

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2014-320

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/20 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.05.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.11.2015**

(Věstník č. 46/2015)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,
Brno, CZ
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, CZ
Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Praha 8, CZ

OspC z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto A, B I, Kb, *Borrelia afzelii* Pko a *Borellia garinii* Pbi. Dále řešení poskytuje vakcinační konstrukt a vakcínu proti Lymeské borelióze obsahující tento rekombinantní antigen a alespoň jedno adjuvans a/nebo Ferritin II.

(72) Původce:
RNDr. Jaroslav Turánek, CSc., Brno- Lesná, CZ
Pharm. Dr. Josef Mašek, Ph.D., Brno- Lesná, CZ
doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D., Olomouc, CZ
prof. MUDr. Evžen Weigl, CSc., Olomouc, CZ
doc. RNDr. Michal Křupka, Ph.D., Olomouc, CZ
Ing. Libor Bittner, CSc., Vyškov- Dědice, CZ
MVDr. Jiří Nepeřený, Ph.D., Vyškov- Nosálovice, CZ
MVDr. Vladimír Vrzal, CSc., Ivanovice na Hané, CZ
RNDr. Miroslav Ledvina, Ph.D., Praha 8, CZ
doc. Ing. Irena Kratochvílová, Ph.D., Praha 8- Troja, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název přihlášky vynálezu:
Polyepitopový antigen, vakcinační konstrukt a vakcína pro prevenci lymeské boreliózy

(57) Anotace:
Řešení poskytuje chimérický polyepitopový rekombinantní antigen, obsahující dva až deset imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspA z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PHei, Pak, *Borrelia garinii* PBi, TN, N34, VS307, G25, PBr, T25 a *Borrelia afzelii* Pko, a orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů

Polyepitopový antigen, vakcinační konstrukt a vakcína pro prevenci lymeské boreliózy

Oblast techniky

Vynález se týká složení a kombinace rekombinantních antigenů a formulace vakcíny k prevenci Lymeské boreliózy a klíšťaty přenášených onemocnění. Vakcína je určena pro humánní a veterinární použití.

Dosavadní stav techniky

Lymeská borelióza je chronické multisystémové infekční onemocnění, které je nejčastějším infekčním onemocněním přenášeným členovci, a to v Evropě i ve Spojených státech. Jde zpravidla o nesmrtící, ale v nezanedbatelném procentu invalidizující onemocnění se závažnými zdravotními důsledky. Z tohoto pohledu jde o závažný socioekonomický problém. O významu tohoto onemocnění svědčí četnost publikací v časopisech zabývajících se infekční problematikou. V poslední dekádě je borelióza svým významem zařazována za syndrom získané imunodeficiency, jak je popsáno např. v článku *Barbour AG, Fish D, Science. 1993 Jun 11;260(5114):1610-6.*

Klinické příznaky lymeské boreliózy jsou popisovány různými autory již z přelomu devatenáctého a dvacátého století (*Bartůněk P. Historie. In: Bartůněk P, a kol. Lymeská borelióza. Praha: Gradapublishing, 2006: 11*), ale až v roce 1982 došlo k popisu původce popisovaných příznaků – spirochéty, později nazvané *Borrelia burgdorferi*. (*Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP., Science. 1982; 216:1317–1319*).

Postupně došlo k popisu dalších blízkých příbuzných druhů, takže druhová skupina označovaná jako *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) v současnosti čítá dvanáct druhů a je možné, že toto číslo stále není konečné.

Z popsaných druhů se jako patogeny na Euroasijském kontinentu uplatňují hlavně tři – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s. s.), *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Na Severoamerickém kontinentu se jako patogen uplatňuje pouze *B. burgdorferi* sensu stricto. Borelie z druhové skupiny *B. burgdorferi* jsou bakterie přenášené nejčastěji klíšťaty rodu *Ixodes*, ale přenos je pravděpodobně možný i prostřednictvím hmyzu sajícího krev, i když k tomuto jevu dosud chybí přesvědčivé důkazy. Přírodním hostitelem v přírodě jsou především drobní hlodavci, ale i ptáci a vysoká zvěř. Tvoří tak přírodní rezervoár infekce.

Člověk je v infekčním řetězci slepým článkem, k dalšímu šíření již nedochází. V současné době je lymeská borelióza nejčastěji diagnostikovanou antropozoonózou na území Evropy a Severní Ameriky. Její výskyt má navíc místy stoupající tendenci.

Klinický průběh Lymeské boreliózy má obecně tři stadia. Jejich manifestace však nemusí proběhnout u všech infikovaných jedinců. První stadium je charakterizováno chřipkovitým průběhem, často provázeným kožními příznaky v místě vniknutí infekce. Kožní projevy jsou charakteristické a jsou označovány jako *erythema migrans*. Pokud infekce není léčena, případně eliminována imunitním systémem hostitele, může progredovat do dalšího stadia s postižením kloubů, nervového systému, kůže, vzácněji srdce, očí apod. Asi 10% pacientů bez ohledu na antibiotickou léčbu vykazuje dlouhodobé klinické příznaky. Jedním z možných vysvětlení je indukce autoimunitních procesů.

Závažné poškození savčího organismu, stejně jako problémy s diagnostikou a terapií Lymeské boreliózy jsou významným podnětem pro vývoj vakcíny. Možnost vývoje vakcíny podporují také poznatky o tom, že protilátková imunitní odpověď je dostatečná k ochraně organismu před touto mikrobiální infekcí.

Z mikrobiologického pohledu jsou mikroorganismy druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. charakterizovány spirálním tvarem, který je určován především bičíky zakotvenými v periplazmatickém prostoru. Povrch borélií je tvořen lipoproteiny OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, případně dalšími, z nichž některé mohou být terčem protektivní imunitní odpovědi (Kumaru OS, Schulze RJ, Rodnin MV, Ladokhin AS, Zückert WR., *J Bacteriol.* 2011 Jun;193(11):2814-25; Livey I, O'Rourke M, Traweger A, Savidis-Dacho H, Crowe BA, Barrett PN, Yang X, Dunn JJ, Luft BJ., *Clin Infect Dis.* 2011 Feb;52 Suppl 3:s266-70; Chen S, Zückert WR., *J Bacteriol.* 2011 Dec;193(23):6724-32; Tilly K, Bestor A, Rosa PA., *Mol Microbiol.* 2013 Jul;89(2):216-27)

Schopnost vyvolávat protektivní odpověď byla popsána na příklad u „outer surface“ proteinů OspA, OspB, OspC, fibronektin vázícího proteinu BBK32 a proteinů vázící dekorin DbpA a DbpB (Gilmore RD 1996 *Infect Immun* 64:2234–2239).

Povrchové proteiny (outer surface proteins) jsou vesměs determinovány genovými sekvencemi umístěnými v plasmidech a jsou značně variabilní v rámci druhu a jejich exprese je jemně regulována v asociaci s podmínkami životního cyklu bakterie.

V trávicím traktu klíštěte jsou na povrchu borélií exprimovány hlavně proteiny OspA a OspB, které zde mají funkci adhezivních molekul. V průběhu sání krve klíštětem se snižuje exprese těchto proteinů a zvyšuje se exprese OspC. Během přechodu do diseminované fáze choroby

dochází k poklesu exprese OspC a na povrchu borelie se objevuje protein VlsE vyznačující se vysokou antigenní variabilitou, která je podmíněna genovou rekombinací multidoménového VlsE genu (*Obonyo M, Munderloh UG, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, J Clin Microbiol. 1999 Jul;37(7):2137-41; Xu Q, McShan K, Liang FT., Microbiology. 2008 Nov;154(Pt 11):3420-9. doi: 0.1099/mic.0.2008/019737-0.*)

Protein OspA byl popsán jako první ze skupiny vnějších povrchových lipoproteinů (*Barbour et al., 1983 Infect Immun. 41(2):795-804*). OspA má molekulární hmotnost 31 kDa. Společně s proteinem OspB je exprimován na povrchu borelii v žaludku klíštěte (*Howe et al., 1985 Science. 227(4687):645-6*). Hlavní funkcí proteinu OspA je vazba na glykoprotein TROSPA přítomný na buňkách žaludečního epitelu klíštěte. Při sání klíštěte se jeho exprese významně snižuje. Další předpokládanou funkcí OspA je vazba na plasminogen v krvi savčího hostitele. V analogii s jinými mikroorganismy je schopnost vazby antigenu OspA na plasminogen vnímána jako faktor virulence. (*Lahteenmaki et al., 2001 FEMS Microbiol Rev. 25(5):531-52*).

Protein OspC je jedním z nadějných kandidátů pro konstrukci preventivní vakcíny proti Lymeské borelióze. Byl identifikován v roce 1992 jako druhý antigen (po OspA) který indukuje protektivní imunitní odpověď (*Preac-Mursic, Wilske et al. 1992 Infection 20(6):342-9*). OspC gen je lokalizována na cirkulárním plazmidu o velikosti 27 kb (*Marconi, R.T., Samuels, D.S. and Garon, C.F. (1993) J. Bacteriol., 175, 926±932*). Jde o lipoprotein o molekulové hmotnosti 22±23 kDa skládající se z 210 aminokyselin. Je tvořen převážně alfa helikálními strukturami propojeným smyčkami. Lipidový triacylglycerolový motiv umožňuje jeho ukotvení v buněčné membráně. Protektivita po aplikaci pokusným zvířatům byla potvrzena již počátkem devadesátých let 20. století. Jako problematická se ale záhy ukázala variabilita proteinu (*Preac-Mursic V, Wilske B, Patsouris E et al 1992 Infection 20:342–349*). Postupně bylo popsáno 38 strukturních variant antigenů OspC. Některé z nich se se zvýšenou frekvencí objevují u boreliových mikroorganismů vyvolávajících systémová onemocnění u člověka. Klony nesoucí tyto antigeny jsou proto označovány jako invazivní klony (*Seinost, G., Dykhuizen, D.E., Dattwyler, R.J., Golde, W.T., Dunn, J.J., Wang, I.-N., Wormser, G.P., Schriefer, M.E. and Luft, B.J. 1999 Infect. Immun., 67, 3518±3524*).

První veterinární vakcína proti borrelióze byla vyvinuta ve Spojených státech v r. 1990 pro psy. Šlo o celobuněčnou vakcínu založenou na bakterinech uvolněných z mikroorganismů homogenizací kultury. (*Levy SA, Lissman BA, Ficke CM., 1993 J Am Vet Med Assoc. Jun 1;202(11):1834-8; Wormser, GP., 1995 Ann Intern Med 123, 627 – 629*).

Výsledky pokusů o přenos protektivní imunity pomocí séra získaného ze zvířat imunizovaných některým z vnějších povrchových antigenů naznačily možnost přípravy subjednotkové vakcíny. Hlavními kandidátními antigeny pro takovou vakcínu se staly vnější povrchové proteiny OspA, B, C a D. Intenzivně byl studován zejména protein OspA. Protektivní efekt této subjednotkové vakcíny byl potvrzen experimentálně u myši, křečků a králíků (Fikrig E et al., 1990 *Science* Oct 26; 250(4980):553-6; Fikrig E et al., 1992 *InfectImmun. Mar*; 60(3):773-7). Laboratorní testy potvrdily, že aplikace tohoto proteinu ve formě purifikovaného, lipidovaného rekombinantního proteinu indukuje protektivní imunitu při parenterálním podání a chrání proti infekci boreliemi podanými nejen injekční cestou, ale též prostřednictvím infikovaného klíštěte, jako přirozeného vektoru. Potvrdilo se také, že infekční klíšťata sající na takto imunizovaných zvířatech ztrácejí svou infekciozitu (Keller D et al., 1994 *JAMA. Jun* 8;271(22): 1764-8; Fikrig E et al., 1992 *ProcNatlAcadSci USA. Jun* 15;89(12):5418-21).

První komerční monovalentní vakcína byla proto založena na antigenu OspA. Vakcína byla schválena Food and Drug Administration (FDA) v roce 1998 (Steere AC et al., *N Engl J Med. 1998 Jul* 23;339(4):209-15). Zvláštností této vakcíny je skutečnost, že interakce mezi hostitelskou protilátkou a patogenem probíhá mimo tělo hostitele – v žaludku klíštěte. Nedostatkem této vakcíny byla monovalentní kompozice. Vakcína byla připravena z proteinu OspA *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Tato genomospecies je dominantním infekčním původcem Lymeské boreliózy na severoamerickém kontinentu. Může tak být efektivní pro obyvatelstvo USA. Pro evropské podmínky však není optimální. OspA antigen připravený z kmene *Borrelia burgdorferi* sensu stricto nemůže pokrýt variabilitu OspA antigenů všech tří genomospecies na evropském kontinentu.

Ferritin II je klíčovým proteinem, který zajišťuje homeostázu sajícího klíštěte, které přijímá enormní množství železa ve formě hemoglobinu z hostitelovy krve. Bylo prokázáno, že vakcinování králíků rekombinantním klíštěcím Ferritin II proteinem významně snižuje sání klíšťat na vakcinovaných králících. (Hajdusek et al. 2010 *Vaccine* 28, 2993-2998)

Přechod od živých vakcín k bezpečnějším avšak méně imunogenním vakcínám, založených na rekombinantních antigenech vyžaduje nová strukturně definovaná adjuvans stimulující protilátkovou i T-buněčnou imunitu. V případě boreliové infekce opsonizační a zejména komplement aktivující protilátky jsou považovány za klíčový mechanismus protekce hostitele. Preparáty schválené pro klinickou aplikaci jsou převážně odvozené od hydroxidu hlinitého, fosforečnanu hlinitého, nebo původního síranu hlinitodraselného. Tato adjuvans

indukují převážně Th2 orientovanou imunitní odezvu spojenou s tvorbou neutralizačních protilátek. Jediná alternativa schválená pro klinickou (humánní) aplikaci potencující částečně i buněčnou efektorovou imunitu jsou MF59 (Novartis) a AS03 (GSK), (olejové emulze). Tato adjuvans indukují jen mírnou Th1 imunitní odpověď nezbytnou k tvorbě opsonizačních a komplement aktivujících protilátek. Tyto o požadavky v plném rozsahu splňují originální, plně syntetické, nepyrogenní, molekulární adjuvans na bázi glykopeptidů normuramylového typu. Kombinací strukturních změn v sacharidové a peptidové části jejich molekul byla eliminována z klinického hlediska netolerovatelná vysoká pyrogenita spojená obecně s muramylovými glykopeptidy (Ledvina M., Ježek J., Šaman D., Hříbalová V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1998, 63, 590-598; Ledvina M., Zyka D., Ježek J., Trnka T., Šaman D.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1998, 63, 577-589). Vzhledem k amfifilnímu charakteru těchto adjuvans, danému přítomností hydrofobní a polární/hydrofilní domény v jejich molekule, jsou tyto látky schopny vytvářet stabilní micelární struktury a lze je efektivně zabudovat do lipidové dvojvrstvy liposomálních nosičových systémů (Turánek J., Mašek J., Raška M., Ledvina M., in: *Biomedical Science, Engineering and Technology, Application of Liposomes for Construction of Vaccines*, InTech, January, 2012, 653-678.).

Liposomy, vesikly z fosfolipních membrán, představují biokompatibilní a víceúčelové nosiče pro přípravu cílených léčiv a konstrukci rekombinantních vakcín. Liposomy jsou nanočásticové systémy schválené FDA pro aplikaci v humánní medicíně. Jejich použití jako adjuvans bylo popsáno Gragoriadisem a Allisonem (*Nature* 252, 252, 1974). Použití metalochelatačních liposomů pro konstrukci rekombinantních vakcín bylo popsáno (Křupka et al. *Journal of Controlled Release* 160 (2012) 374–381; Mašek et al. 151 (2011) 193–201; Mašek et al. *Analytical Biochemistry* 408 (2011) 95–104)

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je chimérický polyepitopový rekombinantní antigen obsahující dva až deset imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspA z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PHei, PKa, *Borrelia garinii* PBi, TN, N34, VS307, G25, PBr, T25 a *Borrelia afzelii* Pko, a orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspC z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto A, B, I, Kb, *Borrelia afzelii* Pko a *Borrelia garinii* Pbi.

Imunodominantním úsekem je zde míněna sekvence zahrnující alespoň jeden epitop.

Tento chimérický polyepitopový antigen je základem vakcíny proti Lymeské borelióze pro humánní i veterinární použití.

Ve výhodném provedení je podstatou vynálezu polyepitopový rekombinantní antigen obsahující dva až deset, s výhodou sedm, imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující OspC orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspC z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto A, B, I, Kb, *Borrelia afzelii* Pko a *Borrelia garinii* Pbi.

V jiném výhodném provedení je podstatou vynálezu polyepitopový rekombinantní antigen obsahujícího dva až deset, s výhodou osm, imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspA z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PHei, PKa, *Borrelia garinii* PBi, TN, N34, VS307, G25, PBr, T25 a *Borrelia afzelii* Pko.

Imunodominantní úseky jsou sloučeny do fúzního proteinu v pořadí umožňujícím imunologické rozpoznání jednotlivých epitopů (tj. orientované sekvence). Na N-terminálním konci je k fúznímu proteinu s výhodou připojena sekvence šesti histidinů (His tag), umožňující metalochelatační vazbu na liposomální nosič. Takový způsob fixace rekombinantního proteinu k liposomálnímu nosiči zajišťuje imunologicky výhodnou orientaci fúzního proteinu tak, že imunodominantní C-terminální aminokyselinové sekvence jsou přístupnější pro indukci imunitní odpovědi.

Předmětem vynálezu je dále vakcinační konstrukt, obsahující mikro- nebo nano-partikulární nosič (tj. nanopartikulární nosič s velikostí částic do 1 mikrometru, mikropartikulární nosič s velikostí částic do 100 mikrometrů) obsahující metalochelatačně vážící složku, chimérický polyepitopový rekombinantní antigen vázaný prostřednictvím metalochelatačně vážící složky, a s výhodou dále adjuvans a/nebo Ferritin II.

S výhodou je nosičem liposom s inkorporovaným metalochelatačním lipidem (např. DOGS-Ni-NTA (Avanti Polar Lipids, USA)) jako metalochelatačně vážící složkou pro vazbu antigenu, popřípadě molekulárního adjuvans a/nebo Ferritin II rekombinantního proteinu na

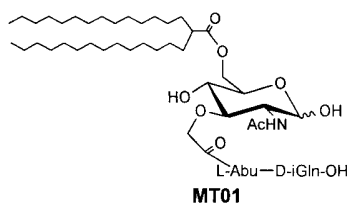
povrch liposomu. Nosičem může být i farmaceuticky přijatelný polymer, jako například kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, polymery a kopolymery na bázi kyseliny akrylové a methakrylové, akrylátů, methakrylátů, např. hydroxymethylmethakrylátu. Nosičem mohou rovněž být částice na bázi anorganických materiálů, např. hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, síran hlinitodraselný, křemičitanové hydrogely.

Předmětem vynálezu je také vakcína k prevenci Lymeské boreliózy pro humánní a veterinární použití, obsahující chimérický polyepitopový rekombinantní antigen podle vynálezu, a alespoň jedno adjuvans. Vakcína může případně obsahovat pomocné látky, jako jsou rozpouštědla, stabilizátory, emulgátory, nosiče, apod.

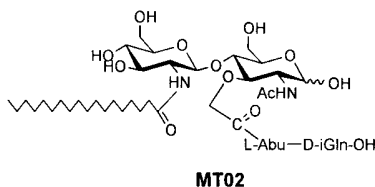
K prevenci šíření borelií z místa kousnutí klíštětem do celého organismu je nejvhodnější využít vakcínu obsahující rekombinantní polyepitopový antigen obsahující imunodominantní úseky OspC.

Adjuvans může být s výhodou vybráno ze skupiny zahrnující hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, síran hlinitodraselný, molekulární adjuvans na bázi normuramylových glykopeptidů popsaná v WO 2009/115782 (obecné vzorce I a II), adjuvans založená na disperzi částic na bázi polymerních polyakrylátových nosičů (například PetGelA).

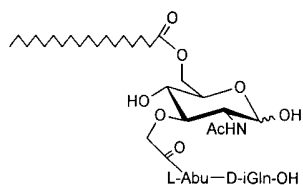
Molekulární adjuvans na bázi normuramylových glykopeptidů jsou zejména vybrána ze skupiny zahrnující:



6-*O*-(2-Tetradecylhexadecanoyl)-*N*-acetylnormuramoyl-L-2-aminobutanoyl-D-isoglutamin,

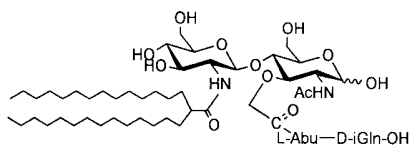


2-Deoxy-2-stearoylamino- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetylnormuramoyl-L-2-aminobutanoyl-D-isoglutamin,



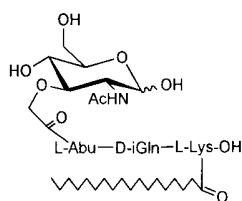
MT03

6-*O*-Stearoyl-*N*-acetylnormuramoyl-L-2-aminobutanoyl-D-isoglutamin,



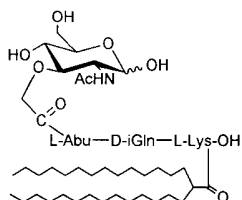
MT04

2-Deoxy-2-(2-tetradecylhexadecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetylnormuramoyl-L-2-aminobutanoyl-D-isoglutamin,



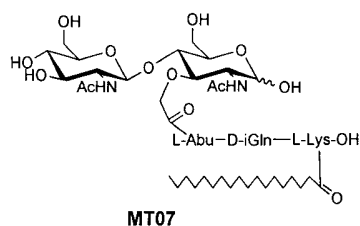
MT05

N-Acetylnormuramoyl-L-2-aminobutanoyl-D- isoglutaminyl-L-lysin(stearoyl),

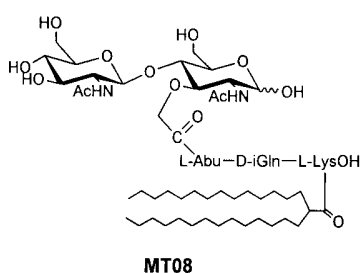


MT06

N-Acetylnormuramoyl-L-2-aminobutanoyl-D- isoglutaminyl-L-lysin(2-tetradecylhexadecanoyl),



2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylnormuramoyl- L-2-aminobutanoyl-D- isoglutaminyl-L-lysine(stearoyl),



2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylnormuramoyl- L-2-aminobutanoyl-D- isoglutaminyl-L-lysine(2-tetradecylhexadecanoyl).

Vakcína s výhodou obsahuje vakcinační konstrukt podle vynálezu.

Ve výhodném provedení jsou OspC antigeny vybrány ze skupin borelií zahrnující :

NP_047005 - gi|11497007: **OspC skupina A** (B31MI) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 1)

```

1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGKDGNTSA NSADESVKGP NLTEISKKIT
51 DSNVALLAVK EVEALLSSID EIAAKAIGKK IHQNNGLDTE NNHNGSLLAG
101 AYAISTLIKQ KLDGLKNEGL KEKIDAAKCC SETFTNKLKE KHTDLGKEGV
151 TDADAKEAIL KTNGTKTKGA EELGKLFESV EVLSKAAKEM LANSVKELTS
201 PVVAESPKKP

```

EF053525 - gi|117574163: **OspC skupina B** (LDP73) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 2)

```

1 NNSGKDGNTS ANSADESVKG PNLTEISKKI TDSNAVLLAV KEVEALLSSI
51 DELAKAIGKK IKNDGSLDNE ANRNESLLAG AYTISTLITQ KLSKLNSEGE
101 LKEKIAAAKK CSEEFSTKLK DNHAQLGIQGV VTDENAKKAI LKANAAGKDK
151 GVEELEKLSG SLESLSKAAK EMLANSVKEL TSPVVAESPK KP

```

AF467874 - gi|23507072: **OspC skupina I** (B331) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 3)

```

1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGKDGNTSA NSADESVKGP NLTEISKKIT
51 ESNVAVLAVK EVETLLTSID ELAKAIGKKI KNDVSLDNEA DHNGSLISGA
101 YLISTLITKK ISAIKDSGEL KAEIEKAKKC SEEF TAKLKG EHTDLGKEGV
151 TDDNAKKAIL KTNNDKTKGA DELEKLFESV KNLSKAAKEM LTNSVKELTS
201 PVVAESPKKP

```

EF053517 - gi|117574147: **OspC skupina K** (LDP74) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 4)

```

1 NNSGKDGNTS ANSADESVKG PNLTEISKKI TESNAVVLAV KEIETLLASI
51 DELATKAIGK KIQQNGGLAV EAGHNGTLLA GAYTISKLIT QKLDGLKNSE
101 KLKEKIENAK KCSEDFTKKL EGEHAQLGIE NVTDENAKKA ILITDAAKDK
151 GAAELEKLFK AVENLAKAAK EMLANSVKEL TSPIVAESPK KP

```

YP_063261 - gi|51038597: **OspC skupina PBi** *B. garinii* (SEQ ID NO. 5)

```

1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGGDSASTN PDESAKGPNL TVISKKITDS
51 NAFLAVKEV EALLSSIDEL SKAIGKKIKN DGTLDNEANR NESLIAGAYE
101 ISKLITQKLS VLNSEELKEK IKEAKDCSEK FTTKLKDSHA ELGIQSVQDD
151 NAKKAILKTH GTKDKGAKEL EELFKSLESL SKAAQAALTN SVKELTNPVV
201 AETPKKP

```

YP_709265 - gi|111074118: **OspC skupina PKo** *B. afzelii* (SEQ ID NO. 6)

```

1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGKGDSAS TNPADSAKG PNLTEISKKI
51 TDSNAFVLAV KEVETLVLSI DELAKKAIGQ KIDNNNGLAA LNNQNGSLLA
101 GAYAISTLIT EKLSKLKNLE ELKTEIAKAK KCSEEF TNKL KSGHADLGKQ
151 DATDDHAKAA ILKTHATTDK GAKEFKDLFE SVEGLLKAAQ VALTNSVKEL
201 TSPVVAESPK KP

```

Ze zvolených OspC antigenů byly vybrány úseky odpovídající $\alpha 3$ -L5- $\alpha 4$ -L6- $\alpha 5$ úsekům jednotlivých OspC proteinů viz následující tabulka.a dále C' terminální úsek odvozený z OspC PKo.

Označení v databázi GeneBank	Vybraný sekvenční úsek –	Zařazení OspC antigenu podle skupiny
---------------------------------	-----------------------------	---

	pořadí aminokyselin	
NP_047005 - gi 11497007	128-196	<i>B. burgdorferi</i> skupina A (B31MI)
EF053525 - gi 117574163	109-178	<i>B. burgdorferi</i> skupina B (LDP73)
AF467874 - gi 23507072	128-196	<i>B. burgdorferi</i> skupina I (B331)
EF053517 - gi 117574147	110-178	<i>B. burgdorferi</i> skupina K (LDP74)
YP_063261 - gi 51038597	125-193	<i>B. garinii</i> skupina P <i>Bi</i>
YP_709265 - gi 111074118	130-211	<i>B. afzelii</i> skupina P <i>ko</i>

Ve výhodném provedení má chimérický polyepitopový rekombinantní antigen založený na OspC antigenech připojeny N' konci tři peptidové úseky: 1) hexa His kotva (His tag) umožňující purifikaci proteinu pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie a přípravu metalochelatačních proteoliposomů, 2) štěpné místo pro thrombin umožňující odstranit His tag kotvu z rekombinantního proteinu pro imunodetekční ELISA aplikace stanovující hladiny antigenem navozených specifických protilátek u imunizovaných jedinců, 3) T7 epitop umožňující snadnou detekci rekombinantního proteinu během biotechnologické přípravy a purifikace pomocí anti T7 protilátky a celkový protein má následující sekvenci (SEQ ID NO. 7):

```

1  MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSMKKCSE EFSTKLKDNH
51  AQLGIQGVTD ENAKKAILKA NAAGKDKGVE ELEKLSGSLE SLSKAAKEML
101 ANSVKKKCSE DFTKKLEGEH AQLGIEQVTD ENAKKAILIT DAAKDKGAAE
151 LEKLKFAVEN LAKAAKEMLA NSVKKKCSET FTNKLKEKHT DLGKEGVTD
201 DAKEAILKTQ GTKTKGAEEL GKLFESEVL SKAAKEMLAN SVKKKCSEEF
251 TAKLKGEHTD LGKEGVTDN AKKAILKTNN DKTKGADELE KLFESVKQLS
301 KAAKEMLTNS VKKDCSEKFT TKLKDSHAEL GIQSVQDDNA KKAILKTHGT
351 KDKGAKELEE LFKSLESLSK AAQAALTNSV KKKCSEEFN KLKSGHADLG
401 KQDATDDHAK AAILKTHATT DKGAKFEKDL FESVEGLLKA AQVALTNSVK
451 ELTSPVVAES PKN

```

nebo v jiném výhodném provedení má chimérický polyepitopový rekombinantní antigen založený na OspC následující sekvenci (SEQ ID NO. 16).

```

1  MASMTGGQQM GRGSMKKCSE EFSTKLKDNH AQLGIQGVTD ENAKKAILKA

```

```

51 NAAGKDKGVE ELEKLSGSLE SLSKAAKEML ANSVKKKCSE DFTKKLEGEH
101 AQLGIEQVTD ENAKKAILIT DAAKDKGAAE LEKLFKAVEN LAKAAKEMLA
151 NSVKKKCSET FTKNLKEKHT DLGKEGVTD AKEAILKTQ GTKTKGAEEL
201 GKLFESVEVL SKAAKEMLAN SVKKKCSEEF TAKLKGEHTD LGKEGVTDN
251 AKKAILKTNN DKTGGADELE KLFESVKQLS KAAKEMLTNS VKKDCSEKFT
301 TKLKDSHAEL GIQSVQDDNA KKAILKTHGT KDKGAKELEE LFKSLESLSK
351 AAQAALTNSV KKKCSEEFNT KLKSGHADLG KQDATDDHAK AAILKTHATT
401 DKGAKFEKDL FESVEGLLKA AQVALTNSVK ELTSPVVAES PKN

```

Ve výhodném provedení jsou OspA antigeny vybrány ze skupiny borelií zahrnující :

>X80257.1 - gi|258153: **OspA-PBi** *B. garinii* (SEQ ID NO. 8)

```

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLMATVDK LELKGTSDKS NGSGTLEGEK SDKSKAKLTI SEDLSKTTFE
101 IFKEDGKTLV SKKVNSKDKS SIEEFNAKG ELSEKTILRA NGTRLEYTEI
151 KSDGTGKAKE VLKDFALEGT LAADKTTLKV TEGTVVLSKH IPNSGEITVE
201 LNDNSTQAT KKTGKWSNT STLTISVNSK KTKNIVFTKE DTITVQKYDS
251 AGTNLEGNAV EIKTLDELKN ALK

```

>S48322 - gi|258151: **OspA-PKo** *B. afzelii* (SEQ ID NO. 9)

```

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSA SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLKATVDK IELKGTSDKD NGSGVLEGTK DDKSKAKLTI ADDLSKTTFE
101 LFKEDGKTLV SRKVSSKDKT STDEMFNEKG ELSAKTMTRE NGTKLEYTEM
151 KSDGTGKAKE VLKNFTLEGK VANDKVTELEV KEGTVTLSKE IAKSGEVTVA
201 LNDTNTTQAT KKTGAWDSKT STLTISVNSK KTTQLVFTKQ DTITVQKYDS
251 AGTNLEGTAV EIKTLDELKN ALK

```

>X80251 - gi|984067: **OspA-PHei** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 10)

```

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGGMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLMATVEK LELKGTSDKN NGSGTLEGEK TDKSKVKLTI AEDLSKTTFE
101 IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNEKG EISEKTIVRA NGTRLEYTDI
151 KSDKTGKAKE VLKDFTEGT LAADGKTTLK VTEGTVTLSK NISKSGEITV
201 ALDDTDSSGN KKSGETWDSGT STLTISKNT KTKQLVFTKE DTITVQNYDS
251 AGTNLEGKAV EITTLKELKN ALK

```

>X80252 - gi|984085:**OspA-TN, N34, VS307, G25** *B. garinii*, **PWudll** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 11)

```
1  MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGGMTV LVSKEKDKDG
51 KYSLEATVDK LELKGTSDKN NGSQTLEGEK TDKSKVKLTI ADDLSQTKFE
101 IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNEKG ETSEKTIVRA NGTRLEYTDI
151 KSDGSGKAKE VLKDFTELEGT LAADGKTTLK VTEGTVVLSK NILKSGEITV
201 ALDDSDTTQA TKKTGKWDSK TSTLTISVNS QKTKNLVFTK EDTITVQKYD
251 SAGTNLEGKA VEITTLKELK DALK
```

>X80182 - gi|984069: **OspA-PKa** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 12)

```
1  MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKNKDG
51 KYDLIATVDK LELKGTSDKN NGSGVLEGVK ADKSKVKLTI SDDLQQTTL
101 VFKEDGKTLV SKKVTSKDKS STEEFNEKG EVSEKIITRA DGTRLEYTGI
151 KSDGSGKAKE VLKGYVLEGT LTAECTTLVV KEGTVTL SKN ISKSGEVSVE
201 LNDDTSSAAT KKTAAWN SGT STLTITVNSK KTKDLVFTKE NTITVQQYDS
251 NGTKLEGS AV EITKLDEIKN ALK
```

>X80256 - gi|984079: **OspA-PBr** *B. garinii* (SEQ ID NO. 13)

```
1  MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGGMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLMATVEK LELKGTSDKS NGSGVLEGEK ADKSKAKLTI SQDLNQTTFE
101 IFKEDGKTLV SRKVNSKDKS STEEFNDKG KLSEKVVTRA NGTRLEYTEI
151 KNDGSGKAKE VLKGFALEGT LTDGGETKLT VTEGTVTL SK NISKSGEITV
201 ALNDTETTPA DKKTGEWKSD TSTLTISKNS QKPKQLVFTK ENTITVQNYN
251 RAGNALEGSP AEIKDLAELK AALK
```

>X80254 - gi|984081: **OspA-T25** *B. garinii* (SEQ ID NO. 14)

```
1  MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLEATVDK LELKGTSDKN NGSGVLEGVK AAKSKAKLTI ADDLSQTKFE
101 IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNDKG KLSEKVVTRA NGTRLEYTEI
151 QNDGSGKAKE VLKSLTELEGT LTADGETKLT VEAGTVTL SK NISESGEITV
201 ELKDTETTPA DKKSGTWDSK TSTLTISKNS QKTKQLVFTK ENTITVQKYN
251 TAGTKLEGSP AEIKDLEALK AALK
```

Ze zvolených OspA antigenů byly vybrány oblasti odpovídající C terminální soudkovité oblasti tvořené β 14 až β 21 listy jednotlivých výše uvedených OspA viz následující tabulka a C' terminální α helix OspA proteinu. Chimérický OspA polyepitop neobsahuje sekvence, které byly v dřívějších studiích identifikovány jako potenciálně zkříženě autoreaktivní s lidským LFA-1 proteinem (oblast aminokyselin 165-173).

Označení v databázi GeneBank	Oblast sekvence v aminokyselinách	Zařazení OspA antigenu podle skupiny
X80257.1 - gi 258153	178-258	<i>B. garinii</i> PBi
S48322 - gi 258151	178-258	<i>B. afzelii</i> PKo
X80251 - gi 984067	179-258	<i>B. burgdorferi</i> PHei
X80252 - gi 984085	178-259	<i>B. garinii</i> TN, N34, VS307, G25 <i>B. burgdorferi</i> PWudll
X80182 - gi 984069	179-258	<i>B. burgdorferi</i> PKa
X80256 - gi 984079	179-259	<i>B. garinii</i> PBr
X80254 - gi 984081	179-259	<i>B. garinii</i> T25

Ve výhodném provedení má chimérický rekombinantní fúzní protein založený na OspA antigenech připojeny na N' konci tři peptidové úseky: 1) hexa His kotva (His tag) umožňující purifikaci proteinu pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie a přípravu metalochelatačních proteoliposomů, 2) štěpné místo pro thrombin umožňující odstranit His tag kotvu z rekombinantního proteinu pro imunodetekční ELISA aplikace stanovující hladiny antigenem navozených specifických protilátek u imunizovaných jedinců, 3) T7 epitop umožňující snadnou detekci rekombinantního proteinu během biotechnologické přípravy a purifikace pomocí anti T7 protilátky následující aminokyselinovou sekvencí (SEQ ID NO. 15)

```

1  MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSLKVTEG TVVLSKHIPN
51  SGEITVELND SNSTQATKKT GKWDSNTSTL TISVNSKKT NIVFTKEDTI
101 TVQKYDSAGT NLEGNLEVKE GTVTLKSKEIA KSGEVTVALN DTNTTQATKK
151 TGAWDSKTST LTISVNSKKT TQLVFTKQDT ITVQKYDSAG TNLEGTLKVT
201 EGTVTLISKNI SKSGEITVAL DTDSSGNKK SGTWDSGTST LTISKNRTKT
251 KQLVFTKEDT ITVQNYDSAG TNLEGKTLKV TEGTVVLSKN ILKSGEITVA

```

```

301 LDDSDTTQAT KKTGKWDSKT STLTISVNSQ KTKNLVFTKE DTITVQKYDS
351 AGTNLEGKLV VKEGTVTL SK NISKSGEVSV ELNDTDSSAA TKKTAAWN SG
401 TSTLTITVNS KKTKDLVFTK ENTITVQQYD SNGTKLEGSL TVTEGTVTLS
451 KNISKSGEIT VALNDTETTP ADKKTGEWKS DTSTLTISK N SQKPKQLVFT
501 KENTITVQNY NRAGNALEGS LTVEAGTVTL SKNISESGEI TVELKDTETT
551 PADKKSGTWD SKTSTLTISK NSQKTKQLVF TKENTITVQK YNTAGTKLEG
601 SAVEITKLDE IKNALKKDLE ALKAALK

```

nebo v jiném výhodném provedení má chimérický rekombinantní fúzní protein založený na OspA antigenech následující aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO. 17)

```

1 MASMTGGQQM GRGSLKVTEG TVVLSKHIPN SGEITVELND SNSTQATKKT
51 GKWDSNTSTL TISVNSKKT NIVFTKEDTI TVQKYDSAGT NLEGNLEVKE
101 GTVTL SKEIA KSGEVTVALN DTNTTQATKK TGAWDSKTST LTISVNSKKT
151 TQLVFTKQDT ITVQKYDSAG TNLEGLTKVT EGTVTL SKNI SKSGEITVAL
201 DDTDSSGNKK SGTWDSGTST LTISKNRKT KQLVFTKEDT ITVQNYDSAG
251 TNLEGKTLKV TEGTVVLSKN ILKSGEITVA LDDSDTTQAT KKTGKWDSKT
301 STLTISVNSQ KTKNLVFTKE DTITVQKYDS AGTNLEGKLV VKEGTVTL SK
351 NISKSGEVSV ELNDTDSSAA TKKTAAWN SG TSTLTITVNS KKTKDLVFTK
401 ENTITVQQYD SNGTKLEGSL TVTEGTVTLS KNISKSGEIT VALNDTETTP
451 ADKKTGEWKS DTSTLTISK N SQKPKQLVFT KENTITVQNY NRAGNALEGS
501 LTVEAGTVTL SKNISESGEI TVELKDTETT PADKKSGTWD SKTSTLTISK
551 NSQKTKQLVF TKENTITVQK YNTAGTKLEG SAVEITKLDE IKNALKKDLE
601 ALKAALK

```

Přehled vyobrazení

Obr. 1 Trojrozměrný prediktivní model struktury chimérického OspA polyepitopu (polyOspA) podle příkladu 1. Predikce byla provedena pomocí programu Phyre 2.

Obr. 2 Výsledky purifikace rekombinantního chimérického OspA polyepitopu (polyOspA) podle příkladu 1 pomocí afinitní chromatografie s Ni-NTA agarosou. Bakterie exprimující polyOspA byly lyzovány za nativních podmínek a lyzát byl nanesen na Ni-NTA kolonu a poté byla kolona postupně promývána pufrům s rostoucí koncentrací imidazolu. Jednotlivé promývací frakce (Promytí 1 - 10 mM imidazol, Promytí 2 - 30 mM imidazol, Promytí 3 - 40 mM imidazol, Promytí 4 - 60 mM imidazol, Promytí 5 - 80 mM imidazol) a eluční frakce, provedené pufrům s koncentrací imidazolu 250 mM tvořené 3 objemy kolony (Eluce 1 až Eluce 6) byly nanesený na 10% SDS-PAGE, rozděleny v elektrickém poli. Gel byl poté barven pomocí Coomassie Brilliant Blue.

Obr. 3 Trojrozměrný prediktivní model struktury chimérického OspC polyepitopu (polyOspC) podle příkladu 2. Predikce byla provedena pomocí programu Phyre 2.

Obr. 4 Výsledky purifikace rekombinantního chimérického OspC (polyOspC) polyepitopu podle příkladu 2 pomocí afinitní chromatografie s Ni-NTA agarosou. Bakterie exprimující polyOspC byly lyzovány za nativních podmínek a lyzát byl nanesen na Ni-NTA kolonu a poté byla kolona postupně promývána pufrům s rostoucí koncentrací imidazolu. Jednotlivé promývací frakce jsou označeny použitou koncentrací imidazolu 10 mM - až 80 mM imid a eluční frakce, provedené pufrům s koncentrací imidazolu 250 mM tvořené 1.5 objemu kolony (Eluce 1 až Eluce 10) byly nanesený na 10% SDS-PAGE, rozdělený v elektrickém poli. Gel byl poté barven pomocí Coomassie Brilliant Blue.

Obr. 5 Distribuce velikostí OspA polyepitopu (polyOspA) (Příklad 3).

Velikost polyOspA (200 µg/ml v PBS) byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer ZS (Malvern, UK).

Obr. 6 Graf teplotní stability antigenu polyOspA (Příklad 3).

Teplotní stabilita polyOspA (200 µg/ml v PBS) byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer ZS (Malvern, UK).

Obr. 7 Distribuce velikostí OspC polyepitopu (polyOspC) (Příklad 3).

Velikost polyOspC (200 µg/ml v PBS) byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer ZS (Malvern, UK).

Obr. 8 Graf teplotní stability antigenu polyOspC (Příklad 3).

Teplotní stabilita polyOspC (200 µg/ml v PBS) byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer ZS (Malvern, UK).

Obr. 9 Vliv polohy His tag-u na C- a N- konci na termální denaturaci antigenu polyOspC (Příklad 3). Charakteristiky byly získány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (koncentrace proteinů 1 mg/ml v PBS). A) polyOspC His tag na N-konci; B) polyOspC His tag na C-konci.

Obr. 10 Charakteristika termálního přechodu antigenu polyOspA (Příklad 3). Charakteristika byly získány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (koncentrace proteinu 1 mg/ml v PBS). PolyOspA His tag na N-konci.

Obr. 11 Schéma struktury liposomální vakcinační částice na bázi metalochelatačních nanoliposomů s molekulárním adjuvans (Příklad 4). Vlevo je výsek povrchu liposomu z nějž vystupuje do středu obrázku DOGS-NTA (pro vazbu antigenu na povrch liposomu) a v dolní části obrázku lipofilní nepyrogenní derivát muramyl dipeptidu (norAbuMDP) jako adjuvans.

Vpravo nahoře rekombinantní protein s kotvou 6 histidinů, které se prostřednictvím komplexů niklu (Ni) na metalochelatačním lipidu DOGS-NTA nekovalentně navazují na povrch liposomu.

Obr. 12 Průkaz vazby rekombinantního antigenu na metalochelatační liposomy pomocí změny distribuce velikosti liposomů po vazbě polyepitopového antigenu (polyOspC) (Příklad 4). Změna distribuce velikosti byla měřena pomocí přístroje ZetaSizer ZS (Malvern, UK). Vložený obrázek z TEM ukazuje liposom bez navázaného proteinu (A) a molekuly polyOspC vázány na povrch liposomu (bílé šipky) a průkaz proteinu pomocí imunoznačení nanočásticemi zlata (černé šipky) (B).

Obr. 13 Výsledky stanovení hladiny sérových protilátek myší imunizovaných polyepitopem polyOspA a polyOspC (Příklad 5). Reaktivita protilátek byla stanovena pomocí ELISA. Na dno ELISA panelu byl navázán rekombinantní polyOspA (horní řada panelů) nebo polyOspC (dolní řada panelů). Myší séra byla naředěna identicky a poté nanesena do jednotlivých jamek. Vazba sérové protilátky specificky reagující s OspA nebo OspC byla prokázána sekundární protilátkou proti celkovému myšimu IgG, nebo IgG1, nebo IgG2a značenou peroxidázou a poté barevnou reakcí s orthofenylendiaminem. Rekombinantní polyepitopy polyOspA a polyOspC použité k imunizaci mají N-terminální His tag.

- A. polyOspC nebo polyOspA
- B. polyOspC nebo polyOspA (adjuvans: Alum)
- C. polyOspC nebo polyOspA (adjuvans: Montanid – PET GEL A)
- D. polyOspC nebo polyOspA (adjuvans: metalochelatační liposomy s molekulárním adjuvans MT06)
- E. polyOspC nebo polyOspA (adjuvans: metalochelatační liposomy s molekulárním adjuvans MT06)

Obr. 14 Reakce sér myší imunizovaných polyOspC s divokými OspC proteiny izolovanými z různých druhů borelií (Příklad 5). Séra myší imunizovaných rekombinantními OspC proteiny s N terminálně připojenou His kotvou byla testována s diagnostickými stripy (Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgM) obsahujícími políčka s OspC všech tří patogenních kmenů – *B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelii*. A – sérum myší imunizované chimérickým polyepitopem OspC (polyOspC), B – sérum myší imunizované rekombinantním OspC z *B. burgdorferi* B31, C – kontrola – sérum myší vakcinované rekombinantním HIS značeným antigenem z *Candida albicans* hps90.

A – chimérický OspC polyepitop (polyOspC)

B – OspC z *B. burgdorferi* B31

C – kontrolní sérum (negativní)

Obr. 15 Stanovení protilátkové odpovědi psů proti OspA *B. afzelii* (A), *B. garinii* (B) a *B. burgdorferi* (C) po aplikaci chimérického rekombinantního antigenu polyOspA v kombinaci s různými adjuvans.

Experimentální vakcíny byly podány i.d. a s.c., protilátková odpověď byla sledována v průběhu 83 dnů. Molekulární adjuvans MT03 v kombinaci s PET GEL A bylo podáno ve formě micel.

Obr. 16: Stanovení protilátkové odpovědi psů proti OspC *B. afzelii* (A), *B. garinii* (B) a *B. burgdorferi* (C) po aplikaci chimérického rekombinantního antigenu polyOspC v kombinaci s různými adjuvans.

Experimentální vakcíny byly podány i.d. a s.c., protilátková odpověď byla sledována v průběhu 83 dnů.

Obr. 17 Indukce specifické protilátkové odpovědi psů proti rekombinantnímu Ferritinu II formulovanému s různými adjuvans.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. Příprava antigenu: OspA polyepitop

Polyepitop OspA je připraven rekombinantní technologií z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii* náležejících do skupin PHei, PKa, (*Borrelia burgdorferi* s.s.), PBi, TN, N34, VS307, G25, PBr, T25 (*Borrelia garinii*) a PKo (*Borrelia afzelii*), charakteristických svou invazivitou a tedy schopností vyvolat systémové infekce. V databázi GenBank jsou OspA proteiny, jejichž fragmenty byly složeny do vakcinačního OspA polyepitopu, uvedeny pod následujícím označením s aminokyselinovou sekvencí:

X80257.1 - gi|258153: **OspA-PBi** *B. garinii* (SEQ ID NO. 8)

```

1  MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG
51  KYSLMATVDK LELKGTSDKS NGSQTLEGEK SDKSKAKLTI SEDLSKTTFE
101 IFKEDGKTLV SKKVNSKDKS SIEEFNAKG ELSEKTI LRA NGTRLEYTEI
151 KSDGTGKAKE VLKDFALEGT LAADKTTLKV TEGTVVLSKH IPNSGEITVE
201 LNDNSTQAT KKTGKWDSNT STLTISVNSK KTKNIVFTKE DTITVQKYDS

```

251 AGTNLEGN AV EIKTLDELKN ALK

S48322 - gi|258151: **OspA-PKo** *B. afzelii* (SEQ ID NO. 9)

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSA SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLKATVDK IELKGTSDKD NGSGVLEGTK DDKSKAKLTI ADDLSKTTFE
101 LFKEDGKTLV SRKVSSKDKT STDEMFNEKG ELSAKTMTRE NGTKLEYTEM
151 KSDGTGKAKE VLKNFTLEGK VANDKVTLEV KEGTVTLKSKE IAKSGEVTVA
201 LNDTNTTQAT KKTGAWDSKT STLTISVNSK KTTQLVFTKQ DTITVQKYDS
251 AGTNLEGTAV EIKTLDELKN ALK

X80251 - gi|984067: **OspA-PHei** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 10)

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGGMKV LVSKEKDKDG
51 KYSLMATVEK LELKGTSDKN NGSGTLEGEK TDKSKVKLTI AEDLSKTTFE
101 IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNEKG EISEKTIVRA NGTRLEYTDI
151 KSDKTGKAKE VLKDFTELEGT LAADGKTTLK VTEGTVTLISK NISKSGETIV
201 ALDDTDSSGN KKSGETWDSGT STLTISKNRT KTKQLVFTKE DTITVQNYDS
251 AGTNLEGKAV EITTLKELKN ALK

X80252 - gi|984085: **OspA-TN, N34, VS307, G25** *B. garinii*, **PWudll** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 11)

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGGMTV LVSKEKDKDG
51 KYSLEATVDK LELKGTSDKN NGSGTLEGEK TDKSKVKLTI ADDLSQTKFE
101 IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEFNEKG ETSEKTIVRA NGTRLEYTDI
151 KSDGSGKAKE VLKDFTELEGT LAADGKTTLK VTEGTVVLSK NILKSGETIV
201 ALDDSDTTQA TKKTGKWDSK TSTLTISVNS QKTKNLVFTK EDTITVQKYD
251 SAGTNLEGKA VEITTLKELK DALK

X80182 - gi|984069: **OspA-PKa** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 12)

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKNKDG
51 KYDLIATVDK LELKGTSDKN NGSGVLEGVK ADKSKVKLTI SDDLQQTTLT
101 VFKEDGKTLV SKKVTSKDKS STEEFNEKG EVSEKIITRA DGTRLEYTGI
151 KSDGSGKAKE VLKGYVLEGT LTAEKTTLVV KEGTVTLSKN ISKSGETSVE
201 LNDTDSSAAT KKTAAWNSGT STLTITVNSK KTKDLVFTKE NTITVQQYDS

251 NGTKLEGS AV EITKLDEIKN ALK

X80256 - gi|984079: **OspA-PBr** *B. garinii* (SEQ ID NO. 13)

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGGMKV LVSKEKDKDG
 51 KYSLMATVEK LELKGTSDKS NGSGVLEGEK ADKSKAKLTI SQDLNQTTFE
 101 IFKEDGKTLV SRKVNSKDKS STEEKFNDDG KLSEKVVTRA NGTRLEYTEI
 151 KNDGSGKAKE VLKGFALEGT LTDGGETKLT VTEGTVTLTK NISKSGETV
 201 ALNDTETTPA DKKTGEWKSD TSTLTISKNS QKPKQLVFTK ENTITVQNYN
 251 RAGNALEGSP AEIKDLAELK AALK

X80254 - gi|984081: **OspA-T25** *B. garinii* (SEQ ID NO. 14)

1 MKKYLLGIGL ILALIACKQN VSSLDEKNSV SVDLPGEMKV LVSKEKDKDG
 51 KYSLEATVDK LELKGTSDKN NGSGVLEGVK AAKSKAKLTI ADDLSQTKFE
 101 IFKEDGKTLV SKKVTLKDKS STEEKFNDDG KLSEKVVTRA NGTRLEYTEI
 151 QNDGSGKAKE VLKSLTLEGT LTADGETKLT VEAGTVTLTK NISESGETV
 201 ELKDTETTPA DKKSGTWDSK TSTLTISKNS QKTKQLVFTK ENTITVQKYN
 251 TAGTKLEGSP AEIKDLEALK AALK

Pro konstrukci polyepitopu OspA byly použity úseky odpovídající C terminální soudkovité oblasti tvořené β 14 až β 21 listy jednotlivých výše uvedených OspA proteinů viz následující tabulka. Polyepitop je ukončen C' terminálním α helixem. Chimerický OspA polyepitop neobsahuje sekvence, které byly v dřívějších studiích identifikovány jako potenciálně zkříženě autoreaktivní s lidským LFA-1 proteinem (oblast aminokyselin 165-173). OspA polyepitop dále obsahuje na N' konci tři peptidové úseky: 1) hexa His kotvu (His tag) umožňující purifikaci proteinu pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie a přípravu metalochelatačních proteoliposomů, 2) štěpné místo pro thrombin umožňující odstranit His tag kotvu z rekombinantního proteinu pro imunodetekční ELISA aplikace stanovující hladiny antigenem navozených specifických protilátek u imunizovaných jedinců, 3) T7 epitop umožňující snadnou detekci rekombinantního proteinu během biotechnologické přípravy a purifikace pomocí anti T7 protilátky.

Označení v databázi GeneBank	Oblast sekvence v aminokyselinách	Zařazení OspA antigenu podle skupiny
---------------------------------	--------------------------------------	---

X80257.1 - gi 258153	178-258	<i>B. garinii</i> PBi
S48322 - gi 258151	178-258	<i>B. afzelii</i> PKo
X80251 - gi 984067	179-258	<i>B. burgdorferi</i> PHei
X80252 - gi 984085	178-259	<i>B. garinii</i> TN, N34, VS307, G25 <i>B. burgdorferi</i> PWudll
X80182 - gi 984069	179-258	<i>B. burgdorferi</i> PKa
X80256 - gi 984079	179-259	<i>B. garinii</i> PBr
X80254 - gi 984081	179-259	<i>B. garinii</i> T25

Výsledný polyepitop OspA má následující aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO. 15):

```

1  MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSLKVTEG TVVLSKHIPN
51  SGEITVELND SNSTQATKKT GKWDSNTSTL TISVNSKKT NIVFTKEDTI
101 TVQKYDSAGT NLEGNLEVKE GTVTLSEIA KSGEVTVALN DTNTTQATKK
151 TGAWDSKTST LTISVNSKKT TQLVFTKQDT ITVQKYDSAG TNLEGLTKVT
201 EGTVTLKNI SKSGEITVAL DDTDSSGNKK SGTWDSGTST LTISKNRKT
251 KQLVFTKEDT ITVQNYDSAG TNLEGKTLKV TEGTVVLSKN ILKSGEITVA
301 LDDSDTTQAT KKTGKWDST STLTISVNSQ KTKNLVFTKE DTITVQKYDS
351 AGTNLEGKLV VKEGTVTLK NISKSGEVSV ELNDTDSSAA TKKTAAWNNG
401 TSTLTITVNS KKTKDLVFTK ENTITVQQYD SNGTKLEGS TVTEGTVTSL
451 KNISKSGEIT VALNDTETTP ADKKTGEWKS DTSTLTISK N SQPKQLVFT
501 KENTITVQNY NRAGNALEGS LTVEAGTVTL SKNISESGEI TVELKDTETT
551 PADKKSGTWD SKTSTLTISK NSQKTKQLVF TKENTITVQK YNTAGTKLEG
601 SAVEITKLDE IKNALKKDLE ALKAALK

```

Trojrozměrný prediktivní model struktury tohoto chimérického OspA polyepitopu je na **Obr.**

1. Fúzní chimérický rekombinantní protein (polyOspA), složený z imunodominantních oblastí OspA proteinů popsanych u klinicky nejvýznamnějších kmenů Borelií, fúzovaný na N' konci s His tag kotvou pro metaloafinitní purifikaci. Genový konstrukt pro polyOspA byl vložen do plasmidu pET28 umožňujícím indukovanou expresi genu v bakteriálním systému po přidavku isopropyl-β-D-thiogalaktosidu. Protein byl exprimován v bakteriálním kmeni *E. coli* BL21 (DE3) a purifikován z bakteriálního lyzátu pomocí metaloafinitní chromatografie za nativních podmínek s využitím vazby His tagu na Ni-NTA agarosu. K promytí kolony a eluci cílového proteinu byly použity pufrý obsahující imidazol jako kompetitor afinitní vazby.

Výstup purifikace OspA polyepitopu pomocí afinitní chromatografie s Ni-NTA agarosou je na **Obr. 2**.

Příklad 2: Příprava antigenu: OspC polyepitop

Polyepitop OspC je připraven rekombinantní technologií z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii* náležejících do skupin A, B, I a Kb (*Borrelia burgdorferi* s. s.), Pbi (*Borrelia garinii*) a PKo, (*Borrelia afzelii*), charakteristických svou invazivitou a tedy schopností vyvolat systémové infekce. V databázi GenBank jsou OspC proteiny, jejichž fragmenty byly složeny do vakcinačního OspC polyepitopu, uvedeny pod následujícím označením s aminokyselinovou sekvencí:

NP_047005 - gi|11497007: **OspC skupina A** (B31MI) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 1)

```
1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGKDGNTSA NSADESVKGP NLTEISKKIT
51 DSNVLLAVK EVEALLSSID EIAAKAIGKK IHQNNGLDTE NNHNGSLLAG
101 AYAISTLIKQ KLDGLKNEGL KEKIDAAKCC SETFTNKLKE KHTDLGKEGV
151 TDADAKEAIL KTNCTKTKGA EELGKLFESV EVLSKAAKEM LANSVKELTS
201 PVVAESPCKP
```

EF053525 - gi|117574163: **OspC skupina B** (LDP73) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 2)

```
1 NNSGKDGNTS ANSADESVKG PNLTEISKKI TDSNAVLLAV KEVEALLSSI
51 DELAKAIGKK IKNDGSLDNE ANRNESLLAG AYTISTLITQ KLSKLNSEG
101 LKEKIAAAK CSEEFSTKLK DNHAQLGIQG VTDENAKKAI LKANAAGKDK
151 GVEELEKLSG SLESLSKAAK EMLANSVKEL TSPVVAESPK KP
```

AF467874 - gi|23507072: **OspC skupina I** (B331) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 3)

```
1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGKDGNTSA NSADESVKGP NLTEISKKIT
51 ESNVLLAVK EVETLLTSID ELAKAIGKKI KNDVSLDNEA DHNGSLISGA
101 YLISTLITKK ISAIKDSGEL KAEIEKAKCC SEEF TAKLKG EHTDLGKEGV
151 TDDNAKKAIL KTNNDKTKGA DELEKLFESV KNLSKAAKEM LTNSVKELTS
201 PVVAESPCKP
```

EF053517 - gi|117574147: **OspC skupina K** (LDP74) *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 4)

1 NNSGKDGNTS ANSADESVKG PNLTEISKKI TESNAVVLAV KEIETLLASI
 51 DELATKAIGK KIQQNGGLAV EAGHNGTLLA GAYTISKLIT QKLDGLKNSE
 101 KLKEKIENAK KCSEDFTKKL EGEHAQLGIE NVTDENAKKA ILITDAAKDK
 151 GAAELEKLFK AVENLAKAAK EMLANSVKEL TSPIVAESPK KP

YP_063261 - gi|51038597: **OspC skupina PBi** *B. garinii* (SEQ ID NO. 5)

1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGGDSASTN PDESAKGPNL TVISKKITDS
 51 NAFLAVKEV EALLSSIDEL SKAIGKKIKN DGTLDNEANR NESLIAGAYE
 101 ISKLITQKLS VLNSEELKEK IKEAKDCSEK FTTKLKDSHA ELGIQSVQDD
 151 NAKKAILKTH GTKDKGAKEL EELFKSLESL SKAAQAALTN SVKELTNPVV
 201 AETPKKP

YP_709265 - gi|111074118: **OspC skupina PKo** *B. afzelii* (SEQ ID NO. 6)

1 MKKNTLSAIL MTLFLFISCN NSGKGGDSAS TNPADSAKG PNLTEISKKI
 51 TDSNAFVLAV KEVETLVLSI DELAKKAIGQ KIDNNGLAA LNNQNGSLLA
 101 GAYAISTLIT EKLSKLKNLE ELKTEIAKAK KCSEEFNTKL KSGHADLGKQ
 151 DATDDHAKAA ILKTHATTDK GAKEFKDLFE SVEGLLKAAQ VALTNSVKEL
 201 TSPVVAESPK KP

Pro konstrukci polyepitopu OspC byly použity úseky odpovídající $\alpha 3$ -L5- $\alpha 4$ -L6- $\alpha 5$ úsekům jednotlivých OspC proteinů, viz následující tabulka. Polyepitop je ukončen C' terminálním úsekem odvozeným z OspC PKo. Protein dále obsahuje na N' konci tři peptidové úseky: 1) hexa His kotvu (His tag) umožňující purifikaci proteinu pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie a přípravu metalochelatačních proteoliposomů, 2) štěpné místo pro thrombin umožňující odstranit His tag kotvu z rekombinantního proteinu pro imunodetekční ELISA aplikace stanovující hladiny antigenem navozených specifických protilátek u imunizovaných jedinců, 3) T7 epitop umožňující snadnou detekci rekombinantního proteinu během biotechnologické přípravy a purifikace pomocí anti T7 protilátky.

Označení v databázi GeneBank	Vybraný sekvenční úsek – pořadí aminokyselin	Zařazení OspC antigenu podle skupiny
NP_047005 - gi 11497007	128-196	<i>B. burgdorferi</i> skupina A (B31MI)

EF053525 - gi 117574163	109-178	<i>B. burgdorferi</i> skupina B (LDP73)
AF467874 - gi 23507072	128-196	<i>B. burgdorferi</i> skupina I (B331)
EF053517 - gi 117574147	110-178	<i>B. burgdorferi</i> skupina K (LDP74)
YP_063261 - gi 51038597	125-193	<i>B. garinii</i> skupina PBi
YP_709265 - gi 111074118	130-211	<i>B. afzelii</i> skupina Pko

Výsledný polyepitop OspC má následující aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO. 7):

```

1  MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSMKKCSE EFSTKLKDNH
51  AQLGIQGVTD ENAKKAILKA NAAGKDKGVE ELEKLSGSLE SLSKAAKEML
101 ANSVKKKCSE DFTKKLEGEH AQLGIEQVTD ENAKKAILIT DAAKDKGAAE
151 LEKLFKAVEN LAKAAKEMLA NSVKKKCSET FTNKLKEKHT DLGKEGVTD
201 DAKEAILKTQ GTKTKGAEEL GKLFESEVL SKAAKEMLAN SVKKKCSEEF
251 TAKLKGEHTD LGKEGVTDN AKKAILKTNN DTKGADLE KLFESVKQLS
301 KAAKEMLTNS VKKDCSEKFT TKLKDSHAEL GIQSVQDDNA KKAILKTHGT
351 KDKGAKELEE LFKSLESLSK AAQAALNSV KKKCSEEFN KLKSGHADLG
401 KQDATDDHAK AAILKTHATT DKGAKFEKDL FESVEGLLKA AQVALTNSVK
451 ELTSPVVAES PKN

```

3-D prediktivní model struktury tohoto chimérického OspC polyepitopu je na **Obr. 3**. Fúzní chimerický rekombinantní protein (polyOspC), složený z imunodominantních oblastí OspC proteinů popsanych u klinicky nejvýznamnějších kmenů Borelií, fúzovaný na N' konci s His tag kotvou pro metaloafinitní purifikaci. Genový konstrukt pro polyOspC byl vložen do plasmidu pET28 umožňujícím indukovanou expresi genu v bakteriálním systému po přidavku isopropyl-β-D-thiogalaktosidu. Protein byl exprimován v bakteriálním kmeni *E. coli* BL21 (DE3) a purifikován z bakteriálního lyzátu pomocí metaloafinitní chromatografie za nativních podmínek s využitím vazby His tagu na Ni-NTA agarosu. K promytí kolony a eluci cílového proteinu byly použity pufrý obsahující imidazol jako kompetitor afinitní vazby. Výstup purifikace OspC polyepitopu pomocí afinitní chromatografie s Ni-NTA agarosou je na **Obr. 4**.

Příklad 3: Charakterizace antigenů

Velikost antigenu a teplotní stabilita

Hydrodynamický poloměr a teplotní stabilita antigenu byla hodnocena metodou dynamického rozptylu světla (DLS). (ZetaSizer ZS, Malvern). Teplotní gradient byl zvolen v rozmezí 10 až 60 °C, rychlost gradientu 0,5 °C/ min. Hydrodynamický průměr u antigenu polyOspA byl určen 5,3 nm, u antigenu polyOspC 6,1 nm. Výpočet byl proveden v modu maximálního počtu částic.

Obr. 5 a 6 ukazují distribuci velikostí, resp. teplotní stabilitu polyOspA . **Obr. 7 a 8** ukazují distribuci velikostí, resp. teplotní stabilitu polyOspC.

Termální přechody a vliv polohy His tagu na C- a N- konci na termální denaturaci antigenu polyOspC včetně termodynamických parametrů termálního přechodu jsou zobrazeny na **Obr. 9**. Charakteristiky byly získány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (NanoDSC II, TA Instruments, USA) (koncentrace proteinů 1 mg/ml v PBS). A) polyOspC His tag na N-konci; B) polyOspC His tag na C-konci. Poloha His tag na N-konci zvyšuje teplotní stabilitu o přibližně 2 °C oproti C-terminálnímu umístění. polyOspA byl připraven s His tag na N-konci a jeho termální stabilita je vyšší než u polyOspA (**Obr. 10**).

Příklad 4: Liposomální formulace rekombinantních vakcín

Liposomální preparáty byly připraveny smícháním antigenů polyOspA nebo polyOspC (20 ug/dávka) s liposomy (0,3 mg lipidu/dávka). Jako komponenty pro tvorbu liposomů byly použity následující lipidy od firmy Avanti Polar Lipids (USA): Vaječný fosfatidyl cholin (EPC) (71 mol. %), palmitoyl-oleoyl fosfatidyl glycerol (POPG) (19 mol. %) a syntetický metalochelatační lipid DOGS-NTA-Ni (1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid) succinyl] (nickel salt)) (pro vazbu antigenu na povrch liposomu; 5 mol. %). Všechny lipidy byly pořízeny od firmy Avanti Polar Lipids, USA. Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidního filmu s následnou extruzí přes polykarbonátové filtry o velikosti pórů 200 nm (Millipore). Jako molekulární adjuvans inkorporované do liposomů byly použity monofosforyl lipid A (MPLA) nebo lipofilní derivát norAbuMDP (MT03) (struktura a chemický název je v příloze 1) v dávce 5 mol. %. Toto molekulární množství odpovídá 32,6 µg MPLA nebo 21,4 µg MT03 na vakcinační dávku.

Charakterizace liposomů

Kvalita liposomálních preparátů byla hodnocena metodami DLS (ZeteSizer ZS, Malvern) a TEM (EM Philips 208 S, Morgagni software, FEI, Brno, ČR). Povrch liposomů byl modifikován antigenem. Antigen se navázal pomocí His tag kotvy na metalochelatační lipid obsažený v liposomu.

Obr. 11 schematicky znázorňuje strukturu liposomální vakcinační částice. **Obr. 12** znázorňuje změřené změny distribuce velikosti (metodou DLS), které jednoznačně potvrzují vazbu antigenu na metalochelatační lipid v liposomu – střední velikost metalochelatačních nanoliposomů je 48 nm, o navázání OspC polyepitopu se změní na 67 nm. Metoda TEM ukázala jednoznačně metalochelatační vazbu antigenů na liposom (vložený snímek na Obr. 13).

Příklad 5. Imunizace myši

Myši byly imunizovány rekombinantním OspA polyepitopem (panel OspA) nebo rekombinantním OspC polyepitopem (panel OspC) dvěma dávkami aplikovanými i.d. v intervalu 14 dní dle níže uvedených schémat.

A) bez adjuvans a liposomu

polyOspA (20 µg/dávka) nebo polyOspC protein volný (20 µg/dávka)

B) ALUXID

Preparáty byly připraveny smícháním antigenu polyOspA nebo polyOspC (50 µg/dávka) a ALUXIDU (25 obj. % finálního objemu aplikované dávky).

C) PET GEL A

Preparáty byly připraveny přidáním antigenu polyOspA nebo polyOspC (50 µg/dávka) a PET GEL A (Seppic) (5 obj. % finálního objemu aplikované dávky).

D) liposomy MT03

Preparáty byly připraveny přidáním antigenu polyOspA nebo polyOspC (20 µg/dávka) k liposomům (0,3 mg lipidu/dávku) s obsahem MT03 (21,3 µg/dávku) a inkubovány nejméně 30 min při pokojové teplotě.

E) liposomy MPLA

Preparáty byly připraveny přidáním antigenu polyOspA nebo polyOspC (20 µg/dávka) k liposomům (0,3 mg lipidu na dávku) s obsahem MPLA (32,6 µg na dávku) a inkubovány 30 min při pokojové teplotě.

Jeden měsíc po druhé dávce byla odebrána séra a koncentrace OspA nebo OspC-specifických protilátek byly stanoveny pomocí ELISA, kde byly na dna jamek navázány rekombinantní proteiny v dávce 100 ng na jamku. Na ose jsou jednotlivé vakcinační preparáty označeny písmeny ve shodě s textem. V případě imunizace solubilním rekombinantním OspA polyepitopem prokázala ELISA jen prahovou antigeně specifickou reakci ve všech izotypech IgG i IgM (IgG viz **Obr. 13**, IgM neuvedeno). Imunizace rekombinantním solubilním OspC polyepitopem indukovala výraznější, byť stále velmi slabou imunitní protilátkovou odpověď. Naopak imunizace rekombinantními OspA a OspC polyepitopy ve formě metalochelatačních liposomů s jednotlivými adjuvans indukovala mnohem vyšší titry protilátek v jednotlivých izotypech IgG a IgM (pro IgM neuvedeno na obrázku). Klíčovým pozorováním je schopnost proteoliposomální formulace OspA i OspC polyepitopů s MT03 a MPLA adjuvans indukovat dominantní antigeně specifickou protilátkovou odpověď v izotypu IgG2a, který je u myší charakteristický schopností aktivovat klasickou dráhu komplementu a zprostředkovat opsonizační funkci, dva mechanismy, které v případě boreliových infekcí patří mezi hlavní obranné nástroje hostitele. Oproti tomu imunizace OspA a OspC proteoliposomy s hliníkovým adjuvans (Aluxid) a s GEL PET A indukovala převážně specifickou protilátkovou odpověď v izotypu IgG1, který zajišťuje neutralizační aktivitu protilátek, která v případě boreliových infekcí v protektivitě nedominuje.

Byla dokumentována (**Obr. 14**) schopnost chimerického OspC polyepitopu po imunizaci experimentálních myší indukovat protilátky, které reagují s OspC antigeny různých boreliových druhů: *Borrelia. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelii* (proužek A). Naopak imunizace myší rekombinantním OspC z *B. burgdorferi* indukovala pouze slabou odpověď protilátek, které nereagovaly se všemi testovanými OspC od hlavních druhů borelií (proužek B). Sérum neimunizované myši nereaguje s žádným OspC antigenem (proužek C).

Příprava micel adjuvans na bázi muramyl dipeptidu

Lipofilní analoga muramyl dipeptidu (MDP) mají amfifilní charakter a proto jsou schopné se spontánně formovat do micel. Micelární forma lipofilních analog MDP může být využita jako adjuvantní formulace pro přípravu rekombinantních vakcín buď samotná, nebo v kombinaci s dalšími látkami vykazujícími adjuvantní účinky.

Lipofilní derivát MDP se rozpustí v minimálním množství etanolu nebo DMSO a tento roztok je rychle zředěn vodou, roztokem vhodného pufru či fyziologickým roztokem.

Příklad složení roztoku micelární formy MT03 o koncentraci 1mg MT03/ml :

Složka	Množství
MT03	1 mg
Ethanol (96%)	30 μ l
0,9% NaCl	970 μ l

Takto připravený roztok se smíchá s roztokem antigenu nebo případně dalšího adjuvans (PET GEL, Alum) tak, aby finální koncentrace obou složek odpovídala požadované imunizační dávce.

Velikost micel MT03 je vyjádřena jako hydrodynamický průměr v nanometrech a činí 8-10 nm. Kritická micelární koncentrace MT03 při 25°C byla stanovena na 100 μ g/ml, při 37 °C na 30 μ g/ml (metoda DLS).

Kombinace lipofilních derivátů MDP s dalšími adjuvantními látkami

Micelární formy lipofilních derivátů MDP mohou být kombinovány s dalšími adjuvantními látkami, jako jsou například soli aluminia nebo PET GEL A. Tím je dosaženo synergického účinku obou adjuvancií.

Příprava formulace PET GEL A potencované micelární formou MT03

Připraví se roztok micel MT03 tak, jak je uvedeno výše. Odděleně se naředí roztok PET GEL A tak, aby po smíchání s roztokem micel MT03 bylo dosaženo požadované koncentrace obou adjuvancií.

Takto připravený roztok se smíchá s roztokem antigenu tak, aby finální koncentrace nebo množství všech složek odpovídala požadované imunizační dávce. Molekulární adjuvans MT03 nepůsobí agregaci antigeny nebo částic PET GEL (měřeno pomocí DLS, data neuváděna)

Formulace GEL PET A potencované micelární formou MT03:

Složka	Finální množství/dávka
MT03	40,2 μ g
GEL PET A	10% roztok
0,9% NaCl	objem doplněn do finálního objemu 0,1 nebo 1 ml
antigen polyOspA	50 μ g

Příklad 6: Sledování protilátkové odpovědi proti OspA u psů po imunizaci chimérickým proteinem *polyOspA* s adjuvantními přípravky Aluxid a PET GEL A, liposomální MT03 a PET GEL A + micelární MT03

Antigen: K imunizaci byl použit fúzní chimérický rekombinantní protein (polyOspA, polyOspA).

Zvířata

Do pokusu bylo zařazeno 20 psů ve věku 11 – 12 měsíců. Zvířata byla rozdělena do deseti skupin po dvou kusech. Jednotlivým zvířatům byl aplikován antigen nebo placebo s příslušným imunitním adjuvans ve třech dávkách v intervalu tří týdnů. Dávka antigenu (chimerický rekombinantní OspA protein - polyOspA, polyOspA) byla jednotně 50 µg v dávce. Vakcinační dávka byla 1,0 ml s.c. nebo 0,1 ml i.d. Placebo (= příslušné imunitní adjuvans) bylo zvířatům aplikováno subkutánně ve stejných časových intervalech a ve stejných dávkách (1,0 ml).

Adjuvancia:

Aluxid – Aluminium Hydroxide Gel Adjuvant, Brenntag Biosector Denmark

PET GEL A – SEPPIC

MT03 liposomální

MT03 micelární + PET GEL A

Příprava liposomů

Liposomální preparáty (MT03 nebo MPLA) byly připraveny smícháním antigenů polyOspA (50 µg/dávka) s liposomy (0,82 mg lipidu/dávka). Jako komponenty pro tvorbu liposomů byly použity následující lipidy: EPC (71 mol. %), POPG (19 mol. %) a syntetický metalochelatační lipid DOGS-NTA-Ni (pro vazbu antigenu na povrch liposomu; 5 mol. %). Všechny lipidy byly pořízeny z Avanti Polar Lipids, USA. Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidního filmu s následnou extruzí přes polykarbonátové filtry o velikosti pórů 200 nm (Millipore). Jako molekulární adjuvans inkorporované do liposomů byly použity monofosforyl lipid A (MPLA) nebo lipofilní derivát norAbuMDP (MT03) v dávce 5 mol. %. Toto molekulární množství odpovídá 88 µg MPLA nebo 40 µg MT03 na vakcinační dávku.

V případě kontrolních skupin MT03 a MPLA byly použity pouze liposomy (0,82 mg/dávka) s obsahem 40 µg MT03 či 88 µg MPLA bez přídavku antigenu.

Příprava vakcinačních dávek:

polyOspA + Aluxid

Antigen – 50 µg

Aluxid - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

polyOspA + PET GEL A

Antigen – 50 µg

PET GEL A - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

polyOspA + MT 03 liposomální

Antigen – 50 µg

Navázání antigenu na imunitní adjuvans bylo provedeno viz Příklad 4.

polyOspA + MT03 micelární + PET GEL A

Antigen – 50 µg

PET GEL A - 10% objemových

MT03 micelární – dle předpisu (viz. Příklad 4))

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním

PLACEBO = Aluxid

Antigen – 0 µg

Aluxid - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány (protřepání obsahu lékovky)

PLACEBO = PET GEL A

Antigen – 0 μg

PET GEL A - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány (protřepání obsahu lékovky)

PLACEBO = MT 03

Antigen – 0 μg

Příprava - VÚVeL

PLACEBO = MT03 micelární + PET GEL A

Antigen – 0 μg

PET GEL A + MT03 micelární - 10% objemových (dle předpisu viz. Příklad 4)

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány (protřepání obsahu lékovky)

Odběry krve

Krev byla všem zvířatům odebrána v den 0 (před primární vakcinací), v den 20 (před 1. revakcinací), v den 53 (před 2. revakcinací) a dále pak v intervalu přibližně jedenkrát za 4 týdny až do doby ukončení pokusu (minimálně 12 měsíců). Ze vzorků krve byla po koagulaci separována séra.

Sledování zvířat v průběhu pokusu:

Zvířata byla sledována denně, po dobu 14 dnů po každé aplikaci a byl hodnocen výskyt lokálních a celkových postvakačních reakcí.

Lokální, ani celkové postvakační reakce nebyly u žádného ze zvířat pozorovány.

Denně, 3 dny před každou aplikací, v den aplikace, 4 hodiny po aplikaci a dále pak po dobu 4 dnů po aplikaci byla všem zvířatům měřena tělesná teplota. V průběhu sledování nebyly naměřeny hodnoty tělesné teploty mimo fyziologické rozmezí.

Schéma experimentu:

Skupina	Číslo pořadové	Číslo evidenční	Pohlaví	Imunizace	Dávka antigenu	Adjuvans	Aplikace	Dávka
1	1	2404	♂	3 dávky (vakcinace + 2 revakcinace) v intervalu cca 21 dnů	50 µg	ALUXID	s.c.	1,0 ml
	2	2431	♀		50 µg	ALUXID	s.c.	1,0 ml
2	3	2412	♂		50 µg	ALUXID	i.d.	0,1 ml
	4	2406	♀		50 µg	ALUXID	i.d.	0,1 ml
3	5	2418	♂		50 µg	PET GEL A	s.c.	1,0 ml
	6	2413	♀		50 µg	PET GEL A	s.c.	1,0 ml
4	7	2428	♂		50 µg	PET GEL A	i.d.	0,1 ml
	8	2407	♀		50 µg	PET GEL A	i.d.	0,1 ml
5	9	2424	♂		50 µg	MT 03	s.c.	1,0 ml
	10	2409	♀		50 µg	MT 03	s.c.	1,0 ml
6	11	2405	♂		50 µg	MT 03	i.d.	0,1 ml
	12	2419	♀		50 µg	MT 03	i.d.	0,1 ml
7	13	2422	♂		50 µg	PET GEL A +MT03 MIC	s.c.	1,0 ml
	14	2414	♀		50 µg	PET GEL A +MT03 MIC	s.c.	1,0 ml
8	15	2429	♂		50 µg	PET GEL A +MT03 MIC	i.d.	0,1 ml
	16	2408	♀		50 µg	PET GEL A +MT03 MIC	i.d.	0,1 ml

9	17	2417	♂		-	ALUXID	s.c.	1,0 ml
	18	2415	♀		-	PET GEL A	s.c.	1,0 ml
10	19	2427	♂		-	MT 03	s.c.	1,0 ml
	20	2416	♀		-	PET GEL A +MT03 MIC	s.c.	1,0 ml

Časový harmonogram:

Den →	0	20	53	83	111	133	139	166	195	223	251	279	307	335	363
Datum →	15.11.13	5.12.13	7.1.14	6.2.14	6.3.14	28.3.14	3.4.14	30.4.14	29.5.14	26.6.14	24.7.14	21.8.14	18.9.14	16.10.14	13.11.14
Imunizace	+	+	+												
Odběr krve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Stanovení postvakcinačních anti OspA protilátek v sérech psů metodou ELISA

Antigeny použité pro potažení mikrotitrační destičky

- **Antigen rOspA *B. afzelii***

Antigen je rekombinantní protein izolovaný z geneticky modifikovaného kmene *E. coli* MSLB 7010 (*E. coli* BL21(DE3)/pDEST17).

- **Antigen rOspA *B. garinii***

Antigen je rekombinantní protein izolovaný z geneticky modifikovaného kmene *E. coli* MSLB 7019 (*E. coli* BL21(DE3)/pCRT7/NT).

- **Antigen rOspA *B. burgdorferi sensu stricto***

Antigen je rekombinantní protein izolovaný z geneticky modifikovaného kmene *E. coli* MSLB 7012 (*E. coli* BL21(DE3)/pDEST17).

Příprava antigenů pro potažení mikrotitrační destičky

Pro potažení mikrotitrační destičky byly použity rekombinantní OspA proteiny uvedené výše.

Kontrolní pozitivní séra

Kontrolní pozitivní séra byla připravena imunizací psů inaktivovanými kmeny *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* sensu stricto s Freundovým adjuvans. Kontrolní negativní sérum bylo připraveno z nevakcinovaného psa.

Vyhodnocení protilátkové odpovědi po imunizaci pokusných zvířat na základě dosažených hodnot OD₄₅₀

Měření OD: OD se měří při vlnové délce 450 nm proti hodnotě BLANK.

Hodnocení: Pro hodnocení se použije průměrná hodnota OD₄₅₀ replikátů testovaného vzorku.

Zkouška je hodnotitelná, je-li: CV replikátů $\leq 15\%$

Vyšetření zahrnuje 4 po sobě jdoucí odběry

- 1) iniciální (před vakcinací)
- 2) 3 týdny po vakcinaci (před 1. revakcinací)
- 3) 53 dnů po 1. revakcinaci (před 2. revakcinací)
- 4) 4 týdny po 2 revakcinaci

Hodnoty OD₄₅₀ jsou v grafech srovnávány s hodnotami OD₄₅₀ kontrolního pozitivního a kontrolního negativního séra.

Průběh imunitní odpovědi psů na různé experimentální formulace vakcín s antigenem polyOspA jsou na **Obr. 15**.

Závěr:

Všechna adjuvans byla schopna navodit produkci specifických protilátek. Z hlediska indukce protilátkové odpovědi proti OspA *B. afzelii*, OspA *B. garinii* a OspA *B. burgdorferi* sensu stricto po vakcinaci psů chimérickým OspA (polyOspA) proteinem se jako nejlepší imunitní adjuvans jeví PET GEL A a PET GEL A ve směsi s micelárním MT03.

Příklad 7: Sledování protilátkové odpovědi proti OspC u psů po imunizaci chimérickým proteinem *polyOspC* s adjuvantními přípravky Aluxid a PET GEL A a s liposomálními adjuvans MT03 a MPLA

Antigen: K imunizaci byl použit fúzní chimerický rekombinantní protein (polyOspC, polyOspC).

Zvířata

Do pokusu bylo zařazeno 20 psů ve věku 10 – 13 měsíců. Zvířata byla rozdělena do deseti skupin po dvou kusech. Jednotlivým zvířatům byl aplikován antigen nebo placebo s příslušným imunitním adjuvans ve třech dávkách v intervalu tří týdnů. Dávka antigenu (chimerický rekombinantní OspC protein - polyOspC, polyOspC) byla jednotně 50 µg v dávce. Vakcinační dávka byla 1,0 ml s.c. nebo 0,1 ml i.d. Placebo (= příslušné imunitní adjuvans) bylo zvířatům aplikováno subkutánně ve stejných časových intervalech a ve stejných dávkách (1,0 ml).

Adjuvancia:

Aluxid – Aluminium Hydroxide Gel Adjuvant, Brenntag Biosector Denmark

PET GEL A – SEPPIC

liposomální MT03

liposomální MPLA

Příprava liposomů

Liposomální preparáty (MT03 nebo MPLA) byly připraveny smícháním antigenů polyOspC (50 µg/dávka) s liposomy (0,82 mg lipidu/dávka) analogicky k Příkladu 6.

*Příprava vakcinačních dávek:***polyOspC + Aluxid**

Antigen – 50 µg

Aluxid - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

polyOspC + PET GEL A

Antigen – 50 µg

PET GEL A - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

polyOspC + liposomální MT 03

Antigen – 50 µg Liposomy – 0,82 mg

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Roztoky antigenu a liposomů byly smíchány a inkubovány při pokojové teplotě alespoň 30 minut.

polyOspC + liposomální MPLA

Antigen – 50 µg

Liposomy – 0,82 mg

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Roztoky antigenu a liposomů byly smíchány a inkubovány při pokojové teplotě alespoň 30 minut.

PLACEBO=Aluxid

Antigen – 0 µg

Aluxid - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány (protřepání obsahu lékovky)

PLACEBO=PET GEL A

Antigen – 0 µg

PET GEL A - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 nebo 0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány (protřepání obsahu lékovky)

PLACEBO =MT 03

Antigen – 0 µg

PLACEBO =MPLA

Antigen – 0 µg

Odběry krve

Krev byla všem zvířatům odebrána v den 0 (před primární vakcinací), v den 21 (před 1. revakcinací), v den 42 (před 2. revakcinací) a dále pak v intervalu přibližně jedenkrát za 4 týdny až do doby ukončení pokusu (minimálně 12 měsíců). Ze vzorků krve byla po koagulaci separována séra.

Sledování zvířat v průběhu pokusu:

Zvířata byla sledována analogicky k Příkladu 6.

Schéma experimentu:

Skupina	Číslo pořadové	Číslo evidenční	Pohlaví	Imunizace	Dávka antigenu	Adjuvans	Aplikace	Dávka
1	1	2214	♀	3 dávky (vakcinace + 2 revakcinace) v intervalu 21 dnů	50 µg	ALUXID	s.c.	1,0 ml
	2	2267	♂		50 µg	ALUXID	s.c.	1,0 ml
2	3	2228	♀		50 µg	ALUXID	i.d.	0,1 ml
	4	2288	♂		50 µg	ALUXID	i.d.	0,1 ml
3	5	2236	♀		50 µg	PET GEL A	s.c.	1,0 ml
	6	2303	♀		50 µg	PET GEL A	s.c.	1,0 ml
4	7	2289	♀		50 µg	PET GEL A	i.d.	0,1 ml
	8	2247	♂		50 µg	PET GEL A	i.d.	0,1 ml
5	9	2294	♀		50 µg	MT 03	s.c.	1,0 ml
	10	2304	♀		50 µg	MT 03	s.c.	1,0 ml
6	11	2292	♂		50 µg	MT 03	i.d.	0,1 ml
	12	2215	♀		50 µg	MT 03	i.d.	0,1 ml
7	13	2216	♀		50 µg	MPLA	s.c.	1,0 ml
	14	2305	♀		50 µg	MPLA	s.c.	1,0 ml
8	15	2266	♂		50 µg	MPLA	i.d.	0,1 ml

	16	2270	♀		50 µg	MPLA	i.d.	0,1 ml
9	17	2123	♂		-	ALUXID	s.c.	1,0 ml
	18	2211	♂		-	PET GEL A	s.c.	1,0 ml
10	19	2212	♂		-	MT 03	s.c.	1,0 ml
	20	2246	♂		-	MPLA	s.c.	1,0 ml

Časový harmonogram:

Den		1	2	9	7	25	53	81	09	37	65	93	17	49	76
Datum	26.4.13	17.5.13	7.6.13	4.7.13	1.8.13	29.8.13	26.9.13	24.10.13	21.11.13	19.12.13	16.1.14	13.2.14	9.3.14	10.4.14	7.5.14
Imunizace	+	+	+												
Odběr krve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Stanovení postvakcinačních anti *OspC* protilátek v sérech psů metodou ELISA

Antigeny použité pro potažení mikrotitrační destičky

Antigen rOspC *B. afzelii*

Antigen je rekombinantní protein izolovaný z geneticky modifikovaného kmene *E. coli* MSLB 7002 (*E. coli* BL21(DE3)/ pET28a).

Antigen rOspC *B. garinii*

Antigen je rekombinantní protein izolovaný z geneticky modifikovaného kmene *E. coli* MSLB 7004 (*E. coli* BL21(DE3)/ pET28a).

Antigen rOspC *B. burgdorferi sensu stricto*

Antigen je rekombinantní protein izolovaný z geneticky modifikovaného kmene *E. coli* MSLB 7003 (*E. coli* BL21(DE3)/ pET28a).

Příprava antigenů pro potažení mikrotitrační destičky

Pro potažení mikrotitrační destičky byly použity rekombinantní rOspC proteiny uvedené výše.

Kontrolní pozitivní séra

Byla připravena imunizací psů inaktivovanými kmeny *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* sensu stricto s Freundovým adjuvans. Kontrolní negativní sérum bylo připraveno z nevakcinovaného psa.

Vyhodnocení protilátkové odpovědi po imunizaci pokusných zvířat na základě dosažených hodnot OD₄₅₀

Měření OD: OD se měří při vlnové délce 450 nm proti hodnotě BLANK.

Hodnocení: Pro hodnocení se použije průměrná hodnota OD₄₅₀ replikátů testovaného vzorku.

Zkouška je hodnotitelná, je-li: CV replikátů ≤ 15%

Vyšetření zahrnuje 4 po sobě jdoucí odběry

- 1) iniciální (před vakcinací)
- 2) 3 týdny po vakcinaci (před 1. revakcinací)
- 3) 3 týdny po 1. revakcinaci (před 2. revakcinací)
- 4) 4 týdny po 2 revakcinaci

Hodnoty OD₄₅₀ jsou v grafech srovnávány s hodnotami OD₄₅₀ kontrolního pozitivního a kontrolního negativního séra.

Průběh imunitní odpovědi psů na různé experimentální formulace vakcín s antigenem polyOspA jsou na **Obr. 16**.

Závěr:

Vyhodnocení antigenně specifické reakce protilátek indukovaných imunizací psů rekombinantním OspC polyepitopem sledovalo dva faktory: A) zkříženou reaktivitu psích hyperimunních sér s OspC antigeny z různých druhů borelií, B) schopnost konkrétního použitého adjuvans indukovat OspC-specifické sérové protilátky v jednotlivých izotypech IgG u psů. Jako příklad uvedena reakce jednotlivých izotypů psích IgG (po imunizaci OspC polyepitopem s různými adjuvans) s OspC polyepitopem navázaným na dna jamek ELISA panelů a s purifikovaným rekombinantním OspC *B. afzelii*.

Všechna použitá testovaná adjuvans byla schopna navodit tvorbu specifických protilátek schopných rozeznat všechny tři typy OspC. Z hlediska indukce protilátkové odpovědi proti OspC *B. afzelii*, OspC *B. garinii* a OspC *B. burgdorferi* sensu stricto po vakcinaci psů chimerickým rekombinantním OspC proteinem (polyOspC) se jako nejlepší imunitní adjuvans jeví Aluxid (2% gel hydroxidu hlinitého).

Příklad 8 Protilátková odpověď proti rekombinantnímu antigenu rFerritin II. Sledování protilátkové odpovědi proti Ferritinu II u psů po aplikaci antigenu formulovaného s různými adjuvans

Antigen:

Byl použit rekombinantní protein FERRITIN II.

Ferritin II je identifikovaný a charakterizovaný protein sekretovaný do plasmy klíštěte. Byly stanoveny nukleotidové sekvence genu Ferritinu II a byla určena jejich primární struktura. (Kopacek *et al.* 2003. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 103-113) Ferritin II v těle klíštěte plní funkci protektivního proteinu, který váže a uchovává ionty železa uvolněné z hemoglobinu a zároveň výrazně eliminuje oxidativní stres způsobený vysokou koncentrací iontů železa. Ferritin je zodpovědný za eliminaci toxicity iontů železa přijatých z krve hostitele (Galay, *et al.* 2014 *PLOS ONE* 9, e90661). Jestliže se podaří blokovat funkci Ferritinu, nebude schopno přisáté klíště parazitovat na hostiteli, protože dojde k jeho intoxikaci nehemově vázanými ionty železa. Zkrácením doby sání na hostiteli může dojít k zamezení přenosu klíšťaty přenášených patogenů (Hajdusek *et al.* 2010 *Vaccine* 28, 2993-2998). Blokování Ferritinu II lze provést reakcí se specifickou protilátkou za vzniku imunokomplexu. Specifické protilátky vzniknou v organismu po imunizaci antigenem. Jako vhodný antigen pro imunizaci lze použít rekombinantní Ferritin II nebo jeho fragment připravený jak v prokaryotických (*E. coli*) tak eukaryotických (*Pichia pastoris*) expresních systémech.

Zvířata

Do pokusu bylo zařazeno 10 nevakcinovaných psů ve věku 3 - 4 měsíce. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin po dvou nebo třech kusech. Jednotlivým zvířatům byl aplikován antigen s příslušným imunitním adjuvans ve třech dávkách v intervalu tří týdnů. Dávka antigenu (FERRITIN II) byla jednotně 50 µg v dávce. Vakcinační dávka byla 1,0 ml s.c.

Adjuvancia:

Aluxid – Aluminium Hydroxide Gel Adjuvant, Brenntag Biosector Denmark

PET GEL A – (SEPPIC)

liposomální MT05

liposomální MT06

*Příprava vakcinačních dávek:***FERRITIN II + Aluxid**

Antigen – 50 µg

Aluxid - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

FERRITIN II + PET GEL A

Antigen – 50 µg

PET GEL A - 10% objemových

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

FERRITIN II + MT 05

Antigen – 50 µg

liposomální MT05 – 0,88mg

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním.

FERRITIN II + MT 06

Antigen – 50 µg

liposomální MT06 – 0,88mg

Sterilní fyziologický roztok – ad 1,0 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a homogenizovány roztřepáním

Příprava liposomů

Liposomální preparáty (MT05 nebo MT06) byly připraveny smícháním antigenu FERRITIN II (20 µg/dávka) s liposomy (0,88 mg lipidu/dávka). Jako komponenty pro tvorbu liposomů byly použity následující lipidy: EPC (71 mol. %), POPG (19 mol. %) a syntetický metalochelatační lipid DOGS-NTA-Ni (pro vazbu antigenu na povrch liposomu; 5 mol. %). Všechny lipidy byly pořízeny z Avanti Polar Lipids, USA. Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidního filmu s následnou extruzí přes polykarbonátové filtry o velikosti pórů 200 nm (Millipore). Jako molekulární adjuvans inkorporované do liposomů byly použity lipofilní deriváty norAbuMDP (MT05 nebo MT06) v dávce 5 mol. %. Toto molekulární množství odpovídá 56,4 nmol látky na vakcinační dávku (odpovídá 50 µg MT05 nebo 65 µg MT06).

Antigen použitý pro potažení mikrotitrační destičky

Rekombinantní klíčecí FERRITIN II (Parazitologický ústav BC AV České Budějovice)

Odběry krve

Krev byla všem zvířatům odebrána v den 0 (před primární vakcinací), v den 21 (před 1. revakcinací), v den 42 (před 2. revakcinací) a dále pak v intervalu přibližně jedenkrát za 4 týdny až do doby ukončení pokusu (minimálně 12 měsíců). Ze vzorků krve byla po koagulaci separována séra.

Sledování zvířat v průběhu pokusu

Zvířata byla sledována denně, po dobu 14 dnů po každé aplikaci a byl hodnocen výskyt lokálních a celkových postvakcinačních reakcí. Lokální, ani celkové postvakcinační reakce nebyly u žádného ze zvířat pozorovány. Denně, 3 dny před každou aplikací, v den aplikace, 4 hodiny po aplikaci a dále pak po dobu 4 dnů po aplikaci byla všem zvířatům měřena tělesná teplota. V průběhu sledování nebyly naměřeny hodnoty tělesné teploty mimo fyziologické rozmezí.

Schéma experimentu:

Skupina	Číslo pořadové	Číslo evidenční	Pohlaví	Vakcinace 1,0 ml s.c.		Revakcinace 1,0 ml s.c.		2. revakcinace 1,0 ml s.c.	
				Dávka antigenu	Adjuvans	Dávka antigenu	Adjuvans	Dávka antigenu	Adjuvans
1	1	2003	♀	50 µg	Aluxid	50 µg	Aluxid	50 µg	Aluxid
	2	2004	♀	50 µg	Aluxid	50 µg	Aluxid	50 µg	Aluxid
2	3	2012	♂	50 µg	PET GEL A	50 µg	PET GEL A	50 µg	PET GEL A
	4	2013	♂	50 µg	PET GEL A	50 µg	PET GEL A	50 µg	PET GEL A
3	5	2032	♀	50 µg	MT05	50 µg	MT05	50 µg	MT05
	6	2037	♂	50 µg	MT05	50 µg	MT05	50 µg	MT05
	7	2043	♂	50 µg	MT05	50 µg	MT05	50 µg	MT05
4	8	2053	♂	50 µg	MT06	50 µg	MT06	50 µg	MT06
	9	2054	♂	50 µg	MT06	50 µg	MT06	50 µg	MT06
	10	2056	♂	50 µg	MT06	50 µg	MT06	50 µg	MT06

Časový harmonogram:

Den →	0	21	42	70	98	126	154	182	210	238	266	294	322	351	378
Datum →	16.5.12	6.6.12	27.6.12	25.7.12	22.8.12	19.9.12	17.10.12	14.11.12	12.12.12	9.1.13	6.2.13	6.3.13	3.4.13	2.5.13	29.5.13
Imunizace	+	+	+												
Odběr krve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Stanovení postvakačních anti FER II protilátek v sérech psů metodou ELISA

Antigeny použité pro potažení mikrotitrační destičky

Rekombinantní FERRITIN II (Parazitologický ústav BC AV České Budějovice)

Rekombinantní protein se skladuje v zamraženém stavu při teplotě -80°C .

Substance

Kontrolní pozitivní sérum FERRITIN II

Kontrolní sérum negativní

Kontrolní pozitivní séra byla připravena imunizací psů rekombinantním FER II s Freundovým adjuvans. Kontrolní negativní sérum bylo připraveno z nevakcinovaného psa.

Postup ELISA

ELISA panely byly potaženy 100 μl rekombinantního FERRITINU II.

Hodnocení

Pro hodnocení se použije průměrná hodnota OD_{450} replikátů testovaného vzorku.

Zkouška je hodnotitelná, je-li: $\text{CV replikátů} \leq 15\%$

Vyšetření zahrnuje 15 po sobě jdoucích odběrů

Hodnoty OD_{450} jsou v grafech srovnávány s hodnotami OD_{450} kontrolního pozitivního a kontrolního negativního séra.

Sledování protilátkové odpovědi psů proti FER II po subkutánní aplikaci je znázorněno na

Obr. 17

Formulace rFerritinu II s různými adjuvans

FERRITIN II + Aluxid

FERRITIN II + PET GEL A

FERRITIN II + MT05

FERRITIN II + MT06

Závěr:

Použitá adjuvans jsou schopna navodit specifickou imunitní protilátkovou odpověď. Z hlediska indukce protilátkové odpovědi proti FER II po imunizaci psů se jako nejlepší imunitní adjuvans jeví Aluxid (2% gel hydroxidu hlinitého) a PET GEL A.

sekvence listing_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> výzkumný ústav veterinárního lékařství
<120> Polyepitopový antigen, vakcinační konstrukt a vakcína pro
prevezci lymeské boreliózy
<130> P
<160> 32
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 210
<212> PRT
<213> Borrelia burgdorferi
<400> 1

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe
1 5 10 15
Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser
20 25 30
Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys
35 40 45
Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala
50 55 60
Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Ile Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys
65 70 75 80
Ile His Gln Asn Asn Gly Leu Asp Thr Glu Asn Asn His Asn Gly Ser
85 90 95
Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu
100 105 110
Asp Gly Leu Lys Asn Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys
115 120 125
Lys Cys Ser Glu Thr Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp
130 135 140
Leu Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu
145 150 155 160
Lys Thr Asn Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu
165 170 175
Phe Glu Ser Val Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala
180 185 190

sekvence listing_ST25

Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys
 195 200 205

Lys Pro
 210

<210> 2
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Borrelia burgdorferi
 <400> 2

Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp
 20 25 30

Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser
 35 40 45

Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys Asn Asp
 50 55 60

Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser Lys Leu Asn
 85 90 95

Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys Lys Cys Ser
 100 105 110

Glu Glu Phe Ser Thr Lys Leu Lys Asp Asn His Ala Gln Leu Gly Ile
 115 120 125

Gln Gly Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Ala Asn
 130 135 140

Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys Leu Ser Gly
 145 150 155 160

Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser
 165 170 175

Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 180 185 190

<210> 3
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Borrelia burgdorferi

09.05.14

sekvence listing_ST25

<400> 3

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe
1 5 10 15

Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser
20 25 30

Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys
35 40 45

Ile Thr Glu Ser Asn Ala Val Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Thr
50 55 60

Leu Leu Thr Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile
65 70 75 80

Lys Asn Asp Val Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asp His Asn Gly Ser Leu
85 90 95

Ile Ser Gly Ala Tyr Leu Ile Ser Thr Leu Ile Thr Lys Lys Ile Ser
100 105 110

Ala Ile Lys Asp Ser Gly Glu Leu Lys Ala Glu Ile Glu Lys Ala Lys
115 120 125

Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Ala Lys Leu Lys Gly Glu His Thr Asp
130 135 140

Leu Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu
145 150 155 160

Lys Thr Asn Asn Asp Lys Thr Lys Gly Ala Asp Glu Leu Glu Lys Leu
165 170 175

Phe Glu Ser Val Lys Asn Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Thr
180 185 190

Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys
195 200 205

Lys Pro
210

<210> 4

<211> 192

<212> PRT

<213> Borrelia burgdorferi

<400> 4

Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu
1 5 10 15

sekvence listing_ST25

Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Glu
20 25 30

Ser Asn Ala Val Val Leu Ala Val Lys Glu Ile Glu Thr Leu Leu Ala
35 40 45

Ser Ile Asp Glu Leu Ala Thr Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Gln Gln
50 55 60

Asn Gly Gly Leu Ala Val Glu Ala Gly His Asn Gly Thr Leu Leu Ala
65 70 75 80

Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Lys Leu Ile Thr Gln Lys Leu Asp Gly Leu
85 90 95

Lys Asn Ser Glu Lys Leu Lys Glu Lys Ile Glu Asn Ala Lys Lys Cys
100 105 110

Ser Glu Asp Phe Thr Lys Lys Leu Glu Gly Glu His Ala Gln Leu Gly
115 120 125

Ile Glu Asn Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Ile Thr
130 135 140

Asp Ala Ala Lys Asp Lys Gly Ala Ala Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys
145 150 155 160

Ala Val Glu Asn Leu Ala Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser
165 170 175

Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Ile Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
180 185 190

<210> 5
<211> 207
<212> PRT
<213> Borrelia garinii

<400> 5

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe
1 5 10 15

Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Gly Asp Ser Ala Ser Thr Asn Pro Asp
20 25 30

Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Val Ile Ser Lys Lys Ile Thr
35 40 45

Asp Ser Asn Ala Phe Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu
50 55 60

09.05.14

sekvence listing_ST25

Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ser Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys Asn
65 70 75 80

Asp Gly Thr Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu Ile Ala
85 90 95

Gly Ala Tyr Glu Ile Ser Lys Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser Val Leu
100 105 110

Asn Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Lys Glu Ala Lys Asp Cys Ser
115 120 125

Glu Lys Phe Thr Thr Lys Leu Lys Asp Ser His Ala Glu Leu Gly Ile
130 135 140

Gln Ser Val Gln Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His
145 150 155 160

Gly Thr Lys Asp Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser
165 170 175

Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Gln Ala Ala Leu Thr Asn Ser Val
180 185 190

Lys Glu Leu Thr Asn Pro Val Val Ala Glu Thr Pro Lys Lys Pro
195 200 205

<210> 6
<211> 212
<212> PRT
<213> Borrelia afzelii

<400> 6

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe
1 5 10 15

Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Thr Asn
20 25 30

Pro Ala Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys
35 40 45

Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu
50 55 60

Thr Leu Val Leu Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Lys Ala Ile Gly Gln
65 70 75 80

Lys Ile Asp Asn Asn Asn Gly Leu Ala Ala Leu Asn Asn Gln Asn Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Thr Glu Lys
Stránka 5

09.05.14

sekvence listing_ST25

100

105

110

Leu Ser Lys Leu Lys Asn Leu Glu Glu Leu Lys Thr Glu Ile Ala Lys
115 120 125

Ala Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His
130 135 140

Ala Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala
145 150 155 160

Ile Leu Lys Thr His Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys
165 170 175

Asp Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala
180 185 190

Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser
195 200 205

Pro Lys Lys Pro
210

<210>	7
<211>	464
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Chimeric recombinant antigen based on OspC antigens

<400> 7

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
20 25 30

Gly Ser Met Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Lys Leu Lys Asp
35 40 45

Asn His Ala Gln Leu Gly Ile Gln Gly Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys
50 55 60

Lys Ala Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu
65 70 75 80

Glu Leu Glu Lys Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala

Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Lys Lys Cys Ser Glu Asp Phe
100 105 110

sekvence listing_ST25

Thr Lys Lys Leu Glu Gly Glu His Ala Gln Leu Gly Ile Glu Gln Val
 115 120 125
 Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Ile Thr Asp Ala Ala Lys
 130 135 140
 Asp Lys Gly Ala Ala Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn
 145 150 155 160
 Leu Ala Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Lys Lys
 165 170 175
 Cys Ser Glu Thr Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Leu
 180 185 190
 Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys
 195 200 205
 Thr Gln Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe
 210 215 220
 Glu Ser Val Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn
 225 230 235 240
 Ser Val Lys Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Ala Lys Leu Lys Gly
 245 250 255
 Glu His Thr Asp Leu Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Asp Asn Ala Lys
 260 265 270
 Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Asn Asp Lys Thr Lys Gly Ala Asp Glu
 275 280 285
 Leu Glu Lys Leu Phe Glu Ser Val Lys Gln Leu Ser Lys Ala Ala Lys
 290 295 300
 Glu Met Leu Thr Asn Ser Val Lys Lys Asp Cys Ser Glu Lys Phe Thr
 305 310 315 320
 Thr Lys Leu Lys Asp Ser His Ala Glu Leu Gly Ile Gln Ser Val Gln
 325 330 335
 Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Gly Thr Lys Asp
 340 345 350
 Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Leu Glu Ser Leu
 355 360 365
 Ser Lys Ala Ala Gln Ala Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Lys Lys Cys
 370 375 380

09.05.14

sekvence listing_ST25

Ser Glu Glu Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala Asp Leu Gly
385 390 395 400

Lys Gln Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr
405 410 415

His Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp Leu Phe Glu
420 425 430

Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu Thr Asn Ser
435 440 445

Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Asn
450 455 460

<210> 8
<211> 273
<212> PRT
<213> Borrelia garinii

<400> 8

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
1 5 10 15

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
20 25 30

Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
50 55 60

Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys
65 70 75 80

Ser Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Glu Asp Leu Ser Lys
85 90 95

Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
100 105 110

Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Ile Glu Glu Lys Phe Asn Ala
115 120 125

Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu Arg Ala Asn Gly Thr Arg
130 135 140

Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Glu
145 150 155 160

sekvence listing_ST25

Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Lys Thr
 165 170 175
 Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys His Ile Pro
 180 185 190
 Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn Ser Thr Gln
 195 200 205
 Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
 245 250 255
 Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu
 260 265 270

Lys

<210> 9
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Borrelia afzelii

<400> 9

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Ala Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45
 Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Val Asp Lys Ile Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Asp Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 Asp Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Lys
 85 90 95
 Thr Thr Phe Glu Leu Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Arg
 100 105 110
 Lys Val Ser Ser Lys Asp Lys Thr Ser Thr Asp Glu Met Phe Asn Glu

09-05-14

```
sequence listing_ST25
120                               125
```

Lys	Gly 130	Glu	Leu	Ser	Ala	Lys 135	Thr	Met	Thr	Arg	Glu 140	Asn	Gly	Thr	Lys	
Leu 145	Glu	Tyr	Thr	Glu	Met 150	Lys	Ser	Asp	Gly	Thr 155	Gly	Lys	Ala	Lys		Glu 160
Val	Leu	Lys	Asn	Phe 165	Thr	Leu	Glu	Gly	Lys 170	Val	Ala	Asn	Asp	Lys 175		Val
Thr	Leu	Glu	Val 180	Lys	Glu	Gly	Thr	Val 185	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu 190	Ile	Ala	
Lys	Ser	Gly 195	Glu	Val	Thr	Val	Ala 200	Leu	Asn	Asp	Thr	Asn 205	Thr	Thr	Gln	
Ala	Thr 210	Lys	Lys	Thr	Gly	Ala 215	Trp	Asp	Ser	Lys	Thr 220	Ser	Thr	Leu	Thr	
Ile 225	Ser	Val	Asn	Ser	Lys 230	Lys	Thr	Thr	Gln	Leu 235	Val	Phe	Thr	Lys	Gln 240	
Asp	Thr	Ile	Thr	Val 245	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser 250	Ala	Gly	Thr	Asn	Leu 255	Glu	
Gly	Thr	Ala	Val 260	Glu	Ile	Lys	Thr	Leu 265	Asp	Glu	Leu	Lys	Asn 270	Ala	Leu	

Lys

```
<210> 10
<211> 273
<212> PRT
<213> Borrelia burgdorferi
```

<400> 10

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
1 5 10 15

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
20 25 30

Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys
50 55 60

Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys
65 70 75 80

sekvence listing_ST25

Thr Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Glu Asp Leu Ser Lys
85 90 95

Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
100 105 110

Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu
115 120 125

Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn Gly Thr Arg
130 135 140

Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys Ala Lys Glu
145 150 155 160

Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys
165 170 175

Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
180 185 190

Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp Ser Ser
195 200 205

Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr
210 215 220

Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
245 250 255

Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Lys Asn Ala Leu
260 265 270

Lys

<210> 11
<211> 274
<212> PRT
<213> Borrelia garinii

<400> 11

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
1 5 10 15

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
20 25 30

09.05.14

sekvence listing_ST25

Asp Leu Pro Gly Gly Met Thr Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
50 55 60

Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Gln
85 90 95

Thr Lys Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
100 105 110

Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu
115 120 125

Lys Gly Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn Gly Thr Arg
130 135 140

Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
145 150 155 160

Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys
165 170 175

Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys Asn Ile
180 185 190

Leu Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr
195 200 205

Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu
210 215 220

Thr Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val Phe Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu
245 250 255

Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Lys Asp Ala
260 265 270

Leu Lys

<210> 12
<211> 273
<212> PRT

sekvence listing_ST25

<213> Borrelia burgdorferi

<400> 12

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
1 5 10 15

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
20 25 30

Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asn Lys
35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Ile Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
50 55 60

Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Val Lys
65 70 75 80

Ala Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp Leu Gly Gln
85 90 95

Thr Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
100 105 110

Lys Val Thr Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu
115 120 125

Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp Gly Thr Arg
130 135 140

Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
145 150 155 160

Val Leu Lys Gly Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Glu Lys Thr
165 170 175

Thr Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser
180 185 190

Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala
195 200 205

Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr
210 215 220

Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe Thr Lys Glu
225 230 235 240

Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Lys Leu Glu
245 250 255

sekvence listing_ST25

Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys Asn Ala Leu
 260 265 270

Lys

<210> 13
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Borrelia garinii

<400> 13

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
 20 25 30

Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys
 50 55 60

Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Glu Lys
 65 70 75 80

Ala Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Gln Asp Leu Asn Gln
 85 90 95

Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Arg
 100 105 110

Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Asp
 115 120 125

Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn Gly Thr Arg
 130 135 140

Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160

Val Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp Gly Gly Glu
 165 170 175

Thr Lys Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190

Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr
 195 200 205

Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu
 Stránka 14

09.05.14

sekvence listing_ST25

210 215 220

Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu
245 250 255

Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Lys Ala Ala
260 265 270

Leu Lys

<210> 14
<211> 274
<212> PRT
<213> Borrelia garinii

<400> 14

Met 1	Lys	Lys	Tyr	Leu 5	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu 10	Ile	Leu	Ala	Leu	Ile 15	Ala
Cys	Lys	Gln	Asn 20	Val	Ser	Ser	Leu	Asp 25	Glu	Lys	Asn	Ser	Val 30	Ser	Val
Asp	Leu	Pro 35	Gly	Glu	Met	Lys	Val 40	Leu	Val	Ser	Lys	Glu 45	Lys	Asp	Lys
Asp	Gly 50	Lys	Tyr	Ser	Leu	Glu 55	Ala	Thr	Val	Asp	Lys 60	Leu	Glu	Leu	Lys
Gly 65	Thr	Ser	Asp	Lys	Asn 70	Asn	Gly	Ser	Gly	Val 75	Leu	Glu	Gly	Val	Lys 80
Ala	Ala	Lys	Ser	Lys 85	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile 90	Ala	Asp	Asp	Leu	Ser 95	Gln
Thr	Lys	Phe	Glu 100	Ile	Phe	Lys	Glu	Asp 105	Gly	Lys	Thr	Leu	Val 110	Ser	Lys
Lys	Val	Thr 115	Leu	Lys	Asp	Lys	Ser 120	Ser	Thr	Glu	Glu	Lys 125	Phe	Asn	Asp
Lys	Gly 130	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys 135	Val	Val	Thr	Arg	Ala 140	Asn	Gly	Thr	Arg
Leu 145	Glu	Tyr	Thr	Glu	Ile 150	Gln	Asn	Asp	Gly	Ser 155	Gly	Lys	Ala	Lys	Glu 160
Val	Leu	Lys	Ser	Leu 165	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr 170	Leu	Thr	Ala	Asp	Gly 175	Glu

sekvence listing_ST25

Thr Lys Leu Thr Val Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190

Ser Glu Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Lys Asp Thr Glu Thr Thr
 195 200 205

Pro Ala Asp Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu
 210 215 220

Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
 225 230 235 240

Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Lys Leu
 245 250 255

Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ala Leu Lys Ala Ala
 260 265 270

Leu Lys

<210> 15
 <211> 627
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chimeric recombinant fusion protein (ch-rospA)
 <400> 15

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
 20 25 30

Gly Ser Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys His Ile
 35 40 45

Pro Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn Ser Thr
 50 55 60

Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu
 65 70 75 80

Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys
 85 90 95

Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu
 100 105 110

sekvence listing_ST25

Glu Gly Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Glu
115 120 125

Ile Ala Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn Thr
130 135 140

Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr
145 150 155 160

Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr
165 170 175

Lys Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn
180 185 190

Leu Glu Gly Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr
245 250 255

Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn
260 265 270

Leu Glu Gly Lys Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser
275 280 285

Lys Asn Ile Leu Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Ser
290 295 300

Asp Thr Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr
305 310 315 320

Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val
325 330 335

Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly
340 345 350

Thr Asn Leu Glu Gly Lys Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu
355 360 365

Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp
370 375 380

09.05.14

sekvence listing_ST25

Thr Asp Ser Ser Ala Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly
385 390 395 400

Thr Ser Thr Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu
405 410 415

Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn
420 425 430

Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ser Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr
435 440 445

Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn
450 455 460

Asp Thr Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser
465 470 475 480

Asp Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln
485 490 495

Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg
500 505 510

Ala Gly Asn Ala Leu Glu Gly Ser Leu Thr Val Glu Ala Gly Thr Val
515 520 525

Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Glu Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu
530 535 540

Lys Asp Thr Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp
545 550 555 560

Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys
565 570 575

Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asn
580 585 590

Thr Ala Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu
595 600 605

Asp Glu Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu Ala Leu Lys Ala
610 615 620

Ala Leu Lys
625

<210> 16
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

sekvence listing_ST25

<220>

<223> chimeric polyepitope recombinant antigen based onOspC 2

<400> 16

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Lys
1 5 10 15Lys Cys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Lys Leu Lys Asp Asn His Ala Gln
20 25 30Leu Gly Ile Gln Gly Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu
35 40 45Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys
50 55 60Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu
65 70 75 80Ala Asn Ser Val Lys Lys Lys Cys Ser Glu Asp Phe Thr Lys Lys Leu
85 90 95Glu Gly Glu His Ala Gln Leu Gly Ile Glu Gln Val Thr Asp Glu Asn
100 105 110Ala Lys Lys Ala Ile Leu Ile Thr Asp Ala Ala Lys Asp Lys Gly Ala
115 120 125Ala Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn Leu Ala Lys Ala
130 135 140Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Lys Lys Cys Ser Glu Thr
145 150 155 160Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Leu Gly Lys Glu Gly
165 170 175Val Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Gln Gly Thr
180 185 190Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu Ser Val Glu
195 200 205Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Lys
210 215 220Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Ala Lys Leu Lys Gly Glu His Thr Asp
225 230 235 240Leu Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu
245 250 255

sekvence listing_ST25

Lys Thr Asn Asn Asp Lys Thr Lys Gly Ala Asp Glu Leu Glu Lys Leu
260 265 270

Phe Glu Ser Val Lys Gln Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Thr
275 280 285

Asn Ser Val Lys Lys Asp Cys Ser Glu Lys Phe Thr Thr Lys Leu Lys
290 295 300

Asp Ser His Ala Glu Leu Gly Ile Gln Ser Val Gln Asp Asp Asn Ala
305 310 315 320

Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Gly Thr Lys Asp Lys Gly Ala Lys
325 330 335

Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala
340 345 350

Gln Ala Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe
355 360 365

Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ala
370 375 380

Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr His Ala Thr Thr
385 390 395 400

Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly
405 410 415

Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu
420 425 430

Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Asn
435 440

<210> 17
<211> 607
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Chimeric polyepitope recombinant protein based on OspA 2

<400> 17

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Leu Lys
1 5 10 15

Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys His Ile Pro Asn Ser Gly
20 25 30

sekvence listing_ST25

Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn Ser Thr Gln Ala Thr Lys
 35 40 45
 Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val
 50 55 60
 Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile
 65 70 75 80
 Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Asn Leu
 85 90 95
 Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Glu Ile Ala Lys Ser
 100 105 110
 Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn Thr Thr Gln Ala Thr
 115 120 125
 Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser
 130 135 140
 Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln Asp Thr
 145 150 155 160
 Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Thr
 165 170 175
 Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys
 180 185 190
 Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp Ser Ser Gly Asn
 195 200 205
 Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser
 210 215 220
 Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr
 225 230 235 240
 Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Lys
 245 250 255
 Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys Asn Ile Leu
 260 265 270
 Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr Gln
 275 280 285
 Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr
 290 295 300

sekvence listing_ST25

Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val Phe Thr Lys Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
 325 330 335
 Gly Lys Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser
 355 360 365
 Ala Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser Thr Leu
 370 375 380
 Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe Thr Lys
 385 390 395 400
 Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Lys Leu
 405 410 415
 Glu Gly Ser Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn
 420 425 430
 Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr
 435 440 445
 Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr
 450 455 460
 Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln Leu Val Phe Thr
 465 470 475 480
 Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala
 485 490 495
 Leu Glu Gly Ser Leu Thr Val Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
 500 505 510
 Asn Ile Ser Glu Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Lys Asp Thr Glu
 515 520 525
 Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Lys Thr Ser
 530 535 540
 Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe
 545 550 555 560
 Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asn Thr Ala Gly Thr
 565 570 575

sekvence listing_ST25

Lys Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys
 580 585 590

Asn Ala Leu Lys Lys Asp Leu Glu Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 595 600 605

<210> 18
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Borelia burgdorferi

<400> 18

Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Lys Leu Lys Asp Asn His Ala
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Ile Gln Gly Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile
 20 25 30

Leu Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu
 35 40 45

Lys Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met
 50 55 60

Leu Ala Asn Ser Val Lys
 65 70

<210> 19
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Borelia burgdorferi

<400> 19

Lys Lys Cys Ser Glu Asp Phe Thr Lys Lys Leu Glu Gly Glu His Ala
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Ile Glu Gln Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile
 20 25 30

Leu Ile Thr Asp Ala Ala Lys Asp Lys Gly Ala Ala Glu Leu Glu Lys
 35 40 45

Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn Leu Ala Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu
 50 55 60

Ala Asn Ser Val Lys
 65

<210> 20
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Borelia burgdorferi

<400> 20

sekvence listing_ST25

Lys Lys Cys Ser Glu Thr Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr
1 5 10 15

Asp Leu Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile
20 25 30

Leu Lys Thr Gln Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys
35 40 45

Leu Phe Glu Ser Val Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu
50 55 60

Ala Asn Ser Val Lys
65

<210> 21
<211> 69
<212> PRT
<213> Borelia burgdorferi

<400> 21

Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Ala Lys Leu Lys Gly Glu His Thr
1 5 10 15

Asp Leu Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile
20 25 30

Leu Lys Thr Asn Asn Asp Lys Thr Lys Gly Ala Asp Glu Leu Glu Lys
35 40 45

Leu Phe Glu Ser Val Lys Gln Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu
50 55 60

Thr Asn Ser Val Lys
65

<210> 22
<211> 69
<212> PRT
<213> Borelia garinii

<400> 22

Lys Asp Cys Ser Glu Lys Phe Thr Thr Lys Leu Lys Asp Ser His Ala
1 5 10 15

Glu Leu Gly Ile Gln Ser Val Gln Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile
20 25 30

Leu Lys Thr His Gly Thr Lys Asp Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu
35 40 45

Leu Phe Lys Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Gln Ala Ala Leu
Stránka 24

09-05-14

sekvenca listing_ST25

50 55 60

Thr Asn Ser Val Lys
65

<210> 23
<211> 69
<212> PRT
<213> Borelia afzelii

<400> 23

Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala
1 5 10 15

Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile
 20 25 30

Leu Lys Thr His Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp
 35 40 45

Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu
 50 55 60

Thr Asn Ser Val Lys
65

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Borelia afzelii

<400> 24

Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Asn
1 5 10

<210> 25
<211> 81
<212> PRT
<213> Borelia garinii

<400> 25

Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys His Ile Pro Asn
1 5 10 15

Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn Ser Thr Gln Ala
 20 25 30

Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu Thr Ile
 35 40 45

Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys Glu Asp
 50 55 60

09.05.14

sekvence listing_ST25

Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly
65 70 75 80

Asn

<210> 26
<211> 81
<212> PRT
<213> Borelia afzelii

<400> 26

Leu Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Glu Ile Ala Lys
1 5 10 15

Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn Thr Thr Gln Ala
20 25 30

Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile
35 40 45

Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln Asp
50 55 60

Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly
65 70 75 80

Thr

<210> 27
<211> 80
<212> PRT
<213> Borelia burgdorferi

<400> 27

Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys
1 5 10 15

Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp Ser Ser Gly Asn
20 25 30

Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser
35 40 45

Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr
50 55 60

Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Lys
65 70 75 80

<210> 28
<211> 82

sekvenca listing_ST25

<212> PRT

<213> Borelia garinii

<400> 28

Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys Asn Ile Leu
 1 5 10 15

Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr Gln
 20 25 30

Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr
 35 40 45

Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val Phe Thr Lys Glu
 50 55 60

Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
 65 70 75 80

Gly Lys

<210> 29

<211> 81

<212> PRT

<213> Borelia burgdorferi

<400> 29

Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala Ala
 20 25 30

Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr Ile
 35 40 45

Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn
 50 55 60

Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Lys Leu Glu Gly
 65 70 75 80

Ser

<210> 30

<211> 81

<212> PRT

<213> Borelia garinii

<400> 30

Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys
 Stránka 27

sekvence listing_ST25

1 5 10 15

Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr Pro Ala
 20 25 30

Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu Thr Ile
 35 40 45

Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn
 50 55 60

Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu Glu Gly
 65 70 75 80

Ser

<210> 31
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Borelia garinii

<400> 31

Leu Thr Val Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Glu
 1 5 10 15

Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Lys Asp Thr Glu Thr Thr Pro Ala
 20 25 30

Asp Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile
 35 40 45

Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn
 50 55 60

Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Lys Leu Glu Gly
 65 70 75 80

Ser

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Borelia

<400> 32

Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys Asn Ala Leu Lys
 1 5 10 15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Chimérický polyepitopový rekombinantní antigen, vyznačený tím, že obsahuje dva až deset imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspA z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PHei, PKa, *Borrelia garinii* PBi, TN, N34, VS307, G25, PBr, T25 a *Borrelia afzelii* Pko, a orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspC z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto A, B, I, Kb, *Borrelia afzelii* Pko a *Borrelia garinii* Pbi.
2. Antigen podle nároku 1, vyznačený tím, že obsahuje dva až deset, s výhodou sedm, imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující OspC orientované sekvence imunodominantních úseků antigenů OspC z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto A, B, I, Kb, *Borrelia afzelii* Pko a *Borrelia garinii* Pbi.
3. Antigen podle nároku 2, vyznačený tím, že OspC sekvence jsou vybrány ze skupiny zahrnující:

OspC-type B *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 18)

KKCSEEFSTKLKDNHAQLGIQGVTDENAKKAILKANAAGKDKGVEELEKLSGSLESL
SKAAKEMLANSVK

OspC-type K *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 19)

KKCEDFTKKLEGEHAQLGIEQVTDENAKKAILITDAAKDKGAAELEKLFKAVENLA
KAAKEMLANSVK

OspC-type A *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 20)

KKCSETFTNKLKEKHTDLGKEGVTDAKAEAILKTQGTCTKGAEELGKLFESVEVLS
KAAKEMLANSVK

OspC-type I *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 21)

KKCSEEFSTAKLKGEHTDLGKEGVTDDNAKKAILKTNNDKTKGADELEKLFESVKQL
SKAAKEMLTNSVK

OspC-PBi *B. garinii* (SEQ ID NO. 22)

KDCSEKFTTKLKDSHAELGIQSVQDDNAKKAILKTHGTDKDGAKAELEELFKSLESLS
KAAQAALTNSVK

OspC-Pko *B. afzelii* (SEQ ID NO. 23)

KKCSEEFNTKLKSGHADLGKQDATDDHAKAAILKTHATTDKGAKFEKDLFESVEGL
LKAAQVALTNSVK

OspC C-terminální úsek (SEQ ID NO. 24)

ELTSPVVAESPKKN

4. Antigen podle nároku 2, vyznačený tím, že má sekvenci (SEQ ID NO. 7)

1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSMKKCSE EFSTKLKDNH
51 AQLGIQGVTD ENAKKAILKA NAAGKDKGVE ELEKLSGSLE SLSKAAKEML
101 ANSVKKKCSE DFTKKLEGEH AQLGIEQVTD ENAKKAILIT DAAKDKGAAE
151 LEKLFKAVEN LAKAAKEMLA NSVKKKCSET FTNKLKEKHT DLGKEGVTD
201 DAKEAILKTQ GTKTKGAEEL GKLFESEVL SKAAKEMLAN SVKKKCSEEF
251 TAKLKEGHTD LGKEGVTDN AKKAILKTNN DKTKGADELE KLFESVKQLS
301 KAAKEMLTNS VKKDCSEKFT TKLKDSHAEL GIQSVQDDNA KKAILKTHGT
351 KDKGAKELEE LFKSLESLSK AAQAALTNSV KKKCSEEFNT KLKSGHADLG
401 KQDATDDHAK AAILKTHATT DKGAKFEKDL FESVEGLLKA AQVALTNSVK
451 ELTSPVVAES PKKN

5. Antigen podle nároku 2, vyznačený tím, že má sekvenci (SEQ ID NO. 16)

1 MASMTGGQQM GRGSMKKCSE EFSTKLKDNH AQLGIQGVTD ENAKKAILKA
51 NAAGKDKGVE ELEKLSGSLE SLSKAAKEML ANSVKKKCSE DFTKKLEGEH
101 AQLGIEQVTD ENAKKAILIT DAAKDKGAAE LEKLFKAVEN LAKAAKEMLA
151 NSVKKKCSET FTNKLKEKHT DLGKEGVTD DAKEAILKTQ GTKTKGAEEL
201 GKLFESEVL SKAAKEMLAN SVKKKCSEEF TAKLKEGHTD LGKEGVTDN
251 AKKAILKTNN DKTKGADELE KLFESVKQLS KAAKEMLTNS VKKDCSEKFT
301 TKLKDSHAEL GIQSVQDDNA KKAILKTHGT KDKGAKELEE LFKSLESLSK
351 AAQAALTNSV KKKCSEEFNT KLKSGHADLG KQDATDDHAK AAILKTHATT
401 DKGAKFEKDL FESVEGLLKA AQVALTNSVK ELTSPVVAES PKKN

6. Antigen podle nároku 1, vyznačený tím, že obsahuje dva až deset, s výhodou osm, imunodominantních úseků vybraných ze skupiny zahrnující orientované sekvence

imunodominantních úseků antigenů OspA z kmenů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PHei, PKa, *Borrelia garinii* PBi, TN, N34, VS307, G25, PBr, T25 a *Borrelia afzelii* Pko.

7. Antigen podle nároku 6, vyznačený tím, že OspA sekvence jsou vybrány ze skupiny zahrnující:

OspA-PBi *B. garinii* (SEQ ID NO. 25)

LKVTEGTVVL SKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTNI
VFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGN

OspA-PKo *B. afzelii* (SEQ ID NO. 26)

LEVKEGTVTL SK EIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQ
LVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGT

OspA-PHei *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 27)

LKVTEGTVTL SKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKTKQLV
FTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK

OspA-TN, N34, VS307, G25 *B. garinii*, **PWudll** *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 28)

TLKVTEGTVVL SKNILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKN
LVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGK

OspA-PKa *B. burgdorferi* (SEQ ID NO. 29)

LVVKEGTVTL SKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKT KD
LVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS

OspA-PBr *B. garinii* (SEQ ID NO. 30)

LTVTEGTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKS DTSTLTISKNSQKPKQL
VFTKENTITVQNYNRAGNALEGS

OspA-T25 *B. garinii* (SEQ ID NO. 31)

LTVEAGTVTL SKNISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTSTLTISKNSQKTKQLV
FTKENTITVQKYNTAGTKLEGS

OspA C-terminální úsek (SEQ ID NO. 32)

AVEITKLDEIKNALK

8. Antigen podle nároku 6, vyznačený tím, že má sekvenci (SEQ ID NO. 15):

```

1  MGSSHHHHHH  SSGLVPRGSH  MASMTGGQQM  GRGSLKVTEG  TVVLSKHIPN
51  SGEITVELND  SNSTQATKKT  GKWDSNTSTL  TISVNSKKTK  NIVFTKEDTI
101 TVQKYDSAGT  NLEGNLEVKE  GTVTLKSKEIA  KSGEVTVALN  DTNTTQATKK
151 TGAWDSKTST  LTISVNSKKT  TQLVFTKQDT  ITVQKYDSAG  TNLEGTLKVT
201 EGTVTLSKNI  SKSGEITVAL  DDTDSSGNKK  SGTWDSGTST  LTISKNRRTKT
251 KQLVFTKEDT  ITVQNYDSAG  TNLEGKTLKV  TEGTVVLSKN  ILKSGEITVA
301 LDDSDTTQAT  KKTGKWDSKT  STLTISVNSQ  KTKNLVFTKE  DTITVQKYDS
351 AGTNLEGKLV  VKEGTVTL SK  NISKSGEVSV  ELNDTDSSAA  TKKTAAWN SG
401 TSTLTITVNS  KKTKDLVFTK  ENTITVQQYD  SNGTKLEGSL  TVTEGTVTLS
451 KNISKSGEIT  VALNDTETTP  ADKKTGEWKS  DTSTLTISK  N  SQKPKQLVFT
501 KENTITVQNY  NRAGNALEGS  LTVEAGTVTL  SKNISESGEI  TVELKDTETT
551 PADKKSGTWD  SKTSTLTISK  NSQKTKQLVF  TKENTITVQK  YNTAGTKLEG
601 SAVEITKLDE  IKNALKKDLE  ALKAALK

```

9. Antigen podle nároku 6, vyznačený tím, že má sekvenci (SEQ ID NO. 17):

```

1  MASMTGGQQM  GRGSLKVTEG  TVVLSKHIPN  SGEITVELND  SNSTQATKKT
51  GKWDSNTSTL  TISVNSKKTK  NIVFTKEDTI  TVQKYDSAGT  NLEGNLEVKE
101 GTVTLKSKEIA  KSGEVTVALN  DTNTTQATKK  TGAWDSKTST  LTISVNSKKT
151 TQLVFTKQDT  ITVQKYDSAG  TNLEGTLKVT  EGTVTLSKNI  SKSGEITVAL
201 DDTDSSGNKK  SGTWDSGTST  LTISKNRRTKT  KQLVFTKEDT  ITVQNYDSAG
251 TNLEGKTLKV  TEGTVVLSKN  ILKSGEITVA  LDDSDTTQAT  KKTGKWDSKT
301 STLTISVNSQ  KTKNLVFTKE  DTITVQKYDS  AGTNLEGKLV  VKEGTVTL SK
351 NISKSGEVSV  ELNDTDSSAA  TKKTAAWN SG  TSTLTITVNS  KKTKDLVFTK
401 ENTITVQQYD  SNGTKLEGSL  TVTEGTVTLS  KNISKSGEIT  VALNDTETTP
451 ADKKTGEWKS  DTSTLTISK  N  SQKPKQLVFT  KENTITVQNY  NRAGNALEGS
501 LTVEAGTVTL  SKNISESGEI  TVELKDTETT  PADKKSGTWD  SKTSTLTISK
551 NSQKTKQLVF  TKENTITVQK  YNTAGTKLEG  SAVEITKLDE  IKNALKKDLE
601 ALKAALK

```

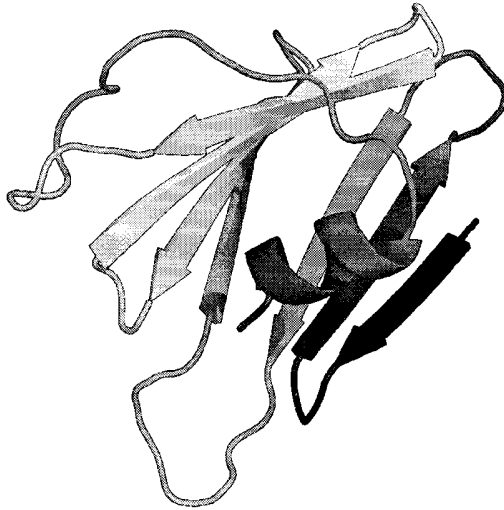
10. Vakcinační konstrukt, vyznačený tím, že obsahuje nano- nebo mikro-partikulární nosič obsahující metalochelatačně vážící složku, chimérický polyepitopový rekombinantní antigen podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 vázaný prostřednictvím metalochelatačně vážící složky, a dále jedno nebo více adjuvans a/nebo Ferritin II.

11. Vakcína k léčbě a prevenci Lymeské boreliózy pro humánní a veterinární použití, vyznačená tím, že obsahuje chimérický polyepitopový rekombinantní antigen podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, a alespoň jedno adjuvans a/nebo Ferritin II.

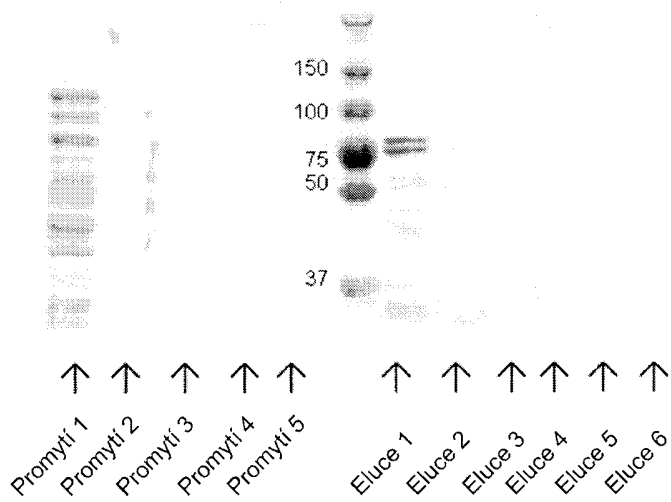
12. Vakcinační konstrukt podle nároku 10 nebo vakcína podle nároku 11, vyznačené tím, že adjuvans je vybrané ze skupiny zahrnující fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý, síran hlinitodraselný a molekulární adjuvans na bázi normuramylových glykopeptidů, adjuvans na bázi disperse částic připravených z biokompatibilních polymerů.

13. Vakcína podle nároku 11 nebo 12, vyznačená tím, že obsahuje vakcinační konstrukt podle nároku 10.

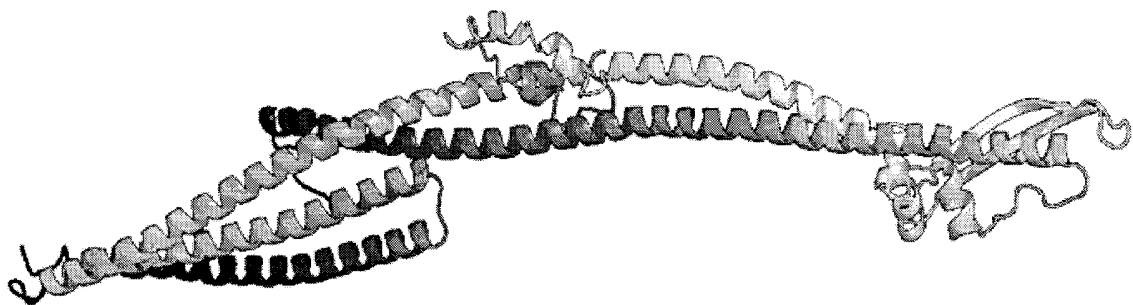
Obr. 1



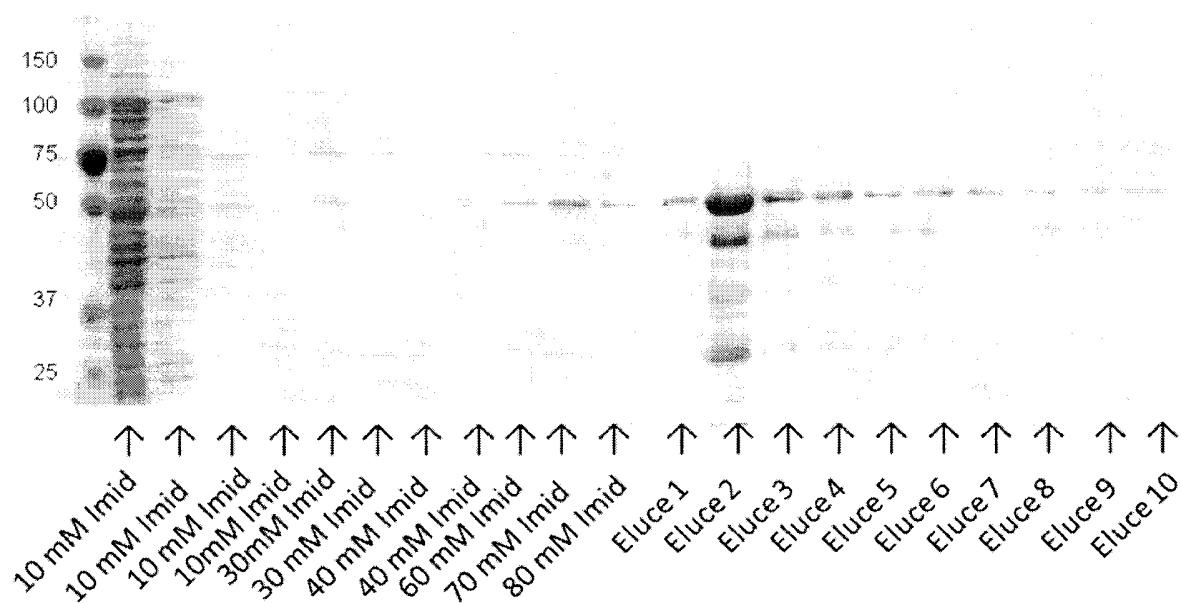
Obr. 2



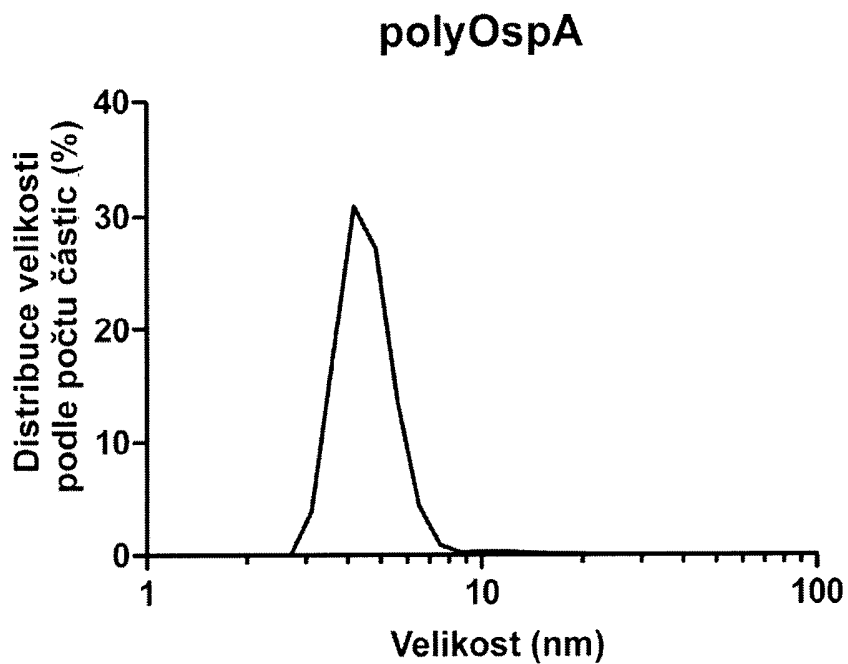
Obr. 3



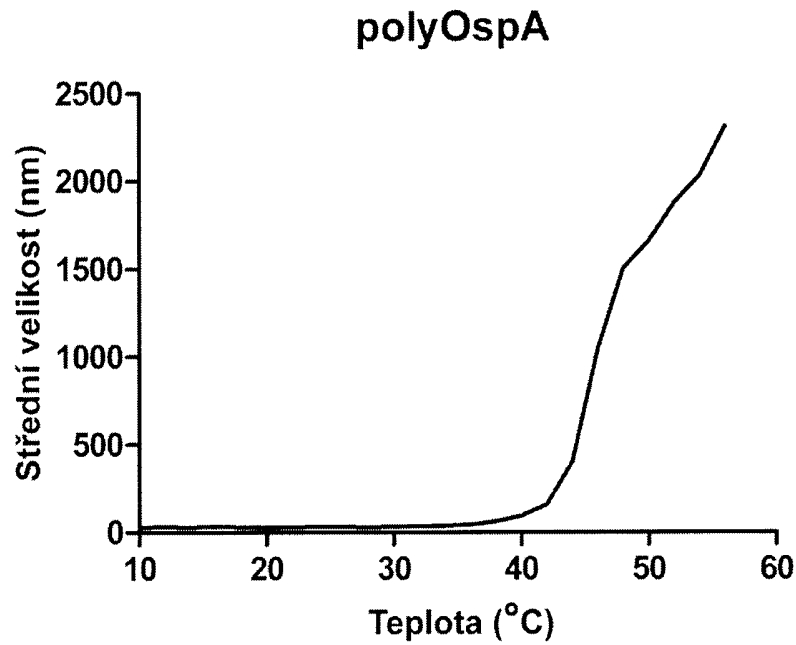
Obr. 4



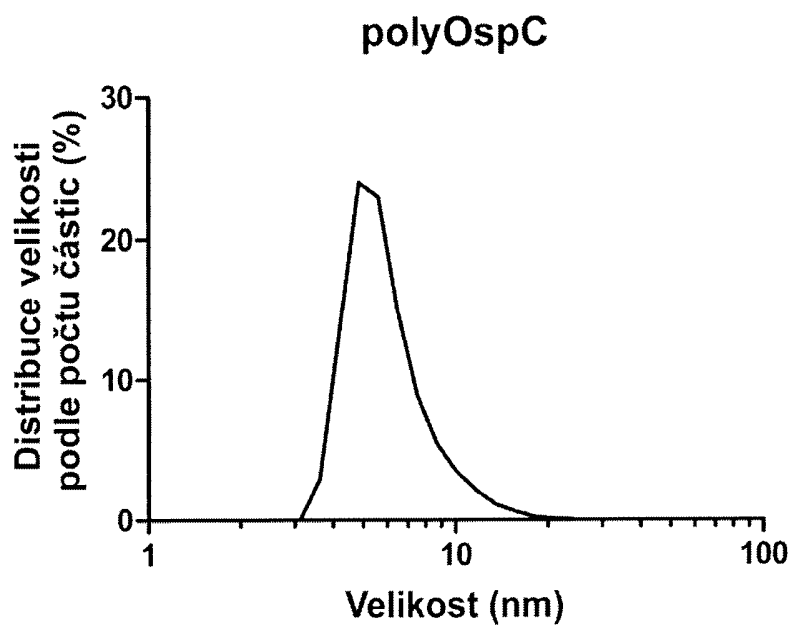
Obr. 5



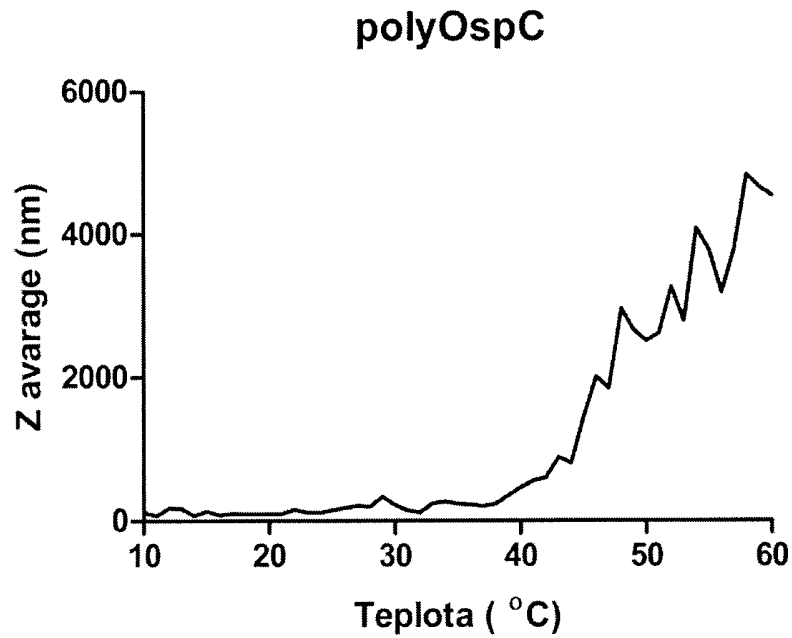
Obr. 6



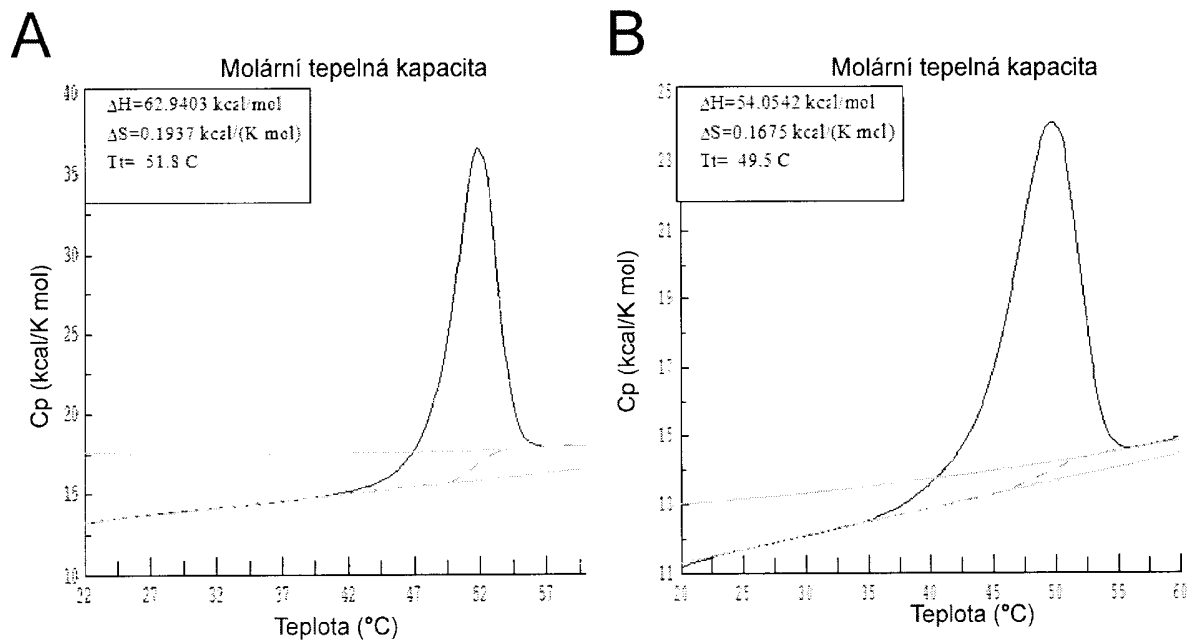
Obr. 7



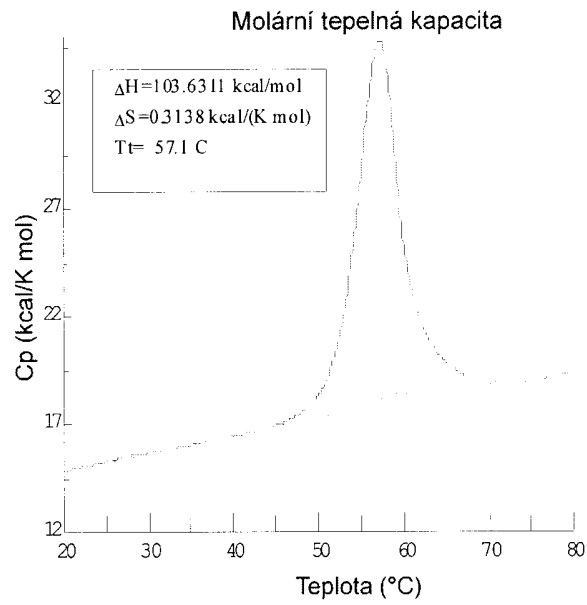
Obr. 8



Obr. 9



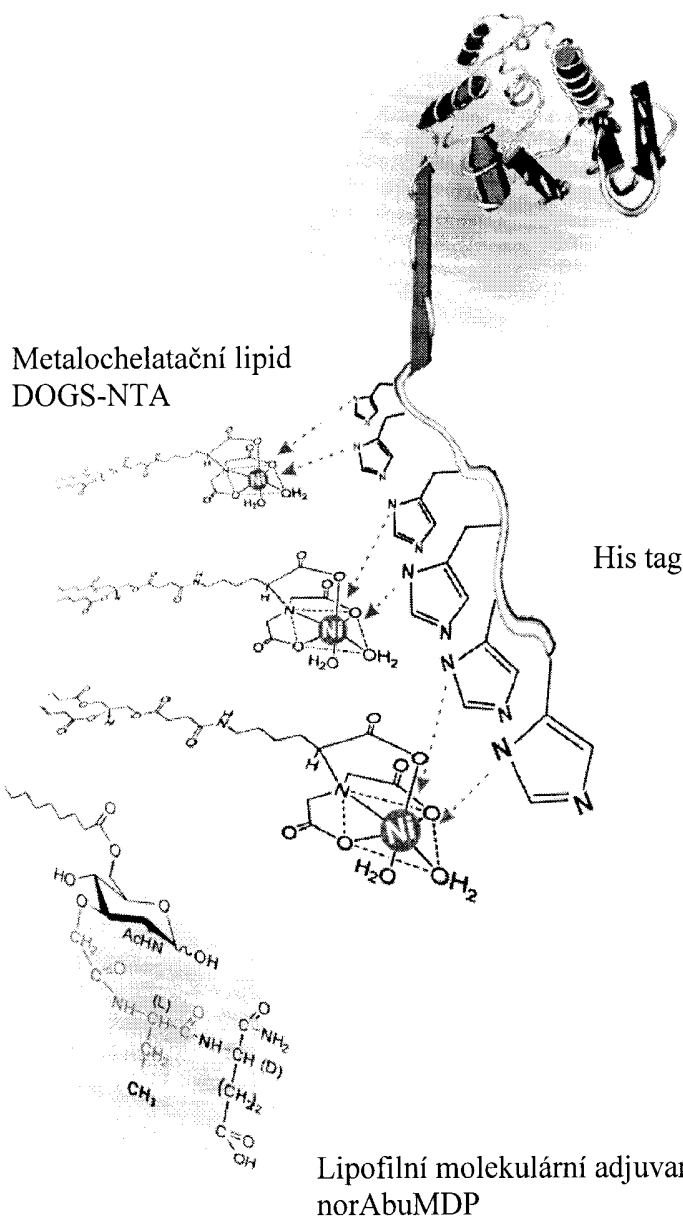
Obr. 10



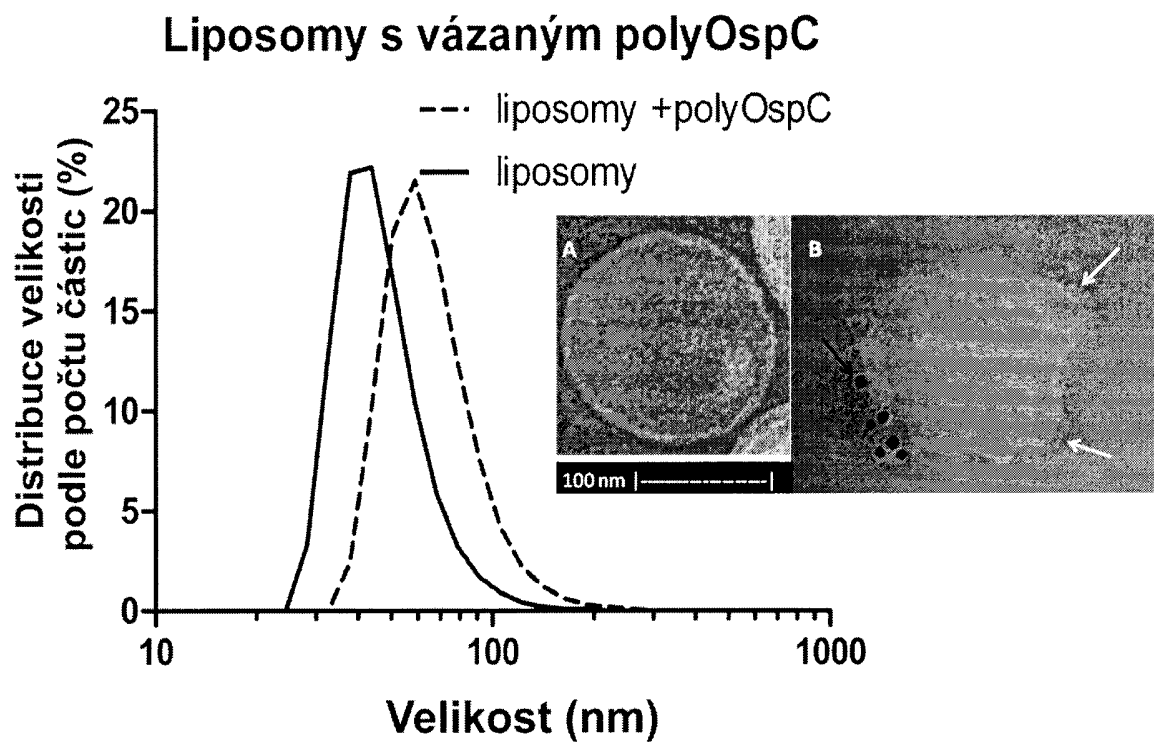
Obr. 11

Rekombinantní antigen

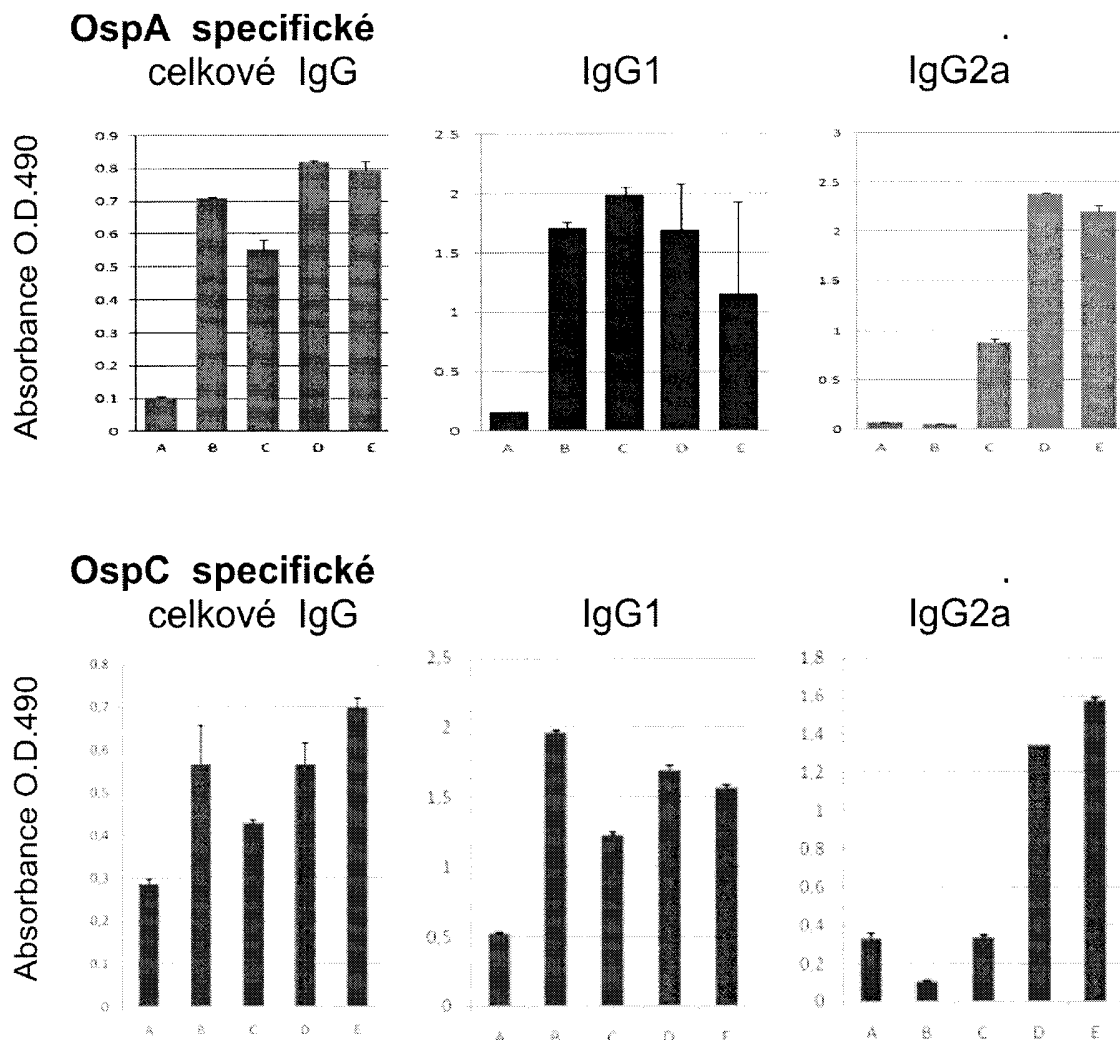
Liposom



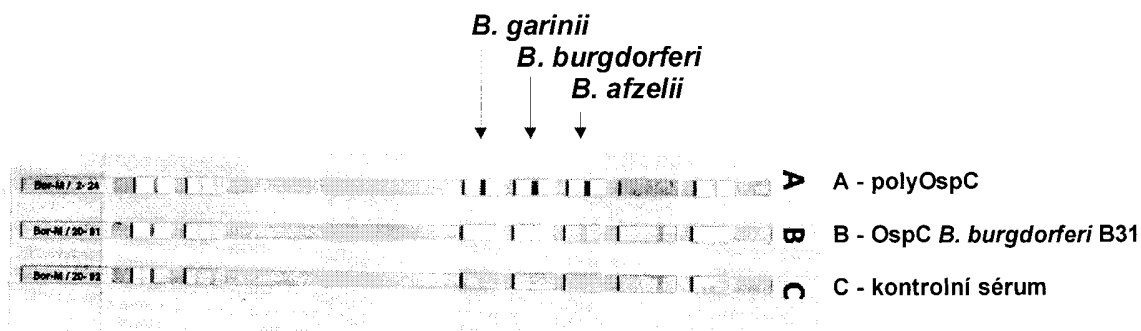
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



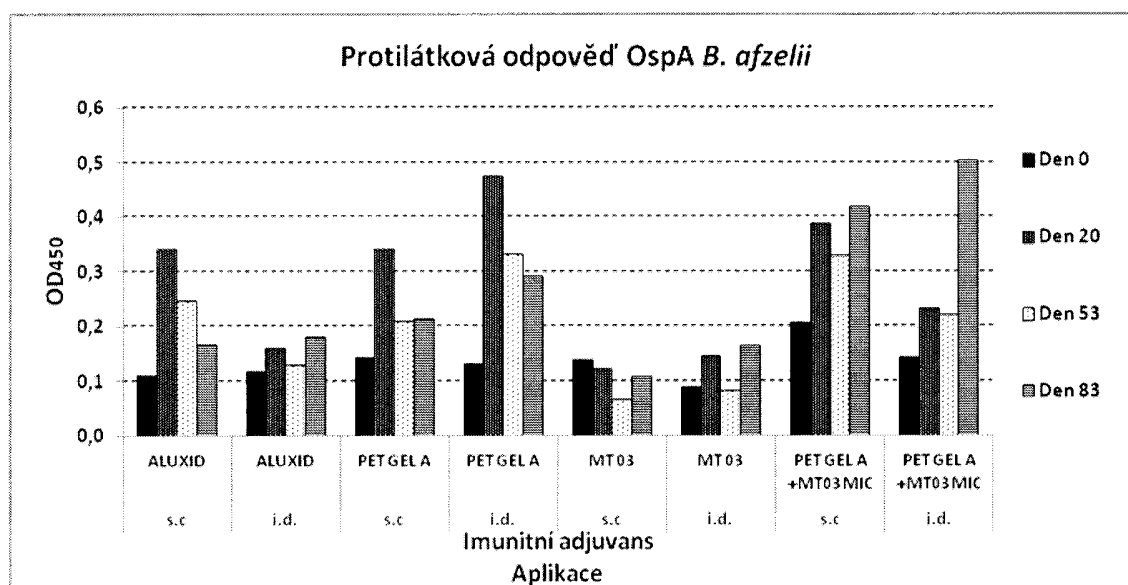
09.05.14

9/13

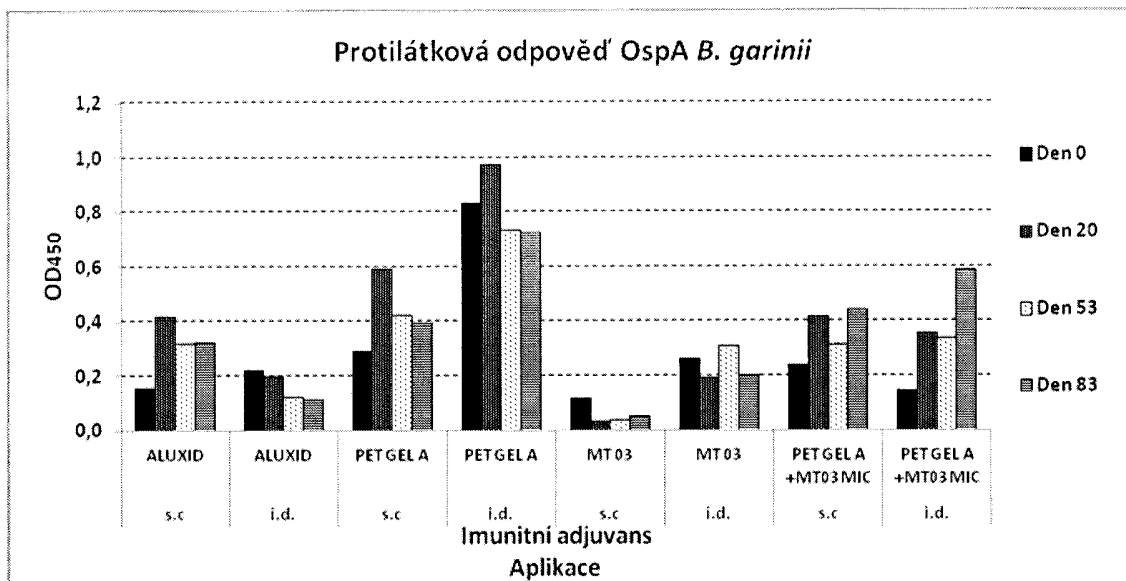
Obr. 15

A) *B. afzelii*

Protilátky OspA <i>B. afzelii</i>	Aplikace Imunitní adjuvans	Den			
		0	20	53	83
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. ALUXID	0,111	0,341	0,246	0,166
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. ALUXID	0,118	0,158	0,129	0,181
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. PET GEL A	0,143	0,341	0,208	0,213
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. PET GEL A	0,132	0,474	0,331	0,291
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. MT 03	0,137	0,122	0,066	0,107
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. MT 03	0,090	0,144	0,081	0,163
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. PET GEL A +MT03 MIC	0,207	0,388	0,328	0,418
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. PET GEL A +MT03 MIC	0,144	0,231	0,220	0,503

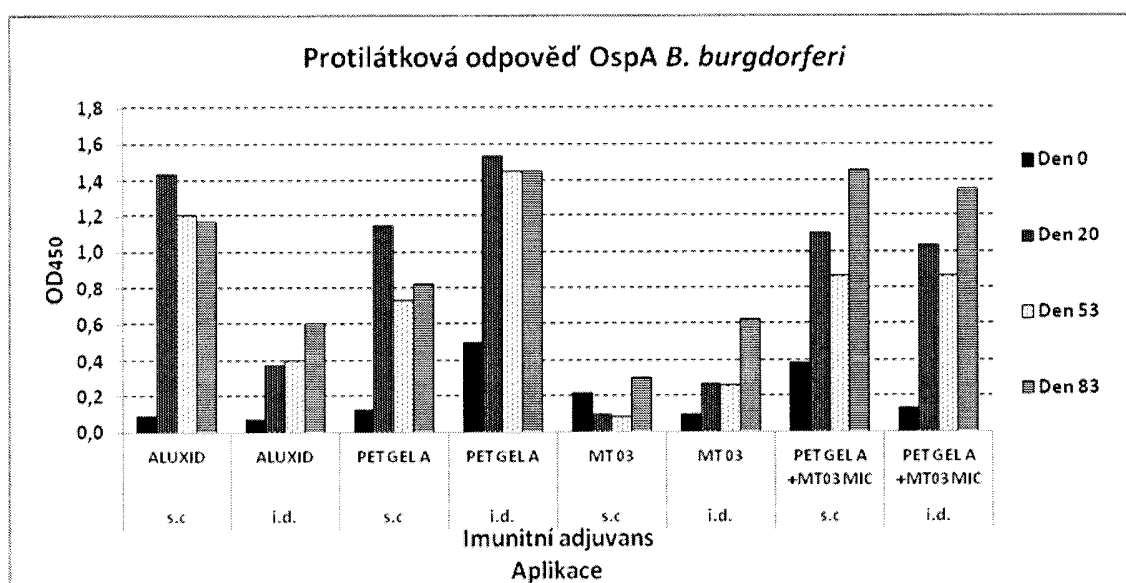
B) *B. garinii*

Protilátky OspA <i>B. garinii</i>	Aplikace Imunitní adjuvans	Den			
		0	20	53	83
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. ALUXID	0,156	0,416	0,317	0,323
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. ALUXID	0,221	0,197	0,121	0,111
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. PET GEL A	0,290	0,592	0,420	0,394
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. PET GEL A	0,834	0,974	0,730	0,725
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. MT 03	0,119	0,033	0,036	0,049
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. MT 03	0,264	0,191	0,307	0,201
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c. PET GEL A +MT03 MIC	0,238	0,415	0,315	0,440
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d. PET GEL A +MT03 MIC	0,145	0,357	0,339	0,587



C) *B. burgdorferi*

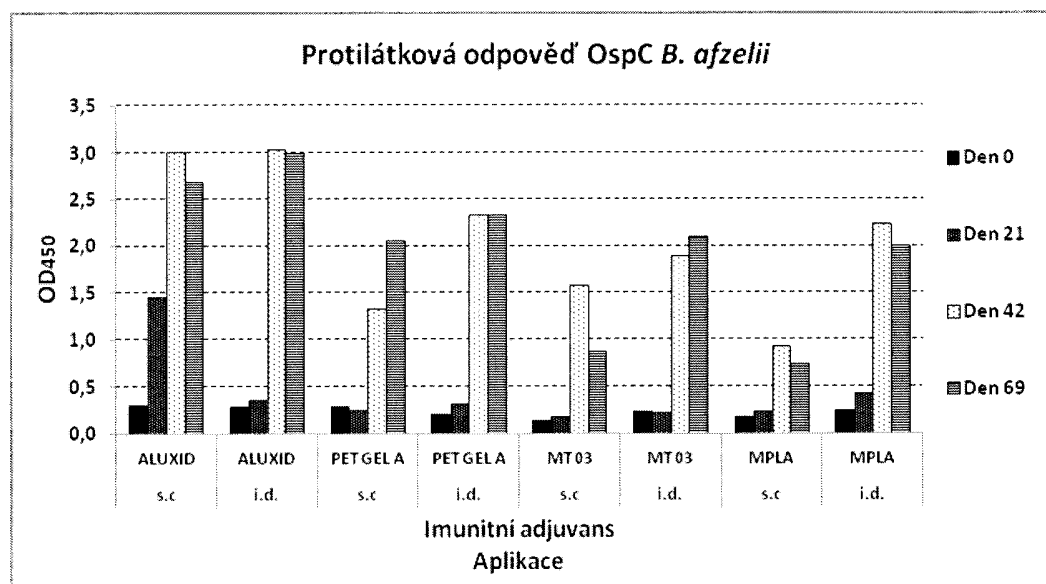
Protilátky OspA <i>B. burgdorferi</i>	Imunitní adjuvans	Aplikace	Den			
			0	20	53	83
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	ALUXID	0,091	1,439	1,202	1,165
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	ALUXID	0,069	0,373	0,399	0,604
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	PET GEL A	0,123	1,148	0,733	0,823
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	PET GEL A	0,498	1,538	1,449	1,450
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	MT 03	0,217	0,099	0,082	0,302
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	MT 03	0,097	0,266	0,259	0,625
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	PET GEL A + MT03 MIC	0,385	1,107	0,865	1,458
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	PET GEL A + MT03 MIC	0,134	1,038	0,868	1,352



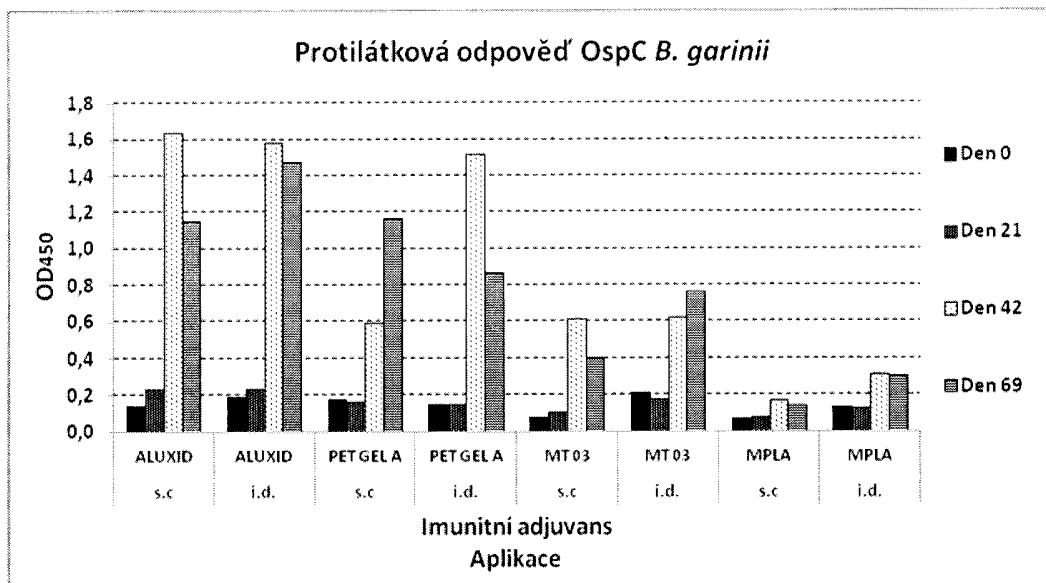
Obr. 16

A) *B. afzelii*

Protilátky OspC <i>B. afzelii</i>	Aplikace		Den			
	Imunitní adjuvans		0	21	42	69
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	ALUXID	0,296	1,447	3,000	2,684
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	ALUXID	0,281	0,348	3,029	2,989
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	PET GEL A	0,283	0,237	1,321	2,051
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	PET GEL A	0,210	0,311	2,321	2,333
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	MT 03	0,142	0,179	1,573	0,879
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	MT 03	0,237	0,212	1,892	2,088
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	MPLA	0,182	0,224	0,923	0,732
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	MPLA	0,248	0,421	2,228	2,003

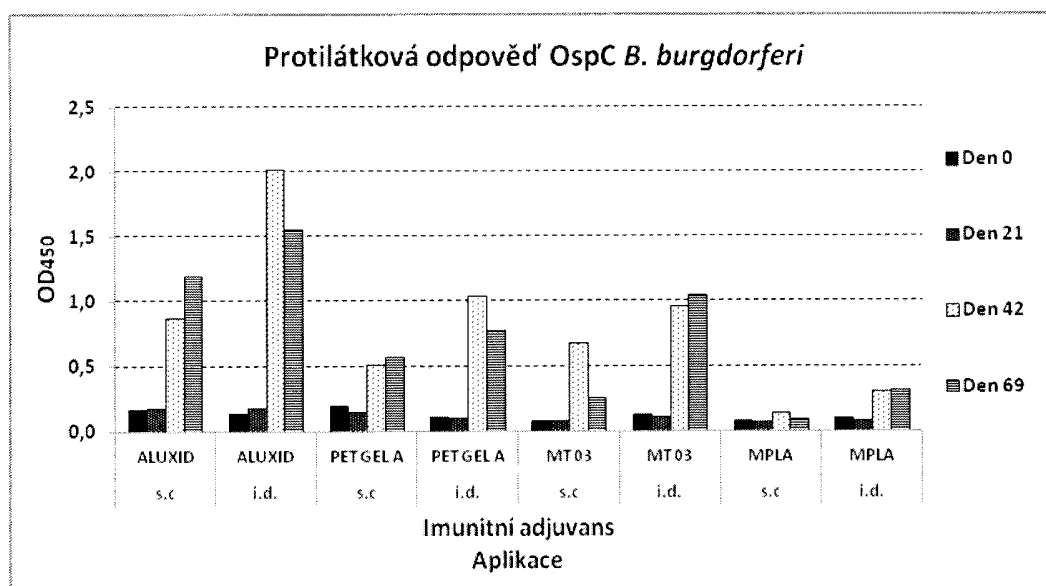
B) *B. garinii*

Protilátky OspC <i>B. garinii</i>	Aplikace		Den			
	Imunitní adjuvans		0	21	42	69
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	ALUXID	0,141	0,229	1,636	1,149
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	ALUXID	0,189	0,229	1,580	1,474
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	PET GEL A	0,174	0,162	0,587	1,160
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	PET GEL A	0,146	0,143	1,513	0,868
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	MT 03	0,078	0,103	0,612	0,400
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	MT 03	0,211	0,177	0,619	0,762
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	s.c.	MPLA	0,071	0,078	0,168	0,140
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	i.d.	MPLA	0,130	0,125	0,307	0,302



C) *B. burgdorferi*

Protilátky OspC <i>B. burgdorferi</i>	Aplikace		Den			
	Imunitní adjuvans		0	21	42	69
Průměrná hodnota OD450	s.c.	ALUXID	0,163	0,177	0,872	1,194
Průměrná hodnota OD450	i.d.	ALUXID	0,140	0,170	2,012	1,553
Průměrná hodnota OD450	s.c.	PET GEL A	0,193	0,140	0,502	0,567
Průměrná hodnota OD450	i.d.	PET GEL A	0,104	0,099	1,036	0,773
Průměrná hodnota OD450	s.c.	MT 03	0,075	0,079	0,674	0,250
Průměrná hodnota OD450	i.d.	MT 03	0,125	0,101	0,958	1,043
Průměrná hodnota OD450	s.c.	MPLA	0,078	0,066	0,136	0,086
Průměrná hodnota OD450	i.d.	MPLA	0,093	0,078	0,297	0,314



Obr. 17

Protilátky FERRITIN II - psi	Imunitní adjuvans	Den					
		0	21	42	70	98	126
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	Aluxid	0,035	0,834	1,054	1,089	0,809	0,656
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	PET GEL A	0,037	0,351	1,220	1,037	0,541	0,354
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	MT05	0,052	0,071	0,086	0,192	0,062	0,057
Průměrná hodnota OD ₄₅₀	MT06	0,048	0,030	0,057	0,159	0,054	0,065

