしないかに関係なく、テスト条件下のコントロール基準からのシグナルをもたらし、テストが正しく機能していることの確認を提供できる。前記ポジティブコントロールは、例えばヒトあるいは機械によって知覚できるシグナルを産出できる。

40

【0024】

本発明の様々な態様において、前記ライム病菌抗原に対するテスト抗体レベルの定性的または定量的な測定を提供するために、前記テスト抗体を基準と比較することができる。いずれにしても、前記基準との比較によって、テスト抗体のレベルは、本発明の方法において分析されるサンプル中に存在している、あるいは存在していないと見なされることができる。

【0025】

基準は、それがシグナルを生成しないように、あるいはそれから生成した何らかのシグ

50

ナルがバックグラウンド・シグナルと見なされるように、構成されてもよい。典型的に、これはネガティブコントロールと見なされ、前記テスト抗体が結合することが予期される特定の抗原を除くすべての反応成分を含む。あるいは、前記ネガティブコントロールは、非特異的タンパク質あるいは抗原(ウシ血清アルブミンまたは同様のもの)も含むことができる。

【 0 0 2 6 】

ある実施形態では、前記抗体のレベルは、一以上の値域を含む基準と比較される。非限定的なある実施形態では、第一の基準値範囲に分類されるテスト抗体のレベルは、前記哺乳類のライム病の状態に関し有益な(情報価値のある)テスト抗体の高いレベルを示す。第二の基準値範囲に分類されるテスト抗体のレベルは、哺乳類のライム病状態に関し同様に有益なテスト抗体の低レベル(検出不能なレベルあるいは完全な非存在を含む)を示す。第三の基準値範囲に分類されるテスト抗体のレベルは、追加テストを行う必要があることを示してもよい。

10

【 0 0 2 7 】

値域からなる基準は、例えば、初期、慢性あるいは中期のライム病と確認された、あるいはライム病に罹患していないと確認された、及び/又はライム病に対するワクチン接種を受けていないと確認された哺乳類の各グループから得られる抗体の平均レベルを測定することによって、作成できる。

【 0 0 2 8 】

何らかの適切な技術、装置、システム及び/又は試薬が、OspA、OspCおよびOspF ライム病菌抗体、及び/又はその組み合わせを検出するために使用できる。一般に、抗体を検出する方法は、固体マトリクスと物理的に結合した、OspA、OspCおよびOspFタンパク質またはそのフラグメントを使用することを含む。前記タンパク質のフラグメントは、ライム病菌に対するワクチン接種によってまたはライム病菌の感染によって哺乳類中で製造される抗体によって認識されると予期されるフラグメントである。そのようなフラグメントのアミノ酸組成は、当該技術分野の通常の技術を使用して同定することができる。前記タンパク質及び/又はフラグメントは、ライム病菌から得られ、単離されあるいは誘導されてもよく、またそれらは多種多様の従来法のいずれかを使用して組換え技術によって製造されてもよい。OspA、OspCおよびOspF ライム病菌タンパク質あるいはそれらのフラグメントが物理的に結合する前記固体マトリクスは、何らかの適切な固体マトリクスであればよい。前記固体マトリクスは、マルチウェルアッセイ・プレート、ビーズ(蛍光標識ビーズ等)、マイクロスフェア、フィルター材、側方流装置あるいはストリップ、あるいは前記タンパク質をある位置に保つのに好適で、それにより哺乳類から得られた生体サンプル中に存在するあるいは由来する抗体を捕獲し検出できる他の何らかのフォームもしくはフォーマット中に存在してもよく及び/又はその一部であってもよい。前記タンパク質は前記固体マトリクスと共有結合または非共有結合してもよい。

20

30

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、前記OspAタンパク質は、以下の配列番号 1 の配列あるいはそのフラグメントを有する：

MKKYLLGIGLI LAL IACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKV LVSKEKNKDGKYDL IATVDKLELKGTS DKNNGSGVLEGVK
ADKSKVKLT I SDDLGGTTLEVFKE DGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEK I ITRADGTRLEYTG I KSDGSGKAKE
VLKGYVLEGT LTAEKTTLVVKEGT VTL SKN I SKSGEVLVELNDTDSSAATK KTA A WNSGTSTLT I TVNSKKT KD LVFTKE
NT I TVQQYDSNGTKLEGS AVE I TKLDE I KNALK

40

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、前記OspCタンパク質は、以下の配列番号 2 の配列あるいはそのフラグメントを有する：

MKKNTLSA I LMTLFLF I SCNNSGKDGNTSANS ADES VKGPNLTE I SKK I TDSNAVLLAVKEVEALLSS I DELAKA I GKK I
KNDGSLDNEANRNESLLAGAYT I STL I TQKLSKLN GSEGLKEK I A AAKK CSEEFSTKL KDNHAQLG I QGVTDENAKKA I L
KANAAGKDKGV EEELEKLSGSLESLSKAAK EMLANSVKELTSPVVAESP KKP

50

【 0 0 3 1 】

ー実施形態において、前記OspFタンパク質は、以下の配列番号3の配列あるいはそのフラグメントを有する：

MNKKMFIIICAVFALIIISCKNYATSKDLEGAVQDLESSEQNVKKTEQEIKKQVEGFLEILETKDLNKLDTKEIEKRIQELKEKIEKLDSSKTSIETYSYEEKLKQIKEKLKGKADLEDKLGLEDKSLKKKKEERKKALEDAKKKFEEFKGQVGSATGVTTGHRAGNQGSIGAQAQQCANSGLGLGVSYSSTGTDSNELANKVIDDSIKKIDEELKNTIENNGEVKKE

【0032】

本明細書中に示された実施例に記述された分析で使用されたOspタンパク質のアミノ酸配列は新規である。特に、表2Aは、既刊のライム病菌Genbank配列との違いを示す。

【0033】

【表2】

10

表2A. 従前のライム病菌Genbank配列との相同性の程度

	OspA	OspC	OspF
プラスミド全配列	OspA/pRSET-1	OspC/pCR4-2	OspF/pCR4-5
サイズ (bp/aa)	822bp/273aa	636bp/211aa	684bp/227aa
Genbank受入番号	HM756743	HM756744	HM756745
以前の利用可能な受入番号 (from B31)	NC_001857	NC_001903	L13925
B31遺伝子サイズ (bp/aa)	同一	633bp/210aa	693bp/231aa
ヌクレオチド相同性 (%)	99.8%	85.8%	91.6%
アミノ酸相同性 (%)	99.3%	79.8%	85.3%

20

bp = 塩基対; aa アミノ酸

【0034】

【表3】

表2B. 発現のために使用した配列およびマルチプレックス解析で使用したrOspA, rOspCおよびrOspF

	OspA	OspC	OspF
全遺伝子配列に基づく発現に使用した塩基	配列番号14の1-666	配列番号16の52-636	配列番号18の178-684
順方向プライマー	OspAFBam	OspCF-Bam2	OspF-178-B
逆方向プライマー	OspARKpn	OspCR-Kpn	OspF-684-K
サイズ (bp/aa)	666bp/222aa	585bp/194aa	507bp/168aa
発現に使用したプラスミド	OspA(1A)/pQE30-2	OspC2(B/K)/pQE30-2	OspF(3A)/pQE30-1

30

40

【0035】

【表 4】

表2C. 発現クローニングのためのプライマー

	順方向	逆方向
OspA (1-666)	<u>Cgcggatcc</u> atgaaaaatatttattggg (配列番号4)	Ggcgggtac <u>ctcaag</u> ttgaagtgcctgaattcc (配列番号5)
OspC (52-636)	<u>Cgcggatcc</u> tcttgaataattcagggaaag (配列番号6)	Ggcgggtac <u>ctcaag</u> gttttttggactttctgc (配列番号7)
OspF (178-684)	<u>Cgcggatcc</u> gagacgaaagatttgaataa (配列番号8)	Ggcgggtac <u>cttatt</u> cttttttgacttctcc (配列番号9)

制限酵素部位にアンダーラインを付し、ストップコдонは強調する

【0036】

Genbank受入番号 HM756743、HM756744およびHM756745と関連する前記ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、本発明の遂行において決定され、2011年1月1日まで公的にアクセス可能にされなかった。このように、様々な実施形態においておよび表2Bで示すように、それらを対象とする抗体を捕獲するために本発明の方法で使用される前記Osp抗原は、本明細書中に記述されるOspAヌクレオチド配列の1~666ヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列(配列番号15)、及び/又はOspCヌクレオチド配列の52~636ヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列(配列番号17)、及び/又は本明細書に開示されたOspFヌクレオチド配列の178~684ヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列(配列番号19)を含む。

【0037】

様々な実施形態において、本発明は、配列番号1、配列番号2または配列番号3の配列を含む(または前記配列からなる)単離されたあるいは組換えタンパク質を含む組成物を提供する。これらのタンパク質のフラグメントも提供され、含む(またはからなる)フラグメントを含むが、それらに限定されない。前記タンパク質またはそのフラグメントは、本明細書中でさらに記述される組成物及び/又はキットの構成成分として提供されることができる。例えば、それらは、それらを特異的に認識できるライム病菌抗体の有無の決定のために使用できるシステム、装置あるいは組成物の一部として提供されることができる。一実施形態において、前記タンパク質は固体マトリクスと物理的に結合して提供されることができる。一実施形態では、前記固体マトリクスはビーズ(ミクロスフェア)である。

【0038】

限定されない例において、ライム病菌に対する抗体は、何らかの免疫検出技術(ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、スナップテスト、様々な種類のマルチプレックス抗体検出技術、あるいは関心のある抗体を検出するために適した分析の何らかの変更を含むが、必ずしもそれらに限定されない)を使用して検出でき、互いから識別できる。

【0039】

一実施形態において、OspA、OspCおよびOspF抗原は、側方流動ストリップの上にあるいは側方流動ストリップ(lateral flow strip)として構成された固体マトリクスと物理的に結合して別々の位置で提供される。哺乳類から得られたあるいは派生した生体サンプルは、ストリップ(OspA、OspCおよびOspF抗原を特異的に認識する別個の抗体の存在が、各抗原に対する抗体の有無を示す別々のシグナルを生成する)を使用して分析できる。前記抗原の全てに対する抗体の非存在は、その哺乳類がワクチン接種を受けておらず、ライム病菌に感染していないことを示す。抗体の有無は、一般に表1に示されたマトリクスとの関連で解釈される。

【0040】

一実施形態において、OspA、OspCおよびOspFに対する抗体またはそれらの組み合わせは

10

20

30

40

50

、蛍光ビーズに結合したOspA、OspCおよびOspF抗原を使用して検出される。前記蛍光ビーズは、適切な蛍光ビーズのいずれであってもよく、その例として、例えばルミネックス社から市販されているものが挙げられる。前記ビーズはそれぞれ、異なったあるいは同じ蛍光検出可能成分で標識されることができる。前記ビーズは、別個の抗原それぞれに結合したビーズが、互いに区別できるようにコード化されることができる。哺乳類から得られたあるいは派生した生体サンプル中に存在する抗体は、各ビーズタイプが結合する抗原によって、抗原-結合蛍光ビーズに結合する。検出可能標識に結合された抗-種特異的抗体は、OspA、OspCおよびOspF、あるいはそれらの組み合わせに対する抗体の有無を検出するために使用でき、その後、例えば、表1に記述したマトリクスに従ってライム病の状態を診断するために使用できる。

10

【0041】

本発明にかかる抗体を測定するためのマルチプレックス蛍光ビーズ解析のための説明に役立つ一例を図9に示す。図9から分かるように、(1)組換えライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原が蛍光ビーズに結合され；(2)サンプル(例えば、血清、CSF、もしくは他の体液)が同時に全3つの蛍光ビーズとともにインキュベートされ；(3)ビオチン化抗-種特異的免疫グロブリン抗体が前記解析に添加され；(4)ストレプトアビジン-フィコエリトリンがレポーター色素として添加される。前記解析は、その後、個々のビーズ解析用の蛍光ビーズコードとレポーター色素を検出するマルチプレックスアナライザーにて測定される。ストレプトアビジンやビオチンやそれらの誘導体等の成分および他のレポーター色素は、マルチプレックス解析において同一または類似する機能を実行できる様々な市販の置換剤(substitute agents)のいずれかで置換されることができる。

20

【0042】

蛍光ベースの抗体検出法から得られた出力データは、当業者に周知の様々な方法で表現されることができる。一実施形態において、蛍光ベースの抗体検出は、蛍光強度中央値(MFI)として提示されることができる。本発明において、我々はあるMFI値の範囲が、ライム病の状態(特にウマ科およびイヌ科の)を決定するために使用できることを特定した。本発明での使用に好適なMFI値は、表3に記述されたものを含む。

【0043】

【表5】

表3. ライム病菌OspA、OspCおよびOspFに対する抗体のための、蛍光ビーズによるマルチプレックス解析を使用した、イヌもしくはウマのサンプル用の陰性、曖昧および陽性の解釈範囲

30

ライム病菌 抗原	解釈	マルチプレックス解析範囲 (MFI)	
		イヌ	ウマ
OspA	陰性	<500	<1000
	曖昧	≥500 <1,500	≥1000-2000
	陽性	≥1,500	>2000
OspC	陰性	<250	<500
	曖昧	≥250 <1,000	≥500-1000
	陽性	≥1,000	>1000
OspF	陰性	<750	<750
	曖昧	≥750 <1,500	≥750-1250
	陽性	≥1,500	>1250

40

50

【 0 0 4 4 】

表 3 に記述される曖昧という結果は、前記サンプルを陰性または陽性に分類することができるように追加のテストを行うべきことを示している。

【 0 0 4 5 】

一実施形態において、前記方法はウマのライム病の状態を判定するために実施される。この実施形態は、ウマから得られたあるいは派生した生体サンプル中で、OspA、OspCおよびOspF抗体の有無を決定(測定)することを含む。前記抗体の有無は、なんらかの適切な技術(一実施形態では、蛍光ビーズと物理的に結合されたOspA、OspCおよびOspF抗原を含むマルチプレックス解析)を使用して決定することができる。前記OspA、OspCおよびOspF抗原は、ウマから得られたあるいは派生した生体サンプルと接触せられる。前記抗原に対する抗体が存在すれば、前記抗原に結合し、それによって、抗原/蛍光ビーズ複合体に固定化される。検出可能に標識化された抗-ウマ特異的抗体が添加され、OspA、OspCおよびOspF抗体それぞれのMFI値を作成するために、蛍光ビーズおよび前記抗-ウマ特異的抗体からの検出可能標識を検出するために、マルチプレックスアナライザーが使用される。前記抗体の有無が、表 3 に示されたウマの値に従って決定され、ライム病の状態が、表 1 に記述されたマトリクスによって決定される。同じ原理が、イヌから得られたあるいは派生した生体サンプルの分析に適用され、その際、表 3 に示されたイヌのサンプル用のMFI値が、抗体の有無を決定するために使用され、抗-ウマ特異的抗体の代わりに抗-イヌ特異的抗体が使用される。このようにして、OspA、OspCおよびOspF抗体のMFI値の測定に基づき、ウマあるいはイヌが、ライム病菌に感染しているか感染していないかが診断でき、さらに、ライム病菌に対するワクチン接種を受けているか、及び/又は初期、中期あるいは慢性のライム病を有しているかが確認できる。

【 0 0 4 6 】

様々な実施形態において、本発明は、有形的表現媒体(tangible medium)に前記抗体に関する決定を固定(保存)することをさらに含む。当該有形的表現媒体は、いかなるタイプの有形的表現媒体(例えば、DVD、CD-ROM、携帯用フラッシュメモリーデバイスなどを含むがこれらに限定されないあらゆる種類のデジタルメディア等)であってもよい。本発明は、動物の飼主、ブリーダー、及び/又は動物のヘルスケア提供者に、ライム病感染を有すると判定された哺乳類の治療のための勧告を展開するために、前記有形的表現媒体を提供することを含む。

【 0 0 4 7 】

本発明ではまた、前記抗体を測定するための装置も提供される。一実施形態において、前記装置は、固体マトリクスに物理的に結合したOspA、OspCおよびOspF抗原を含む側方流装置である。一実施形態において、前記OspA、OspCおよびOspFは、前記固体マトリクスに結合して提供される唯一のライム病菌抗原である。一実施形態において、前記装置に備えられた前記OspA、OspCおよびOspF抗原は、本明細書中に開示されたアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる。

【 0 0 4 8 】

前記抗体の有無を検出するためのキットも提供される。一実施形態において、前記キットは、固体マトリクスに物理的に結合したOspA、OspCおよびOspF抗原を含む。一実施形態において、前記OspA、OspCおよびOspFは、前記キットに備えられる唯一のライム病菌抗原である。前記キットは、前記固体マトリクスとして蛍光ビーズを含んでも良い。前記キットはさらに、前記抗原及び/又は前記ビーズを一以上の別個のバイアル中に含んでも良い。前記キットは、任意で、前記キットの使用説明書を含んでも良い。

【 0 0 4 9 】

以下の実施例は、本発明を具体的に説明することを目的とするものであり、限定を目的としない。

【 実施例 1 】

【 0 0 5 0 】

本実施例は、イヌにおけるライム病の状態の判定に関し高い有用性を示す方法の一実施

形態の説明を提供する。特に、本実施例において、我々はイヌ血清中のライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原に特異的な抗体の同時検出用の蛍光ビーズ-ベースのマルチプレックス解析の開発と検証を記述する。前記検証は、マルチプレックス解析結果を、ライム病診断の推奨確認テストであるウエスタンブロット法(WB)(例えば、www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.htm参照)と比較することによって行われた。本発明の他の利点の中で、本発明は、OspCが適切な診断マーカーではなかったと教示したイヌの過去の研究に反して、別のことをはっきり示す。特に、本実施例で示したテスト結果は、現在利用できるライム病テスト方法と比べて、イヌのライム病の状態の改良された判定を提供し、OspA、OspCおよびOspFに対する抗体を測定することによって、イヌの現在のワクチン接種および感染の状態のより良い決定を提供することができる。

10

【 0 0 5 1 】

以下の材料および方法が、本実施例で示される結果を得るために使用された。

ライム病菌遺伝子のクローニング

ライム病菌 OspA、OspCおよびOspFタンパク質が、E.coli中で発現され、マルチプレックス解析における抗原として使用された。DNAは、ニューヨークのウエストチェスター郡の森林地帯で採取された感染したシカダニ(Ixodes dammini ticks)由来のライム病菌から単離された(1993年、Appel他)。完全なOspCおよびOspF遺伝子は、Pfu DNAポリメラーゼ(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ、Stratagene社)を使用したPCRによって増幅された。OspCおよびOspFプライマーはそれぞれ、Genbank受入番号 NC_001903およびL13925からデザインされた。増幅のために使用されたプライマーのポジションが、括弧内に示される :OspC forward (1-23) 5' atgaaaaagaatacattaagtgc 3' 配列番号10 ; OspC reverse (633-607) 5' ttaagggttttttggactttctgccac 3' 配列番号11 ; OspF forward (16-44) 5' atgaataaaaaaaaaatgtttattattttgtgc 3' 配列番号12 ; およびOspF reverse (708-688) 5' ttattcttttttggactttctcc 3' 配列番号13。PCRは、前述の通り実施された(2001年、Wagner他)。PCR産物は、pCR4 TopoBluntベクター(米国、カリフォルニア州、カールズバッド、Invitrogen社)中でクローン化され、コーネル大学のバイオリソースセンター(BioResource Center)にてABI自動配列決定装置を使用して配列決定された。OspA遺伝子は、プラスミドOspA/pRSETから増幅された。前記クローン化した遺伝子の完全な翻訳領域のヌクレオチド配列は、Genbankに提出され、受入番号 HM756743(OspA)、HM756744(OspC)およびHM756745(OspF)にて受理された。

20

30

【 0 0 5 2 】

ライム病菌遺伝子の発現と精製

発現クローニングは、表 2 でも言及した以下のDNA配列に基づいて実施された。

OspA(822bp)、Genbank受入番号 HM756743

atgaaaaaatatttatttgggaataggtctaatattagccttaatagcatgtaagcaaaatgttagcagccttgacgagaa
aaacagcgttttcagtagatttgcctggtgaaatgaaagtcttctaagcaaaagaaaaaacaagacggcaagtacgatc
taattgcaacagtagacaagcttgagcttaaaaggaacttctgataaaaaacaatggatctggagtagtgaaggcgtaaaa
gctgacaaaagttaaagtaaaattaacaatttctgacgatctaggtcaaaccacacttgaagttttcaaagaagatggcaa
aacactagtatcaaaaaaagtaacttccaaagacaagtcataacagaagaaaaattcaatgaaaaaggtagaagtatctg
aaaaataataacaagagcagacggaaccagacttgaatacacaggaattaaaagcgatggatctggaaaagctaaagag
gttttaaaaggctatgttcttgaaggaactctaactgctgaaaaaacaacattgggtgggttaaagaaggaactgttacttt
aagcaaaaatatttcaaaatctggggaagttttagttgaacttaattgacactgacagtagtgcctgactaaaaaaactg
cagcttggaaattcgggcacttcaactttaacaattactgtaaacagtaaaaaaactaaagacacctgtgtttacaaaagaa
aacacaattacagtacaacaatacagactcaaatggcaccaaaattagaggggtcagcagttgaaattacaaaacttgatga
aattaaaaacgcttttaaaataa 配列番号14

40

【 0 0 5 3 】

M K K Y L L G I G L I L A L I A C K Q N V S S L D E K N S V S V D L P G E M K V
L V S K E K N K D G K Y D L I A T V D K L E L K G T S D K N N G S G V L E G V K
A D K S K V K L T I S D D L G Q T T L E V F K E D G K T L V S K K V T S K D K S
S T E E K F N E K G E V S E K I I T R A D G T R L E Y T G I K S D G S G K A K E

50

V L K G Y V L E G T L T A E K T T L V V K E G T V T L S K N I S K S G E V L V E
L N D T D S S A A T K K T A A W N S G T S T 配列番号15

【 0 0 5 4 】

OspC(636bp)、Genbank受入番号 HM756744

atgaaaaagaatacattaaagtgaatatattatgactttattttattttatatcttgtaataattcagggaaagatgggaa
tacatctgcaaatctctgctgatgagctctgttaaaggccctaattcttacagaaaataagtaaaaaaattacggatttctaag
cggttttacttgctgtgaaagaggttgaagcgttgctgtcatctatagatgagcttgctaaagctattggtaaaaaaata
aaaaacgatggtagtttagataatgaagcaaatcgcaacgagtcattgttagcaggagcttatacaatatcaaccttaat
aacacaaaaattaaagtaattaaacggatcagaaggtttaaaaggaaaagattgccgcagctaagaaatgctctgaagagt
ttagtactaaactaaaagataatcatgcacagcttggtatacaggcgcttactgatgaaaatgcaaaaaaagctatttta
aaagcaaatgcagcgggttaaagataagggcggtgaagaacttgaaaagtgtccggatcatttagaaagcttatcaaaagc
agctaaagagatgcttgctaattcagttaaagagcttacaagccctgttggtggcagaaagtccaaaaaaccttaa 配
列番号16

10

【 0 0 5 5 】

S C N N S G K D G N T S A N S A D E S V K G P N L T E I S K K I T D S N A V L L
A V K E V E A L L S S I D E L A K A I G K K I K N D G S L D N E A N R N E S L L
A G A Y T I S T L I T Q K L S K L N G S E G L K E K I A A A K K C S E E F S T K
L K D N H A Q L G I Q G V T D E N A K K A I L K A N A A G K D K G V E E L E K L
S G S L E S L S K A A K E M L A N S V K E L T S P V V A E S P K K P 配列番号17

20

【 0 0 5 6 】

OspF(684bp)、Genbank受入番号 HM756745

atgaataaaaaaatgtttattatttgtgctgtttttgcgttgataatttcttgcaagaattatgcaactagtaaagattt
agaaggggagtgcaagatttagaaaagttcagaacaaaatgtaaaaaaaacagaacaagagataaaaaaacaagttgaag
gatttttagaaaattctagagacgaaagatttgaataaatggatacaaaagagattgaaaaacgaattcaagaattaaag
gaaaaaatagaaaaattagatttcaaaaaaacttctattgaaacatatcttgagtatgaagaaaaactaaaaacaataaa
agaaaaattgaaaggaaaggcagatcttgaagataaattaaagggacttgaagatagcttaaaaaagaaaaagaggaaa
gaaaaaaagctttagaagatgctaagaagaaatttgaagagtttaaaggacaagttggatccgcgactggagtaactacc
gggcatagagctggaaatcaaggtagtattggggcacaagcttggcagtgctgaatagtttgggggttgggtgtaagtta
ttctagtagtactggtactgatagcaatgaattggcaacaaaagttatagatgattcaattaaaaagattgatgaagagc
ttaaaaaactatagaaaaataatggagaagtcaaaaaagaataa 配列番号18

30

【 0 0 5 7 】

E T K D L N K L D T K E I E K R I Q E L K E K I E K L D S K K T S I E T Y S E Y
E E K L K Q I K E K L K G K A D L E D K L K G L E D S L K K K K E E R K K A L E
D A K K K F E E F K G Q V G S A T G V T T G H R A G N Q G S I G A Q A W Q C A N
S L G L G V S Y S S S T G T D S N E L A N K V I D D S I K K I D E E L K N T I E
N N G E V K K E 配列番号19

【 0 0 5 8 】

発現クローニングのために、OspA(塩基1-666)、OspC(塩基52-636)およびOspF(上述のDN
A配列の塩基178-684)は、まずBamHI(5')およびKpnI(3')制限酵素部位を有するプライマ
ーを使用したPCRによって増幅された。前記遺伝子は、pQE-30 Xa発現ベクター(カリフォ
ルニア州、バレンシア、Qiagen社)内でクローン化され、1mMのIPTGの導入後、E.coli SG
13009細胞(カリフォルニア州、バレンシア、Qiagen社)内でHisタグタンパク質として発現
された。前記バクテリアは、100mMのリン酸ナトリウム、10mMのトリスおよび8Mの尿素を
含む、pH8の緩衝液中で溶解された。溶解物は、40mMのイミダゾール緩衝液で1:5に希釈さ
れ、前記Hisタグタンパク質は、AKTA-FPLC機器を使用するHisTrapFFカラム(両方とも、ニ
ュージャージー州、ピスカタウェイ、GE Healthcare社)を使用して精製された。タンパク
質濃度は、BCA assay(イリノイ州、ロックフォード、Pierce社)によって測定された。

40

【 0 0 5 9 】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法

SDS-PAGE、ウエスタンブロット法および免疫ブロット法(後者2つを本明細書中でWBと

50

称する)は、記述されているように行われた(2005年、Wagner他)。手短に説明すれば、2~4 µg/レーンの組換えライム病菌タンパク質は、還元条件下で15%のmini-gels(米国、カリフォルニア州、ハーキュリーズ、BioRad Laboratories社)中で分離された。ゲルが、クーマシーブリリアントブルーで染色されるか、タンパク質が免疫ブロット法用の膜(PVDF: 米国、カリフォルニア州、ハーキュリーズ、BioRad Laboratories社)に転写された。転写後、トリス緩衝液(0.1M Tris、pH 7.6、0.05%(v/v)Tween 20を含む)中の5%(w/v)ノンファット・ドライミルクを使用して、ブロッキングステップが実施された。前記膜は、その後、5%のノンファット・ドライミルクを含むトリス緩衝液で1:10に希釈されたイヌ血清とともにインキュベートされた。二次ペルオキシダーゼ結合ラビット抗-ドッグIgG(H+L)抗体(ペンシルベニア州、ウエストグローブ、Jackson ImmunoResearch Lab社)が検出のために使用された。各抗体のインキュベーション後、膜はトリス緩衝液で三回洗浄され、抗体結合が、ECL化学発光法(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ、Amersham Bioscience社)によって可視化された。さらに、マルチプレックス解析の検証のために使用された血清は全て、前述の通り、全細菌溶解物を使用した従来のライム病菌WB(1993年、Appel他)で試験された。

10

【0060】

蛍光ビーズと組換えライム病菌抗原のカップリング

精製された組換えライム病菌タンパク質それぞれ計100 µgが、蛍光ビーズ(Luminex社)にカップリング(結合)された。OspAはビーズ33に、OspCがビーズ34に、OspFはビーズ37にカップリングされた。前記カップリングは、前記ビーズ供給者であるルミネックス社(www.luminexcorp.com/uploads/data/Protein%20Protocols%20FAQs/Protein%20Coupling%20Protocol%200407%2010207.pdf参照)の推奨プロトコルに従って行われた。手短に説明すると、全手順は室温で行われた。全遠心分離ステップは、4分間14,000xgで行われた。その後、前記ビーズは20秒間、ボルテックスおよび超音波処理によって再懸濁された。活性化のために、 5×10^6 ビーズはH₂O中で一度洗浄された。ビーズは、100mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.2)80 µl中で再懸濁された。その後、10 µlのSulfo-NHS(50 mg/ml)および10 µlの1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC、50 mg/ml、いずれもイリノイ州、ロックフォード、Pierce Biotechnology社より)が添加され、20分間インキュベートされた。前記ビーズは、50mMのpH5.0の2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸(MES)で二回洗浄され、MES溶液中に再懸濁された。これらの活性化ビーズは、組換えライム病菌抗原のカップリングのために使用された。前記カップリングは、回転しながら3時間行われた。カップリング後、前記ビーズはブロッキング緩衝液[1%(w/v)のBSAと0.05%(w/v)のアジ化ナトリウムを含むPBS]中で再懸濁され、30分間インキュベートされた。前記ビーズは、0.1%(w/v)のBSA、0.02%(v/v)のTween 20および0.05%(w/v)のアジ化ナトリウムを含むPBS(PBS-T)中で3回洗浄され、カウントされ、2~8 の暗所で保管された。

20

30

【0061】

ルミネックス解析

OspA、OspCおよびOspFと結合したビーズは、それぞれ、超音波処理され、混合され、およびブロッキング緩衝液で 1×10^5 ビーズ/mlの最終濃度に希釈された。前記解析のために、マイクロタイター・ウェルあたり 5×10^3 ビーズ/各々が使用された。全イヌ血清サンプルはブロッキング緩衝液で1:600に希釈された。あらかじめテストされた、陰性、低陽性および高陽性のイヌ血清と、ブロッキング緩衝液のみでインキュベートされたビーズが、陽性および陰性コントロールとして各解析プレート上で用いられた。ミリボアマルチスクリーンHTSプレート(マサチューセッツ州、ダンバース、Millipore社)が、ELx50プレート・ウォッシャー(バーモント州、ウィヌースキ、Biotek Instruments社)を使用するPBS-Tに2分間浸漬された。前記溶液は、前記プレートから吸引され、50 µlの各コントロール血清あるいはサンプルが前記プレートに塗布された。その後、50 µlのビーズ溶液が各ウェルに添加され、室温にて振盪機上で30分間インキュベートされた。前記プレートはPBS-Tで洗浄され、ブロッキング緩衝液で1:5000に希釈された50 µlのビオチン化ラビット抗-ドッグIgG(H+L)(ペンシルベニア州、ウエストグローブ、Jackson ImmunoResearch Lab社)

40

50

が各ウェルに添加され、上記のように30分間インキュベートされた。洗浄後、ブロッキング緩衝液で1:100に希釈された50 μ lのストレプトアビジン-フィコエリトリン(カリフォルニア州、カールズバッド、Invitrogen社)が添加された。プレートは上記のように30分間インキュベートされ、洗浄された。前記ビーズは100 μ lのブロッキング緩衝液中で再懸濁され、各プレートは、ビーズを再懸濁するために15分間振盪機上に置かれた。前記解析は、Luminex IS 100 instrument (Luminex社)で解析された。データは、蛍光強度中央値(MFI)として報告された。

【0062】

血清サンプル

全てのイヌ血清サンプルが、コーネル大学の動物健康診断センター(Animal Health Diagnostic Center)に、ライム病菌に対する抗体の血清学的テストのために提出され、ライム病菌に対する抗体を検出するためにキネティックELISAおよびWBによってテストされた。両方の解析は、ライム病菌の全細胞溶解物を使用しており、前述されている(1993年、Appel他; 1996年、Jacobson他)。ニセットのイヌ血清サンプルが、この研究のために使用された。

まず、ライム病菌に対する抗体のための利用可能なELISAおよびWB結果を有する79の血清サンプルが、各抗原に関するおよびシングルプレックスとマルチプレックス解析の結果の比較に関するビーズ-ベース解析のコンディションを確立するために使用された。これら79のサンプルは、ELISAとWBにより陰性の結果から高陽性の結果にわたる同様の数のサンプルを提供するために選択され、これらの結果によれば、ワクチン接種及び/又は自然感染した犬からの血清を含んだ。第二に、あらかじめテストされなかった計188のイヌ血清サンプルが、さらなるマルチプレックス解析の検証のために使用された。全サンプルは、WBによって、ライム病菌抗原に対する抗体について平行して分析された。プロット上の31kDa (OspA)、22kDa (OspC)および29kDa (OspF)に対する血清抗体の存在(陽性)あるいは非存在(陰性)が、マルチプレックス解析結果を知らないオブザーバーによって盲検的に決定された。前記WB結果は、各抗原に対し「相対的ゴールド・スタンダード」を提供し、受信者動作曲線(ROC)分析のためにおよびマルチプレックス解析におけるライム病菌 OspA、OspC およびOspF抗原に対する抗体の解釈範囲を決定するために使用された。

【0063】

統計解析

シングルプレックスおよびマルチプレックス解析フォーマットによって得られた結果の比較のために、全サンプルの対応するMFI値が、スピアマンの順位相関を算出することによって各ライム病菌抗原について比較された。マンホイットニー検定が、WBによってテストされた際それぞれの抗原に対し陰性あるいは陽性のいずれかであったサンプルに対するマルチプレックス解析のMFI値の違いを比較するために実施された。マンホイットニー検定は、ガウス近似、両側、95%信頼区間および有意性カットオフとして $p < 0.05$ を使用して実行された。マルチプレックス解析フォーマットにおける各ビーズ解析の感度(敏感度)および特異度を判定するために、各血清サンプルのWB結果(陽性/陰性)および「相対的ゴールド・スタンダード」としての対応するタンパク質を使用して、マルチプレックス解析の使用によりそのサンプルおよび組換え抗原について得られたMFI値と比べることによって、ROC曲線が作成された。解釈範囲と、マルチプレックス解析における診断の感度(sensitivity)および特異度(specificity)を規定するために、尤度比解析が行われた。ROC曲線および尤度解析は、各抗原に対し別々に行われた。スピアマンの順位相関およびマンホイットニー検定は、GraphPad Prism program, version 5.01を使用して行われた。ROC曲線は、MedCalc program, version 11.2.0.0;2010F.(Schoonjans, Mariakerke, Belgium)を使用して作成された。尤度解析は、Statistix 9.0, 2008 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA)を使用して行われた。

【0064】

結果

ライム病菌抗原の発現

ライム病菌OspA、OspCおよびOspFタンパク質の細胞外部分が、E. coliで発現され(図1)、それぞれ333、194および169のアミノ酸サイズであった。結果として生じたrOspAタンパク質は、30 kDaの計算分子量を有していた。30kDaでの対応する主タンパク質に加えて、22と42kDaの2つのより弱いタンパク質が、精製後に観察され、これはrOspAのアフィニティ精製の間に他のタンパク質が微量に混入したことを示唆する。計算分子量は、rOspCが17.5kDa、rOspFが15.2kDaであった。SDS-PAGEによって見つけれられたタンパク質は、rOspCが29kDa、rOspFが27kDaであり、両方のタンパク質の二量体形成を示唆する。

【0065】

蛍光ビーズ-ベース解析の開発

組換えライム病菌 OspA、OspCおよびOspFタンパク質が蛍光ビーズにカップリングされた。プレテストされたイヌの血清サンプル(ライム病菌に対する抗体のための既知のWBテスト結果を有する)が、各ビーズ-ベース解析のコンディションを確立するために使用された。陽性と陰性コントロールが同定され、各解析プレートに含まれた(表3)。計79の血清は、その後個々の抗原を有するシングルプレックス解析と3つ全ての抗原を同時に使用するマルチプレックス解析で測定された(図2)。シングルプレックスとマルチプレックス解析の間のスピアマン順位相関は、0.93 (OspA)、0.88 (OspC)および0.96 (OspF)であった。マルチプレックス解析の平均バックグラウンド値は、血清無しの40ランで決定され、OspAとOspCの解析について10 MFI未満、OspFについて80 MFIであった。

【0066】

【表6】

表4:イヌのコントロール血清サンプル(陽性、低陽性、陰性)およびバックグラウンド値(希釈緩衝液)を使用した、20の別個のマルチプレックス解析ランによって得られたOspA、OspCおよびOspF解析のMFI値(平均±標準偏差)

	OspA	OspC	OspF
陽性血清	10386 ± 2292	3759 ± 1012	21976 ± 2924
低陽性血清	965 ± 298	1125 ± 297	5336 ± 1289
陰性血清	201 ± 72	48 ± 17	244 ± 71
バックグラウンド(緩衝液)	7 ± 2	4 ± 1	84 ± 4

【0067】

OspA、OspCおよびOspFのWBおよびマルチプレックス解析結果の比較

188のイヌ血清から得られたWBおよびマルチプレックス解析結果が各タンパク質のために比較された。図3は、感染(レーン2)、ワクチン接種(レーン3)および非感染/非ワクチン接種(レーン4)の犬血清から得られた従来法のWB結果を示す。OspAのマルチプレックスの結果が、WBの31kDaタンパク質の発生と比較され、OspCが22kDaタンパク質と、OspFが29kDaタンパク質と比較された。WB結果は、3つの抗原それぞれについて別々に陰性または陽性として分類された(図4)。WBによって、188の血清のうち、107が31kDa OspA抗原を検出し、39が22kDa OspCを検出し、82が29kDa OspFタンパク質を確認した。有意に高い($p < 0.0001$)MFI値が、陰性WB結果のものと比べてWB陽性血清を使用した3つ全てのライム病菌タンパク質のマルチプレックス解析において得られた。さらに、ライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原のためのROC曲線が、「相対的ゴールド・スタンダード」として188の血清のWB結果を使用して作成された(図5)。前記ROC曲線は、OspA、OspCおよびOspFについてマルチプレックス解析とWB結果の間の高い一致を示した。

【0068】

マルチプレックス解析結果の解釈

マルチプレックス解析におけるライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原の解釈範囲を決定するために、尤度解析が実施された。前記解析は、血清学的解析は大抵、ゴールド・スタ

ンダードと比較した際、いくらの偽陽性および偽陰性の結果をもたらすということを考慮した(1996年、Jacobson他)。これは、高い非特異的結合を示すある種の血清の性質によって、準最適なゴールド・スタンダードによって、あるいは比較される解析の分析感度の違いによって、引き起こされる可能性がある。このようにして、陰性、曖昧および陽性の解釈範囲が各抗原について決定された。表5は、解釈範囲、陽性テストの尤度比(LR+)およびイヌ血清におけるライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原のそれぞれに対する抗体のマルチプレックス解析の診断感度と特異度を示す。マルチプレックスフォーマットにおけるOspA、OspCおよびOspF解析の診断特異度は、それぞれ90%、89%および86%であった。診断感度は、83% (OspA)、62% (OspC)および82% (OspF)であった。

【0069】

10

【表7】

表5. イヌ血清中のライム病菌 OspA、OspCおよびOspF に対する抗体の、蛍光ビーズによるマルチプレックス解析の解釈範囲

	マルチプレックス解析 (MFI)	真陽性 (WBpos)	偽陽性 (WBneg)	LR+	感度 (%)	95% CI	特異度 y (%)	95% CI
OspA								
陰性	<500	3/107	41/81	0.055				
曖昧	≥500 <1,500	15/107	32/81	0.35				
陽性	≥1,500	89/107	8/81	8.40	83	75-90	90	82-96
OspC								
陰性	<250	3/39	65/149	0.18				
曖昧	≥250 <1,000	12/39	67/149	0.68				
陽性	≥1,000	24/39	17/149	5.40	62	45-77	89	82-93
OspF								
陰性	<750	3/82	37/106	0.11				
曖昧	≥750 <1,500	12/82	56/106	0.28				
陽性	≥1,500	67/82	15/106	5.75	82	72-89	86	78-92

20

30

【0070】

前述したことから明らかなように、本実施例において、我々はライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原に対する血清抗体を同時に検出するため、新しいマルチプレックス解析の開発と検証を実証する。前記マルチプレックス解析は、ELISAとWBの現在のテスト手順を一つのテストにまとめ、且つ、ワクチン接種または感染のためのマーカーとして個々のライム病菌抗原を区別する。ELISAとその後に続くWBは、今なお、ライム病菌に対する抗体を検出するためのゴールド・スタンダードであると考えられている。ライム病菌の全細胞溶解物について行われるELISAは、高い診断感度を有するが、かなり低い診断特異度を有していた(1996年、Jacobson他)。全細胞溶解物を使用する偽陽性のELISA結果は、血清抗体と、他のバクテリアの対応するタンパク質と高い相同性を共有するスピロヘータタンパク質(例えば、ライム病菌の鞭毛タンパク質)との反応によって引き起こされた(1990年、Lindenmayer他; 1993年、Shin他)。本願で開発されたマルチプレックス解析が、ライム病菌の新規の組換えタンパク質を使用したことは、新しい解析における交差反応の可能性を減少させた。

40

【0071】

ここで、我々は、特異的ライム病菌抗原に対するWB結果と、対応するOspA、OspCおよびOspF抗原に対するマルチプレックス結果を比較した。前記ROC曲線解析は、2つのテスト

50

の間の非常に良好な関連性を示した。しかしながら、WBとマルチプレックス解析の間の不一致が観察された。この不一致について考えられる説明として、WBは一般的に、特異的なバンドが存在するか否かの観察者の主観的な解釈に依存するということが挙げられる。WBの解釈は、プロット展開における日差変動によっても影響され得る。WBの分析感度(低 $\mu\text{g/ml}$ 範囲)は、ELISAのそれ(低 ng/ml 範囲)より低く、マルチプレックス解析の分析感度(低 pg/ml 範囲)よりはるかに低い。したがって、低濃度のライム病菌に対する抗体を含む様々な血清は、WBによって検出されなかったが、マルチプレックス解析によって識別されたと考えられる。

【0072】

WBと比較したマルチプレックス解析の分析感度の増加に加えて、プロット上のいくつかのバンドも誤解釈される可能性がある。例えば、ライム病菌は、WB上で22kDa付近に現れる2つのタンパク質である、OspCと22kDaのさらなるタンパク質を発現する(2001年、Magnarelli他)。一般に、ライム病菌の粗製調製物がWBのために使用されるため、OspCに対する抗体の分析は、サンプル中の22kDaタンパク質に対する抗体の存在によって複雑になり得る。結果的に、WBによって同定される22kDaのバンドは、OspCに対する抗体と常に対応しているわけではない可能性がある。これは、我々がビーズ-ベースOspC解析とWB結果の間に観察した低い一致を説明できる。したがって、OspCマルチプレックス解析の真の診断特異度と感度は、WBによって検出される22kDaのタンパク質との比較によって計算されるものより高いと思われる。全体的に見て、我々は、WBはライム病菌に対する抗体を検出する他の解析を検証するための「相対的ゴールド・スタンダード」であり得るだけであると結論を出した。

【0073】

188のイヌ血清サンプルからなるセットを使用して、我々は、OspC ($n=39$)およびOspF ($n=82$)に関するWB陽性サンプルの総数について、高い相違を観察した。これは、ライム病菌抗原の差次的発現および結果として生じる上述の宿主抗体応答に一致している。前記サンプルは、診断分野の提出に由来するものであり、したがって、これらの犬の感染及び/又はワクチン接種の時期は知られていなかった。我々は、前記血清サンプルに応じて、OspCもしくはOspFのいずれか又は両方に対する抗体がマルチプレックス解析によって検出できることを観察し、このことは、これらの細胞表層タンパク質検出パターンがライム病菌による感染の異なる段階の指標となることを示唆する。このように、OspCとOspF抗原に対する異なった抗体パターンは、前記犬においてライム病菌への暴露が生じた時期の指標となる。このような改良された感染段階の判定は、治療法の決定および治療成功の予測に役立つと思われる。

【0074】

このように、ライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体の検出のために本実施例において記述されたマルチプレックス解析は、ライム病菌への感染及び/又はワクチン接種の結果生じた抗体の指標となるイヌ血清中の抗体を測定するための、定量的、経済的および鋭敏な代替手段を提供する。

【実施例2】

【0075】

本実施例は、ウマにおいてライム病の状態を判定するための高い有用性を実証する方法の一実施形態に関する説明を提供する。馬のためのマルチプレックス解析は、実施例1のイヌのライム解析について前述したように、ワクチン接種及び/又は初期もしくは慢性の感染のマーカーとして、OspA、OspCおよびOspFを使用する。一般に、マルチプレックス解析は、生体サンプルにおける可溶性分析物の同時検出の原理を使用する(2004年、Morgan他; 2005年、Prabhakar他)。それらは、前記解析のマトリクスを提供する個々の抗原と結合した蛍光ビーズをベースとする。ELISAは ng/ml 濃度、WBは $\mu\text{g/ml}$ 濃度を検出するのに対し、マルチプレックス解析は、典型的には pg/ml 範囲の抗体を検出する(2003年、KellarおよびDouglas; 2004年、Morgan他; 2009年、WagnerおよびFreer)。このように、馬のための新しいライム・マルチプレックス解析は、ライム病菌による感染あるいはライム病菌

に対するワクチン接種に関する特異的マーカータンパク質に基づいており、また、抗体の濃度が低い状況(感染初期あるいは神経学的兆候を有する馬の脳脊髄液サンプル中など)において有利であると思われる。

【0076】

以下の材料および方法が、本実施例に示す結果を得るために使用された。

【0077】

組換えライム病菌タンパク質および蛍光ビーズへのカップリング

ライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原は、E.coli中で発現され、実施例1で説明したように、蛍光ビーズにカップリング(結合)された。OspAはビーズ33に、OspCはビーズ34に、OspFはビーズ37にカップリングされた。前記カップリングは、ビーズ提供者の推奨プロトコルに従って実施された。

10

【0078】

マルチプレックス解析

マルチプレックス解析は、以下の変更を伴い、実施例1のイヌ血清サンプルについて前述した通りに行われた：ウマ血清サンプルは、1:400に希釈された。血清抗体の検出のために、ピオチン化ヤギ抗-ウマIgH(H+L)抗体(ペンシルベニア州、ウエストグロブ、Jackson ImmunoResearch Laboratories社)が1:3000の希釈にて使用された。全ての他の試薬、緩衝液およびインキュベーション工程は、先に述べた手順と同一である。当該解析は、Luminex IS 100 instrument (Luminex社)で分析された。データは蛍光強度中央値(MFI)として報告された。

20

【0079】

馬の血清

全てのウマ血清サンプルは、コーネル大学の動物健康診断センターに、血清学的なライムテストのために提出され、ライム病菌に対する抗体を検出するためにキネティックELISAそしてそれに続くWBによってテストされた。両方の解析は、ライム病菌の全細胞溶解物を使用し、前述したように行われた(2000年、Chang他)。二セットのウマ血清サンプルがこのアプローチのために分析された：

まず、ライム病菌に対する抗体のための利用可能なELISAおよびWB結果を有する81のウマ血清サンプルが、各抗原のためのおよびシングルプレックスとマルチプレックス解析を比較するための、ビーズ-ベース解析のコンディションを確立するために使用された。これら81のサンプルは、ELISAとWBによって同定される陰性から高陽性の解釈範囲内の同様の数のサンプルを提供するために選択され、ワクチン接種及び/又は自然感染した馬の血清を含んだ。第二に、前もってテストされなかった計562のウマ血清サンプルが、さらなるマルチプレックス解析の検証のために評価された。これらのサンプルは、2008年7月と2009年6月の間にコーネル大学の動物健康診断センターに提出された。全てのサンプルは、ライム病菌抗原に対する抗体についてもWBによって分析された。プロット上の31kDa (OspA)、22kDa (OspC)および29kDa (OspF)に対する血清抗体の存在(陽性)あるいは非存在(陰性)が、マルチプレックス解析結果を知らないオブザーバーによって盲検的に判定された(図6)。

30

【0080】

統計解析

第一セットの血清サンプル(n=81)から得られたMFI値が、シングルプレックスとマルチプレックス解析フォーマットによって分析され、スピアマンの順位相関を算出することによって各ライム病菌抗原について比較された。マンホイットニー検定が、WBによってテストされた際それぞれの抗原に対し陰性あるいは陽性のいずれかであったサンプルに関するマルチプレックス解析のMFI値における違いを比較するために実施された。マンホイットニー検定は、ガウス近似、両側、95%信頼区間および有意性カットオフとして $p < 0.05$ を使用して実行された。スピアマンの順位相関およびマンホイットニー検定は、GraphPad Prism program, version 5.01を使用して行われた。

40

【0081】

50

第二の血清サンプルセット(n=562)のために、前記WB結果が、受信者動作特性(ROC)曲線解析における「相対的ゴールド・スタンダード」(陽性/陰性)として使用され、マルチプレックスMFI値と比較された。この解析は、WBが本当に真のゴールド・スタンダード(すなわち、100%の診断感度と特異度)であると想定した。尤度比解析は、ライム病菌 OspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体の解釈範囲およびマルチプレックス解析の診断感度と特異度を規定するために行われた。ROC曲線と尤度解析は、各抗原について別々に行われた。ROC曲線は、MedCalc program, version 11.2.0.0 2010(MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke)を使用して作成された。尤度解析は、Statistix 9.0, 2008 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA)を使用して行われた。

【0082】

10

第二の血清サンプルセットは、真のゴールド・スタンダードが利用できない場合に分析性能の解析のために使用できるベイズ統計アプローチのためにも使用された(2007年、Wang他)。その乏しい分析感度および特異的なバンドが存在するか否かの分析におけるその主観的な構成要素のため、ライム抗体検査において、WBは「相対的ゴールド・スタンダード」として考慮されることができのみである(2011年、Wagner他)。前記データは、新しいライム・マルチプレックス解析およびWBの両方のテストに対する診断特異度、感度および陽性カットオフ値を特定するためにベイズモデルを使用して分析された。

【0083】

20

ベイズ的アプローチは、異なる有病率の疾患指標を有する2つのグループを必要とした。さもないとパラメーターを推定するために使用されたベイズモデルは同定不可能になる(2006年、Wang他；2007年、Wang他)。したがって、血清サンプルは、人為的に2つのグループに分けられた。2008年7月と12月の間に収集された全サンプル(n=408)は、グループ1に割り当てられ、2009年1月と6月の間に収集された全サンプル(n=156)は、グループ2とされた。この分類は、ライム病の指標としてのライム病菌に対する抗体の保有率が、年の最初の6か月の期間より7月から12月により高いという前提に基づいた。前記解析は、この前提が、OspCとOspFに対する抗体について真実であることを示したため、前記解析が行われた。OspAについては、前記2グループ間の保有率は同様に低く、ベイズ的アプローチはOspA解析のために使用できなかった。

【0084】

30

結果

ライム病菌に対する抗体を検出するためのウマのマルチプレックス解析の開発

ライム病菌に対する抗体を含むあるいは含まない計81のプレテストされたウマ血清が、蛍光ビーズ-ベース解析のコンディションを確立するために使用された。ビーズは、ライム病菌の組換えOspA、OspCあるいはOspF抗原と結合された。これらの抗原に対する血清抗体の測定値は、個々のビーズについての解析(シングルプレックス)を行うことによっておよびマルチプレックス解析によっても比較された(図7)。ライム病菌に対する抗体のマルチプレックスおよびシングルプレックス解析結果は、高度に相関した。個々の抗原比較用のスピアマンランク値は、OspA、OspCおよびOspFについて、それぞれ0.77、0.83および0.96であった。マルチプレックス解析のためのバックグラウンド値は、OspAとOspCについて10MFI未満であり、OspFについて100MFI未満であった(表6)。前記81の血清サンプルは、OspAについて347~21650、OspCについて75~3842、およびOspFについて192~23209の間のMFI値をもたらし、ライム・マルチプレックス解析の広いダイナミックレンジが確認された。

40

【0085】

【表 8】

表6. ウマ血清におけるライム病菌OspA、OspCおよびOspF抗原に対する抗体の、蛍光ビーズによるマルチプレックス解析の蛍光強度中央値(MFI)の値(中央値、範囲)およびバックグラウンド値 (n=562)

	バックグラウンド ^a	WB陰性	WB陽性
OspA	3.5 (2.5 – 8.0)	866 (160 – 20,451)	2317 (206 – 27,471)
OspC	4.7 (3.0 – 8.0)	439 (59 – 4702)	1106 (128 – 9261)
OspF	85.0 (62.5 – 96.5)	848 (209 – 14,550)	2560 (217 – 25,961)

10

^a バックグラウンド値は、血清なしのマルチプレックス解析の18の別個のランから得られた

WB=ウエスタンブロット

【0086】

ウマのライム・マルチプレックス解析の検証

OspA、OspCおよびOspFに対する抗体のマルチプレックス解析の検証が、計562の馬の血清に対する、マルチプレックスの結果と、WBによって得られた対応する結果を比較することによって行われた。WBによって、OspCとOspFに対する抗体が、ダニ咬傷後ライム病菌に感染した馬において検出できる。OspAに対する抗体は、ライム病に対するワクチン接種後に発生すると考えられる(図6)。マルチプレックス解析によって得られたMFI値は、WB陰性および陽性の血清サンプルと比較された。これは、個々の抗体それぞれについて、WB陰性サンプルよりもWB陽性サンプルにおいて明確に高いMFI値を示した(図8)。全MFI値におけるこれらの明確な差にもかかわらず、前記解析は、WB陰性および陽性サンプルのMFI値間の重複も示し(表6)、これは様々な統計アプローチによるマルチプレックス解析のカットオフ値のさらなる評価を要求した。

20

【0087】

「相対的ゴールド・スタンダード」としてWBを使用する解析

WBは、その相対的に乏しい分析感度およびWB評価に含まれる主観的な構成要素のため、「相対的ゴールド・スタンダード」として考慮されることができのみである。それにもかかわらず、ROC曲線が、個々のOspA、OspCあるいはOspF解析に対するマルチプレックス解析結果を、WB上の対応するバンドの存在または非存在と比較することによって作成された。ROC曲線下のエリアは、OspAで0.765、OspCで0.773およびOspFで0.738であった。WB陰性およびWB陽性サンプルの量複するMFI値のために(図8)、我々は各ビーズ-ベース解析について、3つの解釈範囲(陰性、曖昧、陽性)を確立するために尤度比解析も実施した。診断感度と特異度の値は、尤度解析の陽性カットオフ値に基づいても計算された(表7)。

30

【0088】

【表 9】

表7. ウマ血清におけるライム病菌 OspA、OspCおよびOspFに対する抗体の、蛍光ビーズによるマルチプレックス解析の解釈範囲

	マルチプレックス 解析 (MFI)	真陽性 % (WBpos)	偽陽性 % (WBneg)	LR+	感度 (%)	特異度 (%)
OspA						
陰性	<1000	18.6	57.6	0.323		
曖昧	≥1000-2000	32.6	27.4	1.19		
陽性	>2000	48.8	15.0	3.25	49	85
OspC						
陰性	<500	19.1	59.2	0.323		
曖昧	≥500-1000	25.0	26.5	0.943		
陽性	>1000	55.9	14.3	3.91	56	86
OspF						
陰性	<750	15.4	42.4	0.363		
曖昧	≥750-1250	12.5	24.4	0.512		
陽性	>1250	72.0	33.2	2.17	72	67

LR=尤度比

【0089】

ベイズモデルを使用する真のゴールド・スタンダードが無い場合の解析の妥当性

WBは、複数の解釈の間違いをもたらす可能性も非常に高いということを考慮し、我々は、比較される両方のテストについて診断感度と特異度を推定するベイズ的アプローチを使用してもう一つの解析を行った。前記解析は、異なる罹患率を有する二つの実験群を必要とした。前記データは、1年の間に提出されたサンプルから得られ、それらは人為的に7月～12月の間に提出された血清(グループ1)および1月～6月の間に提出されたサンプル(グループ2)に分類された(グループ1のライム病罹患率がより高いと想定される)。前記解析は、グループ1で、ライム病菌に対する抗体の保有率が、2つの感染マーカーOspCとOspFについてはより高いが、ワクチン接種マーカーOspAについてはそうではないことを確認した。したがって、前記モデルは、OspCとOspFに対する抗体のための結果について実行されることができただけであり、2つの独立したテストとしてビーズ-ベース解析とWBを比較した(それらのいずれもゴールド・スタンダードでは無い)(表8)。OspCに対する抗体について、ビーズ-ベース解析は80%の診断感度と79%の診断特異度をもたらした。OspC WBは、わずか72%の感度と92%の特異度を有した。OspFに対する抗体については、ビーズ-ベース解析の感度は86%であり、特異度は69%であった。OspF WBは、80%の感度と77%の特異度を有した。前記ベイズ解析は、より多数の偽陰性が、マルチプレックス解析よりもWBによって得られることを示した。WBのより高い特異度の値は、このテストによって検出された偽陽性の数の低さを示していた。OspCとOspFのビーズ-ベース解析のためのカットオフ値は、それぞれ、813と1270 MFIであり、これは尤度解析によって規定される曖昧(OspC)あるいは非常に低い陽性(OspF)解釈範囲に該当する(表7および8)。

【0090】

【表 10】

表8. ライム病菌のOspCもしくはOspFに対する抗体について、新マルチプレックス解析とウエスタンブロット法 (WB)を比較するベイズ統計解析

ライム病菌の細胞 表層タンパク質	試験	感度 (%)	特異度 (%)	最適なカットオフ値 (マルチプレックス)
OspC	マルチプレックス	80 (68-90)	79 (73-85)	813
	WB	72 (55-89)	92 (88-96)	NA
OspF	マルチプレックス	86 (77-93)	69 (60-79)	1270
	WB	80 (70-89)	77 (69, 88)	NA

診断解析の感度と特異度は、95%信頼できるインターバルレベルを有する最適値として表される。

NA=WBは定性的な試験であり、それゆえカットオフ値を有さないので利用できない。

【0091】

前述したことから明らかなように、本実施例において、我々は、ライム病の指標となる抗体を検出するための新しいマルチプレックス解析を開発するために、E.coliによって発現されたライム病菌のOspA、OspCおよびOspF抗原を使用した。新マルチプレックス解析の検証における大きな課題は、カットオフ値、解釈範囲、および診断の感度と特異度の値を確立するための真のゴールド・スタンダードが存在しないことであった。ライム病菌に対する抗体の検出について、WBは、確認テストおよび、血清学的ライム病診断のための最も優れた利用可能なスタンダードと考えられる。テスト検証のためのゴールド・スタンダードとしてWBを使用することは、この方法についての100%の診断感度と特異度を前提とする。この事実に基づけば、新しいテストが、従来のゴールド・スタンダード法を使用する既存のテストより優れていることはありえない。しかしながら、WBは定性的なテストであり、分析感度、プロット展開における日差変動、および、経験豊かな評価者によってさえバンドの誤解をもたらし得るその主観的な評価に関し、限界を有する(実施例1参照)。WB結果の解釈は、非常に高い抗体価を有するサンプルについては、あるいは、実験的に感染させた隔離されたウマでは単純であるが、感染歴が不明な臨床的状况では及び/又はライム病菌に対する抗体レベルの低い血清については、より困難である。WBとマルチプレックス・テクノロジー間の分析感度の予想される違いとともに、WB評価のこれらの特徴は、新ライム・マルチプレックス解析を検証するための異なる統計アプローチを我々に探索させた。従来のROC曲線と尤度比解析は、WBが真のゴールド・スタンダード、すなわち100%正確であるという前提の下で行われた。ベイズモデル・アプローチは、ゴールド・スタンダード不在の中で診断解析を分析でき(2006年、Wang他;2007年、Wang他)且つWBとマルチプレックス解析を同等のテストとして比較できる。それゆえ、前記分析は、両方の解析に対し診断の感度と特異度のデータをもたらした。2つのテストがそれらの分析感度の点で明らかに広範囲において異なるので、これら全ての前提は必ずしも正しくないかもしれないが、ベイズ解析は、WBが真のゴールド・スタンダードではない、すなわち100%正確ではないということを考慮することによって、より正確に新マルチプレックス解析の診断感度と特異度を推定することを可能にした。その結果として、前記ライム・マルチプレックス解析の診断感度および特異度の値は、「相対的ゴールド・スタンダード」アプローチよりも、前記ベイズ法においてより高かった。従来のゴールド・スタンダード分析は、OspCおよびOspFビーズ-ベース解析の感度として56%と72%、特異度として86%と67%の値をそれぞれ示した。上記のWBに関する議論に基づいて、これらの値は前記マルチプレックス解析の真の特異度および感度を過小評価した可能性がある。前記ベイズモデルは、WBに関する後者の記載を確認し、OspCおよびOspFビーズ-ベース解析と比較べてWBのより低い診断感度と

より高い診断特異度を算出した。前記ベイズ解析は、マルチプレックス解析においてOspCについて80%、OspFについて86%の診断感度をもたらした(WBでは、それぞれ72%と80%)。前記マルチプレックス解析の診断感度の値は、従来のゴールド・スタンダードアプローチと比べて明らかに改善され、且つ、WB($\mu\text{g/ml}$)と比べたマルチプレックス解析(pg/ml)による抗体検出の改善した分析感度のため、実際の診断感度の値をより反映する。ベイズ解析を使用するマルチプレックス解析の診断特異度は、OspCについて79%(WB 92%)、OspFについて69%(WB 77%)であったが、これは計算に基づくゴールド・スタンダードと比べてOspFについて改善され、OspCについてはわずかに低い。OspC解析の特異度の値が違う理由は、ベイズ的アプローチの計算におけるOspCに対するより低いカットオフ値(ゴールド・スタンダード解析に対するより)を適用する2つの統計的手法によるOspCのカットオフ値がより大きく違うためである。

10

【0092】

ゴールド・スタンダードおよびベイズ解析は、OspCおよびOspFに対する抗体のカットオフ値を確立するためにも使用された。OspCに関し、尤度比解析は、 >1000 MFIの陽性カットオフ値を示し、ベイズ的アプローチは、813 MFIといったさらに低いカットオフ値さえ確認した。OspFに関し、尤度解析は、ベイズ的アプローチでの1270 MFIカットオフとほぼ同一の最適陽性カットオフとして >1250 MFIを見出した。我々のサンプルセットに関し、OspCについて約10,000およびOspFについて $>25,000$ のMFI値をもたらしたマルチプレックス解析の広いダイナミックレンジを考慮すると、示されたカットオフ値はウマ血清におけるライム病菌に対する抗体の詳細な定量分析を可能にするこのテストの広いダイナミックレンジを裏付けた。広い動的定量範囲は、かなり狭い線形の定量範囲を有するELISA等の現存する定量テストに比べて、前記マルチプレックスアプローチの重要な利点である(2009年、WagnerおよびFreer)。我々の経験では、増加した線形のダイナミックレンジの最も重要な利点は、血清が、マルチプレックス解析において単一の希釈で使用でき、および結果がほとんどの場合、前記解析の線形の定量範囲に属することである(前記解析の上部プラトーに分類されるごくわずかな結果は除く。すなわち、これらの血清はそれぞれのライム病菌Osp抗原に対する非常に高濃度の抗体を含む)。

20

【0093】

現在の従来型ライムELISAは、ほぼ全ライム病菌溶解物に基づいており、感染とワクチン接種とを区別しない。これらの解析は、溶解混合物中の共通の細菌成分に対する非特異的交差反応性のリスクを負った(1990年、Lindenmayer他；1993年、Shin他；1996年、Jacobson他)。したがって陽性の場合、これらの解析は、定性的WB等の第二の確認テストを必要とする。抗体の定量が要求される状況(例えば、ライム病の馬における抗生物質による治療の成功を判定するため)では、テストは通常2つのテスト；第一に、抗体の減少を確認するための定量的ELISA、および、第二に、その現象がライム病の指標となる抗体に特異的であることを確認するためのWBテストを要求する。他のオンサイド(stick-based tests)またはELISAに基づくテスト(C6に対する抗体の定量等)は、ライム病原体を有する馬の感染とよく相関することが発見された(2008年、Johnson他；2010年、Hansen他；2010年、Maurizi他)。しかしながら、C6に対する抗体が早期に検出される、または、従来のライム病菌ELISAによって検出される抗体と比べてより急速に低下するようには見えなかった(2008年、Johnson他)。

30

40

【0094】

WBと新マルチプレックス・ライム解析の両方が、ライム病菌による自然感染から生じた抗体と、ワクチン接種後に発生した抗体とを区別できる。後者の応答は、ヒト、実験齧動物、イヌ(1990年、Fikrig等；1990年、Schaible他；1996年、Jacobson等；1996年、Wittenbrink等；2000年、Wieneke他；2007年、ToepferおよびStraubinger)についておよび馬(2000年、Chang他)についても頻繁に記述されているように、ライム病菌のOspA抗原に対する抗体の高い値を特徴とする。馬に使用するための認可されたライムワクチンは現在存在していない。それゆえ、イヌ用のワクチンが時々、ライム病が風土病の地域において小屋で飼われている馬のために使用されている(2009年、Divers)。認可ワクチンが存在しな

50

いことは、我々のサンプルセットにおけるOspA陽性のウマ血清が全体的に低い数(562中43)であることを説明する。2つのグループ間でOspAに対する抗体の保有率が同様であったため、ベイズモデルは、OspAに対する抗体のためのこのデータセットについて実行できなかった。ワクチン接種がいつでも実施でき、環境中の感染ダニの発生に依存するライム病菌感染のように必ずしも季節的なピークに追従しないので、これは当然のことである。風土病地域の小屋で飼われたワクチン接種済みの馬に対し、ワクチン接種力価の定量的な評価は、これらの馬についてライム病を防止するためにワクチンを再接種するか否かの決定を方向付けることができる重要な情報である。新マルチプレックス解析は、ワクチン接種マーカーOspAに対する抗体反応を定量化する初めての利用可能なテストであり、ワクチン接種に対する宿主応答と感染に対する宿主応答を区別することもできる。ワクチン応答は、使用したワクチンによって、OspAのみに対する、あるいはOspAとOspCに対する抗体によって特徴づけられることができる。OspFは、現在利用できるワクチンには含まれておらず、それゆえ、たとえその馬がワクチン接種を受けていたとしても感染用マーカーのままである。

10

【0095】

要約すれば、ウマのための新ライム・マルチプレックス解析を検証するための2つの統計アプローチの使用は、感染マーカーOspCおよびOspFに対して、よく似たカットオフおよび診断感度と特異度の値をもたらした。前記分析は、WBの最初の診断感度と特異度の評価、ライム病菌に対する抗体分析用の伝統的なゴールド・スタンダードももたらした。マルチプレックス解析の総合的性能は、それがWBに比べて、期待できる向上した分析および診断に関する感度を有する有益なテストであることを示した。馬のための新ライム・マルチプレックス解析は、ウマにおけるライム病感染及び/又はライム病に対するワクチン接種の指標となる抗体を検出するための、有益で、素早く、鋭敏でかつ定量的なツールを提供する。

20

【0096】

本発明は、実例となる実施例を通して説明されてきたが、当業者に明らかな通常の変更は、本発明の範囲内であることが意図される。

【 図 1 】

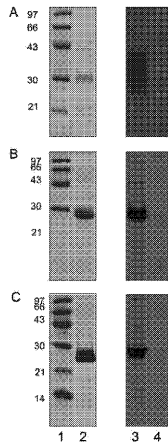


Figure 1

【 図 2 】

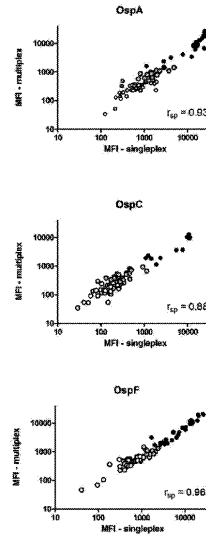


Figure 2

【 図 3 】

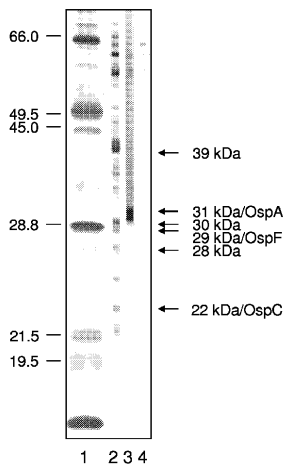


Figure 3

【 図 4 】

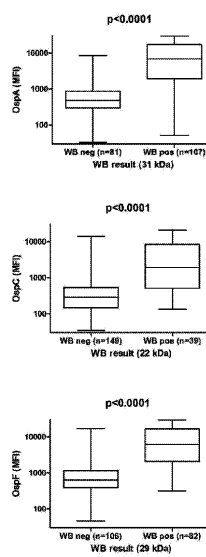


Figure 4

【 図 5 】

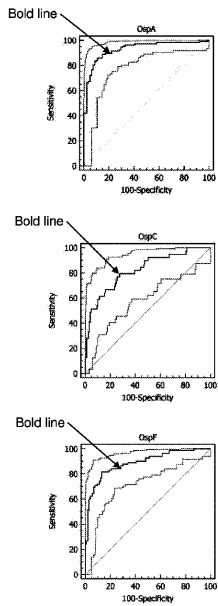


Figure 5

【 図 7 】

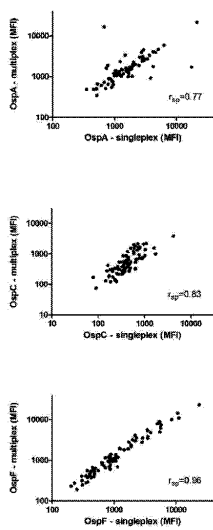


Figure 7

【 図 6 】

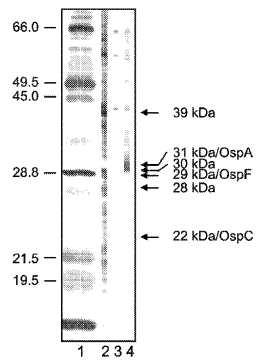


Figure 6

【 図 8 】

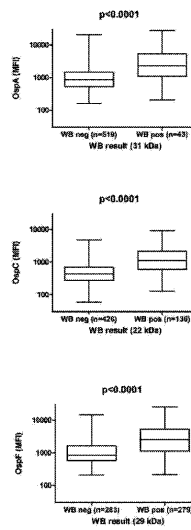


Figure 8

【 図 9 】

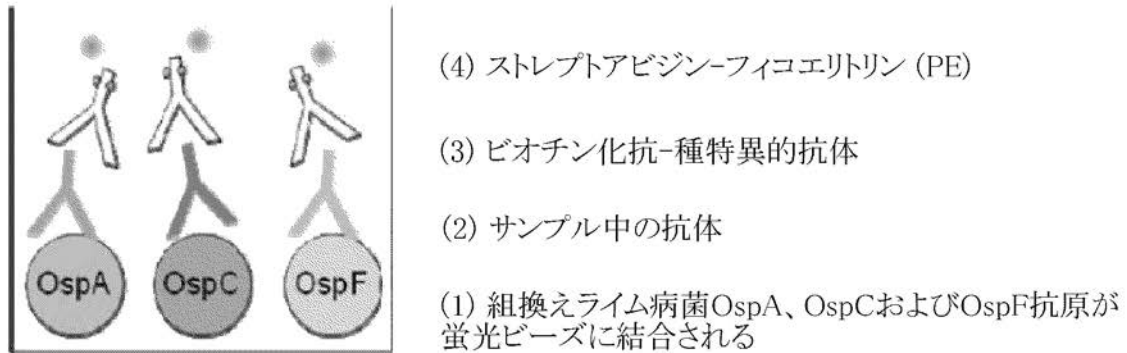


Figure 9

【 配 列 表 】

2013539032000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/53359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - G01N 33/53 (2012.01)

USPC - 436/501; 435/7.2

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC: 436/501; 435/7.2Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 436/501, 63; 435/7.2, 7.1 (text search)Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Electronic data bases: PubWEST (PGPB, EPAB, JPAB, USPT); Google Scholar
Search terms: Lyme disease, diagnosis, antibody detection, OspA, OspC, OspF, lateral flow device, fluorescent bead-based multiplex assay, veterinary

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAGNARELLI et al. Use of recombinant antigens of Borrelia burgdorferi in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol.; February 1996; Vol. 34, No 2; Pages 237-240. Especially abstract, pg 238 table 1.	1, 3, 4
Y		2, 5-8
Y	US 7,794,727 B2 (MARCONI et al.) 14 September 2010 (14.09.2010). Especially col 14 ln 64-67; col 15 ln 5-12.	2
Y	MAGNARELLI et al. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. J. Clin. Microbiol.; May 2000; Vol. 38, No 5; Pages 1735-1739. Especially pg 1738 col 1 para 2.	5
Y	GOMES-SOLECKI et al. Recombinant Assay for Serodiagnosis of Lyme Disease Regardless of OspA Vaccination Status. J. Clin. Microbiol.; Jan 2002; Vol. 40, No 1; Pages 283-297. Especially abstract.	6
Y	Rockland Immunochemicals. News and Posters: Multiplex Assay for Lyme Disease [online] 2 August 2010 [retrieved 8 May 2012]. Available on the internet: <URL: http://web.archive.org/web/20100802110310/http://www.rockland-inc.com/Support/Newsletters.aspx> and <URL: http://rockland-inc.com/uploadedFiles/Support/Poster%20on%20LymeDisease_PhaseI.pdf>. Especially pg 1 and 3.	7
Y	ELSHAL et al. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. Methods; April 2006; Vol. 38, No 4; Pages 317-323. Especially Table 1.	8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2012 (08.05.2012)

Date of mailing of the international search report

21 MAY 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/53359

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.:
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 examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-8, directed to a method for diagnosing Lyme disease status in a mammal comprising, in a biological sample obtained or derived from the mammal, determining the presence or absence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* (*B.burgdorferi*) outer surface proteins (Osp) OspA, OspC, and OspF, and, based on the presence or absence of the antibodies, identifying the mammal as infected or not infected with *B.burgdorferi*.

Group II: claims 9-14, directed to a method for diagnosing Lyme disease status in a mammal comprising, in a biological sample obtained or derived from the mammal, determining a test level of antibodies to *Borrelia burgdorferi* (*B.burgdorferi*) outer surface proteins (Osp) Osp A, Osp C, and Osp F, and based upon a comparison of the test level of the Osp A, Osp C, and Osp F antibodies to a reference, identifying the mammal as vaccinated against *B.burgdorferi* and/or as having an early, intermediate or chronic *B.burgdorferi* infection.

—see Extra Sheet for continuation—

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.:
Claims 1-8

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 11/53359

Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

Group III: claims 15 and 16, directed to composition comprising an isolated protein comprising the sequence of SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, or a combination of said proteins.

The inventions listed as Groups I - III 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:

The special technical feature of the claims of Groups I-III are disclosed above. The claims of Group II share all of the common technical elements of Claim I, but add the special technical elements of being related to determining if a mammal has been vaccinated against *B. burgdorferi* and/or as having an early, intermediate or chronic *B. burgdorferi* infection.

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to *B. burgdorferi* Osp A, Osp C, and Osp F proteins. Groups I and II further share the common technical elements of claim 1. However, these common technical elements do not represent an improvement over the prior art of the article entitled 'Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis' by MAGNARELLI et al, which teaches a method for diagnosing Lyme disease status in a mammal comprising, in a biological sample obtained or derived from the mammal, determining presence or absence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) outer surface proteins (Osp) OspA, OspC, and OspF (abstract; 'Recombinant antigens of outer surface proteins (Osps) OspA, OspB, OspC, OspE, and OspF of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and of p41-G, an antigenic region of flagellin of this spirochete, were tested with human sera in class-specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)) and based on the presence or absence of the antibodies, identifying the mammal as infected or not infected with *B. burgdorferi* (abstract; 'With relatively high degrees of specificity, ELISAs with recombinant antigens, particularly OspC and p41-G, can help to confirm *B. burgdorferi* infections'; pg 238 Table 1; 'Reactivity of human sera to whole cells and recombinant antigens of *B. burgdorferi* in class-specific ELISA for IgM antibodies').

Therefore, the inventions of Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/543 5 0 1 D

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

Fターム(参考) 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA29 EA52 FA74