

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-524802

(P2015-524802A)

(43) 公表日 平成27年8月27日(2015.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-524305 (P2015-524305)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月11日 (2013.7.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年3月17日 (2015.3.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/050058
 (87) 国際公開番号 W02014/018274
 (87) 国際公開日 平成26年1月30日 (2014.1.30)
 (31) 優先権主張番号 61/676,668
 (32) 優先日 平成24年7月27日 (2012.7.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591013229
 バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
 BAXTER INTERNATIONAL
 L INCORPORATED
 アメリカ合衆国 60015 イリノイ州
 、ディアフィールド、ワン・バクスター・
 パークウェイ (番地なし)

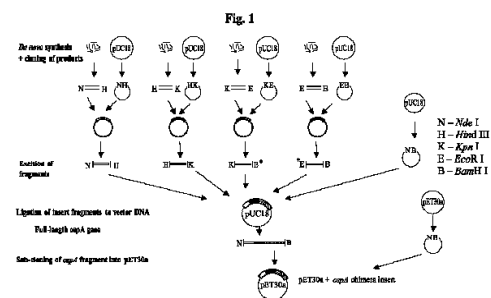
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラOSP A分子を含む組成物およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、新規なライムワクチンに使用するためのキメラOSP A分子の開発に関する。より具体的には、本キメラOSP A分子は、1つのOSP A血清型由来の近位部分を、別のOSP A血清型由来の遠位部分と共に含み、同時に、親ポリペプチドの両方の抗原特性を保持する。キメラOSP A分子は、単独でまたは組み合わせて送達され、様々なボレリア遺伝子種に対する防御を提供する。本発明はまた、ライム病またはボレリア症の防止および治療において、対象にキメラOSP A分子を投与するための方法を提供する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 2】

対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 3】

対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 4】

対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 5】

対象におけるボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g、約 20 μ g、約 30 μ g、約 40 μ g、約 50 μ g、約 60 μ g、約 70 μ g、約 80 μ g、約 90 μ g、約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 6】

対象におけるボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g、約 20 μ g、約 30 μ g、約 40 μ g、約 50 μ g、約 60 μ g、約 70 μ g、約 80 μ g、約 90 μ g、約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 7】

対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番

10

20

30

40

50

号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g、約 20 μ g、約 30 μ g、約 40 μ g、約 50 μ g、約 60 μ g、約 70 μ g、約 80 μ g、約 90 μ g、約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 8】

対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g、約 20 μ g、約 30 μ g、約 40 μ g、約 50 μ g、約 60 μ g、約 70 μ g、約 80 μ g、約 90 μ g、約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

10

【請求項 9】

前記組成物は、アジュバントをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

前記アジュバントは、水酸化アルミニウムである、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記ポリペプチドの組み合わせは、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸配列を含むそれぞれのポリペプチドの等しい量を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の組成物。

20

【請求項 12】

前記組成物は、免疫原性組成物またはワクチン組成物である、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 13】

前記ボレリアは、広義のボレリアまたは狭義のボレリアである、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

前記ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンシス、狭義のボレリアブルグドルフェリ、ボレリアジャボニカ、ボレリアアンダーソニイ、ボレリアピセッティ、ボレリアシニカ、ボレリアタルジ、ボレリアタヌキイ、ボレリアバライシアナ、ボレリアルシタニアエ、ボレリアスピエルマニイ、ボレリアミヤモトイ、またはボレリアローンスターである、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 15】

前記ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンシス、または狭義のボレリアブルグドルフェリである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記組成物は、対象におけるボレリア抗体産生を、初回投薬の約 60 日後に、約 1,000 ~ 10,000 の幾何平均力価 (GMT) レベルに増加させるのに有効な単位用量で製剤化される、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 17】

前記組成物は、対象におけるボレリア抗体産生を、初回投薬の約 90 日後に、約 2,000 ~ 30,000 の幾何平均力価 (GMT) レベルに増加させるのに有効な単位用量で製剤化される、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 18】

前記組成物は、対象におけるボレリア抗体産生を、ブースター投与後に、約 15,000 ~ 50,000 の幾何平均力価 (GMT) レベルに増加させるのに有効な単位用量で製剤化される、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物は、単回用量での投与に有効な単位用量で製剤化される、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の組成物。

50

【請求項 20】

前記組成物は、複数回用量での投与に有効な単位用量で製剤化される、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 21】

前記単位用量は、約 10 μ g ~ 約 90 μ g である、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 22】

前記単位用量は、約 30 μ g または約 60 μ g である、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 23】

対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導する方法であって、前記対象に、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の組成物の免疫学的有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 24】

前記組成物の前記免疫学的有効量は、単回の単位用量で投与される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組成物の前記免疫学的有効量は、複数回の単位用量で投与される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記複数回の単位用量は、約 1 か月間隔で投与される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記組成物のブースターが、前記初回単位用量の約 6 ~ 約 18 か月後にさらに投与される、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記組成物のブースターが、前記初回単位用量の約 9 ~ 約 12 か月後にさらに投与される、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 29】

前記組成物は、約 1 日目、約 29 日目、および約 57 日目に投与される、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記組成物のブースターが、前記初回単位用量の約 9 か月 ~ 約 12 か月後にさらに投与される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記単位用量は、約 10 μ g ~ 約 90 μ g である、請求項 21 ~ 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

前記単位用量は、約 30 μ g または約 60 μ g である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物が、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

【請求項 34】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組成物中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約 10 μ g ~ 約 1

10

20

30

40

50

00 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

【請求項 35】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物は、約10 μg ~ 約100 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

10

【請求項 36】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組成物中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約10 μg ~ 約100 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

【請求項 37】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物が、約10 μg 、約20 μg 、約30 μg 、約40 μg 、約50 μg 、約60 μg 、約70 μg 、約80 μg 、約90 μg 、約100 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

20

【請求項 38】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組成物中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約10 μg 、約20 μg 、約30 μg 、約40 μg 、約50 μg 、約60 μg 、約70 μg 、約80 μg 、約90 μg 、約100 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

30

【請求項 39】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、前記組成物が、約10 μg 、約20 μg 、約30 μg 、約40 μg 、約50 μg 、約60 μg 、約70 μg 、約80 μg 、約90 μg 、約100 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

40

【請求項 40】

組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組成物中の前記ポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、前記組成物は、約10 μg 、約20 μg 、約30 μg 、約40 μg 、約50 μg 、約60 μg 、約70 μg 、約80 μg 、約90 μg 、約100 μg の単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組

50

み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用。

【請求項 4 1】

前記組成物は、アジュバントをさらに含む、請求項 3 3 ~ 4 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 2】

前記アジュバントは、水酸化アルミニウムである、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 3】

前記ポリペプチドの組み合わせは、配列番号 2、4、および 6 に記載のアミノ酸配列を含む、前記ポリペプチドのそれぞれの等しい量を含む、請求項 3 3 ~ 4 2 のいずれかに記載の使用。

10

【請求項 4 4】

前記組成物は、免疫原性組成物またはワクチン組成物である、請求項 3 3 ~ 4 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 5】

前記ボレリアは、広義のボレリアまたは狭義のボレリアである、請求項 3 3 ~ 4 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 6】

前記ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンス、狭義のボレリアブルグドルフェリ、ボレリアジャボニカ、ボレリアアンダーソニイ、ボレリアピセッティ、ボレリアシニカ、ボレリアタルジ、ボレリアタヌキイ、ボレリアバライシアナ、ボレリアルシタニアエ、ボレリアスピエルマニイ、ボレリアミヤモトイ、またはボレリアローンスターである、請求項 3 3 ~ 4 4 のいずれかに記載の使用。

20

【請求項 4 7】

前記ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンス、または狭義のボレリアブルグドルフェリである、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記組成物は、ボレリア抗体産生を、初回投薬の約 6 0 日後に、約 1 , 0 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0 の幾何平均力価 (G M T) レベルに増加させる量で製剤化される、請求項 3 3 ~ 4 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 9】

前記組成物は、ボレリア抗体産生を、初回投薬の約 9 0 日後に、約 2 , 0 0 0 ~ 3 0 , 0 0 0 の機械平均力価 (G M T) レベルに増加させる量で製剤化される、請求項 3 3 ~ 4 7 のいずれかに記載の使用。

30

【請求項 5 0】

前記組成物は、ボレリア抗体産生を、ブースター投与後に、約 1 5 , 0 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0 の幾何平均力価 (G M T) レベルに増加させる量で製剤化される、請求項 3 3 ~ 4 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 5 1】

前記組成物は、単回の単位用量で投与するために製剤化される、請求項 3 3 ~ 5 0 のいずれかに記載の使用。

40

【請求項 5 2】

前記組成物は、複数回の単位用量で投与するために製剤化される、請求項 3 3 ~ 5 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 5 3】

前記組成物は、約 1 か月間隔で複数回の単位用量で投与するために製剤化される、請求項 5 2 に記載の使用。

【請求項 5 4】

前記組成物は、前記初回単位用量の約 6 ~ 約 1 8 か月後に、ブースターとして投与するために製剤化される、請求項 5 1 または 5 2 に記載の使用。

【請求項 5 5】

50

前記組成物は、前記初回単位用量の約 9 ~ 約 12 か月後に投与するためにブースターとして製剤化される、請求項 51 または 52 に記載の使用。

【請求項 56】

前記組成物は、複数回の単位用量で、約 1 日目、約 29 日目、および約 57 日目に投与するために製剤化される、請求項 52 に記載の使用。

【請求項 57】

前記組成物は、複数回の単位用量に続いて最初の単位用量の約 9 か月 ~ 約 12 か月後にブースターで投与するために製剤化される、請求項 56 に記載の使用。

【請求項 58】

前記単位用量は、約 10 μ g ~ 約 90 μ g である、請求項 33 ~ 57 のいずれかに記載の使用。

10

【請求項 59】

前記単位用量は、約 30 μ g または約 60 μ g である、請求項 33 ~ 58 のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012 年 7 月 27 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 676 , 668 号の利益を主張し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

本発明は、概して、キメラ O s p A ポリペプチド、ポリペプチドをコードする核酸、これらの分子を含む組成物、およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

ライム病は、広義の (s . l .) ボレリアブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) により引き起こされるマダニ媒介性疾患である。この疾患は、典型的にはマダニ咬傷部位での拡大する赤い発疹の発症、その後起こり得る全身合併症、例えば、髄膜炎、心炎、または関節炎を特徴とする。ライム病のほとんど全ての症例が、3 つの遺伝種、ボレリアアフゼリ (*Borrelia afzelii*)、ボレリアガリニ (*Borrelia garinii*)、および狭義の (s . s .) ボレリアブルグドルフェリのうちの 1 つにより引き起こされる。欧州では、ヒトに感染する 3 つの種全てが見い出されている。しかしながら、北米では、唯一の種、狭義のボレリアブルグドルフェリのみが見い出されている。ボレリアブルグドルフェリは、ボレリア属のスピロヘータクラスのグラム陰性菌種である。ライム病の抗生物質治療は、通常は有効であるが、患者の中には関節または神経系に関連する疾患の慢性身体障害性形態を発症するものもあり、これは、非経口抗生物質療法後でさえも実質的には改善せず、したがって、ハイリスク集団のためのワクチンの必要性が強調されている。

30

【0004】

細胞表層タンパク質 A (O s p A) は、イクソデスダニの中腸に存在する広義のボレリアブルグドルフェリ種により発現される 31 kDa 抗原である。O s p A は、北米においてライム病を防止するのに効果的であることが証明されている (*Steere et al . , N . Engl . J . Med . 339 : 209 - 15 , 1998*、*Sigal et al . , N . Engl . J . Med . 339 : 216 - 22 , 1998*、*erratum in : N . Engl . J . Med . 339 : 571 , 1998*)。完全にプロセシングされた O s p A のアミノ末端は、タンパク質を細菌膜の外表面に固着させる 3 つの脂肪 - アシル鎖で翻訳後修飾されたシステイン残基である (*Bouchon et al . , Anal . Biochem . 246 : 52 - 61 , 1997*)。O s p A の脂質付加が分子を安定化することが報告されており (*Luft*、私信)、強いアジュバントが存在しない場合の防御に必須である (*Erdile et al . , Infect . Immun .*

40

50

61:81-90, 1993)。アミノ末端脂質膜アンカーを欠くタンパク質の可溶性組換え形態が、凝集マウスモノクローナル抗体のFabフラグメントと共結晶化されて、OspAの構造を決定し、これは、21の逆平行鎖、続いて単一の α -ヘリックスを含むことが示された(Liet al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:3584-9, 1997)。

【0005】

一価OspA系ワクチン(LYMERIX(登録商標))がライム病の防止のために米国で市販された。しかしながら、欧州では、3つの遺伝種にわたるOspA配列の不均一性が、単一株由来のOspAに基づくワクチンによる広い防御を妨げている(Gern et al., Vaccine 15:1551-7, 1997)。7つの主要なOspA血清型が、ヨーロッパ分離株中で認識されている(指定血清型1~7、Wiltske et al., J. Clin. Microbiol. 31:340-50, 1993)。OspA血清型は種と相関し、血清型1は狭義のB.ブルグドルフェリに対応し、血清型2はB.アフゼリに対応し、血清型3~7はB.ガリニに対応する。

【0006】

OspAでの免疫化により獲得された防御免疫は、宿主の免疫応答と病原体との間の相互作用が宿主内で起こらず、マダニベクターの中腸で起こるため、異常である。ライム病の場合、マダニは動物からヒトへのライム病伝達のベクターまたは担体として機能する。感染したマダニによる摂食中に獲得されたOspA特異抗体は、広義のB.ブルグドルフェリの免疫化した哺乳動物宿主への伝達を防止する(de Silva et al., J. Exp. Med. 183:271-5, 1996)。防御は、抗体媒介であり、主に殺菌抗体により与えられるが、スピロヘータのマダニ腸上皮の内膜上の受容体への付着を阻止する抗体もまた効果的であり得る(Pal et al., J. Immunol. 166:7398-403, 2001)。

【0007】

有効なOspAワクチンの合理的開発には、防御モノクローナル抗体LA-2により規定されるもの等、防御エピトープの同定が必要である(Golde et al., Infect. Immun. 65:882-9, 1997)。X線結晶解析およびNMR分析がOspAにおける免疫学的に重要な高頻度可変ドメインを同定するために使用され、LA-2エピトープがアミノ酸203~257に位置付けされている(Ding et al., J. Mol. Biol. 302:1153-64, 2000、Luft et al., J. Infect. Dis. 185(Suppl. 1):S46-51, 2002)。

当該技術分野では、米国、欧州、および他の場所に存在する様々なボレリア種に対し広い防御を提供することができるOspAワクチンの開発が必要である。以下の開示は、そのようなワクチンの明細を記載する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Steere et al., N. Engl. J. Med. 339:209-15, 1998

【非特許文献2】Bouchon et al., Anal. Biochem. 246:52-61, 1997

【非特許文献3】Erdile et al., Infect. Immun. 61:81-90, 1993

【非特許文献4】Liet al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:3584-9, 1997

【非特許文献5】Gern et al., Vaccine 15:1551-7, 1997

【非特許文献6】Wiltske et al., J. Clin. Microbiol. 3

10

20

30

40

50

1 : 3 4 0 - 5 0 , 1 9 9 3

【非特許文献 7】de Silva et al., J. Exp. Med. 183: 271 - 5, 1996

【非特許文献 8】Pal et al., J. Immunol. 166: 7398 - 403, 2001

【非特許文献 9】Golde et al., Infect. Immun. 65: 882 - 9, 1997

【非特許文献 10】Ding et al., J. Mol. Biol. 302: 1153 - 64, 2000

【非特許文献 11】Luft et al. J Infect Dis. 185 (Suppl. 1): S46 - 51, 2002 10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、ライム病またはライムボレリア症の防止および治療に関連する当該技術分野における 1 つ以上の要求に対処する。

【0010】

本発明は、配列番号 1、3、および 5 に示される配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を含む。いくつかの態様では、本発明は、配列番号 1、3、および 5 に示される配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列から構成される単離核酸分子を含む。他の態様では、本発明は、下記からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子を含む：(a) 配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有するヌクレオチド配列；および (b) (a) に相補的なヌクレオチド配列。さらなる態様では、本発明は下記からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子を含む：(a) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および (b) (a) に相補的なヌクレオチド配列。なおもさらなる態様では、本発明は、下記からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を含む：(a) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含み、1 ~ 25 の保存的アミノ酸の置換を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(b) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含み、1 ~ 25 の保存的アミノ酸の挿入を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含み、1 ~ 25 の保存的アミノ酸の内部欠失を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(d) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含み、1 ~ 25 のアミノ酸の C および / または N 末端トランケーションを有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(e) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端トランケーション、または N 末端トランケーションから選択される 1 ~ 25 個のアミノ酸の修飾を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；ならびに (f) (a) - (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。 20 30 40

【0011】

本発明は、配列番号 7、9、および 11 に示される配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を含む。いくつかの態様では、本発明は、配列番号 7、9、および 11 に示される配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる単離核酸分子を含む。追加の態様では、本発明は、下記からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子を含む：(a) 配列番号 7、配列番号 9、または配列番号 11 に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 90、91、92、93、9 50

4、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するヌクレオチド配列；および(b)(a)に相補的なヌクレオチド配列。さらなる態様では、本発明は、下記からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子を含む：(a)配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および(b)(a)に相補的なヌクレオチド配列。なおもさらなる態様では、本発明は下記からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を含む：(a)配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み、1～25個の保存的アミノ酸の置換を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(b)配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み、1～25個の保存的アミノ酸の挿入を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c)配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み、1～25個の保存的アミノ酸の内部欠失を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(d)配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み、1～25個のアミノ酸のCおよび/またはN末端トランシェーションを有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(e)配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端トランシェーション、またはN末端トランシェーションから選択される1～25個のアミノ酸の修飾を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；ならびに(f)(a)-(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

10

20

【0012】

本発明は、本明細書に記載される宿主細胞を培養することによりポリペプチドを生成させるベクター、宿主細胞、およびプロセスを含む。いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載される核酸分子のうちのいずれかを含むベクターを含む。他の態様では、本発明は、そのようなベクターを含む宿主細胞を含む。いくつかの態様では、宿主細胞は、真核細胞である。他の態様では、宿主細胞は、原核細胞である。様々な態様では、ポリペプチドを生成させるプロセスは、本明細書に記載される宿主細胞を、ポリペプチドを発現させるのに好適な条件下で培養すること、および任意でポリペプチドを培養物から単離することを含む。様々な態様では、本発明は、これらのキメラ核酸分子のうちのいずれかまたはそのような核酸分子を含む任意のベクターと、薬学的に許容される1つまたは複数の担体とを含む組成物を含む。

30

【0013】

本発明は、本明細書に記載される核酸分子のうちのいずれかまたは本明細書に記載されるベクターのうちのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む組成物を含む。いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載される核酸分子のうちの少なくとも2つと薬学的に許容される担体とを含み、核酸分子が異なるヌクレオチド配列を有する、組成物を含む。特定の態様では、本発明は、配列番号1、3、および5に示されるヌクレオチド配列の組み合わせを含む組成物を含む。

40

【0014】

本発明は、配列番号2、4、および6に示される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、本発明は配列番号2、4、および6に示される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる単離ポリペプチドを含む。追加の態様では、本発明は、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチドを含む。さらなる態様では、本発明は配列番号8、10、および12に示される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを含む。なおもさらなる態様では、本発明は、配列番号8、10、および12に示される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列から

50

なる単離ポリペプチドを含む。いくつかの態様では、本発明は、少なくとも200のアミノ酸残基を有し、配列番号8、配列番号10、または配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチドを含む。

【0015】

本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドのうちのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む組成物を含む。いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドのうちの少なくとも2つと、薬学的に許容される担体とを含み、ポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、組成物を含む。特定の態様では、本発明は、配列番号2、4、および6に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの組み合わせを含む組成物を含む。

10

【0016】

本発明は、免疫原性組成物を含む。いくつかの態様では、本発明の免疫原性組成物は、本明細書に記載される組成物のうちのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む。様々な態様では、免疫原性組成物は、細胞表層タンパク質A (OspA) タンパク質に特異的に結合する抗体の産生を誘導する特性を有する。ある特定の態様では、免疫原性組成物は、ボレリアに特異的に結合する抗体の産生を誘導する特性を有する。具体的な態様では、免疫原性組成物は、ボレリアを中和する抗体の産生を誘導する特性を有する。ある特定の態様では、ボレリアは、広義のボレリアブルグドルフェリである。具体的な態様では、ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンシス、または狭義のボレリアブルグドルフェリである。さらなる態様では、ボレリアは、ボレリアジャポニカ (*Borrelia japonica*)、ボレリアアンダーソニー (*Borrelia andersonii*)、ボレリアビセッティ (*Borrelia bissetti*)、ボレリアシニカ (*Borrelia sinica*)、ボレリアタルジ (*Borrelia turdi*)、ボレリアタヌキイ (*Borrelia tanukii*)、ボレリアバライシアナ (*Borrelia valaisiana*)、ボレリアルシタニアエ (*Borrelia lusitaniae*)、ボレリアスピエルマニイ (*Borrelia spielmanii*)、ボレリアミヤモトイ (*Borrelia miyamotoi*)、またはボレリアローンスタール (*Borrelia lonestari*) である。いくつかの態様では、抗体は動物により産生される。さらなる態様では、動物は哺乳動物である。なおもさらなる態様では、哺乳動物はヒトである。

20

30

【0017】

本発明は、ワクチン組成物を含む。いくつかの態様では、本発明のワクチン組成物は、本明細書に記載されるいずれかの免疫原性組成物と薬学的に許容される担体とを含む。様々な態様では、本発明は混合ワクチンを含む。ある特定の態様では、本発明の混合ワクチンは、本明細書に記載されるいずれかのワクチン組成物を少なくとも第2のワクチン組成物と共に含む。いくつかの態様では、第2のワクチン組成物は、マダニ媒介疾患に対して防御する。様々な態様では、マダニ媒介疾患は、ロッキー山紅斑熱、バベシア症、回帰熱、コロラドダニ熱、ヒト単球エーリキア症 (HME)、ヒト顆粒球エーリキア症 (HGE)、南部ダニ関連発疹病 (STARI)、野兔病、ダニ麻痺、ポワッサン脳炎、Q熱、クリミアコンゴ出血熱、キタウクゾーン病、ポタン熱、またはダニ媒介脳炎である。他の態様では、第2のワクチン組成物は下記からなる群より選択されるワクチンである：ダニ媒介脳炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、およびロッキー山紅斑熱ワクチン。様々な態様では、第2のワクチン組成物は、ボレリア感染またはライム病に対する免疫化に適合する季節的免疫化スケジュールを有する。

40

【0018】

本発明は、対象において免疫学的応答を誘導するための方法を含む。様々な態様では、そのような方法は、対象に、本明細書に記載される免疫原性組成物またはワクチン組成物のうちのいずれかを、免疫学的応答を誘導するのに有効な量で投与するステップを含む。

50

ある特定の態様では、免疫学的応答は、抗 O s p A 抗体の産生を含む。本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドのうちのいずれかに特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを含む。

【0019】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための方法を含む。様々な態様では、そのような方法は、本明細書に記載されるワクチン組成物のうちのいずれかまたは本明細書に記載される混合ワクチンのうちのいずれかを、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するのに有効な量で、対象に投与するステップを含む。他の態様では、そのような方法は、本明細書に記載される抗体のうちのいずれかを、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するのに有効な量で、対象に投与するステップを含む。ある特定の態様では、そのような方法は、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物で哺乳動物を免疫化することにより生成される抗体またはそのフラグメントを、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するのに有効な量で、対象に投与するステップを含む。いくつかの態様では、抗体またはそのフラグメントは、過免疫血清、過免疫血漿、またはその精製免疫グロブリン画分である。

10

【0020】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を受動的に防止するための方法であって、本明細書に記載されるワクチン組成物のうちのいずれかで哺乳動物を免疫化することにより生成される抗 O s p A 抗体またはそのフラグメントを、ボレリア感染またはライム病を防止するのに有効な量で、対象に投与するステップを含み、抗体またはそのフラグメントが精製免疫グロブリン調製物または免疫グロブリンフラグメント調製物である、方法を含む。

20

【0021】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を防止するための方法であって、本明細書に記載されるワクチン組成物のうちのいずれかで対象を免疫化した後に生成される抗 O s p A モノクローナル抗体またはそのフラグメントを、ボレリア感染またはライム病を防止するのに有効な量で、対象に投与するステップを含む、方法を含む。いくつかの態様では、モノクローナル抗体またはそのフラグメントはヒト化される。具体的な態様では、モノクローナル抗体は F 2 3 7 / B K 2 である。

【0022】

本発明は、対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

30

【0023】

本発明は、対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、配列番号 2、4、または 6 に記載のアミノ酸を含み、組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

40

【0024】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、少なくとも 200 個のアミノ酸残基を有し、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物は、約 10 μ g ~ 約 100 μ g の単位用量で製剤化される、ポリペプチ

50

ドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

【0025】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、前記組み合わせ中の前記ポリペプチドのそれぞれが、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g～約100 μ gの単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

【0026】

本発明は、対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

10

【0027】

本発明は、対象においてボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

20

【0028】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

30

【0029】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病を防止または治療するための組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位用量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を含む。

40

【0030】

本発明は、対象におけるボレリア感染またはライム病に対する防御免疫応答を誘導する方法であって、対象に、本明細書に記載の組成物のうちのいずれかの免疫学的有効量を投与することを含む、方法を含む。いくつかの態様では、組成物の免疫学的有効量は、単回の単位用量で投与される。いくつかの態様では、組成物の免疫学的有効量は、複数回の単位用量で投与される。いくつかの態様では、複数回の単位用量は、約1か月間隔で投与される。さらなる態様では、組成物のブースターは、組成物の初回単位用量の約6か月～約18か月後に投与される。他の態様では、ブースターは、初回単位用量の約9～約12か月後にさらに投与される。より具体的な態様では、組成物は、1か月間隔で、例えば、約

50

1日目、約29日目、および約57日目に、投与される。これらの具体的な態様の一部では、ブースターは、最初の単位用量の約9か月～約12か月後に投与される。いくつかの態様では、単位用量は、約10 μ g～約90 μ gである。具体的な態様では、単位用量は、約30 μ gまたは約60 μ gである。

【0031】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物が、約10 μ g～約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

10

【0032】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組成物中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g～約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

【0033】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g～約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

20

【0034】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組成物中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g～約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

30

【0035】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物が、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

40

【0036】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組成物中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリアに対する抗体産生を刺激するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

50

【 0 0 3 7 】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組み合わせ中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、少なくとも200個のアミノ酸残基を有し、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対し少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99パーセントの配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、組成物が、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

10

【 0 0 3 8 】

本発明は、組成物であって、ポリペプチドの組み合わせであって、組成物中のポリペプチドのそれぞれが、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するための医薬品の製造において、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含み、組成物は、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ gの単位投与量で製剤化される、ポリペプチドの組み合わせと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物の使用を含む。

【 0 0 3 9 】

様々な態様では、本発明の組成物は、アジュバントをさらに含む。いくつかの態様では、アジュバントは、水酸化アルミニウムである。

20

【 0 0 4 0 】

本発明の具体的な態様では、組成物中のポリペプチドの組み合わせは、配列番号2、4、または6に記載のアミノ酸配列を含むそれぞれのポリペプチドの等しい量を含む。本発明の態様では、組成物は、免疫原性組成物またはワクチン組成物である。

【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの態様では、ボレリアは、広義のボレリアまたは狭義のボレリアである。より具体的な態様では、ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンス、狭義のボレリアブルグドルフェリ、ボレリアジャポニカ、ボレリアアンダーソニイ、ボレリアビセッティ、ボレリアシニカ、ボレリアタルジ、ボレリアタヌキイ、ボレリアバライシアナ、ボレリアルシタニアエ、ボレリアスピエルマニイ、ボレリアミヤモトイ、またはボレリアローンスタールである。さらにより具体的な態様では、ボレリアは、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、ボレリアババリエンス、または狭義のボレリアブルグドルフェリである。

30

【 0 0 4 2 】

様々な態様では、本発明の組成物は、対象におけるボレリア抗体産生を、初回投薬の約60日後に、約1,000~10,000の幾何平均力価(GMT)レベルに増加させるのに有効な単位用量で製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、対象におけるボレリア抗体産生を、初回投薬の約90日後に、約2,000~30,000の幾何平均力価(GMT)レベルに増加させるのに有効な単位用量で製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、対象におけるボレリア抗体産生を、ブースター投与後に、約15,000~50,000の幾何平均力価(GMT)レベルに増加させるのに有効な単位用量で製剤化される。

40

いくつかの態様では、本発明の組成物は、単回用量での投与に有効な単位用量で製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、複数回用量での投与に有効な単位用量で製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、1か月間隔で複数回用量での投与に有効な単位用量で製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、初回単位用量の約6か月~約18か月後にブースターとして投与するために製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、初回単位用量の約9か月~約12か月後にブースターとして投与するために製剤化される。いくつかの態様では、組成物は、約1か月間隔で、例えば、約1日目、約29日目、および約57日目に、複数回単位用量で投与するために製剤化される。いくつかの態様で

50

は、組成物は、複数回の単位用量に続いて最初の単位用量の約 9 か月～約 12 か月後のブースターで投与するために製剤化される。いくつかの態様では、単位用量は、約 10 μ g～約 90 μ g である。具体的な態様では、単位用量は、約 30 μ g または約 60 μ g である。さらにより具体的な態様では、単位用量は 30 μ g である。いくつかの態様では、単位用量は、約 10 μ g～約 90 μ g である。いくつかの態様では、単位用量は、約 30 μ g または約 60 μ g である。

【0043】

本発明は、医薬品の調製のための本発明の組成物の使用を含む。他の関連する態様もまた、本発明において提供される。

【0044】

前述の概要は、本発明の全ての態様を規定することを意図するものではなく、追加の態様が、以下の詳細な説明等、他の節に記載される。文書全体は統合された開示として関連することが意図され、本明細書に記載される特徴の全ての組み合わせが、例えその特徴の組み合わせがこの文書の同じ文章、段落、または節において一緒に見られなくても、企図されることが理解されるべきである。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなろう。しかしながら、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の特定の実施形態を示しているが、例示により示されるにすぎないことが理解されるべきであり、これは、本発明の精神および範囲内の様々な変更および改変が、この詳細な説明から当業者に明らかとなろうためである。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】脂質付加された O s p A キメラ構築物の調製のための概略図である。

【図2】l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} のアミノ酸配列（配列番号 2）である。

【図3A】l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} のヌクレオチド配列（配列番号 1）および推定アミノ酸配列（配列番号 2）を示す。

【図3B】同上。

【図4】l i p B s O s p A 6 / 4 のアミノ酸配列（配列番号 4）である。

【図5A】l i p B s O s p A 6 / 4 のヌクレオチド配列（配列番号 3）および推定アミノ酸配列（配列番号 4）を示す。

【図5B】同上。

【図6】l i p B s O s p A 5 / 3 のアミノ酸配列（配列番号 6）である。

【図7A】l i p B s O s p A 5 / 3 のヌクレオチド配列（配列番号 5）および推定アミノ酸配列（配列番号 6）を示す。

【図7B】同上。

【図8】高レベル発現のためのコドン使用頻度の最適化を示す。

【図9】脂質付加および非脂質付加の構築物の間の配列差を示す。

【図10】T7発現系の描写である。

【図11】誘導および非誘導廃用物に由来する新規な組換え O s p A タンパク質の発現を示す SDS - P A G E である。

【図12】プラスミド p U C 18 のマップである。

【図13】プラスミド p E T 30 a のマップである。

【図14】l i p B s O s p A 5 / 3 K p n I - B a m H I フラグメントの作成のための戦略を示す。

【図15】l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} におけるアミノ酸の変化（配列番号 39）を強調するアライメント、ならびにその変化を誘導するために使用した P C R プライマー配列（配列番号 21 および 41）である（l i p B O s p A 1 / 2 m o d（配列番号 38）、コンセンサス配列（配列番号 40））。

【図16A】B l i p O s p A B P B P / A 1 と修飾分子 l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} との O s p A 配列のアライメントである。上の鎖は元の配列（配列番号 42）であり、下の鎖は最適化された配列（配列番号 43）である。注記：配列の最初の 3 つの

10

20

30

40

50

塩基 (CAT) は示されず、これらは、Nde I 部位 CATATG の一部を形成する。

【図 16 B】同上。

【図 17 A】B lip O s p A K T と修飾分子 l i p B s O s p A 6 / 4 との O s p A 配列のアライメントである。上の鎖は元の配列 (配列番号 44) であり、下の鎖は最適化された配列 (配列番号 45) である。注記：配列の最初の 1 つの塩基 (C) は示されず、これは、Nde I 部位 CATATG の一部を形成する。

【図 17 B】同上。

【図 18 A】B lip O s p A 5 / 3 と修飾分子 l i p B s O s p A 5 / 3 との O s p A 配列のアライメントである。上の鎖は元の配列 (配列番号 46) であり、下の鎖は最適化された配列 (配列番号 47) である。

10

【図 18 B】同上。

【図 19】は、狭義の B . ブルグドルフェリ B 3 1 株での負荷前に、3 ng の O s p A 1 / 2 で免疫化した防御および感染動物間の抗体表面結合および増殖阻害アッセイにおける機能的抗 O s p A 応答の分布を示す。マンホイットニーの p 値は、防御および感染動物間での機能的抗体含量の極めて有意な差を示した。

【図 20】野生マダニでの負荷前に、3 ng の O s p A 1 / 2 で免疫化した防御および感染動物間での抗体表面結合および増殖阻害アッセイにおける機能的抗 O s p A 応答の分布を示す。マンホイットニーの p 値は、防御および感染動物間での機能的抗体含量の極めて有意な差を示した。

20

【図 21】3 成分キメラ O s p A ワクチンの 3 回の投与により免疫化した後の、プールしたマウス血清における表面結合 (平均蛍光強度 (MFI)) および増殖阻害 (GI - 50 力価) を示す。効率的な表面結合および増殖阻害が、ワクチン中の O s p A 型 (1 ~ 6 型) に相同な O s p A 型を発現する 6 つ全てのボレリア株に対して検出された。

【図 22】表面結合アッセイ (SBA) において r O s p A ワクチンの組み合わせで免疫化した個々のマウスに由来する 42 日目の血清を使用して得られた平均蛍光強度 (MFI) 力価を示す。結果は、C3H マウスにおいて 6 つ全ての株に対する高力価の表面結合 IgG 抗体を誘導するためには、多価抗体中に 3 つ全ての r O s p A 成分 (1 / 2、6 / 4、および 5 / 3) が必要であることを示した。2 成分ワクチンは、2 つの欠落した株は完全にカバーしなかった。

【図 23】r O s p A ワクチンの組み合わせで免疫化した個々のマウス (10 匹ずつの群) に由来する 42 日目の血清を使用したボレリアの増殖阻害を示す。多価ワクチン (3 つ全ての株を含むワクチン) のみが、90% を超える動物 (n = 10) に 50% を超える増殖阻害をもたらした。黒色の棒 (単色の棒) は、使用したワクチンに相同性の株を示す。

30

【図 24】O s p A の型内変異体を発現するボレリアのカバレッジを示す。表面結合は、強い (蛍光が 10 倍を超えて増加) または弱い (蛍光が 2 ~ 10 倍増加) に分類した。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本発明は、ライム病またはボレリア感染のための免疫原性組成物またはワクチン組成物として送達させることができる抗原として有用なキメラ O s p A 分子を提供する。本発明の実施形態を詳細に説明する前に、本発明が、その適用において以下の説明に記載されるか、または図および実施例で例示される成分の構成および配列の詳細に限定されないことを理解されたい。本明細書に使用される節の見出しは、組織的目的にすぎず、記載された対象に限定するものと解釈されるべきではない。本出願において引用される参考文献は、明確に参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0047】

本発明は他の実施形態を含み、様々な様式で実施または実行される。また、本明細書に使用される表現および専門用語は説明のためのものであり、限定するものと見なすべきではないことを理解されたい。「含む」、「備える」、または「有する」という用語およびその変形は、その後列挙されるアイテムまたはその等価物ならびに追加のアイテムを包含することを意味する。

50

【0048】

本発明の実施形態は、3つの異なる脂質付加されたO s p A分子をコードする3つのキメラO s p Aコード配列の設計および合成において例示され、これらは全て共通の特徴を共有する。各キメラコード配列は、2つのO s p A血清型を表し、キメラコード配列は、安全で著しく免疫原性で、広義のB・ブルグドルフェリ(s.l.)による感染に対する対象の防御を可能にする安定なキメラO s p A分子をコードするように設計された。

【0049】

1つの態様では、キメラO s p A分子は、1つのO s p A血清型由来の近位部を、別のO s p A血清型由来の遠位部と共に含み、同時に両方の親ポリペプチドの防御特性を保持する。キメラO s p A核酸分子は、大腸菌(E.coli)中で発現されて抗原を提供し、これは、混合ワクチンとして製剤化することができ、欧州におけるライム病またはボレリア感染と関連する6つ全ての流行性血清型(血清型1~6)に対する、および北米におけるライム病またはボレリア感染と関連する単一のO s p A血清型に対する防御が提供される。血清型1~6を含むワクチンは、B・アフゼリ、B・ガリニ、B・ババリエンシス、およびB・ブルグドルフェリに対する防御を提供するため、このワクチンは世界的利用のために設計される。

10

【0050】

本発明はまた、1つの態様では、脂質付加されたO s p A分子を生成するのに必要とされるリーダー配列をコードする核酸配列を除去することにより、3つの遺伝子の第1の組から誘導される、キメラO s p Aコード配列の第2の組の調製を含む。2つの組の構築物(脂質付加されたおよび脂質付加されていないポリペプチドを生じさせる)が、発酵槽における製造の容易さ(バイオマス、安定性、生成収率等)を評価するために、異なる型の抗原をどれだけ容易に精製することができるかを評価するために、およびそれらの生物学的特性(安全性プロファイルおよび防御能力)を比較するために、必要であった。

20

【0051】

本発明は、本発明のキメラO s p A分子を含む免疫原性組成物を含む。本発明は同様に、そのようなO s p A分子を含むワクチンおよびワクチンキット、免疫原性組成物およびワクチンを製造するためのプロセス、ならびにヒトおよび獣医学の医学療法および防止における免疫原性組成物およびワクチンの使用を含む。本発明はさらに、本明細書に記載されるO s p A組成物を使用してライム病またはボレリア感染に対して免疫化する方法、ならびにライム病またはボレリア感染の防止のための薬剤の製造におけるO s p A組成物の使用を含む。

30

【0052】

定義

別記されない限り、本明細書に使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。次の参考文献は、当業者に、本発明で使用される用語の多くの一般的な定義を提供する: Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed., 1994)、THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988)、THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991)、および Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。

40

【0053】

次の略称が全体にわたって使用される。

【化 1】

AA	アミノ酸	
Amp	アンピシリン	
bp	塩基対	
B. アブゼリ	ボレリアアブゼリ	
B. ババリエンシス	ボレリアババリエンシス	
B. ブルドルフェリ	ボレリアブルグドルフェリ	
B. ガリニ	ボレリアガリニ	10
DNA	デオキシリボ核酸	
dNTP	デオキシヌクレオチド三リン酸	
E. coli	大腸菌	
GC含量	塩基グアニンおよびシトシンを含有する配列の割合	
hLFA-1	ヒト白血球機能関連抗原1	
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	
IP	知的財産	
IPTG	イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド	20
Kan	カナマイシン	
kDa	キロダルトン	
LB	ルリア培養液	
Lip B	細胞表層タンパク質B由来のリーダー配列	
Ma b	モノクローナル抗体	
OD	光学密度	
Os pA	細胞表層タンパク質A	
Os pB	細胞表層タンパク質B	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	30
RNA	リボ核酸	
s. l.	広義の	
s. s.	狭義の	
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム	
SMK	大腸菌の増殖培地 (ケトグルタル酸ソルビトール培地)	
tRNA	転移リボ核酸	
WCB	ワーキングセルバンク	

【0054】

40

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に明確に記載のない限り、複数形の参照を含むことを、ここに記載しておく。

【0055】

本明細書に使用される際、以下の用語は、別記されない限り、それらに属する意味を有する。

【0056】

「遺伝子」という用語は、1つ以上のポリペプチド、タンパク質または酵素の全てまたは一部を含むアミノ酸の配列をコードし、イントロン、および制御DNA配列、例えばプロモーターもしくはエンハンサー配列、5' - 非翻訳領域、または3' - 非翻訳領域 (例

50

えば、遺伝子が発現される条件に影響する)を含むかまたは含まない可能性のあるDNA配列を指す。本開示では、OspA遺伝子は細菌性であり、したがって、イントロンは存在しない。「コード配列」という用語は、アミノ酸の配列をコードするが、イントロンまたは制御配列を含有しないDNA配列を指す。同様に、本開示では、OspAコード配列は制御配列を含有しない。

【0057】

「核酸」または「核酸配列」または「核酸分子」は、一本鎖または二本鎖形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーを指す。この用語は、周知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基または結合を含有する核酸を含み、これらは合成、天然由来、および非天然由来であり、参照核酸と同様の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと同様に代謝される。そのような類似体としては、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が挙げられるが、これらに限定されない。この用語は、DNAおよびRNAの周知の塩基類似体、例えば、限定はされないが4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデニン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、5'-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸チルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリンのもので形成された分子を含む。

【0058】

別記されない限り、特定の核酸配列はまた、暗にその保存的修飾変異体(例えば、縮重コドン置換)および相補的配列、ならびに明確に示された配列を含む。具体的には、縮重コドン置換は、いくつかの態様では、1つ以上の選択された(または全ての)コドンの第3位が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基により置換された配列を生成させることにより達成される(Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991)、Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985)、Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換的に使用される。

【0059】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合を介して結合されたアミノ酸残基のポリマーを指して本明細書に互換的に使用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然由来アミノ酸の人工化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然由来アミノ酸ポリマーおよび非天然由来アミノ酸ポリマーに当てはまる。「タンパク質」という用語は、典型的には大きなポリペプチドを指す。「ペプチド」という用語は、典型的には短いポリペプチドを指す。合成ポリペプチドは、例えば、自動ポリペプチド合成機を用いて合成することができる。

【0060】

10

20

30

40

50

「O s p A分子」または「キメラO s p A分子」という用語は、1つの態様では、配列番号1 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号3 (l i p B s O s p A 6 / 4)、配列番号5 (l i p B s O s p A 5 / 3)、配列番号7 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号9 (s O s p A 6 / 4)、配列番号11 (s O s p A 5 / 3)、配列番号168 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号170 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号172 (o r i g s O s p A 5 / 3)のヌクレオチド配列を含む「O s p A核酸」、または別の態様では、配列番号2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号4 (l i p B s O s p A 6 / 4)、配列番号6 (l i p B s O s p A 5 / 3)、配列番号8 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号10 (s O s p A 6 / 4)、配列番号12 (s O s p A 5 / 3)、配列番号169 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号171 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号173 (o r i g s O s p A 5 / 3)のアミノ酸配列を含む「O s p Aポリペプチド」を指す。

10

【0061】

「l i p B s O s p A分子」という用語は、1つの態様では、配列番号1 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号3 (l i p B s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号5 (l i p B s O s p A 5 / 3)のヌクレオチド配列を含む「O s p A核酸」、または別の態様では、配列番号2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号4 (l i p B s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号6 (l i p B s O s p A 5 / 3)のアミノ酸配列を含む「O s p Aポリペプチド」を指す。配列番号7、9、および11の核酸配列は、l i p Bリーダー配列 (M R L L I G F A L A L A L I G (配列番号13))をコードする核酸配列を欠いている。加えて、配列番号7、9、および11の核酸配列は、配列番号2、4、および6のl i p Bリーダー配列のカルボキシ末端に存在するシステイン残基の代わりに、配列番号8、10、および12のアミノ末端のメチオニン残基をコードする。

20

【0062】

「o r i g s O s p A分子」または「オリジナルs O s p A分子」という用語は、1つの態様では、配列番号168 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号170 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号172 (o r i g s O s p A 5 / 3)のヌクレオチド配列を含む「O s p A核酸」、または別の態様では、配列番号169 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号171 (o r i g s O s p A 6 / 4)、または配列番号173 (o r i g s O s p A 5 / 3)のアミノ酸配列を含む「O s p Aポリペプチド」を指す。これらの「オリジナル」分子は、突然変異およびコドン最適化を有さないキメラ構築物である。

30

【0063】

本発明は「脂質付加されたO s p A」および「脂質付加されていないO s p A」キメラ分子を含む。様々な態様では、脂質付加は、O s p Aにアジュバント特性を与える。本発明のいくつかの態様では、脂質付加されたO s p A分子は、O s p Bリーダー配列を含む。本発明のいくつかの態様では、O s p Bリーダー配列は、アミノ酸M R L L I G F A L A L A L I G (配列番号13)を含む。他の態様では、O s p Bリーダー配列は、他のアミノ酸を含む。

40

【0064】

当該技術分野で知られているように「同一」またはパーセント「同一性」という用語は、配列を比較することにより決定される2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。当該技術分野では、「同一性」はまた、場合によっては、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列の列間の一致により決定される、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)により対処されるギャップアライメント(もしあれば)によるより小さな2つ以上の配列間の完全一致パーセントを測定する。「実質的同一性」は、特定の配列にわたり、少なくとも約70%、

50

約 71%、約 72%、約 73%、約 74%、約 75%、約 76%、約 77%、約 78%、約 79%、約 80%、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、約 87%、約 88%、約 89%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、または約 99%の配列同一性を有する配列を指す。いくつかの態様では、同一性は、少なくとも約 50 ~ 100 のアミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって存在する。他の態様では、同一性は、少なくとも約 100 ~ 200 のアミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって存在する。他の態様では、同一性は、少なくとも約 200 ~ 500 のアミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって存在する。ある特定の態様では、パーセント配列同一性は、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、および Smith-Waterman アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを使用して決定される。

10

【0065】

本明細書に列挙されるいずれの数値も、下の値から上の値までの全ての値を含むこと、すなわち、列挙される最低値および最高値間の数値の全ての可能な組み合わせが本出願において明確に記載されていると考えられるべきであることもまた具体的に理解される。例えば、濃度範囲が約 1% ~ 50% として記載される場合、2% ~ 40%、10% ~ 30%、または 1% ~ 3% 等の値が本明細書に明確に列挙されることが意図される。上に列挙された値は、具体的に意図されるものの例にすぎない。

【0066】

範囲は、様々な態様では、「約」または「およそ」1つの特定の値からおよび/または「約」または「およそ」別の特定の値までとして本明細書では表現される。値が先行する「約」を使用して近似として表される場合、いくらかの量の変動が範囲内に含まれることが理解されるであろう。

20

【0067】

「類似性」という用語は関連概念であるが、「同一性」とは対照的に、類似性の尺度を表し、完全一致および保存的置換一致の両方を含む。2つのポリペプチド配列が、例えば、10/20の同一なアミノ酸を有し、残りは全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性はいずれも50%である。同じ例において、保存的置換が存在する位置がさらに5つ存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75% (15/20) となる。したがって、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間のパーセント類似性の程度は、2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高くなる。

30

【0068】

「単離された核酸分子」という用語は、(1) タンパク質、脂質、炭水化物、または総DNAが起源細胞から単離される場合に自然に見られる他の材料から、任意の程度まで分離された、(2) 「単離された核酸分子」が自然界で結合されるポリヌクレオチドの全てまたは一部に結合されていない、(3) 自然界で結合されていないポリヌクレオチドに動作可能に結合されている、または(4) より大きなポリヌクレオチド配列の一部として自然界で生じない、本発明の核酸分子を指す。本明細書に使用される際、実質的に含まないとは、核酸分子が、その自然環境で見い出され、ポリペプチド生成における使用またはその治療、診断、予防、もしくは研究的使用を妨害するいずれの他の混入核酸分子(複数可)または他の混入物質も含まないことを示す。

40

【0069】

「単離されたポリペプチド」という用語は、(1) ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または起源細胞から単離される場合に自然に見られる他の材料から、任意の程度まで分離された、(2) 「単離されたポリペプチド」が自然界で結合されるポリペプチドの全てまたは一部に(共有または非共有相互作用により)結合されていない、(3) 自然界で結合されていないポリペプチドに動作可能に(共有または非共有相互作用により)結合されている、または(4) 自然界で生じない、本発明のポリペプチドを指す。1つの態様では

50

、単離されたポリペプチドは、その自然環境で見い出され、その治療、診断、予防、または研究的使用を妨害するいずれの他の混入ポリペプチドまたは他の混入物質も実質的には含まない。

【0070】

本明細書に使用される際、ポリペプチドの「フラグメント」は、全長ポリペプチドまたはタンパク質発現産物よりも小さなポリペプチドの任意の部分を目指す。フラグメントは、典型的には、1つ以上のアミノ酸残基が全長ポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシ末端から除去されている全長ポリペプチドの欠失類似体である。したがって、「フラグメント」は、下記に記載される欠失類似体のサブセットである。

【0071】

本明細書に使用される際、「類似体」は、ある特定の事例では異なる程度までであるが、天然由来分子と構造が実質的に類似し、同じ生物活性を有するポリペプチドを目指す。類似体は、類似体が誘導される天然由来ポリペプチドに比べ、下記を含む1つ以上の突然変異に基づき、そのアミノ酸配列の組成が異なっている：(i) ポリペプチド(上記フラグメントを含む)の1つ以上の末端および/または天然由来ポリペプチド配列の1つ以上の内部領域での1つ以上のアミノ酸残基の欠失、(ii) ポリペプチドの1つ以上の末端での(典型的には「付加」類似体)および/または天然由来ポリペプチド配列の1つ以上の内部領域での1つ以上のアミノ酸の挿入または付加(典型的には「挿入」類似体)、または(iii) 天然由来ポリペプチド配列における他のアミノ酸の代わりに1つ以上のアミノ酸の置換。置換は、置換されるアミノ酸およびそれを置換するアミノ酸の物理化学または機能関連性に基づき保存的または非保存的である。

【0072】

「保存的に修飾された類似体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に当てはまる。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された核酸は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列を目指す。遺伝コードの縮重のために、多くの機能的に同一の核酸が任意の一定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全て、アミノ酸アラニンをコードする。そのため、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、コドンは、コードされたポリペプチドを変化させることなく記載される対応するコドンのいずれかに変化され得る。そのような核酸変異は「サイレント変異」であり、これは保存的に修飾された類似体の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書における全ての核酸配列はまた、核酸の全ての可能なサイレント変異を記載する。当業者であれば、核酸中の各コドン(AUG(これは通常、メチオニンに対する唯一のコドンである)およびTGG(これは通常、トリプトファンに対する唯一のコドンである)を除く)が修飾されて、機能的に同一の分子をもたらす得ることを理解するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が、各記載される配列に潜在している。

【0073】

アミノ酸配列に関しては、当業者であれば、コードされる配列中の単一のアミノ酸または小さいパーセンテージのアミノ酸を変化、付加、または欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列への個々の置換、挿入、欠失、付加、またはトランケーションが、この変化によりアミノ酸の化学的に同様なアミノ酸との置換が得られる場合「保存的に修飾された類似体」であることを認識するであろう。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野ではよく知られている。そのような保存的に修飾された変異体は、本発明の多形変異体、種間相同体、およびアレルに追加され、それらを排除しない。

【0074】

下記8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：

- 1) アラニン(A)、グリシン(G)；
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- 3) アスパラギン(N)、グリタミン(Q)；

10

20

30

40

50

- 4) アルギニン (R)、リジン (K) ;
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ;
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) ;
- 7) セリン (S)、スレオニン (T) ; および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins (1984) を参照されたい)。

【 0 0 7 5 】

本明細書に使用される際、「変異体」は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、挿入、または修飾を含むポリペプチド、タンパク質、またはその類似体を指すが、ただし、変異体が天然ポリペプチドの生物活性を保持することを条件とする。

10

【 0 0 7 6 】

本明細書に使用される際、「アレル変異体」は、同じ遺伝子座を占める遺伝子の2つ以上の多形形態のうちのいずれかを指す。アレル変異は、突然変異により自然に生じ、いくつかの態様では、集団内での表現型多形となる。ある特定の態様では、遺伝子突然変異はサイレント(コードされたポリペプチドにおける変化なし)であるか、または他の態様では、変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。「アレル変異体」はまた、遺伝子アレル変異体のmRNA転写物由来のcDNA、ならびにそれらによりコードされたタンパク質を指す。

【 0 0 7 7 】

「誘導体」という用語は、治療または診断薬への結合、標識(例えば、放射性核種もしくはは様々な酵素による)、ポリマー共有結合、例えばペグ化(ポリエチレングリコールを用いた誘導体化)、および非天然アミノ酸の化学合成による挿入または置換によって、共有結合により修飾されたポリペプチドを指す。いくつかの態様では、誘導体は、通常は分子の一部ではない追加の化学的部分を含むように修飾される。そのような部分は、様々な態様では、分子の溶解度、吸収、および/または生物学的半減期を調節する。その部分は、様々な他の態様では、代替として、分子の毒性を減少させ、分子のいずれの望ましくない副作用等も排除または減弱させる。そのような効果を媒介することができる部分は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) に開示される。そのような部分を分子に結合させるための手順は、当該技術分野ではよく知られている。例えば、いくつかの態様では、OspA誘導体は、インビボでタンパク質により長い半減期を与える化学修飾を有するOspA分子である。1つの実施形態では、ポリペプチドは、当該技術分野で知られている水溶性ポリマーの付加により修飾される。関連する実施形態では、ポリペプチドはグリコシル化、ペグ化、および/またはポリシリアル化により修飾される。

20

30

【 0 0 7 8 】

「組換え」という用語は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関連して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくははタンパク質の導入または天然核酸もしくははタンパク質の変化により修飾されていること、あるいは細胞がそのように修飾された細胞から誘導されることを指す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然(非組換え)形態内には見られない遺伝子を発現し、またはそうでなければ異常に発現される、低発現される、もしくは全く発現されない天然遺伝子を発現する。

40

【 0 0 7 9 】

本明細書に使用される際、「選択可能なマーカー」は、遺伝子が発現される細胞または生物に同定可能な表現型変化、例えば薬物、抗生物質または他の作用物質に対する抵抗性を与える酵素または他のタンパク質をコードする遺伝子を指し、よって、マーカーの発現または活性は、(例えば、限定はされないが、陽性マーカー、例えばネオ遺伝子)または反対(例えば、限定はされないが、陰性マーカー、例えばジフテリア遺伝子)に対して選択される。「異種を選択可能なマーカー」は、通常は見い出されない動物のゲノムに挿入された選択可能なマーカー遺伝子を指す。

50

【0080】

選択可能なマーカーの例としては、抗生物質抵抗性遺伝子、例えばネオマイシン（neo）、ピューロマイシン（Puro）、ジフテリア毒素、ホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、およびヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、当該技術分野で知られている任意の選択可能なマーカーが本明細書に記載される方法において有用であることを理解するであろう。

【0081】

「異種」という用語は、核酸の部分に関連して使用される場合、核酸が自然界で互いに同じ関係で見い出されない2つ以上のサブ配列を含むことを指す。例えば、核酸は、典型的には組換えで生成され、新規機能性核酸を作製するように配列された非関連遺伝子由来の2つ以上の配列、例えば、1つの起源由来のプロモーターおよび別の起源由来のコード領域を有する。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が自然界で互いに同じ関係で見い出されない2つ以上のサブ配列を含むことを指す（例えば、融合タンパク質）。

【0082】

本明細書に使用される際、「相同」という用語は、「共通の進化上の起源」を有するタンパク質、例えばスーパーファミリー（例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー）由来のタンパク質および異なる種由来の相同タンパク質（例えば、ミオシン軽鎖等）の関係を指す（Reeck et al., Cell 50: 667, 1987）。そのようなタンパク質（およびそれらのコード遺伝子）は、それらの配列類似性により反映されるように、パーセント類似性または保存位置での特定の残基もしくはモチーフの存在の観点で、配列相同性を有する。

【0083】

比較のための配列の最適アライメントは、例えば、限定はされないが、下記により実施される：Smith et al., Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981の局地的相同性アルゴリズム、Needleman et al., J. Mol. Biol. 48: 443, 1970の相同性アライメントアルゴリズム、Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装（Wisconsin Genetics Software Package内のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）、または目視検査（一般に、Ausubel et al.（上記）を参照されたい）。パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために好適なアルゴリズムの別の例は、BLASTアルゴリズムであり、これはAltschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationから公的に入手可能である。パーセント配列同一性の計算に加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する（例えば、Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993を参照されたい）。

【0084】

「ベクター」という用語は、コーディング情報を宿主細胞に伝達するのに使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）を指して使用される。

【0085】

「クローニングベクター」は、外来DNAフラグメントを挿入することができるDNAの小片である。フラグメントのクローニングベクターへの挿入は、媒体と外来DNAを同じ制限酵素で処理し、その後、フラグメントと一緒に連結することにより行われる。多くの型のクローニングベクターが存在し、全ての型のクローニングベクターが本発明で使用さ

10

20

30

40

50

れる。遺伝子操作されたプラスミドおよびバクテリオファージ（例えばファージ）が、おそらく最も一般にこの目的のために使用される。他の型のクローニングベクターとしては、細菌人工染色体（BAC）および酵母人工染色体（YAC）が挙げられる。

【0086】

「発現ベクター」は、組換えまたは合成で、宿主細胞において特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸要素と共に生成された核酸構築物である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルス、または核酸フラグメントの一部であり得る。ある特定の態様では、発現ベクターは、プロモーターに動作可能に結合され転写される核酸を含む。

【0087】

「コード配列」という用語は、mRNAに転写され、適切な制御配列の制御下に置かれるとポリペプチドに翻訳される核酸配列として本明細書に規定される。コード配列の境界は、一般的には、通常mRNAの5'端のオープンリーディングフレームの開始であるATG開始コドンおよびmRNAの3'端のオープンリーディングフレームのすぐ下流に位置する転写終結配列によって決定される。コード配列としては、ゲノムDNA、cDNA、半合成、合成、および組換え核酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。1つの態様では、プロモーターDNA配列は、これに関連するコード配列の上流に位置するDNA配列であること、およびこのコード配列の発現を制御することができることにより規定される。

10

【0088】

「プロモーター」は、核酸の転写を誘導する核酸制御配列のアレイとして規定される。本明細書に使用される際、プロモーターは、転写の開始点付近の必要な核酸配列、例えば、ポリメラーゼII型プロモーターの場合ではTATA要素を含む。プロモーターはまた、任意で遠位エンハンサーまたはリプレッサ要素を含み、これらは転写開始点から数千もの塩基対離れて位置することができる。「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境および発生条件下で活性であるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境または発生制御下で活性であるプロモーターである。

20

【0089】

「動作可能に結合される」という用語は、核酸発現制御配列（例えば、プロモーター、または転写因子結合部位のアレイ）と第2の核酸配列との間の機能的結合を示し、ここで、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を誘導する。

30

【0090】

「形質導入」という用語は、通常ファージによる1つの細菌から別の細菌への核酸の伝達を指して使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核細胞配列の獲得および伝達を指す。

【0091】

「トランスフェクション」という用語は、外来または外因性DNAの細胞による取り込みを指して使用され、細胞は、外因性DNAが細胞膜の内側に導入された場合、「トランスフェクト」されている。多くのトランスフェクション技術が当該技術分野でよく知られており、本明細書に開示される。例えば、Graham et al., Virology, 52: 456 (1973)、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, (1989)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, (1986)、およびChu et al., Gene, 13: 197 (1981)を参照されたい。そのような技術は、1つ以上の外因性DNA部分を好適な宿主細胞に導入するために使用することができる。

40

【0092】

本明細書に使用される「形質転換」という用語は、細胞の遺伝的特徴の変化を示し、細胞は、新規DNAを含有するように修飾された場合、形質転換されている。例えば、細胞は、その天然状態から遺伝的に修飾された場合、形質転換されている。トランスフェクシ

50

ョンまたは形質導入後、形質転換するDNAは、細胞の染色体に物理的に組み込むことにより、細胞のものと再結合し得る。いくつかの事例では、DNAは、複製されずにエピソーム要素として一時的に維持されるか、またはプラスミドとして独立して複製する。細胞は、DNAが、細胞分裂と共に複製されると、安定に形質転換されたと考えられる。

【0093】

「内因性」という用語は、自然に宿主生物において発現される、または細胞、組織、もしくは生物内で生じるポリペプチドまたはポリヌクレオチドまたは他の化合物を指す。「外因性」は、細胞、組織、または生物外で生じるポリペプチド、ポリヌクレオチド、または他の化合物を指す。

【0094】

「作用物質」または「化合物」という用語は、本発明における生物学的パラメータに影響する能力を有する任意の分子、例えば、タンパク質または医薬品を表す。

【0095】

本明細書に使用される「対照」は、活性、陽性、陰性、またはビヒクル対照を指し得る。当業者には理解されるように、対照は、実験結果の関連性を確立し、試験された条件に対する比較を提供するために使用される。

【0096】

「重症度を減少させる」という用語は、ライムまたはライム病の症状に言及する場合、症状が、発症の遅延、重症度の減少を有するか、または対象への損傷の減少を引き起こすことを意味する。一般的には、症状の重症度は、対照、例えば、活性な予防または治療組成物を受容しないものと比較される。その場合、組成物は、症状が、対照の症状レベルに比べ、10%、25%、30%、50%、80%、または100%（すなわち、本質的に排除される）減少された場合、ライムの症状の重症度を減少させると言うことができる。

【0097】

「抗原」という用語は、選択的結合作用物質、例えば抗体により結合することができ、さらに各抗原のエピトープに結合することができる抗体を産生させるために対象において使用することができる、分子または分子の一部を指す。抗原は、様々な態様では、1つ以上のエピトープを有する。

【0098】

「抗体」という用語は、O s p Aポリペプチドに対する特異性を有する1つまたは複数の分子を指す。本明細書に使用される際、「特異的」、「特異性」、および「特異的に結合する」という用語は、抗体の、O s p Aポリペプチドに結合するが、非O s p Aポリペプチドには結合しない能力を指す。ある特定の態様では、抗体は「中和抗体」であり、ここで、抗体は、感染病原体と反応し、その感染性または病原性を破壊または阻害する。本発明は、ボレリアを「中和する」抗体を含む免疫原性組成物を含む。

【0099】

本明細書に使用される「薬学的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という用語は、薬学的組成物としてのO s p Aポリペプチド、O s p A核酸分子、またはO s p A抗体の送達を達成または増強するのに好適な1つ以上の製剤材料を指す。

【0100】

「安定剤」という用語は、物質またはワクチン賦形剤を指し、これは、ワクチンの免疫原性組成物を、例えば加熱もしくは凍結中に起こる悪条件から保護する、および/または安定な免疫原性条件もしくは状態における免疫原性組成物の安定性もしくは有効期間を長くする。安定剤の例としては、糖、例えばスクロース、ラクトース、およびマンノース；糖アルコール、例えばマンニトール；アミノ酸、例えばグリシンまたはグルタミン酸；およびタンパク質、例えばヒト血清アルブミンまたはゼラチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0101】

「抗菌性保存剤」という用語は、免疫原性組成物またはワクチンに添加され、複数回投与バイアルの繰り返し穿刺で（そのような容器が使用される場合）導入され得る微生物の

10

20

30

40

50

増殖を阻害する任意の物質を指す。抗菌性保存剤の例としては、チメロサル、2-フェノキシエタノール、塩化ベンゼトニウム、およびフェノール等の物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

「免疫原性組成物」という用語は、抗原（例えば、キメラO s p A分子）（これに対し抗原特異性抗体が産生される）、対象宿主の免疫応答を刺激するアジュバント、および好適な免疫学的に不活性な薬学的に許容される担体を含む組成物を指す。任意で、免疫原性組成物は、1つ以上の安定剤を含む。任意で、免疫原性組成物は、1つ以上の抗菌性保存剤を含む。

【0103】

「ワクチン」または「ワクチン組成物」という用語は、特定の疾患（例えば、ライム病またはボレリア感染）に対する免疫を改善する生物学的製剤を指す。ワクチンは、典型的に、疾患を引き起こす微生物に似た作用物質（例えば、ボレリアのキメラO s p A分子（抗原））を含有する。作用物質は、身体の免疫系を刺激して、作用物質を外来と認識させ、これを破壊させ、これを「記憶」させ、よって、免疫系は後に遭遇するこれらの微生物のいずれをもさらに容易に認識し、破壊することができるようになる。ワクチンは、様々な態様では、予防的（任意の天然もしくは「野生」病原体による将来の感染の効果を防止もしくは寛解させる）または治療的（現在の感染に対するワクチン）である。上記のように、そのようなワクチン組成物としては、薬学的に許容される担体を含む製剤が挙げられる。任意で、ワクチンはまた、1つ以上の安定剤および/または1つ以上の抗菌性保存剤を含む。

【0104】

「有効量」および「治療的有效量」という用語はそれぞれ、本明細書に記載されるO s p Aポリペプチドの1つ以上の生物活性の観察可能なレベルを支持するために使用される核酸分子、ポリペプチド、組成物、または抗体の量を指す。例えば、有効量は、本発明のいくつかの態様では、ボレリア感染を防止する、中和する、または減少させるのに必要な量である。

【0105】

「組み合わせ」という用語は、本発明の2つ以上の核酸分子、または本発明の2つ以上のポリペプチドを指す。いくつかの態様では、本発明の分子の組み合わせが、本明細書に記載されるボレリアの6つの血清型（1～6）のうちの少なくとも4つに対する免疫を提供するか、またはこれらに起因する感染と闘うように投与される。様々な態様では、本発明の2つまたは3つの分子またはポリペプチドの組み合わせが使用される。ある特定の態様では、本発明の分子の組み合わせが対象に投与され、本明細書に記載されるボレリアの6つ全ての血清型（1～6）に対する免疫が提供される。後者の組み合わせは、核酸分子またはポリペプチドの組み合わせにおいて存在しないO s p A型を発現するボレリアの異種株に対する免疫を提供することが示されている。

【0106】

「混合ワクチン」という用語は、1つ以上の疾患に対する1つを超えるワクチン組成物または1つを超える防御抗原を含有するワクチン製剤を指す。本発明は、1つ以上の他の疾患に対する抗原に加えて、ライム病またはボレリアに対するO s p Aキメラ抗原を含む混合ワクチンを含む。様々な態様では、1つ以上の他の疾患はマダニ媒介疾患である。ある特定の態様では、他のマダニ媒介疾患はロッキー山紅斑熱、バベシア症、回帰熱、コラドダニ熱、ヒト単球エーリキア症（HME）、ヒト顆粒球エーリキア症（HGE）、南部ダニ関連発疹病（STAR I）、野兔病、ダニ麻痺、ポワッサン脳炎、Q熱、クリミアコンゴ出血熱、キタウクゾーン病、ボタン熱、またはダニ媒介脳炎である。具体的な態様では、本発明は、1つ以上のワクチン、例えばダニ媒介脳炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、およびロッキー山紅斑熱ワクチンを含む混合ワクチンを含む。いくつかの態様では、混合ワクチンは、ボレリア感染またはライム病に対する免疫化に適合する季節的免疫化スケジュールを有するワクチン組成物を含む。より具体的な態様では、混合ワクチンは、これ

らの疾患が流行している地理的位置で使用するための複数疾患の防止に有用である。

【0107】

「ボレリア」という用語は、ボレリア属のスピロヘータクラスのグラム陰性菌の種を指す。1つの態様では、「広義のボレリアブルグドルフェリ(s.l.)」は、より広い意味でのボレリアブルグドルフェリを指す。ライム病またはボレリア症のほとんど全ての症例が、3つの遺伝種、ボレリアアフゼリ、ボレリアガリニ、およびより厳密な意味でのボレリアブルグドルフェリを指す)狭義のボレリアブルグドルフェリ(s.s.)のうちの1つにより引き起こされる。ボレリアのOspA血清型は種と相関し、血清型1は狭義のボレリアブルグドルフェリに対応し、血清型2はボレリアアフゼリに対応し、血清型3~7はボレリアガリニに対応する。最近の文献は、OspA血清型4が、ボレリアババリエンスとしてその独自の種の状態を有することが提示されたことを示す(Margos et al., Appl. Environ. Microbiol. 75: 5410-6, 2009)。様々な態様では、本発明の免疫原性またはワクチン組成物はまた、ボレリアの他の種、例えば、限定はされないが、ボレリアジャポニカ、ボレリアアンダーソニー、ボレリアビセッティ、ボレリアシニカ、ボレリアタルジ、ボレリアタヌキイ、ボレリアパラシアナ、ボレリアルシタニアエ、ボレリアスピエルマニイ、ボレリアミヤモトイ、またはボレリアローンスターに対する防御を提供する。

10

【0108】

「対象」には、植物でなく、原生生物でない生物のその従来の意味が与えられる。ほとんどの態様では、対象は動物である。具体的な態様では、動物は哺乳動物である。より具体的な態様では、哺乳動物はヒトである。他の態様では、哺乳動物は、ペットもしくはコンパニオンアニマル、家畜、または動物園動物である。ある特定の態様では、哺乳動物は、ネコ、イヌ、ウマ、またはウシである。様々な他の態様では、哺乳動物は、シカ、マウス、シマリス、リス、オポッサム、またはアライグマである。

20

【0109】

ライム病(ボレリア症またはライムボレリア症)

いくつかの態様では、本発明は、ライム病またはボレリア感染の防止におけるキメラOspA分子およびこれらの分子を含む組成物を含む。ライム病はまた、ボレリア症またはライムボレリア症として当該技術分野で知られており、したがって、これらの用語は全て本発明に含まれる。同様に、本発明は、本明細書に記載されるキメラOspA分子を投与することを含む、ライム病を防止または治療する方法を含む。ライム病、またはボレリア症は、ボレリア属に属する少なくとも3つの種のグラム陰性スピロヘータ細菌により引き起こされる感染である。少なくとも13のボレリア種が発見されており、そのうちの3つがライム関連であることが知られている。ライム病を引き起こすボレリア種は、まとめて広義のボレリアブルグドルフェリとして知られており、多大な遺伝的多様性を示す。広義のボレリアブルグドルフェリ群は、おそらく大多数の症例の原因である3つの密接に関連する種から構成される。狭義のボレリアブルグドルフェリは、米国におけるライム病の主因である(しかし、欧州でも存在する)が、ボレリアアフゼリおよびボレリアガリニがほとんどの欧州の症例を引き起こす。最近の文献は、ババリアで最初に発見されたボレリアババリエンスが、新種と見なされ得ることを示す。しかしながら、現在まで、OspA血清型4は、ボレリアガリニの株と見なされてきた(Margos et al. (同上))。いくつかの研究はまた、ボレリア種(例えば、ボレリアビセッティ、ボレリアスピエルマニイ、ボレリアルシタニアエ、およびボレリアパラシアナ)が時として、ヒトに感染し得ることを提示している。これらの種は疾患の重要な原因であると考えられないが、これらの種に対する免疫原性防御もまた、本発明に含まれる。

30

40

【0110】

ライム病は、北半球で最も一般的なマダニ媒介疾患である。疾患は、多くの症例が1975年に同定されたコネティカット州ライム村にちなんで命名されたものである。ボレリアはイクソデス属の数種に属する感染したマダニ(「カタダニ」)の咬傷によりヒトに伝染する。初期症状としては、場合によっては、熱、頭痛、疲労、抑うつ、および遊走性紅

50

斑と呼ばれる特徴的な円形皮疹が挙げられる。治療せずに放置すると、後期症状は、しばしば、関節、心臓、および中枢神経系と関係する可能性がある。ほとんどの場合、感染およびその症状は、とりわけ病気が早期に治療された場合、抗生物質により排除される。しかしながら、遅い、遅延した、または不十分な治療によって、より重篤な症状に至る可能性があり、これは身体障害性および治療困難となり得る。時折、関節炎等の症状が、感染が抗生物質により排除された後に持続する。

【0111】

いくつかのグループは、「慢性」ライム病が、遅発ライム病の認識された症状を超えるある範囲の医学的に説明されていない症状の原因であり、追加の長期抗生物質治療が必要とされることを主張している。しかしながら、長期治療は議論の余地があり、そのような治療に関する論争は、治療ガイドラインに対する法的行為に至っている。

10

【0112】

ライム病は、齧歯類および鳥類を含む自然宿主からヒトへ、両方の組の宿主上で摂食するマダニによって伝染されるため、人畜共通感染として分類される。イクソデス属の硬体のマダニが、ライム病の主なベクターである。ほとんどのヒト感染は、幼虫段階のマダニにより引き起こされ、これは、幼虫マダニが非常に小さく長期間検出されずに摂食し得るためである。マダニ咬傷はしばしば、幼虫段階のマダニの寸法が小さいため、ならびに宿主が咬傷によるいずれの痒みまたは疼痛も感じないようにするマダニ分泌物のために気付かれない。

20

【0113】

ライム病は、症状、客観的な身体所見（例えば、遊走性紅斑、顔面神経麻痺、または関節炎）、感染したマダニへの暴露可能性歴、ならびに血清学的血液検査に基づき臨床的に診断される。ライム病患者の約半数が特徴的な慢性遊走性紅斑を発症するが、多くがマダニ咬傷を思い出せない。ライム病の症状を有さない人には、臨床試験は推奨されない。

【0114】

研究室でボレリア細菌を培養することが難しいため、ライム病の診断は典型的には臨床検査所見および流行ライム地域への暴露歴に基づく。遊走性紅斑（EM）発疹は、全ての症例の約50%でしか起こらないが、血清学的血液検査が陰性である場合であっても、ライム病の診断を確立するのに十分であると考えられる。血清学的試験は、臨床的に疑われる症例を裏付けるために使用することができるが、それ自体は診断的ではない。後期ライム病の診断は、多くの他の疾患の症状によく似ている多くの多面的な外観のために、しばしば困難である。こういう訳で、評論家は、ライムを新規な「グレートイミテーター」と呼んだ。ライム病は、場合によっては、多発性硬化症、関節リウマチ、線維筋痛症、慢性疲労症候群（CFS）、ループス、または他の自己免疫および神経変性疾患として誤診されている。よって、当該技術分野ではライム病を防止または治療するためのワクチンが非常に必要とされている。

30

【0115】

ボレリアの細胞表層タンパク質A（OspA）

様々な態様では、本発明は、ライム病またはボレリア感染の防止および治療におけるボレリアのキメラOspA分子およびこれらの分子を含む組成物を含む。このスピロヘータはマダニから哺乳類に伝染されるため、温度および/または哺乳類宿主特異的シグナルにより上方制御されるいくつかのボレリア細胞表層タンパク質が、過去10年にわたって同定されている。

40

【0116】

ボレリアブルグドルフェリの主な細胞表層タンパク質、OspAは、ワクチン候補としてのその可能性のために特に興味深いリポタンパク質である。ボレリアの欧州および北米両方の株に由来するOspAの血清型および遺伝子分析は、抗原および構造異種性を証明した。OspAは、公開済みのPCT特許出願第WO92/14488号、Jiang et al. (Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1:406-12, 1994)に記載されており、当該技術分野で知られている。OspAは、マウス、ハムス

50

ター、およびイヌの負荷試験において防御免疫を誘導することが示されている。ヒトでの臨床試験は、O s p A 製剤がヒトにおいて安全であり、免疫原性であることを示している (K e l l e r e t a l . , J A M A (1 9 9 4) 2 7 1 : 1 7 6 4 1 7 6 8) 。

【 0 1 1 7 】

O s p A は、北米からのボレリアブルグドルフェリの臨床分離株の大部分において発現されるが、欧州の臨床ボレリア分離株の検査からは異なる状況が明らかになった。欧州では、ライム病は主に、ボレリアの3つの遺伝種、すなわちB . ブルグドルフェリ、B . ガリニ、およびB . アフゼリにより引き起こされる。最近の文献は、ボレリアババリエンスが、その独自の遺伝子種であり得ることを示す。したがって、ボレリアババリエンスは、ボレリアガリニ株としても知られるO s p A 血清型4の新しい名称として提唱された (M a r g o s e t a l . (同上)) 。本発明は、ボレリアの全ての遺伝種に対して防御免疫を提供するキメラO s p A 分子に関する。本発明は、共通の特徴を共有する3つの異なる脂質付加されたO s p A 分子をコードする3つのキメラO s p A 遺伝子の設計および合成を記載する。各遺伝子は、2つのO s p A 血清型を表し、遺伝子は、安全で高免疫原性であり、対象に広義の (s . l .) B . ブルグドルフェリによる感染に対する防御を提供する、安定なO s p A 分子をコードするように設計された。本発明はまた、共通の特徴を共有する3つの異なる脂質付加されたO s p A 分子をコードする、突然変異を有さず、コドン最適化を有さない3つのオリジナルキメラO s p A 遺伝子を記載する。各遺伝子は、2つのO s p A 血清型を表し、対象に広義の (s . l .) B . ブルグドルフェリによる感染に対する防御を提供する分子をコードする。

10

20

【 0 1 1 8 】

7つの主要なO s p A 血清型が、ヨーロッパ分離株中で認識されている (指定血清型1 ~ 7、W i l s k e e t a l . , J . C l i n . M i c r o b i o l . 3 1 : 3 4 0 - 5 0 , 1 9 9 3) 。O s p A 血清型は種と相関し、血清型1は狭義のB . ブルグドルフェリに対応し、血清型2はB . アフゼリに対応し、血清型3 ~ 7はB . ガリニに対応する。血清型4は、いくつかの態様では、代替的にボレリアババリエンスと見なされる。 (M a r g o s e t a l . (同上) を参照されたい) 。欧州ボレリア分離株の疫学調査は、O s p A 型1、2、3、4、5、および6に基づくワクチンが、欧州においてライム病の98 . 1 %の理論的カバレッジを提供し、96 . 7 %の侵襲性疾患分離株をカバーすることを示す。本発明は、6つのキメラO s p A 核酸分子 (配列番号1、3、および5、ならびに配列番号168、170、および172) および6つのキメラO s p A ポリペプチド分子 (配列番号2、4、および6、ならびに配列番号169、171、および173) を提供し、これらは、6つ全ての血清型1 ~ 6に対する防御免疫を提供することができる。6つの合成O s p A 遺伝子は、O s p A 血清型1および2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} (配列番号1 (核酸) および2 (アミノ酸)) ならびにo r i g s O s p A 1 / 2 (配列番号168 (核酸) および169 (アミノ酸)) 、O s p A 血清型6および4 (l i p B s O s p A 6 / 4 (配列番号3 (核酸) および4 (アミノ酸)) ならびにo r i g s O s p A 6 / 4 (配列番号170 (核酸) および171 (アミノ酸)) 、ならびにO s p A 血清型5および3 (l i p B s O s p A 5 / 3 (配列番号5 (核酸) および6 (アミノ酸)) ならびにo r i g s O s p A 5 / 3 (配列番号172 (核酸) および173 (アミノ酸)) 由来の防御エピトープを有するO s p A 分子をコードするように設計された。キメラO s p A 遺伝子は合成オーバーラップオリゴヌクレオチドを用いて作製された。これらの組換えタンパク質は、ある特定の態様では、高い収率および純度で生成され、様々な態様では、所望の活性を最大化し、望ましくない活性を最小化するように操作される。

30

40

【 0 1 1 9 】

キメラO s p A 核酸分子およびポリペプチド分子

様々な態様では、本発明は、ボレリアのキメラO s p A 核酸およびポリペプチド分子を含む。本発明のO s p A 核酸は、配列番号1 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) 、配列番号3 (l i p B s O s p A 6 / 4) 、配列番号5 (l i p B s O s p A 5

50

/ 3)、配列番号7 (s O s p A 1 / 2^{2 5 1})、配列番号9 (s O s p A 6 / 4)、配列番号11 (s O s p A 5 / 3)、配列番号168 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号170 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号172 (o r i g s O s p A 5 / 3)に示されるヌクレオチド配列、または配列番号2 (l i p B s O s p A 1 / 2^{2 5 1})、配列番号4 (l i p B s O s p A 6 / 4)、配列番号6 (l i p B s O s p A 5 / 3)、配列番号8 (s O s p A 1 / 2^{2 5 1})、配列番号10 (s O s p A 6 / 4)、配列番号12 (s O s p A 5 / 3)、配列番号169 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号171 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号173 (o r i g s O s p A 5 / 3)に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本質的にそれらからなる、またはそれらからなる、核酸分子を含む。

10

【0120】

配列番号7、9、および11の核酸配列は、l i p Bリーダー配列 (M R L L I G F A L A L A L I G (配列番号13))をコードする核酸配列を欠いている。加えて、配列番号7、9、および11の核酸配列は、配列番号2、4、および6のl i p Bリーダー配列のカルボキシ末端に存在するシステイン残基の代わりに、配列番号8、10、および12のアミノ末端のメチオニン残基をコードする。配列番号1、3、および5はl i p B s O s p Aポリヌクレオチドであり、配列番号2、4、および6はl i p B s O s p Aポリペプチドである。

【0121】

いくつかの態様では、本発明は突然変異を有さず、コドン最適化を有さないボレリアのオリジナル (「o r i g」) キメラO s p A核酸およびポリペプチド分子を含む。よって、本発明のO s p A核酸は、配列番号168 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号170 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号172 (o r i g s O s p A 5 / 3)に示されるヌクレオチド配列、または配列番号169 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号171 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号173 (o r i g s O s p A 5 / 3)に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本質的にそれらからなる、またはそれらからなる、核酸分子を含む。

20

【0122】

キメラO s p A分子に対するD N Aおよびアミノ酸配列に対する配列識別番号は、下記表1に示される。

30

【表 1 - 1】

【表 1】 キメラ O s p A DNA および アミノ酸配列

配列	DNA 配列番号	アミノ酸 配列番号	相補鎖 配列番号
lipB sOspA 1/2 ²⁵¹	1	2	48
lipB sOspA 6/4	3	4	49
lipB sOspA 5/3	5	6	50
sOspA 1/2 ²⁵¹	7	8	56
sOspA 6/4	9	10	57
sOspA 5/3	11	12	58
Orig sOspA 1/2	168	169	
Orig sOspA 6/4	170	171	
Orig sOspA 5/3	172	173	

10

lipB sOspA 1/2²⁵¹

アミノ酸配列 (配列番号 2)

20

MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKNGKYDLIATVDKLELKG
 TSDKNNGS
 GVLEGVKTNSKVKLITISDDLQTTLEVFKEDGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEK
 IITMADGT
 RLEYTGIKSDGTGKAKYVLKNFTLEGKVANDKTTLEVKEGTVTLSMNISKSGEVSVELNDT
 DSSAATKKT
 AAWNSKTSTLTISVNSKKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

30

DNA 配列(配列番号 1)

【表 1 - 2】

catatgcgtctgtgatcggtttgctctggcgctggctctgatcggtgcgcacagaaaggctgctgagt
 ctattggftccgtttctgttagatctgcccgggtgaaatgaaggftctggtagcaagaaaaagacaagaa
 cggcaagtacgatctcatcgcaaccgtcgacaagctggagctgaaaggtaacttctgataaaaacaacggc
 tctggtgtgctggaggcgctaaaactaacaagagcaaaagtaaaacttacgatctctgacgatctcggtc
 agaccacgtcggaagtfttcaagaggatggcaagacctcgtgtccaaaaagtaacttccaaagacaa
 gtctctacggaagaaaaatcaacgaaaaaggtaggtgtctgaaaagatcatccatggcagacggc
 acccgcttgaatacacccgtattaaaaagcgatggtagcgttaagcgaaatatttctgaaaaacttca
 ctctggaaggcaaaagggttaatgataaaaccaccttggaaagtcaaggagcaccgttactctgagcat
 gaatatctccaaatctggtgaagtftccgttgaactgaacgacactgacagcagcgctgcgactaaaaa
 actgcagcgtggaattccaaaacttctactttaaccattagcgttaacagcaaaaaactaccagctgg
 tgttactaaacaagacacgatcactgtgcagaaatcgactccgaggcaccactagaaggcagggc
 agtcgaaattaaaacccgtgatgaactgaaaaacgcgtgaataagctgagcggatcc

10

相補鎖(配列番号 48)

catatgcgtctgtgatcggtttgcttggcgctggctttaatcggtgtgcacagaaaggctgctgagt
 ctattggftccgtttctgttagatctgcccgggggtatgaaagtctggtgaagcaagaaaaagacaaaa
 cggtaatacagcctgatggcaaccgtagaaaagctggagctttaaaggcacttctgataaaaacaacggt
 tctggcacccctggaagggtgaaaaaactaacaagcaaaagtaaaagcttactattgctgaggatctgagca
 aaaccaccttgaatatctcaagaagatggcaaaactctggatatcaaaaaagtaacctgaagacaa
 gtcttctaccgaagaaaaatcaacgaaaagggtgaaatctctgaaaaactatcgtaattggcaaatggt
 acccgcttgaatacacccgatcaaaagcgataaaaccggcaagctaaatacgttctgaaagacttta
 ctctggaaggcactctggctgctgacggcaaaaccactctgaaagtaccgaaggcactgttactctgag
 catgaacatttcaaatccggcgaaatcacctgtgcactggatgacactgactctagcggcaataaaaaa
 tccggcacctgggattctgatacttctactttaaccattagcaaaaacagccagaaaaactaaacagctgg
 tattaccaagaaaaacatatccgttacagaactataaccgtgcaggcaatgcgtggaaggcagccc
 ggctgaaattaaagatctggcagagctgaaagccgcttgaataagctgagcggatcc

20

30

【表 1 - 3】

lipB sOspA 6/4

アミノ酸配列 (配列番号 4)

MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKNGKYSLEATVDKLELK
 GTSDKNNGS
 GTLEGEKTNKSKVKLTIADDLSQTKFEIFKEDAKTIVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGETSEKT
 IVMANGT
 RLEYTDIKSDGSGKAKYVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTEGTVVLSMNLKSGETVALDDS
 DTTQATKK
 TGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

10

DNA 配列(配列番号 3)

catatgcgtctgtgatcggttctgctctggcgtggtctgatcggtcgccacagaaaggctgctgagt
 ctattggftccgttctgtagatctgcccgtggcatgaccgttctggtcagcaagaaaaagacaaaaa
 cggtaatacagcctcgagcgaccgtcgacaagcttgagctgaaaggcacctctgataaaaacaacggt
 tccggcaccttggaaggtaaaaaactaacaagcaaaagtgaactgaccattgctgatgacctagcc
 agaccaattcgaaatttcaaagaagatgccaaaaccttagtaccaaaaagtgacctgaaagacaa
 gtctctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaaacctctgaaaaaccatcgtaatggcaaatggt
 acccgtctggaatacaccgacatcaaaagcgatggctccggcaagccaaatagttctgaaagactca
 ccctggaaggcacctcgctgccgacggcaaaaccaccttgaaagttaccgaaggcactgtgttttaag
 catgaacatctaaaaatccggtgaaatcacctgtgcgtggatgactctgacaccactcaggccactaaa
 aaaaccggcaaatgggattctaacacttcactctgacctcagcgtgaattcaaaaaaactaaaaaca
 tcgtgttcacaaagaagacaccatcacctccagaatacgaactctcgggcaccaacctcgaaggcaa
 cgcagtcgaaatcaaaacctggatgaactgaaaacgctctgaaataagctgagcggatcc

20

相補鎖 (配列番号 49)

30

【表 1 - 4】

ggatccgctcagctatttcagcgctttttcagttcatcaagggtttaattcgactgccgtgccttc
taagtgggtgctgcggagtcgtattctgcacagtgatcggtcttggtagtgaaaccagctgggta
gttttttgctgttaacgctaattggttaagtagaagtttggaaattccacgctgcagtttttagtcg
cagcgctgctgtcagtgctggtcagttcaacggaaacttcaccagattggagataatcatgctcagagt
aacgggtgccttccttgactccaagggtgtttatcattagccacttgccttcagagtgaagttttc
agaacataatttcgctttaccgggtaccatcgcttttaataccgggtgtattcaagacgggtgccgtctgcca
tgggtgatgatctttcagacacctcaccttttctgtaattttcttccgtagaggacttgccttggga
agttactttttggacacgagggcttgcctcctcttggaaaacttcacgctgggtctgaccgagatcg
tcagagatcgttaagctttactttgctctgttagtttgacgccctccagcacaccagagccgtgtttt
tatcagaagtaccttcagctccagctgtcgacggttgcgatgagatcgacttgcgcttcttgccttt
ttcttgcctaccagaaccttcatttcacgggcagatctacagaaacggaaccaatagactcagcacct
ttctgtgcgcagccgatcagagccagcgcagagcaaagccgatcaacagacgcatatg

【表 1 - 5】

lipB sOspA 5/3**アミノ酸配列 (配列番号 6)**

MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKNGKYSIMATVEKLELK
 GTSDKNNGS
 GTLEGEKTNKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTCLKDKSSTEEKFNEKGEISEKTI
 VMANGT
 RLEYTDIKSDKTGKAKYVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTEGTVTLNISKSGEITVALDDT
 DSSGNKKS
 GTWSDSTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK

10

DNA 配列(配列番号 5)

catatgcgtctgtgatcggttcttggcgctggcttaatcggtgtgcacagaaaggctgagt
 ctattggtccgttcttagatctgcccgggggtatgaaagttctggaagcaagaaaaagacaaaa
 cggtaafacagcctgatggcaaccgtagaaaagctggagctaaaggcacttctgataaaacaacggt
 tctggcacccctggaagggtgaaaaactaacaagcaagtaaagcttactattgctgaggatctgagca
 aaaccaccttgaatctcaagaagatggcaaaactctggtatctaaaaagtaaccctgaaagaca
 gtcttctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaatctctgaaaaactatcgtaatggcaaatggt
 acccgctggaatacacgacatcaaaagcgataaaaccggcaagctaaatacgttctgaaagacttta
 ctctggaaggcactctggctgctgacggcaaaaccactctgaaagttaccgaaggcactgttactctgag
 catgaacattctaaatccggcgaaatcaccgttgactggatgacactgactctagcgcaataaaaaa
 tccggcacctgggattctgatacttctactttaaccattagcaaaaacagccagaaaactaaacagctgg
 tattaccaaaagaaaacatcatcaccgtacagaactataaccgtgcaggcaatgcgctggaaggcagccc
 ggctgaaattaaagatctggcagagctgaaagccgcttgaataagctgagcggtatcc

20

相補鎖 (配列番号 50)

30

【表 1 - 6】

ggatccgcfcagcttatttcagagcgttttfcagttcatccagggttttgatttcgactgcgttgccttc
gaggttggtcccgagagtcgtatttctggacgggtgatgggtctcttcttggtgaacacgatgtttta
gttttttggaaftcacgctgatggtcagagtggaggttagaatccatttgcgggttttttagtgg
cctgagtggtgfcagagtcacccagcgcaacgggtatttcaccggattttaagatgttcattgcttaaac
aacagtgccttcggttaacttcaaggtggttttgcgctcggcagcgagggtgccttcagggtgaagtct
ttcagaacgtatttggccttgcggagccatcgctttgatgtcgggtgatttcagacgggtaccatttg
ccattacgatgtgttttcagaggttccacctttcgtgaattttcttcggtagaggacttgccttt
cagggtcactttttggatactaaggttttgcactctcttgaataattcgaatttggctcggctgagg
tcacagcaatggtcagttcactttgctttttagtttttccacttcagggtgcgggaaccgttgt
ttttacagaggtgccttcagctcaagctgtcgcggctgcctcagggtgtatttaccgttttgc
ttttcttctgcaccagaacgggtcatgccaccggcagatctacagaaacggaaccaatagactcagca
cctttctgtgcgcagccgatcagagccagcggcagagcaagccgatcaacagacgatatg

10

【表 1 - 7】

sOspA 1/2²⁵¹

20

アミノ酸配列 (配列番号 8)

MAQKGAESIGSVSVDLPGEKMLVLSKEKDKNGKYDLIATVDKLELKGTSCKNNGSGVLEG
VKTNKS VKL
TISDDLQTTLEVFKEGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIITMADGTRLEYTGK
SDGTGKA
KYVLKNFTLEGKVANDKTTLEVKEGTVTLNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAWNSK
TSTLTISVN
SKKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

30

DNA 配列(配列番号 7)

catatggcacagaaaggtgctgagtcattgttccgtttctgtagatctgcccgggtgaaatgaagggtc
tggtgagcaaaagaaagacaagaacggcaagtacgatctatcgcaaccgtcgacaagctggagctgaa
aggtactctctgataaaacaacggctctggtgtgctggaggcgctcaaaactaacaagagcaagtaaag
cttacgatctctgacgatctcggtcagaccacgtggaagtttcaaaaggatggcaagacctcgtgt
ccaaaaagtaacttccaaagacaagtcctctacggaagaaaaatcaacgaaaaggtgaggtgtctga
aaagatcatcaccatggcagacggcaccctgtgaatacaccgggtattaaaagcgtggtaccggtaaa
gcgaaatatgttctgaaaaacttactctggaaggcaagtggtctaatgataaacaccttggaagtca
aggaaggcaccgttactctgagcatgaatatctcaaatctggtgaagttccgttgaactgaacgacac
tgacagcagcgtcgcactaaaaaactgcagcgtggaattccaaaacttactttaaccattagcgtt
aacagcaaaaaaactaccagctggtgttactaaacaagacacgatcactgtgcagaatacactcca
acggcaccaacttagaaggcagcgagtcgaaataaaacctgtatgaactgaaaaacgcgtgaaata
agctgagcggatcc

40

相補鎖 (配列番号 56)

【表 1 - 8】

gtataccgtgtcttccacgactcagataaccaaggcaaagacatctagacggccactttacttccaag
 accactcgtttcttttctgttcttccggttcagctagagtagcgttggcagctgttcgacctcgactt
 tccatgaagactattttgttgcgagaccacacgacctcccgcagtttgattgtctcgtttcatttc
 gaatgctagagactgctagagccagctcgtgtgcgaccttcaaaagtctcctaccgttctgggagcaca
 ggtttttcattgaaggttctgttcaggagatgccttctttaagtgtcttttccactccacagact
 ttctagtagtggtaccgtcgcggtgggcagaacttatgtggccataatttcgctaccatggccattt
 cgctttatacaagacttttgaagtgcgaccttcggttcaccgattactatttgggtgaaccttcagt
 tccttcggtggcaatgagactcgtacttatagagggttagaccacttcaaggcaacttgacttgctgtg
 actgtcgtcgcgacgctgattttttgacgtcgcaccttaagggtttgaagatgaaattggtaatcgcaa
 ttgtcgtttttgatgggtgcaccacaagtgtttgtctgtgctagtgacacgtctttatgctgaggt
 tgccgtggttgaatctccgtgccgtcagctttaatttgggaactactgacttttgcgcgactttat
 tcgactcgcctagg

10

sOspA 6/4**アミノ酸配列 (配列番号 10)**

20

MAQKGAESIGSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKNGKYSLEATVDKLELKGTSCKNNGSGTLEG
 EKTNKSQVVL
 TIADDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGETSEKTIVMANGTRLEYTDIK
 SDGSGKA
 KYVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTEGTVVLSMNILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGWDS
 NTSTLTISV
 NSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

DNA 配列(配列番号 9)

30

【表 1 - 9】

catatggcacagaaaggtgctgagtctattggtccgtttctgtagatctgcccggtggcatgaccgttc
 tggtcagcaaaagaaaaagacaaaaacggtaatacagcctcgaggcgaccgtcgacaagcttgagctgaa
 aggcacctctgataaaaaaacggttccggcacccctggaagggtgaaaaactaacaagcaagtgaaa
 ctgaccattgctgatgacctagccagaccaaattcgaaattttcaagaagatgccaaaaccttagtat
 ccaaaaaagtgacctgaaagacaagtcctctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaaacctctga
 aaaaaccatcgtaatggcaaatggtaccgtctggaatacaccgacatcaaaagcgatggctccggcaaa
 gccaaatacgttctgaaagacttcacctggaaggcacccctcgtgccgacggcaaaaccaccttgaaag
 ttaccgaaggcactgtgtttaaagcatgaacatcttaaaatccggtgaaatcaccgttgctgctgatga
 ctctgacaccactcaggccactaaaaaacggcaaatgggattctaacttccactctgacctcagc
 gtgaattcaaaaaactaaaaacatcgtgttcaccaagaagacacatcaccgtccagaatacgaact
 ctgcgggcaccaacctgaaggcaacgcagtcgaaatcaaacctggatgaactgaaaacgctctgaa
 ataagctgagcggtacc

10

相補鎖 (配列番号 57)

gtataccgtgtctttccacgactcagataaccaaggcaagacatctagacgggccaccgtactggcaag
 accagtcgtttctttctgttttggcaattatgtcggagctccgtggcagctgttcgaactcgaactt
 tccgtggagactattttgttccaaggccgtgggaccttccactttttgattgtttcgtttcacttt
 gactggtaacgactactggagtcggtctgtgttaagctttaaagttcttctacggttttgaatcata
 ggtttttcactgggactttctgtcaggagatggcttcttttaagtgtctttccactttggagact
 ttttggtagcattaccgtttaccatgggcagaccttatgtggtctgtagtttctaccgaggccgttt
 cggtttatgcaagacttctgaagtgggacccctcgtgggagcgacggctgccgttttgggtggaacttc
 aatggcttccgtgacaacaaaattcgtactttagaatttttaggccacttttagtgcaacgcgacctact
 gagactgtggtgagtcgggtgatttttggccgtttaccctaagattgtgaaggtagactggtagtcg
 cacttaagggtttttgattttgtagcacaagtgttcttctgtggtagtggcaggtctttatgctga
 gacgcccgtggttggagcttccgttgcgtcagcttagtttgggacctacttgacttttgcgagactt
 tatcgaactcgctagg

20

30

【表 1 - 10】

sOspA 5/3

アミノ酸配列 (配列番号 12)

MAQKGAESIGSVSDLPGGMKVLVSKEKDKNKYSLSMATVEKLELKGTSKNNNGSGTLEGEKTNKSKVKL
TIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNKGEISEKTIVMANGTRLEYTDIKSDKTGKA
KYVLKDFLTLEGTALAADGKTTLKVTEGTVTLNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWSDSTLTISK
SQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELKAALK

10

DNA 配列(配列番号 11)

catatggcacagaaaggctgagtcattggtccgtttctgtagatctgccgggggtatgaaagttc
tggtaagcaagaaaaagacaaaacggtaatacagcctgatggcaaccgtagaaaagctggagcftaa
aggcacttctgataaaaacacgggtctggcacctggaagggtaaaaaactaataaaagcaagtaag
cttactattgctgaggatctgagcaaaaccacctttgaaatcttcaagaagatggcaaaactctggtat
ctaaaaagtaaccctgaagacaagcttctacccaagaaaaaattcaacgaaaagggtgaaatctctga
aaaaactatcgtaattggcaaatggtaaccgtctggaatacaccgacatcaaaagcgataaaaccggcaaa
gctaaatacgttctgaaagactttactctggaaggcactctggctgctgacggcaaaaccactctgaaag
ttaccgaaggcactgttactctgagcatgaacatttctaaatccggcgaaatcaccgttgactggtga
cactgactctagcggcaataaaaaatccggcacctgggattctgatacttctactttaaccattagcaaa
aacagccagaaaaactaaacagctgtgattcaccaaaagaaaactatcaccgtacagaactataaccgtg
caggcaatgcgctggaaggcagccccggctgaaatfaaagatctggcagagctgaaagccgcttgaata
agctgagcgcatcc

20

相補鎖 (配列番号 58)

gtataccgtgtctttccacgactcagataaccaaggcaagacatctagacgggccccatactttcaag
accattcgtttcttttctgttttgcacattatgtcggactaccgttgcatctttcgacctcgaatt
tccgtgaagactattttgttccaagaccgtgggaccttccactttttgattgtttcgtttcatttc
gaatgataacgactcctagactcgttttgggtgaaactttagaagtttcttaccgttttgagaccata
gatttttcatgtggactttctgttcagaagatggcttcttttaagtgtctttccacttttagagact
ttttgatagcattaccgtttaccatggcgagaccttatgtggctgtagtttctgctattttggccgttt
cgatttatgcaagactttctgaaatgagaccttccgtgagaccgacgactccgttttgggtgagacttc
aatggcttccgtgacaatgagactcgtacttgaagaatttagccgcttagtggaacgtgacctact
gtgactgagatcgccgttafttttagccgtggaccctaagactatgaagatgaatfgtaaatcgttt
ttgtcggcttttgaattgtcgaccataagtggttcttttgtagatgtggcatgtcttgatattggcac
gtccgttacgcgaccttccgtggggcgaccttaatttctagaccgtctcgacttccggcgaaactttat
tcgactcgctagg

30

40

【表 1 - 1 1】

Orig sOspA 1/2**アミノ酸配列 (配列番号 169)**

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLEL
 KGTSDKNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSKDKSSTEEKF
 NEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLISK
 NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSKTSTLTISVNSKKTTQLVFTKQDTTIVQKYDSAG
 TNLEGTAVEIKTLDELKNALK

10

DNA 配列(配列番号 168)

atgaaaaatatatttgggaataggtctaataatagccttaatagcatgtaagcaaatgt
 tagcagccttgacgagaaaaacagcgttcagtagatttgcctgggaaatgaaagtcttg
 taagcaagaaaaaaacaaagacggcaagtagcatctaattgcaacagtagacaagcttgag
 cttaaaggaaactctgataaaaaacaatggatctggagtacttgaaggcgtaaaagctgacaa
 aagtaagtaaaattaacaatttctgacgatctaggtcaaacacacttgaagtttcaaag
 aagatggcaaaacactagtatcaaaaaagtaactccaagacaagtcacacagaagaa
 aaattcaatgaaaaagggtgaagtatctgaaaaataataacaagacagacggaaccagact
 tgaatacacaggaattaaaagcgatggatctggaaaagctaaagggttttaaaaacttta
 ctcttgaaggaaaagtagctaataataagtaacattggaagtaaaagaagggaaccgttact
 ttaagtaaaaatatttcaaaatctggggagttcagttgaacttaatagacactgacagtag
 tgctgctactaaaaaactgcagcttgaattcaaaaacttctacttaacaattagtgta
 acagcaaaaaactacacaactgtgttactaaacaagacacaataactgtacaaaaatac
 gactccgcaggtagcaatttagaaggcacagcagtcgaattaaaacacttgatgaacttaa
 aaacgctttaaataag

20

30

Orig sOspA 6/4**アミノ酸配列 (配列番号 171)**

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSTLDEKNSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLE
 LKGTSDKNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIADDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLKDKSSTEE
 KFNEKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLEGTLAADGKTTLKVTEGTV
 VLSKNILKSGETIVALDDSDTTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQK
 YDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

40

【表 1 - 1 2】

DNA 配列(配列番号 170)

atgaaaaaatatttattgggaataggtctaattagccftaatagcatgtaagcaaatgt
tagcacgcttgatgaaaaaatagcgttcagtagatttacctgggtggaatgacagttcttg
taagtaaaagaaaaagacaaagcgttaaatacagctagaggcaacagtagacaagcttgag
cttaaggaacttctgataaaaacaacgggtctggaacacttgaaggtaaaaaactgacaa
aagtaagtaaaattaacaattgctgatgacctaagtcaaaactaaatttgaaattttcaaag
aagatgccaaaacattagtagtaaaaaagtaacccttaaagacaagtcatacagaagaa
aaattcaacgaaaagggtgaaacatctgaaaaacaatagtaagagcaaatggaaccagact
tgaatacacagacataaaaagcgaatggatccgaaaagctaaagaagttttaaagacttta
ctcttgaaaggaaacttagctgctgacggcaaaacaacattgaaagttacagaaggcactgtt
gttttaagcaagaacatttttaaatccggagaaataacagttgcacttgatgactctgacac
tactcaggctactaaaaaaactggaaaatgggattcaatacttcactttaacaattagt
tgaatagcaaaaaaactaaaaacattgtattfcaaaaagaagacacaataacagtacaaaaa
tacgactcagcaggcaccaatctagaaggcaacgcagtcgaaattaaaacacttgatgaact
taaaaacgctttaaataa

10

20

Orig sOspA 5/3

アミノ酸配列 (配列番号 173)

MKKYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLMATVEKLE
LKGTSDDKNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEE
KFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTEGTV
TLSKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSGTWSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNY
NRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK

30

【表 1 - 1 3】

DNA 配列(配列番号 172)

atgaaaaaatatttattgggaataggtctaatattagccftaatagcatgtaagcaaaatgt
tagcagcccttgatgaaaaaatagcgtttcagtagattfacctgggtggaatgaaagtcttg
taagtaaagaaaaagacaaagatggtaatacagctctaatggcaacagtagaaaagcttgag
cttaaaaggaaacttctgataaaaacaacgggtctggaacacttgaaggtagaaaaactgacaa
aagtaaagtaaaattaacaattgctgaggatctaagtaaaaccacatttgaatcttcaaag
aagatggcaaaacattagatcaaaaaagtaacccttaagacaagtcacacagaagaa
aaattcaacgaaaagggtgaaatatctgaaaaacaatagtaagagcaaatggaaccagact
tgaatacacagacataaaaaagcgataaaaccgaaaagctaaagaagtttaaaagacttta
ctcttgaaggaaactctagctgctgacggcaaaacaacattgaaagttacagaaggcactgtt
actttaagcaagaacatttcaaaatccggagaataacagttgcacttgatgacactgactc
tagcggcaataaaaaatccggaacatgggattcagatacttctactttaacaattagtaaaa
acagtcaaaaaactaaacaacttgattcacaaaagaaaacacaataacagtacaaaactat
aacagagcaggcaatgcgcttgaaggcagccagctgaaattaaagatcttgcagagcttaa
agccgctttaaaataa

10

20

【0 1 2 3】

本発明の O s p A ポリペプチドは配列番号 2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})
、配列番号 4 (l i p B s O s p A 6 / 4) 、配列番号 6 (l i p B s O s p A
5 / 3) 、配列番号 8 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) 、配列番号 10 (s O s p A 6 /
4) 、配列番号 12 (s O s p A 5 / 3) 、配列番号 169 (o r i g s O s p A
1 / 2) 、配列番号 171 (o r i g s O s p A 6 / 4) 、または配列番号 173 (o r i g
s O s p A 5 / 3) のアミノ酸配列を含む、本質的にそれらからなる、または
それらからなるポリペプチド、ならびに関連ポリペプチドを含む。関連ポリペプチドは
、O s p A ポリペプチド類似体、O s p A ポリペプチド変異体、および O s p A ポリペ
チド誘導体を含む。いくつかの態様では、O s p A ポリペプチドは、それらが調製される
方法によってアミノ末端メチオニン残基を有する。関連する態様では、本発明の O s p A
ポリペプチドは O s p A 活性を含む。

30

【0 1 2 4】

1 つの実施形態では、関連核酸分子は、配列番号 1 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})
、配列番号 3 (l i p B s O s p A 6 / 4) 、配列番号 5 (l i p B s O s
p A 5 / 3) 、配列番号 7 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) 、配列番号 9 (s O s p A
6 / 4) 、配列番号 11 (s O s p A 5 / 3) 、配列番号 168 (o r i g s O s p
A 1 / 2) 、配列番号 170 (o r i g s O s p A 6 / 4) 、または配列番号 17
2 (o r i g s O s p A 5 / 3) に示されるヌクレオチド配列と約 70 パーセント (70 %)
同一または類似するヌクレオチド配列を含むか、またはそれらからなり、ある特
定の態様では、配列番号 2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) 、配列番号 4 (l i
p B s O s p A 6 / 4) 、配列番号 6 (l i p B s O s p A 5 / 3) 、配列番号
8 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) 、配列番号 10 (s O s p A 6 / 4) 、配列番号 12
(s O s p A 5 / 3) 、配列番号 169 (o r i g s O s p A 1 / 2) 、配列番号
171 (o r i g s O s p A 6 / 4) 、または配列番号 173 (o r i g s O s p
A 5 / 3) に示されるポリペプチドと約 70 パーセント (70 %) 同一であるポリペ
プチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本質的にそれらからなる、またはそれらから
なる。様々な実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1 (l i p B s O s p A
1 / 2 ^{2 5 1}) 、配列番号 3 (l i p B s O s p A 6 / 4) 、配列番号 5 (l i p B

40

50

s O s p A 5 / 3)、配列番号7 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号9 (s O s p A 6 / 4)、配列番号11 (s O s p A 5 / 3)、配列番号168 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号170 (o r i g s O s p A 6 / 4)、もしくは配列番号172 (o r i g s O s p A 5 / 3)に示されるヌクレオチド配列と約70パーセント、または約71、72、73、74、75、76、77、78、もしくは79パーセント、または約80パーセント、または約81、82、83、84、85、86、87、88、もしくは89パーセント、または約90パーセント、または約91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、あるいは、ヌクレオチド配列は、配列番号2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号4 (l i p B s O s p A 6 / 4)、配列番号6 (l i p B s O s p A 5 / 3)、配列番号8 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号10 (s O s p A 6 / 4)、配列番号12 (s O s p A 5 / 3)、配列番号169 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号171 (o r i g s O s p A 6 / 4)、または配列番号173 (o r i g s O s p A 5 / 3)に示されるポリペプチド配列と約70パーセント、または約71、72、73、74、75、76、77、78、もしくは79パーセント、または約80パーセント、または約81、82、83、84、85、86、87、88、もしくは89パーセント、または約90パーセント、または約91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。

10

【0125】

いくつかの実施形態では、配列同一性および/または類似性を決定するための方法は、試験される配列間で最大の一致が得られるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムで記載される。いくつかの態様では、2つの配列間の同一性および類似性を決定するコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ、例えばGAP (Devereux et al., Nucleic Acid Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990))が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給元 (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894, Altschul et al. (上記) (1990)) から公的に入手可能である。よく知られているSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用される。

20

30

【0126】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸配列をアライメントするためのある特定のアライメントスキームにより、2つの配列の短い領域のみの一致が得られ、この小さなアライメントされた領域は、2つの全長配列間に有意な関係性がない場合であっても、非常に高い配列同一性を有し得る。したがって、1つの実施形態では、選択されたアライメント方法 (GAPプログラム) により、標的ポリペプチドの少なくとも50の連続するアミノ酸に及ぶアライメントが得られる。例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を用いると、パーセント配列同一性が決定される2つのポリペプチドは、それらの個々のアミノ酸の最適な一致 (アルゴリズムにより決定される「一致範囲」) に関してアライメントされる。ギャップオープニングペナルティ (これは平均ダイアゴナルの3倍として計算される; 「平均ダイアゴナル」は、用いられる比較マトリクスのダイアゴナルの平均である; 「ダイアゴナル」とは、特定の比較マトリクスにより、各々の完全アミノ酸対応に対して割り当てられるスコアまたは数のことである) およびギャップエクステンションペナルティ (これは通常、ギャップオープニングペナルティの10分の1である)、ならびにPAM250またはBLOSUM62等の比較マトリクス

40

50

が、このアルゴリズムと共に使用される。標準比較マトリクス (PAM250 比較マトリクスに関しては Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5 (3) (1978)、BLOSUM62 比較マトリクスに関しては Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915 - 10919 (1992) を参照されたい) もまた、このアルゴリズムによって使用される。

【0127】

様々な態様では、ポリペプチド配列比較のためのパラメータには以下が含まれる：

アルゴリズム：Needleman et al., J. Mol. Biol., 48: 443 - 453 (1970)、

比較マトリクス：BLOSUM 62 from Henikoff et al. (上記) (1992)、

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

類似性の閾値：0

【0128】

GAP プログラムは、以上のパラメータを用いると有用である。前述のパラメータは、GAP アルゴリズムを用いるポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータである (この他、末端ギャップに関してはペナルティなしとする)。

【0129】

いくつかの態様では、核酸分子配列比較のためのパラメータには以下が含まれる：

アルゴリズム：Needleman et al. (上記) (1970)、

比較マトリクス：対応 = +10、非対応 = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長ペナルティ：3

【0130】

GAP プログラムはまた、以上のパラメータを用いると有用である。前述のパラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティ、ギャップエクステンションペナルティ、比較マトリクス、類似性の閾値等、例えば、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997 に示されるものが当業者によって使用される。特定の選択は当業者に明らかであり、実施される特定の比較、例えば DNA 対 DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対 DNA；さらに、比較がある配列対間か (この場合、GAP または Best Fit が一般的に好ましい)、1つの配列と大きな配列データベースとの間か (この場合、FASTA または BLASTA が好ましい) に依存する。

【0131】

核酸配列の差は、いくつかの態様では、配列番号 2 (lipB sOspA 1/2^{2 5 1})、配列番号 4 (lipB sOspA 6/4)、配列番号 6 (lipB sOspA 5/3)、配列番号 8 (sOspA 1/2^{2 5 1})、配列番号 10 (sOspA 6/4)、配列番号 12 (sOspA 5/3)、配列番号 169 (orig sOspA 1/2)、配列番号 171 (orig sOspA 6/4)、または配列番号 173 (orig sOspA 5/3) のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列の保存的および/または非保存的修飾をもたらし得る。

【0132】

配列番号 2 (lipB sOspA 1/2^{2 5 1})、配列番号 4 (lipB sOspA 6/4)、配列番号 6 (lipB sOspA 5/3)、配列番号 8 (sOspA 1/2^{2 5 1})、配列番号 10 (sOspA 6/4)、配列番号 12 (sOspA 5/3)、配列番号 169 (orig sOspA 1/2)、配列番号 171 (orig sOspA 6/4)、または配列番号 173 (orig sOspA 5/3)

のアミノ酸配列への保存的修飾（およびコードするヌクレオチドへの対応する修飾）は、天然由来 O s p A ポリペプチドのものと類似する機能および化学特性を有する O s p A ポリペプチドを生成させる。対照的に、O s p A ポリペプチドの機能および / または化学特性における実質的な修飾は、(a) 置換領域での分子骨格の構造、例えば、シートもしくはらせん形構造、(b) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または (c) 側鎖の嵩の維持に対する効果が著しく異なる、配列番号 2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号 4 (l i p B s O s p A 6 / 4)、配列番号 6 (l i p B s O s p A 5 / 3)、配列番号 8 (s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1})、配列番号 10 (s O s p A 6 / 4)、配列番号 12 (s O s p A 5 / 3)、配列番号 169 (o r i g s O s p A 1 / 2)、配列番号 171 (o r i g s O s p A 6 / 4)、または配列番号 173 (o r i g s O s p A 5 / 3) のアミノ酸配列の置換を選択することにより達成される。

【 0 1 3 3 】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、いくつかの態様では、天然アミノ酸残基の非天然残基との置換を含み、そのためその位置のアミノ酸残基の極性または電荷に、ほとんどまたは全く影響がない。さらに、ポリペプチド中のいずれの天然残基も、ある特定の態様では、「アラニン系統的変異導入法」に関して前に記載されたように、アラニンと置換される。

【 0 1 3 4 】

保存的アミノ酸置換はまた、非天然由来のアミノ酸残基を含み、これらは典型的には、生体システムにおける合成ではなく、ペプチド化学合成によって組み入れられる。これには、ペプチド模倣物、およびその他の逆転型または逆方向型のアミノ酸部分が含まれる。

【 0 1 3 5 】

天然由来の残基は、様々な態様では、共通の側鎖特性に基づいて複数のクラスに分類される：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、
- 2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、
- 3) 酸性：A s p、G l u、
- 4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：G l y、P r o；および
- 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【 0 1 3 6 】

例えば、非保存的置換には、いくつかの態様では、これらのクラスの 1 つのメンバーと別のクラスのメンバーとの交換が含まれる。そのような置換残基は、様々な態様では、O s p A ポリペプチドオルソログに相同もしくは類似の O s p A ポリペプチドの領域に、またはその分子の非相同領域内に導入される。

【 0 1 3 7 】

このような変化を加える際に、アミノ酸の疎水性親水性指標がしばしば考慮される。それぞれのアミノ酸には、その疎水性および荷電特性に基づいて、疎水性親水性指標が割り当てられている。それらは以下の通りである：イソロイシン (+ 4 . 5)；バリン (+ 4 . 2)；ロイシン (+ 3 . 8)；フェニルアラニン (+ 2 . 8)；システイン / シスチン (+ 2 . 5)；メチオニン (+ 1 . 9)；アラニン (+ 1 . 8)；グリシン (- 0 . 4)；スレオニン (- 0 . 7)；セリン (- 0 . 8)；トリプトファン (- 0 . 9)；チロシン (- 1 . 3)；プロリン (- 1 . 6)；ヒスチジン (- 3 . 2)；グルタミン酸 (- 3 . 5)；グルタミン (- 3 . 5)；アスパラギン酸 (- 3 . 5)；アスパラギン (- 3 . 5)；リシン (- 3 . 9)；およびアルギニン (- 4 . 5)。

【 0 1 3 8 】

相互作用性の生物機能をタンパク質に付与する際のアミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当該技術分野では理解されている。K y t e e t a l . , J . M o l . B i o l . , 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 1 (1 9 8 2)。ある特定のアミノ酸が、類似した疎水性親

水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸と置換され得、類似した生物活性を保持し続けることが、知られている。疎水性親水性指標に基づいて変化を加える際、ある特定の態様では、疎水性親水性指標が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、他の態様では、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、様々な態様では、 ± 0.5 以内であるものが特に好ましい。

【0139】

また、本明細書の場合のように、それによって作製される生物学的に機能性の同等のタンパク質またはペプチドを免疫学的実施形態において使用することがある程度意図される場合には特に、親水性に基づいて、同様のアミノ酸の置換を効果的に行うことができることが、当該技術分野では理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性に左右される、あるタンパク質の最大局所平均親水性は、その免疫原性および抗原性と、すなわちそのタンパク質の生物学的特性と相関する。

10

【0140】

下記親水性値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（ $+3.0$ ）；リシン（ $+3.0$ ）；アスパラギン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；グルタミン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；セリン（ $+0.3$ ）；アスパラギン（ $+0.2$ ）；グルタミン（ $+0.2$ ）；グリシン（ 0 ）；スレオニン（ -0.4 ）；プロリン（ -0.5 ± 1 ）；アラニン（ -0.5 ）；ヒスチジン（ -0.5 ）；システイン（ -1.0 ）；メチオニン（ -1.3 ）；バリン（ -1.5 ）；ロイシン（ -1.8 ）；イソロイシン（ -1.8 ）；チロシン（ -2.3 ）；フェニルアラニン（ -2.5 ）およびトリプトファン（ -3.4 ）。類似の親水性値に基づいて変化を加える際、ある態様では、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、他の態様では、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、様々な態様では、 ± 0.5 以内であるものが特に好ましい。当業者はまた、親水性に基づき一次アミノ酸配列からエピトープを同定する。これらの領域はまた、「エピトープ性コア領域」とも呼ばれる。

20

【0141】

所望のアミノ酸置換（保存的か非保存的に関係なく）は、そのような置換が要求される時に当業者により決定され得る。例えば、O s p A ポリペプチドの重要な残基を同定するために、または本明細書に記載されるそれらの基質に対するO s p A ポリペプチドの親和性を増加または減少させるために、アミノ酸置換を使用することができる。

30

【0142】

いくつかの態様では、ヌクレオチド配列におけるヌクレオチドおよびアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換は、本発明に含まれる。置換は、 $1 \sim 5$ 、 $1 \sim 10$ 、 $1 \sim 15$ 、 $1 \sim 20$ 、 $1 \sim 25$ 、 $1 \sim 30$ 、 $1 \sim 35$ 、 $1 \sim 40$ 、 $1 \sim 45$ 、 $1 \sim 50$ 、 $1 \sim 55$ 、 $1 \sim 60$ 、 $1 \sim 65$ 、 $1 \sim 70$ 、 $1 \sim 75$ 、 $1 \sim 80$ 、 $1 \sim 85$ 、 $1 \sim 90$ 、 $1 \sim 95$ 、 $1 \sim 100$ 、 $1 \sim 150$ 、および $1 \sim 200$ ヌクレオチドを含む。同様に、置換は、 $1 \sim 5$ 、 $1 \sim 10$ 、 $1 \sim 15$ 、 $1 \sim 20$ 、 $1 \sim 25$ 、 $1 \sim 30$ 、 $1 \sim 35$ 、 $1 \sim 40$ 、 $1 \sim 45$ 、 $1 \sim 50$ 、 $1 \sim 55$ 、 $1 \sim 60$ 、 $1 \sim 65$ 、 $1 \sim 70$ 、 $1 \sim 75$ 、 $1 \sim 80$ 、 $1 \sim 85$ 、 $1 \sim 90$ 、 $1 \sim 95$ 、および $1 \sim 100$ アミノ酸を含む。置換は、様々な態様では、保存的または非保存的である。

40

例示的なアミノ酸置換が表2に示される。

【表 2】

【表 2】 アミノ酸置換

オリジナル残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser、Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro、Ala	Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、 Phe、ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン、Ile、 Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、1,4 ジアミノ-酪酸、Gln、 Asn	Arg
Met	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、 Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr、Phe	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Met、Leu、Phe、 Ala、ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0143】

当業者は、よく知られている技術を用いて配列番号 2、4、6、8、10、12、169、171、または 173 に示されるポリペプチドの好適な類似体または変異体を決定することができる。活性を破壊せずに変化させることができる分子の好適な領域を同定するために、当業者は、活性に対し重要でないと考えられる領域を標的とすることができる。例えば、同じ種または他の種に由来する類似の活性を有する類似のポリペプチドがわかっている場合、当業者は、O s p A ポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似のポリペプチドと比較することができる。そのような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定することができる。そのような類似のポリペプチドに対し保存されない O s p A ポリペプチドの領域の変化は、O s p A ポリペプチドの生物活性および/または構造に悪影響を与える可能性が低いことが理解されるであろう。当業者はまた、比較的保存されている領域であっても、活性を保持しながら天然由来の残基を化学的に類似するアミノ酸と置換することができる（保存的アミノ酸残基置換）。

【0144】

いくつかの実施形態では、O s p A ポリペプチド変異体は、グリコシル化部位の数およ

び/または型が配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、または173に示されるアミノ酸配列に比べ変化しているグリコシル化変異体を含む。1つの実施形態では、O s p Aポリペプチド変異体は、配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、または173に示されるアミノ酸配列よりも多いかまたは少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合グリコシル化部位は、配列：A s n - X - S e rまたはA s n - X - T h rにより特徴付けられ、ここで、Xとして表されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合炭水化物鎖の付加のための潜在的新規部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、既存のN結合炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN結合グリコシル化部位（典型的には、天然由来）が排除され、1つ以上の新規N結合部位が作製される、N結合炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。追加のO s p A変異体としては、システイン変異体が挙げられ、この場合、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、または173に示されるアミノ酸配列に比べ欠失しているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）に置換されている。例えば不溶性封入体の単離後、O s p Aポリペプチドが生物学的に活性な立体配座にリフォールディングされなければならない場合に、システイン変異体が有用である。システイン変異体は、一般的には、天然タンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、典型的には不對システインに起因する相互作用を最小にするように偶数有する。

10

【0145】

本発明はさらに、配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、または173に示されるタンパク質のエピトープを有する部分を含むポリペプチドを提供する。「エピトープ」という用語は、抗体が結合できるタンパク質の領域を指す。例えば、G e y s e n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 81:3998-4002(1984)を参照されたい。エピトープは、線形または立体配座であり得、後者は、タンパク質のフォールディングでエピトープを形成するタンパク質の不連続領域から構成される。線形エピトープは、一般的には少なくとも6アミノ酸残基長である。タンパク質配列の一部を模倣する比較的短い合成ペプチドは、通常、部分的に模倣されたタンパク質と反応する抗血清を誘導することができる。S u t c l i f f e e t a l . , S c i e n c e 219:660-666(1983)を参照されたい。短い線形エピトープを認識する抗体は、変性タンパク質を使用する分析および診断用途、例えばウェスタンブロットティングにおいて特に有用である。T o b i n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 76:4350-4356(1979)を参照されたい。短いペプチドに対する抗体は、ある特定の事例では、天然の立体配座のタンパク質も認識し、よって、例えば、E L I S Aによりまたは免疫沈降研究において、タンパク質発現およびタンパク質単離をモニタリングするために、および溶液中のO s p Aタンパク質を検出する際に、有用である。

20

30

【0146】

キメラO s p A核酸分子およびポリペプチド分子の合成

核酸分子は、O s p Aポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、限定はされないが、組換えDNA方法および化学合成を含む様々な方法で容易に得ることができる。

40

【0147】

組換えDNA方法は、一般的には、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y (1 9 8 9) および/またはA u s u b e l e t a l . , e d s . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , G r e e n P u b l i s h e r s I n c . a n d W i l e y a n d S o n s , N Y (1 9 9 4) に記載されるものである。以下に示される説明に従い実施される組換え発現技術は、様々な態様では、これらのポリヌクレオチドを生成させ、コードされたポリ

50

ペプチドを発現するために従われる。例えば、O s p A ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することにより、当業者は容易に大量の所望のヌクレオチド配列を生成させることができる。配列はその後、検出プローブまたは増幅プライマーを作製するために使用され得る。あるいは、O s p A ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入してもよい。発現ベクターを適切な宿主に導入することにより、コードされた1つのO s p A ポリペプチドまたは複数のO s p A ポリペプチドが、いくつかの態様では、大量に生成される。

【0148】

同様に、核酸およびポリペプチドの化学合成は当該技術分野ではよく知られており、例えば、Engels et al., Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716 - 734 (1989) により記載されるものである。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホラミダイト、およびH - ホスホネート方法が挙げられる。1つの態様では、そのような化学合成のための方法は、標準ホスホラミダイト化学を使用するポリマー担持合成である。典型的には、O s p A ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長となる。約100ヌクレオチドより大きな核酸は、これらの方法を使用していくつかのフラグメントとして合成される。その後、フラグメントが共に連結され、本発明の全長ヌクレオチド配列が形成される。具体的な態様では、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントはATGを有し、これはメチオニン残基をコードする。

【0149】

本発明の具体的な態様では、キメラO s p A コード配列は、合成オーバーラップオリゴヌクレオチドを使用して作製される。ボレリア細胞由来のDNAは使用されないため、合成アプローチのさらなる利点は、ボレリア培養培地中に存在する動物起源の材料（すなわち血清または血清アルブミン）に含有される外来病原体の混入の回避である。この戦略はまた、配列変化、例えば、発現の最適化（O s p B リーダー配列）、クローニングを促進するための制限部位の導入、または潜在的な知的所有権問題の回避のための修飾が単一ステップで実施されるため、実質的に、キメラ遺伝子を作製するのに必要とされる操作数を減少させる。コドン使用頻度を大腸菌宿主に対し最適化させることも可能であり、というのも、大腸菌でめったに使用されないコドンの存在が、外来遺伝子の高レベル発現に対する潜在的妨害を示すことが知られているからである（Makoff et al., Nucleic Acids Res. 17: 10191 - 202, 1989; Lakey et al., Infect. Immun. 68: 233 - 8, 2000）。当業者に知られている他の方法が同様に使用される。

【0150】

ある特定の実施形態では、核酸変異体は、ある宿主細胞でのO s p A ポリペプチドの最適発現のために変化されたコドンを含む。特定のコドン変化は、O s p A ポリペプチド（複数可）および発現のために選択された宿主細胞（複数可）に依存する。そのような「コドン最適化」は、様々な方法により、例えば、ある宿主細胞において高度に発現した遺伝子に使用するために好ましいコドンを選択することにより、実施することができる。コドン出現頻度表、例えば高度に発現した細菌遺伝子のコドン優先度のための「Ecohigh.cod」を組み入れるコンピュータアルゴリズムが、いくつかの事例では使用され、University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI により提供される。他の有用なコドン出現頻度表としては、「Cellegans__high.cod」、「Cellegans__low.cod」、「Drosophila__high.cod」、「Human__high.cod」、「Maize__high.cod」および「Yeast__high.cod」が挙げられる。

【0151】

O s p A ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、ある特定の態様では、適切な発現ベクター中に、標準連結技術を用いて挿入される。ベクターは、典型的には使

用される特定の宿主細胞において機能するように選択される（すなわち、ベクターは宿主細胞機構と適合し、そのため、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が起こり得る）。O s p A ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、様々な態様では、原核、酵母、昆虫（バキュロウイルス系）、および／または真核宿主細胞において増幅／発現される。宿主細胞の選択は、一つには、O s p A ポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および／またはリン酸化）されるかどうか依存する。そうであれば、酵母、昆虫、または哺乳類宿主細胞が好ましい。発現ベクターの説明については、M e t h . E n z . , v o l . 1 8 5 , D . V . G o e d d e l , e d . , A c a d e m i c P r e s s I n c . , S a n D i e g o , C A (1 9 9 0) を参照されたい。

【0152】

クローニングベクターは、当該技術分野で知られているもの全てを含む。例えば、S a m b r o o k , F r i t s c h & M a n i a t i s , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n . C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . : C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , 1 9 8 9 を参照されたい。1つの態様では、p U C 1 8 は全ての間ステップのためのクローニングベクターとして使用され、というのも、ベクター p E T 3 0 a よりもこのプラスミドを使用した方が遺伝子操作および配列決定がより容易になるからである。主要特徴は、特に、塩基対 1 4 9 ~ 4 6 9 の L a c Z

ペプチドをコードする l a c Z 遺伝子フラグメント（塩基対 5 0 7 での l a c プロモーター）、塩基対 1 6 2 9 ~ 2 4 8 6 のアンピシリン耐性決定基をコードする b l a 遺伝子（塩基対 2 5 2 1 での b l a プロモーター）、塩基対 8 6 7 での複製開始点、および塩基対 1 8 5 ~ 4 5 1 の複数のクローニング部位である（図 1 2 ）。

【0153】

発現ベクターは、当該技術分野で知られているもの全てを含み、例えば、限定はされないがコスミド、プラスミド（例えば、ネイキッドまたはリボソームに含有される）、およびウイルスが挙げられ、これらは組換えポリヌクレオチドを組み込む。発現ベクターは、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現のために、当該技術分野で知られている技術を使用して形質転換またはトランスフェクションを介して、適切な宿主細胞に（例えば、形質転換または形質導入を介して）挿入される。例えば、S a m b r o o k , F r i t s c h & M a n i a t i s , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n . C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . : C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , 1 9 8 9 を参照されたい。1つの態様では、p E T 3 0 a (N o v a g e n) が最終の完全 O s p A 遺伝子インサートのための発現ベクターとして使用される。p E T ベクターでは、遺伝子は、T 7 プロモーターの制御下でクローニングされ、発現は宿主細胞に T 7 R N A ポリメラーゼ源を提供することにより誘導される（T 7 R N A ポリメラーゼ源が供給されるまで発現は起こらない）。主要特徴は、塩基対 4 0 4 8 ~ 4 8 6 0 でのカナマイシン耐性をコードする遺伝子（k a n）、8 2 6 - 1 9 0 5 の l a c I 遺伝子塩基対、塩基対 4 9 5 6 - 5 4 1 1 での F 1 複製開始点、および塩基対 1 5 8 ~ 3 4 6 の複数のクローニング部位である（図 1 3 ）。

【0154】

ベクターが構築され、ベクターの適切な部位に O s p A ポリペプチドをコードする核酸分子が挿入された後に、完成したベクターは、増幅および／またはポリペプチド発現用の好適な宿主細胞に挿入される。選択した宿主細胞への O s p A ポリペプチドのための発現ベクターの形質転換は、様々な態様では、よく知られている方法、例えばトランスフェクション、感染、塩化カルシウム媒介形質転換、電気穿孔法、微量注入法、リポフェクション法、もしくは D E A E - デキストラン法、または他の公知の技術によって達成される。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の型の機能である。これら方法および他の好適な方法は当業者によく知られており、例えば、S a m b r o o k e t a l . (上記) に記載されている。

10

20

30

40

50

【0155】

宿主細胞は、いくつかの態様では原核宿主細胞（例えば大腸菌）または真核宿主細胞（例えば酵母、昆虫、もしくは脊椎動物細胞）である。適切な条件下で培養された場合、宿主細胞はOspAポリペプチドを合成し、次にこれを、培養培地（宿主細胞が培地中に分泌する場合）から、または産生している宿主細胞から直接（分泌されない場合）、採取することができる。適切な宿主細胞の選択は、望ましい発現レベル、活性のために望ましいまたは必要なポリペプチドの修飾（例えばグリコシル化もしくはリン酸化）、およびフォールディングして生物活性分子となることが容易かといった、様々な要素に依存する。そのような宿主細胞としては、細菌、酵母、真菌、ウイルス、無脊椎動物、および哺乳類源の宿主細胞が挙げられるが、これらに限定されない。そのような宿主細胞の例としては、*Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)*を参照されたい。追加の態様では、*Maniatis*（上記）マニュアルの公開から当該技術分野で使用されている宿主細胞もまた本発明で使用される。

10

【0156】

1つの態様では、宿主細胞は大腸菌細胞である。大腸菌の好適な株としては、BL21、DH5、HMS174 (DE3)、DH10B、またはE.CLONI 10G (Lucigen, Middleton, Wis.)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ベクターの形質転換効率および/または維持を増強するように操作される。

20

【0157】

1つの態様では、大腸菌株DH5 [遺伝子型: end A1 hsdR17 (rk-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 D (lacZYA-argF) U169 deoR (F80dlacD (lacZ) M15)] (Gibco BRL)が中間クローニングステップ全てに対して使用される。この株は、遺伝子工学において最も広く使用される宿主の1つである大腸菌株K12に由来する。この株は、アンピシリン耐性遺伝子 (amp) を含有するベクターを有する形質転換体の選択を可能にするamp-である。

30

【0158】

別の態様では、大腸菌株HMS174 (DE3)が、発現のための宿主として使用される。大腸菌HMS174 (DE3) 宿主細胞 [遺伝子型: F-recA1 hsdR (rk12-mk12+) RifR (DE3)] (Novagen)が、本明細書に記載される様々な実施例で、最終クローニングステップのために使用される。この株は、カナマイシン耐性遺伝子 (kan) を含有するベクターを有する形質転換体の選択を可能にするkan-である。

【0159】

OspAポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者によく知られている標準培地を使用して培養される。培地は通常、細胞の増殖および生存に必要な栄養分を全て含有する。大腸菌細胞を培養するのに好適な培地としては、例えば、ルリア培養液 (LB) および/またはテリフィック培養液 (TB)が挙げられる。真核細胞を培養するのに好適な培地としては、Roswell Park Memorial Institute 培地1640 (RPMI 1640)、基礎培地 (MEM)、および/またはDulbecco変法イーグル培地 (DMEM)が挙げられ、これらは全て、いくつかの場合には、培養される特定の細胞株により示される血清および/または増殖因子が補充される。昆虫培養物に好適な培地は、イーストレート、ラクトアルブミン加水分解物、および/またはウシ胎仔血清が必要に応じて補充されたGrace培地である。

40

【0160】

典型的には、抗生物質または形質転換細胞の選択的増殖に有用な他の化合物が、培地への補充物として添加される。使用される化合物は、それにより宿主細胞が形質転換された

50

プラスミド上に存在する選択可能なマーカー要素により示されるであろう。例えば、選択可能なマーカー要素がカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物はカナマイシンとなる。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0161】

宿主細胞により産生されるOspAポリペプチドの量は、当該技術分野で知られている標準方法を使用して評価することができる。そのような方法としては、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、クロマトグラフィー分離、例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、免疫検出、例えば免疫沈降、および/または活性アッセイ、例えばDNA結合ゲルシフトアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0162】

いくつかの場合には、OspAポリペプチドは、単離されると生物学的に活性でなくなる。「リフォールディング」またはポリペプチドをその三次構造に変換するおよびジスルフィド結合を生成させるための様々な方法が、生物活性を回復させるために使用される。そのような方法は、可溶化ポリペプチドを、通常7を超えるpHに、特定の濃度のカオトロップの存在下で暴露することを含む。カオトロップの選択は、封入体可溶化のために使用される選択と非常に類似するが、通常、カオトロップは可溶化のために使用されるカオトロップより低い濃度で使用され、必ずしも同じではない。いくつかの事例では、リフォールディング/酸化溶液はまた、還元剤または還元剤に加えてその酸化形態を特定の比率で含有し、特定の酸化還元電位が生じ、タンパク質のシステイン架橋（複数可）の形成においてジスルフィドシャッフリングが起こり得る。一般に使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン（GSH）/ジチオビスGSH、塩化第一銅、ジチオスレイトール（DTT）/ジチアンDTT、および2-2メルカプトエタノール-b（ME）/ジチオ-b（ME）が挙げられる。共溶媒がしばしば、リフォールディングの効率を増加させるために使用され、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール、アルギニン等が挙げられる。

20

【0163】

封入体がOspAポリペプチドの発現時にかなりの程度まで形成されない場合、ポリペプチドが細胞ホモジネートの遠心分離後、上清中で主に見られる。ポリペプチドはさらに、本明細書に記載されるか、またはそうでなければ当該技術分野で知られているものといった方法を用いて上清から単離される。

30

【0164】

OspAポリペプチドの溶液からの精製は、当該技術分野で知られている様々な技術を用いて達成することができる。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（OspAポリペプチド/hexaHis）等のタグまたは他の小ペプチド、例えばFLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）またはmyc（Invitrogen, Carlsbad, CA）を、そのカルボキシルまたはアミノ末端のいずれかに含有するように合成される場合、ポリペプチドはしばしば、カラムマトリクスがタグに対して高い親和性を有する親和性カラムに溶液を通過させることにより、1ステッププロセスで精製される。例えば、ポリヒスチジンは大きな親和性および特異性で、ニッケルに結合し、したがって、ニッケルの親和性カラム（例えばQiagen（登録商標）ニッケルカラム）がOspAポリペプチド/polyHisの精製のために使用され得る。例えば、Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993)を参照されたい。

40

【0165】

さらに、OspAポリペプチドは、OspAポリペプチドを特異的に認識し、そこに結合することができるモノクローナル抗体の使用により精製され得る。したがって、精製の

50

ための好適な手順としては、親和性クロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、電気泳動（天然ゲル電気泳動を含む）、その後のゲル溶出、および分取等電点電気泳動（「Isoprime」機械/技術、Hoefler Scientific, San Francisco, CA）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合には、2つ以上の精製技術が組み合わせられ、純度の増大が達成される。

【0166】

OspAポリペプチドはまた、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）により、当該技術分野で知られている技術、例えば、Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963), Houghten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985)、およびStewart and Young, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)において記載されているものを用いて調製される。そのようなポリペプチドは、アミノ末端のメチオニンありまたはなしで合成される。化学的に合成されたOspAポリペプチドは、いくつかの態様では、ジスルフィド架橋を形成するためのこれらの参考文献において示される方法を用いて酸化される。化学的に合成されたOspAポリペプチドは組換えで生成された、または天然起源から精製された対応するOspAポリペプチドに匹敵する生物活性を有することが予測され、したがって、組換えOspAポリペプチドと同じ意味で使用される。核酸およびポリペプチドを生成するための多くの追加の方法が当該技術分野で知られており、それらの方法はOspAポリペプチドを生成させるために使用することができることが、理解される。

10

20

【0167】

OspAポリペプチド分子の化学誘導体

OspAポリペプチドの化学修飾誘導体は、本明細書において下記で説明される開示が与えられれば、当業者により調製される。OspAポリペプチド誘導体は、ポリペプチドに自然に付着された分子の型または位置のいずれかが異なるように修飾される。誘導体は、いくつかの態様では、1つ以上の自然に付着された化学基の欠失により形成される分子を含む。配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、または173のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはOspAポリペプチド変異体は、1つの態様では、1つ以上のポリマーの共有結合により修飾される。例えば、選択されるポリマーは、典型的には水溶性であり、そのため、これが付着されたタンパク質は、水性環境、例えば生理環境で沈殿しない。ポリマーの混合物は、好適なポリマーの範囲に含まれる。ある特定の態様では、最終製品調製物の治療用途のために、ポリマーは薬学的に許容される。

30

【0168】

ポリマーはそれぞれ、様々な態様では、任意の分子量を有し、分枝または非分枝である。ポリマーはそれぞれ、典型的には約2 kDa～約100 kDaの平均分子量を有する（「約」という用語は、水溶性ポリマーの調製において、いくつかの分子が定められた分子量より大きい、幾分少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、様々な態様では、約5 kDa～約50 kDa、約12 kDa～約40 kDa、および約20 kDa～約35 kDaである。

40

【0169】

好適な水溶性ポリマーまたはそれらの混合物としては、下記が挙げられるが、これらに限定されない：N結合もしくはO結合炭水化物；糖；ホスフェート；ポリエチレングリコール（PEG）（タンパク質を誘導するために使用されたPEGの形態を含む、例えばモノ-（C1-C10）アルコキシ-もしくはアリーロキシ-ポリエチレングリコール）；モノメトキシ-ポリエチレングリコール；デキストラン（例えば、約6 kDaの低分子量デキストラン等）；セルロース；または他の炭水化物系ポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、

50

グリセロール)、およびポリビニルアルコール。配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、もしくは173のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはO s p Aポリペプチド変異体の共有結合により付着されたマルチマーを調製するために時として使用される二官能性架橋分子もまた本発明に包含される。

【0170】

いくつかの態様では、化学誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるのに使用される任意の好適な条件下で実施される。ポリペプチドの化学誘導体を調製するための方法は、一般的には(a)ポリペプチドを、活性化ポリマー分子(例えば、ポリマー分子の反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体)と、配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、もしくは173のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはO s p Aポリペプチド変異体が、1つ以上のポリマー分子に付着される条件下で反応させるステップ、および(b)反応生成物(複数可)を得るステップを含む。最適反応条件は、周知のパラメータおよび所望の結果に基づき決定される。例えば、ポリマー分子:タンパク質の比が大きいほど、付着されるポリマー分子のパーセンテージが大きくなる。1つの実施形態では、O s p Aポリペプチド誘導体は、単一のポリマー分子部分をアミノ末端に有する(例えば、米国特許第5,234,784号を参照されたい)。

10

【0171】

ポリペプチドのペグ化は、ある特定の態様では、例えば、下記参考文献において記載されるように、当該技術分野で知られているペグ化反応のいずれかにより特定的に実施される: Francis et al., Focus on Growth Factors, 3:4-10(1992)、EP 0154316号、EP 0401384号、および米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。アシル化反応では、選択されるポリマー(複数可)は、単一の反応性エステル基を有しなければならない。還元的アルキル化では、選択されるポリマー(複数可)は、単一の反応性アルデヒド基を有しなければならない。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド(耐水性である)、またはそのモノC1-C10アルコキシもしくはアリーロキシ誘導体である(米国特許第5,252,714号を参照されたい)。

20

【0172】

別の実施形態では、O s p Aポリペプチドは、ビオチンに化学的に結合され、結合されたビオチン/O s p Aポリペプチド分子はその後、アビジンに結合することができ、四価アビジン/ビオチン/O s p Aポリペプチド分子が得られる。O s p Aポリペプチドはまた、共有結合によりジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に結合され、得られた複合物は、抗DNPまたは抗TNP-IgMにより沈殿し、結合価10を有する十量体複合物が形成される。本明細書に開示されるO s p Aポリペプチド誘導体は、ある特定の態様では、非誘導体化分子に比べ、追加の活性、増強または減少された生物活性または他の特性、例えば増加または減少した半減期を有する。

30

【0173】

免疫原性組成物、ワクチン、および抗体

40

本発明のいくつかの態様は、免疫原性組成物およびワクチンを含む。本発明の免疫原性キメラO s p A分子は組み合わせられて抗原(複数可)として使用され、対象において抗O s p A免疫応答を誘導する(すなわち、ワクチンとして作用する)。例示的な免疫原性O s p Aポリペプチド(配列番号2、4、6、169、171、および173)は、組み合わせられて送達され、ボレリアの血清型1~6のいずれか1つ以上に対し、より一般的には、本明細書に記載されるボレリアの多くの他の種に対し免疫応答を誘導する。免疫応答はまた、本発明のO s p Aポリペプチドをコードするプラスミドベクターの送達(すなわち、「ネイキッドDNA」の投与)により上昇させることができる。いくつかの態様では、O s p A核酸分子(配列番号1、3、5、168、170、および172)は注射により、リポソームを介して、または本明細書に記載される他の投与手段により送達される。免

50

疫化されるとすぐに、対象は、ボレリアの血清型 1 ~ 6 の O s p A タンパク質に対し、およびボレリアの他の種に対し増大した免疫応答を誘導する。

【 0 1 7 4 】

したがって、上記で提示されるように、O s p A ポリペプチドおよび O s p A 核酸分子はいずれも本発明の免疫原性および / またはワクチン組成物において使用するための抗原として含まれる。ある特定の態様では、核酸およびタンパク質はいずれも対象に送達される。具体的な態様では、核酸ワクチンに対する免疫応答は、同族タンパク質の同時投与により増強されることが提示されている (W O 9 9 / 3 0 7 3 3 号を参照されたい)。核酸およびタンパク質は、同じ組成物中で投与される必要はない。いずれも単にタンパク質による免疫応答の誘導期中に投与されなければならない、いくつかの態様では、核酸が免疫系を刺激するまでマスクされるか、または制止される。具体的な態様では、ワクチンは、核酸およびタンパク質抗原を抗原提示細胞中に送達するように意図される (W O 9 7 / 2 8 8 1 8 号を参照されたい)。様々な態様では、核酸およびタンパク質は、例えば、共有結合により複合体化される。さらなる態様では、リボソーム製剤もまた、ワクチン抗原の免疫原性を増強させるために含まれる。

10

【 0 1 7 5 】

ある特定の態様では、本発明の免疫原性組成物は、本明細書に記載される O s p A 分子のいずれか 1 つ以上を薬学的担体と組み合わせる含み、ここで、組成物は、細胞表層タンパク質 A (O s p A) タンパク質に特異的に結合する抗体の産生を誘導する。いくつかの態様では、免疫原性組成物はまた、安定剤または抗菌性保存剤を含む。具体的な態様では、免疫原性組成物は、ボレリアに特異的に結合する抗体の産生を誘導する。他の態様では、組成物は、ボレリアを中和する抗体の産生を誘導する。

20

【 0 1 7 6 】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載されるキメラ O s p A 分子 (抗原) を含む免疫原性組成物におけるアジュバントの使用を含む。ある特定の態様では、抗原がアジュバントと同時に投与される場合、免疫原性は著しく改善される。いくつかの態様では、アジュバントは、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中の 0 . 0 0 1 % ~ 5 0 % 溶液として使用される。アジュバントは、抗原の免疫原性を増強するが、必ずしもそれ自体免疫原性ではない。

【 0 1 7 7 】

アジュバントは、様々な態様では、ワクチン接種に対し多くのプラス効果を有する。いくつかの事例では、アジュバントは、対象において強い免疫応答の発生を促進する。アジュバントは、他の事例では、免疫応答のレベルを増加させ、その期間を引き延ばし、免疫記憶を改善する。アジュバントはしばしば、特定の対象群 (例えば、高齢または免疫抑制患者) の弱った免疫を克服するか、または特定の「危険群」 (例えば、限定はされないが、非常に若いまたは高齢) の免疫原性を改善するために使用される。アジュバントの免疫増強効果は、様々な事例において、防御応答を与える最終製剤中に必要とされる抗原の量の減少につながる (すなわち、用量節約)。

30

【 0 1 7 8 】

一般に、アジュバントは、その主要な作用機序に基づき、2 つの主な群に分類される : 第 1 の群は、自然免疫系受容体またはセンサのアゴニスト、例えば、T o l l 様受容体 (T L R) アゴニスト、C 型レクチン受容体アゴニスト、レチノイン酸誘導性遺伝子 1 (R I G - 1) 様受容体 (R L R) アゴニスト、ならびにヌクレオチド結合ドメインおよびロイシンリッチリピート含有受容体 (N L R) アゴニストである。第 2 の群は、送達系として機能する物質であり、T L R 非依存性アジュバントとしても知られている。T L R アゴニストアジュバントの例は、下記である : A S O 4 (G l a x o S m i t h K l i n e)、市販の B 型肝炎およびパピローマウイルスワクチンにおいてアジュバントとして使用される T L R - 4 アゴニスト ; V a x i n a t e、フラゲリン融合タンパク質 T L R - 5 アゴニスト ; ならびに多くの T L R - 9 アゴニストアジュバント、例えば二本鎖 DNA (d s D N A) およびオリゴヌクレオチド C p G または O D N 1 a を使用するもの。アジ

40

50

ュバントのこのカテゴリに含まれる他の TLR - アゴニストとしては、糖脂質 (TLR - 1)、リポテイコ酸およびリポタンパク質 (TLR - 1 / TLR - 2 および TLR - 2 / TLR - 6) リポ多糖、リポオリゴ糖、およびモノホスホリル脂質 A (MPL) (TLR - 4)、二本鎖 RNA (TLR - 3) ; ペプチドグリカン (TLR - 6)、一本鎖 RNA (TLR - 7) が挙げられる。2つの C 型レクチン受容体アゴニストアジュバントの例としては、 α -グルカン (デクチン - 1) およびマンナン (デクチン - 2) が挙げられ、いずれも真菌細胞壁に由来する。RLR 受容体アゴニストアジュバントは、一本鎖ウイルス RNA および二本鎖ウイルス DNA を含み、NLR アゴニストアジュバントは、ペプチドグリカン分解生成物、微生物産物、および非感染性結晶粒子を含む。全ての場合において、アゴニストは自然免疫系受容体を直接活性化し、免疫増強炎症反応を引き起こすことにより作用する。第 2 の群のアジュバント、TLR 非依存性アジュバントはほとんど、送達系として作用し、抗原提示細胞による抗原取込みおよび提示を増強させる。いくつかの事例では、これらのアジュバントはまた、抗原を投与部位の近くに局所的に保持することにより、抗原の免疫系細胞への遅い持続放出を促進するデポー効果を生成させるように作用することができる。アジュバントはまた、免疫系細胞を抗原デポーに引きつけ、そのような細胞を刺激して、免疫応答を誘導する。TLR 非依存性アジュバントの例としては、無機塩、例えば水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム (まとめて *alum* と呼ばれる) およびリン酸カルシウム ; 水中油型エマルジョン (例えば、MF59、AS03、および *ProVax*) ; 油中水型エマルジョン (*Montanide*、*TiterMax*) ; バイオポリマー (*Advax*) ; 植物誘導体、とりわけサポニンの画分、*South American Molina* ソープツリーキラヤサボナリア (*Quillaja saponaria*) の皮由来のトリテルペノイド抽出物 (SFA - 1、QS21、*Quil A*) ; サポニン画分、ステロール、および、任意で、リン脂質から構成される免疫刺激複合体 (ISCOM および ISCOM マトリクス) (ISCOMATRIX および *Matrix-M*) ; 様々な寸法および電荷を有するリン脂質球であるリボソーム (*Vaxfectin* および *Vaxisome*) ; ウイルス表面抗原、例えばインフルエンザ赤血球凝集素およびノイラミニダーゼを含有するリボソームであるウイルス様粒子およびピロソーム ; 様々な組成物のナノ粒子 ; キトサン、ポリアルギニン等のペプチド、および KKK ペプチドとして知られるペプチドが挙げられる。

10

20

30

【0179】

本明細書において上記で列挙されるアジュバントは、単独でまたは組み合わされて使用される。TLR 依存性および TLR 非依存性アジュバントの組み合わせがしばしば好ましく、というのは、抗原および TLR 依存性アジュバントは、TLR 非依存性アジュバントにより抗原提示細胞へ輸送されると考えられるからであり、TLR 非依存性アジュバントはまた、取込みおよび安定性を刺激し、一方で TLR 依存性アジュバントは直接、TLR シグナル伝達の活性化により免疫を増強させる。

【0180】

TLR 依存性および TLR 非依存性アジュバントの組み合わせの例としては、AS01 : MPL (TLR - 4 アゴニスト)、リボソーム、および QS - 21 (いずれも TLR 非依存性アジュバント) の混合物 ; AS04 : MPL (TLR - 4 アゴニスト) および水酸化 / リン酸アルミニウム ; IC31 : ODN1a (TLR - 9 アゴニスト) および KKK ペプチド (TLR 非依存性アジュバント) ; ならびに Freund 完全アジュバント、マイコバクテリウム・ツベルクローシスの膜抽出物 (TLR - 4 アゴニスト)、および水中油型エマルジョン (TLR 非依存性アジュバント) が挙げられる。

40

【0181】

複数の TLR 依存性アジュバントからなる組み合わせもまた、アジュバント処理されるワクチン製剤の免疫増強効果を最大にするために使用される。異なるアダプタータンパク質を使用する TLR のアゴニストがしばしば組み合わせられる (例えば、TRIF (IRF - 3) を誘導する Toll / インターロイキン 1 受容体ドメイン含有アダプタータンパク質) アダプター経路を使用する細胞膜結合 TLR - 3 または TLR - 4 受容体に対するアゴ

50

ニストと、TLR (TLR - 7、TLR - 8 および TLR - 9) (エンドソームまたはリソソームオルガネラにおいて発現され、MyD88 (一次応答タンパク質を分化させるミエロイド) アダプタータンパク質経路を使用する) のアゴニストとの組み合わせ)。

【0182】

これらの免疫刺激薬またはアジュバントは、その上、ワクチンにおける宿主免疫応答を改善する。いくつかの場合には、リポ多糖等の物質は、内因性アジュバントとして作用することができ、というのも、それらは、通常、ワクチンとして使用される死滅または減弱された細菌の成分であるからである。外因性アジュバント、例えば上記で本明細書に列挙されるものは免疫調節物質であり、これらは、典型的には非共有結合により抗原に結合され、宿主免疫応答を増強させるように製剤化される。

10

【0183】

広範囲の外因性アジュバントは、抗原に対し強力な免疫応答を誘起することができる。これらには、膜タンパク質抗原に複合体化されたサポニン (免疫刺激複合体)、鉱物油を有するプルロニックポリマー、鉱物油中の死滅させたマイコバクテリア、Freund 完全アジュバント、細菌産物、例えばムラミルジペプチド (MDP)、およびリポ多糖 (LPS)、ならびに脂質 A、およびリポソームが含まれる。体液性免疫応答 (HIR) および細胞免疫 (CMI) を効率的に誘導するために、免疫源は、ある特定の態様では、アジュバント中で乳化される。

【0184】

理想的なアジュバントの望ましい特性としては、下記のうちのいくつかまたは全てが挙げられる：毒性の欠如；長期にわたる免疫応答を刺激する能力；製造の容易さおよび長期保管における安定性；様々な経路により投与される抗原への CMI および HIR の両方を誘導する能力；他のアジュバントとの相乗作用；抗原提示細胞 (APC) の集団と選択的に相互作用することができる能力；適切な T_H1 または T_H2 細胞特異的免疫応答を特異的に誘導する能力；ならびに抗原に対して適切な抗体アイソタイプレベル (例えば IgA) を選択的に増加させる能力。

20

【0185】

米国特許第 4,855,283 号 (参照により本明細書に組み込まれる) は、免疫調節物質またはアジュバントとして、N-グリコシルアミド、N-グリコシル尿素、および N-グリコシルカルバメートを含む糖脂質類似体 (その各々は、糖残基においてアミノ酸により置換される) を教示する。米国特許第 4,855,283 号は、天然由来糖脂質に対し構造類似性を示す N-糖脂質類似体、例えばスフィンゴ糖脂質およびグリセロ糖脂質が、単純ヘルペスウイルスワクチンおよび仮性狂犬病ウイルスワクチンの両方において強い免疫応答を誘導することができることを報告した。いくつかの糖脂質は、長鎖アルキルアミンおよびアノマー炭素原子を介して糖と直接結合された脂肪酸から合成され、天然由来脂質残基の機能を模倣する。

30

【0186】

いくつかの態様では、免疫原性組成物は、免疫源に対する免疫応答を増強するのに十分な量のアジュバントを含有する。好適なアジュバントとしては、アルミニウム塩 (リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)、スクアレン混合物 (SAF-1)、ムラミルジペプチド、サポニン誘導体、マイコバクテリア細胞壁調製物、モノホスホリル脂質 A、ミコール酸誘導体、非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤、Quil A、コレラ毒素 B サブユニット、ポリホスファゼンおよび誘導体、ならびに免疫刺激複合体 (ISCOM)、例えば、Takahashi et al. (Nature 344:873-875, 1990) により記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、アジュバントは合成アジュバントである。具体的な態様では、合成アジュバントは、グルコピラノシル脂質アジュバント (GLA) である。例示的な態様では、アジュバントは、水酸化アルミニウムである。

40

【0187】

本発明のさらなる態様は、本発明の免疫原性組成物および薬学的に許容される担体を含

50

むワクチンである。本明細書に上述されるように、ワクチンは、ある特定の態様では、1つ以上の安定剤および/または1つ以上の保存剤を含む。

【0188】

1つの態様では、抗原をコードする核酸配列（本明細書に記載されるキメラO s p Aポリペプチド）に動作可能に結合されたプロモーターを含む少なくとも1つの組換え発現構築物およびアジュバントを含むワクチンが提供される。1つの実施形態では、組換え発現構築物（O s p Aポリヌクレオチドを含む発現ベクター）はウイルスベクター中に存在し、これはある特定のさらなる実施形態では、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、およびレトロウイルスから選択されるウイルス中に存在する。

10

【0189】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載されるキメラO s p A分子に対する抗体を含む。様々な態様では、本発明は、抗O s p A抗体を製造し、ボレリア感染に対して免疫を提供するキメラO s p A分子を含む。いくつかの態様では、これらの抗O s p A抗体、例えば、マウス、ヒト、またはヒト化モノクローナル抗体または単鎖抗体は、対象に投与され（例えば、受動免疫化）、ボレリアの血清型1～6のうちのいずれか1つ以上のO s p Aタンパク質に対する免疫応答を実施させる。本明細書に使用される際、「抗体」という用語は1つ以上のO s p Aポリペプチドに対する特異性を有する分子を指す。好適な抗体は、当該技術分野で知られている方法を用いて調製される。ある特定の態様では、O s p A抗体は、O s p Aポリペプチドのある特定の部分に結合することができ、それによってポリペプチドのO s p Aポリペプチド受容体（複数可）への結合が阻害される。本発明のキメラO s p Aポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメントは、本発明の範囲内にある。

20

【0190】

いくつかの態様では、本発明の抗体には、配列番号2、4、6、8、10、12、169、171、および173からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫化することにより生成される、1つ以上のO s p Aポリペプチドに特異的に結合する抗体またはそのフラグメントが含まれる。他の態様では、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、168、170、および172からなる群より選択される核酸配列によりコードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを含む。様々な態様では、抗体またはそのフラグメントは、ヒト、ヒト化、ポリクローナル、またはモノクローナルである。さらなる態様では、抗体は、F a bまたはF a b'抗体である。具体的な態様では、抗体は、検出可能な標識を含む。いくつかの態様では、抗体は、抗体の化学修飾誘導体である。

30

【0191】

本発明によるキメラO s p A分子の投与は、ヒトまたは動物において免疫または抗体応答を刺激する。いくつかの態様では、3つのキメラO s p A分子（例えば、脂質付加されたO s p A 1 / 2^{2 5 1}、脂質付加されたO s p A 6 / 4 O s p A、および脂質付加されたO s p A 5 / 3；またはオリジナルO s p A 1 / 2、オリジナルO s p A 6 / 4、およびオリジナルO s p A 5 / 3）は、本明細書に記載される6つ全ての血清型（1～6）に対する抗体応答を誘導するために一緒に投与される。この抗体応答は、本発明の方法が、様々な態様では、単に免疫応答を刺激するために（防御反応でもあることとは対照的に）使用されることを意味し、というのも得られた抗体（防御なし）はそれにもかかわらず有用であるためである。誘導する抗体から、当該技術分野ではよく知られている技術により、モノクローナル抗体が調製され、それらのモノクローナル抗体は、よく知られている抗体結合アッセイ、診断キット、または試験において、広義のボレリアブルグドルフェリの有無を決定するため、またはスピロヘータへの免疫応答が単に刺激されたかどうかを決定するために使用される。モノクローナル抗体は、ある特定の態様では、ボレリア抗原、例えばO s p Aを回収または単離するために免疫吸着クロマトグラフィーにおいて使用される。

40

50

【0192】

本発明のO s p A抗体は、様々な態様では、ポリクローナル、例えば単一特異性ポリクローナル、モノクローナル(M A b)、組換え、キメラ、ヒト化、例えばC D Rグラフト化、ヒト、単鎖、および/または二重特異性、ならびにそのフラグメント、変異体または誘導体である。抗体フラグメントは、O s p Aポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のそれらの部分を含む。そのようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素切断により生成されるF a bおよびF (a b ')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えD N A技術、例えば抗体可変領域をコードする核酸配列を含有する組換えプラスミドの発現により作製されたものが挙げられる。

【0193】

O s p Aポリペプチドに対して作られるポリクローナル抗体は、一般的には対象(ウサギ、マウス、または他の動物もしくは哺乳動物を含む)において、O s p Aポリペプチドおよびアジュバントの複数の皮下、筋肉内、または腹腔内注射により生成される。ある特定の態様では、本発明のO s p Aポリペプチドを、免疫化される種において免疫原性である担体タンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニンシ、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシン阻害剤に結合させることは有用である。また、アジュバント、例えばa l u mが、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、血液試料を免疫化された対象から採取し、血清を抗O s p Aポリペプチド抗体力価についてアッセイする。

【0194】

O s p Aポリペプチドに対して作られるモノクローナル抗体(m A b)は、培養下の連続細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法により生成される。モノクローナル抗体を調製するための好適な方法の例としては、K o h l e r e t a l . , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 (1 9 7 5) のハイブリドーマ法およびヒトB - 細胞ハイブリドーマ方法、K o z b o r , J . I m m u n o l . , 1 3 3 : 3 0 0 1 (1 9 8 4)、ならびにB r o d e u r e t a l . , M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s , p p . 5 1 - 6 3 (M a r c e l D e k k e r , I n c . , N e w Y o r k , 1 9 8 7) が挙げられる。O s p Aポリペプチドと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明により提供される。

【0195】

本発明のモノクローナル抗体は、場合によっては、治療薬として使用するために修飾される。1つの実施形態は、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同であるが、鎖(複数可)の残りが、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である、「キメラ」抗体である。そのような抗体のフラグメントもまた、所望の生物活性を示す限り含まれる。米国特許第4,816,567号およびM o r r i s o n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5 (1 9 8 5) を参照されたい。

【0196】

別の実施形態では、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野ではよく知られている(米国特許第5,585,089号および5,693,762号を参照されたい)。一般的には、ヒト化抗体は、1つ以上のアミノ酸残基が、非ヒトである起源からそこに導入されている。ヒト化は、例えば、当該技術分野で記載される方法(J o n e s e t a l . , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 (1 9 8 6)、R i e c h m a n n e t a l . , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 (1 9 8 8)、V e r h o e y e n e t a l . , S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 (1 9 8 8)) を用いて、ヒト抗体の対応する領域に対して齧歯類相補性決定領域(C D R)の少なくとも一部を置換することにより実施することができる。

【0197】

別の実施形態では、ヒト抗体はファージディスプレイライブラリから生成される (Hogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991))。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージの表面上の抗体レパトリーのディスプレイおよびその後の最適抗原へのそれらの結合によるファージの選択を介する免疫同定を模倣する。1つのそのような技術は、PCT出願第PCT/US98/17364号 (Adamsら) に記載されており、これは、そのようなアプローチを使用するMPL-およびmsk-受容体に対する高親和性および機能的アゴニスト抗体の単離を記載する。

【0198】

キメラ、CDRグラフト化、およびヒト化抗体は、典型的には組換え方法により生成される。抗体をコードする核酸は、本明細書に記載されるかまたは当該技術分野で知られている材料および手順を用いて、宿主細胞に導入され、発現される。1つの実施形態では、抗体は哺乳類宿主細胞、例えばCHO細胞において生成される。モノクローナル (例えば、ヒト) 抗体は、様々な態様では、本明細書に記載されるように、宿主細胞における組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞における発現により生成される。いくつかの態様では、モノクローナル抗体またはそのフラグメントはヒト化される。具体的な態様では、モノクローナル抗体は、本明細書に記載されるF237/BK2である。

【0199】

ある特定の態様では、本発明は、対象においてボレリア感染またはライム病を防止または治療するための方法を含み、方法は、本明細書に記載される抗体またはそのフラグメントを、ボレリア感染またはライム病を防止または治療するのに有効な量で、対象に投与するステップを含む。具体的な態様では、抗体またはそのフラグメントは、過免疫血清、過免疫血漿、またはその精製免疫グロブリン画分である。他の態様では、抗体またはそのフラグメントは、精製免疫グロブリン調製物または免疫グロブリンフラグメント調製物である。

【0200】

本発明の抗OspA抗体は、様々な態様では、OspAポリペプチドの検出および定量のための任意の周知のアッセイ方法、例えば競合的結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) において使用される。抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でOspAポリペプチドに結合する。

【0201】

診断または臨床適用のために、ある実施形態では、抗OspA抗体は、検出可能な部分を用いて標識される。検出可能な部分は、直接または間接的にのいずれかで、検出可能なシグナルを生成させることができる任意のものであり得る。例えば、ある特定の態様では、検出可能な部分は、放射性同位体、例えば³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、もしくは¹²⁵I；蛍光もしくは化学発光化合物、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン；または酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼである (Bayer et al., Meth. Enzym. 184: 138-163 (1990))。

【0202】

競合的結合アッセイは、標識された標準物 (例えば、OspAポリペプチド、またはその免疫学的反応性部分) が、限定された量の抗OspA抗体との結合について試験試料分析物 (OspAポリペプチド) と競合する能力に依存する。試験試料中のOspAポリペプチドの量は、抗体に結合する標準物の量に反比例する。結合する標準物質の量の決定を促進するために、抗体は、典型的には競合前または後に可溶化され、そのため、抗体に結合される標準物および分析物は、結合されないままの標準物および分析物から都合良く分離される。

10

20

30

40

50

【0203】

サンドイッチアッセイは、典型的には、各々が検出および／または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分、またはエピトープに結合することができる2つの抗体の使用を含む。サンドイッチアッセイでは、試験試料分析物は、典型的には固体支持体に固定された第1の抗体により結合され、その後、第2の抗体が分析物に結合し、そうして不溶性三部分複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,110号を参照されたい。第2の抗体自体は、いくつかの事例では、検出可能な部分によって標識される（直接サンドイッチアッセイ）か、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定される（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、1つの型のサンドイッチアッセイは、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）であり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

10

【0204】

抗OspA抗体はまた、インビボイメージングに有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、ある特定の態様では、動物の血流に投与され、宿主中の標識された抗体の存在および位置がアッセイされる。抗体は、様々な態様では、核磁気共鳴、放射線学、または他の当該技術分野で知られている検出手段に関係なく、動物において検出可能な任意の部分で標識される。本発明のいくつかの態様では、OspA抗体は治療薬として使用される。

【0205】

キメラOspA組成物および投与

20

本明細書に記載されるOspAキメラポリペプチドを対象に投与するために、OspAポリペプチドは、1つ以上の薬学的に許容される担体を含む組成物中で製剤化される。「薬学的にまたは薬理学的に許容される」という句は、以下に記載されるように、当該技術分野でよく知られている経路を用いて投与された場合、アレルギーまたは他の有害反応を生成させない分子部分および組成物を指す。「薬学的に許容される担体」は、ありとあらゆる臨床的に有用な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等を含む。いくつかの態様では、組成物は、水または一般的な有機溶媒と溶媒和物を形成する。そのような溶媒和物もまた、含まれる。

【0206】

本発明の免疫原性組成物またはワクチン組成物は、様々な態様では、経口、局所、経皮、非経口、吸入噴霧、経膈、経直腸、または頭蓋内注射により投与される。本明細書に使用される非経口という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、大槽内注射、または注入技術を含む。静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、くも膜下腔内、眼球後、肺内注射、およびまたは特定の部位での外科的移植による投与が、同様に企図される。一般的には、組成物は、発熱物質、ならびにレシピエントにとって有害となり得る他の不純物を、本質的に含まない。

30

【0207】

薬学的組成物の製剤は、選択される投与経路によって変動する（例えば、溶液、エマルジョン）。投与される組成物を含む適切な組成物は、生理学的に許容されるビヒクルまたは担体中で調製される。溶液またはエマルジョンでは、好適な担体としては、例えば、水性もしくはアルコール性／水性溶液、エマルジョン、または懸濁液、例えば生理食塩水および緩衝媒質が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、いくつかの態様では、塩化ナトリウム溶液、Ringerデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加Ringerまたは固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルは、ある特定の態様では、様々な添加物、保存剤、または流体、栄養分、もしくは電解質補給物を含む。

40

【0208】

活性成分としてOspAポリペプチドを含有する本発明の化合物および方法において有用な薬学的組成物は、様々な態様では、投与経路に応じて薬学的に許容される担体または添加物を含有する。そのような担体または添加物の例としては、水、薬学的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニ

50

ルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルデンプンナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンゴム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、薬学的に許容される界面活性剤等が挙げられる。使用される添加物は、限定はされないが、上記またはそれらの組み合わせから、適宜、本発明の剤形に応じて選択される。

【0209】

様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、または水性懸濁液は、様々な態様では、活性化合物を、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混合物で含有する。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、およびアカシアゴムであり、分散または湿潤剤は、いくつかの事例では、天然由来ホスファチド、例えばレシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えばステアリン酸ポリオキシエチレン、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノールまたはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレートまたはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物から誘導される部分エステルとの縮合生成物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレートである。水性懸濁液は、いくつかの態様では、1つ以上の保存剤、例えばエチル、またはn-プロピル、p-ヒドロキシベンゾエートを含む。

【0210】

いくつかの態様では、ospA組成物は、保管のために凍結乾燥され、使用前に好適な担体中で再構成される。この技術は、従来の免疫グロブリンでは有効であることが示されている。当該技術分野で知られている任意の好適な凍結乾燥および再構成技術が使用される。凍結乾燥および再構成によって、様々な程度の抗体活性損失が引き起こされることが、補償のために使用レベルがしばしば調整されることが、当業者には理解される。

【0211】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な分散性粉末および顆粒は、分散または湿潤剤、懸濁剤、および1つ以上の保存剤との混合物中で活性化合物を提供する。好適な分散もしくは湿潤剤、および懸濁剤は、既に上で言及されたものによって例証される。

【0212】

ある特定の態様では、これらの製剤中のospA濃度は広く、例えば約0.5重量%未満から、通常約1重量%または少なくとも約1重量%から15または20重量%まで変動し、主に液量、粘度等に基づき、選択される特定の投与方法に従って選択される。したがって、例えば、限定はされないが、非経口注射のための典型的な薬学的組成物は、1mlの滅菌緩衝水、および50mgの血液凝固因子を含有するように構成される。静脈内注入のための典型的な組成物は、250mlの滅菌Ringer溶液、および150mgの血液凝固因子を含有するように構成することができる。非経口投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に知られているか、または明らかであり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)により詳細に記載される。有効投薬量は、通常、1回の投与につき、体重1kg当たり0.01mg~1000mgの範囲内にある。

【0213】

様々な態様では、薬学的組成物は滅菌された注射可能な水性、油性懸濁液、分散物、または滅菌された注射可能な溶液もしくは分散物の即時調製のための滅菌粉末の形態である。懸濁液は、いくつかの態様では、周知の技術に従い、上記で言及されているそれらの好

適な分散または湿潤剤および懸濁剤を用いて、製剤化される。滅菌された注射可能な調製物は、ある特定の態様では、無毒の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌された注射可能な溶液もしくは懸濁液、例えば 1, 3 - ブタンジオール中の溶液である。いくつかの実施形態では、担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、それらの好適な混合物、植物油、Ringer 溶液、および等張塩化ナトリウム溶液を含有する、溶媒または分散媒である。加えて、滅菌された固定油は、従来溶媒または懸濁媒として使用される。この目的のために、様々な態様では、合成モノまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激固定油が使用される。加えて、オレイン酸等の脂肪酸は、注射液の調製において用途が見い出される。

10

【0214】

全ての場合において、形態は滅菌されなくてはならず、容易に注入できる程度まで流動性がなければならない。適正な流動性は、例えば、コーティング、例えばレシチンの使用により、分散物の場合は要求される粒径を維持することにより、および界面活性剤を使用することにより、維持される。これは、製造および保管の条件下で安定でなければならず、微生物、例えば細菌および真菌の混入作用に対して保護されなければならない。微生物の作用の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によりもたらされる。多くの場合、等張作用物質、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが望ましい。ある特定の態様では、注射可能な組成物の長期吸収は、組成物における吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によりもたらされる。

20

【0215】

投与に有用な組成物は、ある特定の態様では、それらの有効性を増加させるための取込みまたは吸収エンハンサーと共に製剤化される。そのようなエンハンサーとしては、例えば、サリチレート、グリココレート/リノレート、グリコレート、アプロチニン、バシトラシン、SDS、カブラート等が挙げられる。例えば、Fix (J. Pharm. Sci., 85: 1282 - 1285, 1996) および Oliyali et al. (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 521 - 544, 1993) を参照されたい。

【0216】

加えて、本発明の化合物および方法において使用される組成物の親水性および疎水性の特性はうまくバランスがとられ、それによって、インビトロ、およびとりわけインビボでの使用の両方にするそれらの有用性が増強され、そのようなバランスを欠く他の組成物は、実質的には有用性が低くなる。特定的には、本発明の組成物は、水性培地中で適切な溶解度を有し、これにより、体内での吸収およびバイオアベイラビリティを可能にし、同時に脂質中である程度の溶解度を有し、これによって化合物は、細胞膜を横切り、推定上の作用部位まで移動することができる。

30

【0217】

具体的な態様では、本明細書に記載される O s p A ポリペプチドは、アジュバントを含むワクチン組成物中で製剤化される。当該技術分野で知られている任意のアジュバントは、ワクチン組成物の様々な態様で使用され、例えば、油系アジュバント、例えば Freund 完全アジュバントおよび Freund 不完全アジュバント、ミコレート系アジュバント（例えば、トレハロースジミコール酸）、細菌リポ多糖（LPS）、ペプチドグリカン（すなわち、ムレイン、ムコペプチド、もしくは糖タンパク質、例えば N - Opaca、ムラミルジペプチド [MDP]、もしくは MDP 類似体）、プロテオグリカン（例えば、肺炎桿菌 (Klebsiella pneumoniae) から抽出）、連鎖球菌調製物（例えば、OK432）、Biosstim（商標）（例えば、01K2）、EP109942号、EP180564号およびEP231039号の「Iscoms」、水酸化アルミニウム、サポニン、DEAE - デキストラン、中性油（例えばミグリオール）、植物油（例えば落花生油）、リボソーム、ブルロニック（登録商標）ポリオール、Rib

40

50

i アジュバント系（例えば G B - A - 2 1 8 9 1 4 1 を参照されたい）、またはインターロイキン、特に細胞免疫を刺激するものが挙げられる。放線菌目内の細菌属であるアミコラ - タ (A m y c o l a t a) の抽出物からなる代替的なアジュバントが、米国特許第 4 , 8 7 7 , 6 1 2 号において記載されている。さらに、専売アジュバント混合物が市販されている。使用されるアジュバントは、一部分において、レシビエント対象に依存する。投与するアジュバントの量は、対象の種類および寸法に依存する。最適な投薬量は、日常的な方法により容易に決定される。

【 0 2 1 8 】

ワクチン組成物は、任意で、薬学的ビヒクル、賦形剤、または媒質として機能する、ワクチン適合性の薬学的に許容される（すなわち、滅菌および無毒の）液体、半固体、または固体希釈剤を含む。当該技術分野で知られている任意の希釈剤が使用される。例示的な希釈剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ステアリン酸マグネシウム、メチルおよびプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、アルギナート、デンプン、ラクトース、スクロース、デキストロース、ソルビトール、マンニトール、アカシアゴム、リン酸カルシウム、鉱物油、カカオバター、ならびにカカオ脂が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 2 1 9 】

ワクチン組成物は、送達に好都合な形態にパッケージされる。組成物は、カプセル、カプレット、サシェ、カシエ、ゼラチン、紙、または他の容器内に封入される。これらの送達形態は、免疫原性組成物のレシビエント生物への進入と適合する場合、特に、免疫原性組成物が単位用量形態で送達される場合に好ましい。投薬量単位が、例えば、錠剤、カプセル、坐剤、バイアル、またはカシエ中にパッケージされる。

20

【 0 2 2 0 】

本発明は、対象において免疫学的応答を誘導するための方法を含み、哺乳類宿主における O s p A 抗体を含む、本明細書に記載される O s p A 組成物の有効量を投与することを含む。同様に、本発明は、対象においてボレリア感染またはライム病を防止または治療するための方法を含み、方法は、本明細書に記載されるワクチン組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。

【 0 2 2 1 】

ワクチン組成物は、本明細書で詳細に上述される任意の従来の方法により免疫化される対象に導入される。ある特定の態様では、組成物は、単回用量または複数回用量で、一定の期間にわたり投与される（下記でより詳細に記載される）。いくつかの態様では、「用量」および「単位用量」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

30

免疫学的応答を誘導するためのキメラ O s p A 組成物の投与 / 方法

【 0 2 2 2 】

投与される免疫原性組成物またはワクチン組成物の有用な投薬量は、薬物の作用を調節する様々な因子、例えば、対象の年齢、状態、体重、性別、および食餌、全ての感染の重症度、投与時間、投与方法、ならびに他の臨床学的因子によって変動する。

【 0 2 2 3 】

いくつかの態様では、本発明の製剤または組成物は、最初のブースター、続いて一定期間が経過した後に、ブースター送達により投与される。ブースター免疫化（または「ブースター」）は、いくつかの態様では、細菌に対する防御のために高力価の循環抗体を達成するのに重要である。いくつかの態様では、本発明の組成物は、ボレリア抗体産生を増加させて、対象の幾何平均力価（G M T）レベルを増加させるのに有効な用量または単位用量で製剤化される。いくつかの態様では、G M T レベルは、初回投薬の約 6 0 日後に、約 1 , 0 0 0 ~ 約 1 0 , 0 0 0 のレベルに増加する。さらなる態様では、G M T レベルは、初回投薬の約 9 0 日後に、約 2 , 0 0 0 ~ 約 3 0 , 0 0 0 のレベルに増加する。なおもさらなる態様では、G M T レベルは、ブースター投与後に、より高いレベルに増加する。例えば、G M T レベルは、ブースター投与後に約 1 5 , 0 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0 のレベルに増加した。ある特定の態様では、G M T レベルは、ブースター投与後に 5 0 , 0 0 0 を超えて

40

50

増加した。ある特定の態様では、本発明の製剤は、最初のボーラス、続いて製剤の治療的循環レベルを維持する連続注入により、投与される。具体的な態様では、本発明の免疫原性組成物またはワクチン組成物は、様々な期間後、ワクチン接種スキームで投与される。いくつかの態様では、ワクチン接種は、ボレリア感染の傾向のある地域への旅行者のための迅速免疫化スキームで送達される。別の例として、本発明の組成物または製剤は、1回限りの用量として投与される。当業者は容易に、適正な医療行為および個々の対象の臨床状態により決定される有効投薬量および投与レジメンを最適化する。投薬の頻度は、作用物質の薬物動態パラメータおよび投与経路に依存する。

【0224】

薬学的製剤は、当業者により、投与経路および所望の投薬量によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435 - 1712を参照されたく、この開示は、参照により本明細書に組み込まれる。そのような製剤は、場合によっては、投与される組成物の物理的状态、安定性、インピボでの放出速度、インピボでのクリアランス速度に影響する。投与経路によって、好適な用量が、具体的な態様では、体重、体表面積、または器官寸法に従い計算される。いくつかの態様では、適切な投薬量は、適切な用量応答データと共に血液レベル投薬量を決定するための確立されたアッセイを使用することより確認される。ある特定の態様では、個体の抗体力価が、最適投薬量および投与レジメンを決定するために測定される。最終的な投薬レジメンは、主治医または医者により、薬学的組成物の作用を修正する様々な因子、例えば組成物の特異的活性、対象の応答性、対象の年齢、状態、体重、性別、および食餌、全ての感染または悪性状態の重症度、投与時間、ならびに他の臨床学的因子を考慮して決定される。研究が実施されるにつれ、さらなる情報が、関連状態の防止および/または治療のための適切な投薬量レベルおよび治療期間に関して現れてくるであろう。

【0225】

ある特定の態様では、OspA免疫原性またはワクチン組成物は、対象において免疫応答を誘起するのに十分な、任意の用量のOspA核酸分子(複数可)またはポリペプチド(複数可)を含む。治療的に使用されるOspA免疫原性またはワクチン組成物の有効量は、例えば、治療背景および目的に依存する。当業者であれば、よって、ワクチン接種または治療に対する適切な投薬量レベルは、一部には、送達される分子、OspA分子(複数可)が使用される適応、投与経路、ならびに患者の寸法(体重、体表面、または器官寸法)および状態(年齢および全体的な健康)によって変動することを認識するであろう。したがって、臨床医は、いくつかの事例では、投薬量を滴定し、投与経路を修正して、最適治療効果が得られるようにする。

【0226】

典型的な投薬量は、様々な態様では、上記の因子によって、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg 以上の範囲である。他の実施形態では、投薬量は、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg ; または1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg ; または5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg の範囲とすることができる。例として、本発明において有用なOspAポリペプチドの用量は、約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、190 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、210 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、220 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、230 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、260 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、270 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、340 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、360 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、380 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、420 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、440 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、460 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、480 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、520 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、540 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、580 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6

00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、620 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、640 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。より具体的な態様では、典型的な用量は、1対象当たり0.1～5.0 ml を含む。より具体的な態様では、典型的な用量は、1対象当たり0.2～2.0 ml を含む。ある特定の態様では、用量は1対象当たり0.5～1.0 ml を含む。

【0227】

より具体的な態様では、対象に投与される用量または単位用量は、約10 μg 、約20 μg 、約30 μg 、約40 μg 、約50 μg 、約60 μg 、約70 μg 、約80 μg 、約90 μg 、または約100 μg である。したがって、OspAキメラポリペプチドを含む組成物および製剤は、このような用量を対象に容易に投与するために設計される。さらに具体的な態様では、対象につき投与される用量または単位用量は、1回投与されるか、または約1か月に1回、2か月以上投与され、次いで、任意にブースターが行われる。いくつかの態様では、ブースターは、初回単位用量または初回複数回単位用量の約2か月、約3か月、約4か月、約5か月、約6か月、約7か月、約8か月、約10か月、約11か月、約12か月後に、投与される。いくつかの態様では、ブースターは、防御的免疫を提供するために、約1年に1回、または約2もしくは3もしくは4もしくは5もしくは6もしくは7もしくは8もしくは9年に1回投与される。

10

【0228】

投薬回数は、使用される製剤中のOspA分子の薬物動態パラメータに依存する。典型的には、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで組成物を投与する。したがって、組成物は、様々な態様では、単回投与として、または経時的に2回以上の投与（同じ量の所望の分子を含有するか、または含有しなくてもよい）として、または移植装置もしくはカテーテルを介する連続注入として、投与される。適切な投薬量のさらなる精密化は、日常的に当業者によりなされ、彼等が日常的に実施する業務の範囲内にある。適切な投薬量はしばしば、日常的に入手される適切な用量応答データの使用により確認される。

20

【0229】

キット

追加の態様として、本発明は、対象への投与のための使用を容易にするようにパッケージされた、対象にOspAポリペプチド（複数可）を投与するための1つ以上の薬学的製剤を含むキットを含む。

30

【0230】

特定の実施形態では、本発明は単回用量投与単位を生成させるためのキットを含む。キットは、様々な態様では、それぞれが、乾燥タンパク質を有する第1の容器および水性製剤を有する第2の容器の両方を含む。単一および複数のチャンバを有する予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（*lysyringe*））を含むキットもまた、本発明の範囲に含まれる。

【0231】

別の実施形態では、そのようなキットは、密閉ボトルまたはベッセル等の容器にパッケージされた本明細書に記載される薬学的製剤（例えば、治療タンパク質またはペプチドを含む組成物）を、容器に添付されるかまたはパッケージに含まれる、方法を実施する際の化合物または組成物の使用を記載するラベルと共に含む。1つの実施形態では、薬学的製剤は容器内のヘッドスペースの量（例えば、液体製剤と容器の上面との間の空気量）が非常に小さくなるように容器にパッケージされる。好ましくは、ヘッドスペースの量は無視できる（すなわち、ほとんどない）。

40

【0232】

1つの態様では、キットは、治療タンパク質またはペプチド組成物を有する第1の容器および組成物のための生理学的に許容される再構成溶液を有する第2の容器を含む。1つの態様では、薬学的製剤は、単位剤形でパッケージされる。キットは、任意で、特定の投与経路に従って薬学的製剤を投与するのに好適な装置をさらに含む。いくつかの態様では、キットは、薬学的製剤の使用を説明するラベルを含む。

50

【 0 2 3 3 】

本明細書に引用される各出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は、本開示と矛盾することのない程度に、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 2 3 4 】

本明細書に記載される実施例および実施形態は、例示目的のためのものにすぎず、これらを考慮すると様々な改変および変更が、当業者に示唆され、それらは本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲に含まれることは理解される。本明細書に引用される出版物、特許、特許出願は全て、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 実施例 】

10

【 0 2 3 5 】

本発明の追加の態様および詳細は、下記実施例から明らかになるであろう。これらの実施例は、制限するものではなく、むしろ例示であることが意図される。

【 0 2 3 6 】

実施例 1 :OSPA ワクチン製剤の決定のための欧州広義のボレリアブルグドルフェリ株由来の OSPA の配列分析 (分子疫学)

この研究の目的は、欧州用のライム病 O s p A ワクチンのための好適な製剤を決定することがであった。研究は、広義の B . ブルグドルフェリの大きく多様な株コレクション由来の O s p A 遺伝子の配列分析 (分子疫学) に基づいたものであり、これは、十分に欧州の広い地理的カバレッジ、疾患と関連する様々な臨床症候群、およびライム病と関連する 3 つ病原性遺伝種 (B . アフゼリ、 B . ガリニ、および狭義の B . ブルグドルフェリ) を代表する。ライム病は、広義のボレリアブルグドルフェリにより引き起こされ、これは、総計 13 遺伝種を含み、そのうちの 3 つ (B . アフゼリ、 B . ガリニ、および狭義の B . ブルグドルフェリ) がヒトにおいて病原体であると認識されている。

20

【 0 2 3 7 】

最初に、大規模な疫学研究 (下記表 3 を参照されたい) を実施し、欧州の 21 か国からのライム病患者由来 (およびマダニ由来) の広義のボレリアブルグドルフェリ株を評価した。16 の欧州国から収集した総計 553 の欧州ボレリア分離株を研究した。それぞれの種を、それぞれの種の 16 s r R N A 遺伝子に特異的なプライマーセットを使用して、P C R により判別した。

30

【 0 2 3 8 】

欧州においてヒトライム病を引き起こすことが知られている 3 つのボレリア種のそれぞれに由来する分離株が、十分に表された: B . アフゼリ (n = 309、55.9%)、狭義の B . ブルグドルフェリ (n = 67、12.1%)、および B . ガリニ (n = 173、31.3%)。359 のヒト分離株のうち、56.8% が B . アフゼリであり、B . アフゼリは、ほとんどの場所においてヒト分離株から判別された主な種であった。同様に、B . アフゼリは、54.1% のマダニ分離株から単離された。狭義の B . ブルグドルフェリは、11.7% のヒト株および 12.9% のマダニ分離株から単離された。狭義の B . ブルグドルフェリは、東南欧州、特にイタリア、ハンガリー、スロベニア、およびオーストリア由来のヒト分離株から単離された。B . ガリニ株は、30.4% のヒト分離株から単離され、マダニ分離株の 33% を占めた。ヒトおよびマダニから単離された B . ガリニ株は、欧州全体の地理的領域のほとんどから得られた。この研究からのデータは他の欧州研究から示されたデータとよく相関し、研究した分離株のコレクションは、欧州におけるライム病の正確な状況を表すことが示唆される。

40

【 0 2 3 9 】

欧州に対する最適ワクチン製剤を決定するために O s p A 配列決定を実施した。このデータに基づき、O s p A 型 1 ~ 6 を含むワクチンは、98.1% の株および 96.7% の侵襲性疾患症例をカバーする。欧州ボレリア分離株の疫学調査結果は、O s p A 型 1、2、3、4、5 および 6 に基づくワクチンは、98% のライム病および 96.7% の侵襲性

50

神経ボレリア症分離株の欧州での理論的カバレッジを提供することを示す。

【表 3】

【表 3】

疫学研究の結果

OspA 型	ヒト分離株	侵襲性疾患症例 由来の分離株	ワクチンカバレ ッジ総計 ¹	侵襲性疾患のワ クチンカバレッ ジ ²
<i>B. アフゼリ</i> 型 2	56.8% (204)	3% (7)	56.8 %	11.7%
狭義の <i>B.b</i> 型 1	11.7% (42)	17% (7)	68.5%	23.3%
<i>B. ガリニ</i> 型 6	15.9% (57)	40% (23)	84.4%	61.7%
<i>B. ガリニ</i> 型 5	7.2% (26)	35% (9)	91.6%	76.7%
<i>B. ガリニ</i> 型 4	4.5% (16)	44% (7)	96.1%	88.3%
<i>B. ガリニ</i> 型 3	2.0% (7)	71% (5)	98.1%	96.7%
<i>B. ガリニ</i> 型 7	0.8% (3)	67% (2)	98.9%	100%
<i>B. スピエルマニ イ</i>	1.1% (4)	0%	100%	

10

20

30

40

50

¹ 分離株の数に基づく予測ワクチンカバレッジ；総計は累積である。

² 神経ボレリア症の症例に由来する予測ワクチンカバレッジ；総計は累積である。

³ 血清型 4 は、代替的にボレリアパバリエンシスと見なされる。（Margos et al.（同上）を参照されたい）。

【0240】

したがって、それぞれ 2 つの OspA 血清型を表す、3 つの新規組換え OspA（1 / 2、6 / 4、および 5 / 3）を含むワクチンは、欧州のライムボレリア症と関連する 6 つの流行性 OspA 血清型（1 ~ 6）全てに対する、および米国のライムボレリア症に関連する単一の OspA 血清型に対する防御に必要な主構造要素を保持する。

【0241】

B. ガリニ OspA 血清型 5 および 3 を表す OspA 5 / 3 構築物の包含（OspA 血清型 1 / 2 および 6 / 4 と共に）は、98.1% の疾患および 96.7% の侵襲性分離株に対し防御するはずである。OspA 5 / 3 を含まないワクチンは、約 88.9% のみの疾患、約 73.4% のみの侵襲性疾患に対し防御することが予測される。したがって、6 つ全ての血清型を含むワクチンは、4 つの血清型しか有さないワクチンよりもライム病防止においてより有効である。

【0242】

実施例 2：

脂質付加された OSP A をコードする合成 OSP A 遺伝子の構築のための戦略

この研究の目的は、レシピエントをこれらのいくつかのボレリア株のいずれかにより引き起こされるライム病から防御するワクチンを製造するために、ボレリアのいくつかの株

から脂質付加された O s p A キメラ構築物を調製することであった。一般的な戦略を図 1 にまとめて示し、下記で説明する。

【0243】

各新規 O s p A 遺伝子に対し、4つの組の 30 - 60 塩基のオリゴヌクレオチドを合成した。各オリゴヌクレオチドは、8 ~ 12 の相補的なオーバーラップオリゴヌクレオチドからなった。各組からのオリゴヌクレオチドを、別々の実験で、共にアニールさせ、いずれかの端に特異的な制限酵素認識部位を有する二本鎖 DNA フラグメント、すなわちフラグメント N - H (N d e I - H i n d I I I)、H - K (H i n d I I I - K p n I)、K - E (K p n I - E c o R I)、および E - B (E c o R I - B a m H I) を生成させた。4つのフラグメントの各々を、独立して p U C 18 にクローニングし、対応する制限酵素で切断し、大腸菌宿主 D H 5 中に形質転換させ、その後、クローニングされたフラグメントの配列を確認した。

10

【0244】

大腸菌株 D H 5 [遺伝子型 : e n d A 1 h s d R 17 (r_K⁻ m_K⁺) s u p E 44 t h i - 1 r e c A 1 g y r A (N a l^r) r e l A 1 (l a c Z Y A - a r g F) U 169 d e o R (80 d l a c (l a c Z) M 15] (G i b c o B R L) を、全ての中間クローニングステップに対して使用した。この株は、遺伝子工学において最も広く使用される宿主の1つである大腸菌株 K 12 に由来する。この株は、アンピシリン耐性遺伝子 (a m p) を含有するベクターを有する形質転換体の選択を可能にする a m p^r である。大腸菌 H M S 174 (D E 3) を発現のための宿主として選択した。大腸菌 H M S 174 (D E 3) 宿主細胞 [遺伝子型 : F - r e c A 1 h s d R (r_K₁₂⁻ m_K₁₂⁺) R i f^R (D E 3)] (N o v a g e n) を、最終クローニングステップのために使用した。この株は、カナマイシン耐性遺伝子 (k a n) を含有するベクターを有する形質転換体の選択を可能にする k a n^r である。

20

【0245】

p U C 18 (G i b c o B R L , B a s e l , S w i t z e r l a n d) を全ての中間ステップのためのクローニングベクターとして使用したが、これは、遺伝子操作および配列決定が、このプラスミドを用いた場合に p E T 30 a よりも容易であったからである。主要特徴は、特に、塩基対 149 ~ 469 の L a c Z ペプチドをコードする l a c Z 遺伝子フラグメント (塩基対 507 での l a c プロモーター)、塩基対 1629 ~ 2486 のアンピシリン耐性決定基をコードする b l a 遺伝子 (塩基対 2521 での b l a プロモーター)、塩基対 867 での複製開始点、および塩基対 185 ~ 451 の複数のクローニング部位である (図 12)。

30

【0246】

p E T 30 a (N o v a g e n) を、最終の完全 O s p A 遺伝子インサートのための発現ベクターとして使用した。p E T ベクターでは、遺伝子は、T7 プロモーターの制御下でクローニングされ、発現は宿主細胞に T7 R N A ポリメラーゼ源を提供することにより誘導される (T7 R N A ポリメラーゼ源が供給されるまで発現は起こらない)。主要特徴は、塩基対 4048 ~ 4860 でのカナマイシン耐性をコードする遺伝子 (k a n)、826 - 1905 の l a c I 遺伝子塩基対、塩基対 4956 - 5411 での F 1 複製開始点、および塩基対 158 ~ 346 の複数のクローニング部位である (図 13)。

40

【0247】

全長 O s p A 遺伝子を作製するために必要とされる4つのフラグメントを DNA ミニプレップから切除した。DNA を、オリジナルクローニングステップのために使用された同じ制限酵素を使用して4つのクローンの各々から単離した。DNA フラグメントを精製し、N d e I および B a m H I で切断した p U C 18 DNA と共に連結し、大腸菌 D H 5 コンピテント細胞に形質転換した。p U C 18 でクローニングさせた全長 O s p A 遺伝子を配列決定し、このステップで誤差が導入されていないことを確認した。

【0248】

O s p A 遺伝子をその後、制限酵素 N d e I および B a m H I を用いて p E T - 3

50

0 a 発現ベクターにサブクローニングし、大腸菌宿主HMS 174 (DE3) に形質転換させた。pET30aベクターでは、OspA遺伝子は、バクテリオファージT7プロモーターにより制御される。

【0249】

3つの合成OspA遺伝子を、ボレリアの血清型1および2のOspA (lipB s OspA 1 / 2²⁵¹)、血清型6および4のOspA (lipB s OspA 6 / 4)、ならびに血清型5および3のOspA (lipB s OspA 5 / 3)由来の防御エпитープを有するOspA分子をコードするように設計した。これらの分子の一次アミノ酸配列(それぞれ、配列番号2、4、および6)を、図2～8に示し、それらの設計に組み込まれた主特徴の詳細な説明と共に、本明細書で説明する。

10

【0250】

lipB s OspA 1 / 2構築物に対するオリゴヌクレオチドは、社内でABI 394 DNA / RNA合成機において合成した。lipB s OspA 5 / 3およびlipB s OspA 6 / 4構築物に対するオリゴヌクレオチドは、GenXpress (Wiener Neudorf、オーストリア)から購入し、HPLC精製した。

【表 4 - 1】

【表 4】 l i p B s O s p A 1 / 2 * 遺伝子フラグメントに対するオリゴヌクレオチド

名称	配列(5'-3')	L	S	配列番号
<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I フラグメント				
NH1	TAATGCGTCTGTGATCGGCTTTGCTCTGGCGCTGGCTCTGATCGG	45	C	59
NH2	CTGCGCACAGAAAGGTGCTGAGTCTATTTGGTTTCGTTCTGTAGATCTGC	50	C	60
NH3	CCGGTGAATGAAAGGTTCTGGTGAGCAAGAAAAAGACAAAGAACGGCAAG	50	C	61
NH4	TACGATCTCATCGCAACCGTCGACAAAGCTGGAGCTGAAAGGTACTTCTGA	50	C	62
NH5	TAAAAACAACGGCTCTGGTGTGAGGGCGTCAAAACTAACAAAGAGCAAAAGTAA	56	C	63
NH6	AGCTTTACTTTGCTCTTGTAGTTTGTAGCGCCTCCAGCA	40	C'	64
NH7	CACCAGAGCCGTTGTTTATCAGAAAGTACTGCTAGCTCCAGCTTGTCG	50	C'	65
NH8	ACGGTTGGATGAGATCGTACTTGGCGTCTTGTCTTCTTGTCTCAC	50	C'	66
NH9	CAGAACCTTCATTTCAACCGGGCAGATCTACAGAAACGGAACCAATAGACT	50	C'	67
NH10	CAGACCTTCTGTGCGCAGCCGATCAGAGCCAGAGCAAGCCGATCAACAGACGCA	63	C'	68
<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I フラグメント				
HK1	AGCTTACGATCTCTGACGATCTGGTCAGACCAC	34	C	69
HK2	GCTGGAAGTTTCAAAGAGGATGGCAAGACCCCTCGTGTCCAAAAAAGTAA	50	C	70
HK3	CTTCCAAAGACAAGTCTCTACGGAAGAAAAATCAACGAAAAAAGGTGAG	50	C	71
HK4	GTGCTGAAAAGATCATCACCATGGCAGACGGCACCCGTC	40	C	72
HK5	TTGAATACACCGGTATTAAGCGATGGTAC	31	C	73
HK6	CATCGCTTTAATACCGGTGTTATCAAGACGGGTGCGCTGCCCATG	47	C'	74
HK7	GTGATGATCTTTTCAGACACCTCACCTTTTCGTGTAATTTTCTTCCGT	50	C'	75
HK8	AGAGGACTTGCTTTTGGAAAGTACTTTTGGACACGAGGGTCTTGCCAT	50	C'	76
HK9	CCTCTTTGAAAAACTTCCAGCGTGGTCTGACCGAGATCGTCAGAGATCGTA	40	C'	77
<i>Kpn</i> I - <i>Eco</i> RI フラグメント				
KE1	CGGTAAAGCGAAATAGTTTCTGAAAAAATCTCACTCTGGA	39	C	78
KE2	AGGCAAGTGGTAATGATAAAACCACCTTGGAAAGTCAAGGAAGGCACCG	50	C	79
KE3	TTACTCTGAGCATGAATATCTCCAAATCTGGTGAAGTTTCCGTTGAACGTG	50	C	80
KE4	AACGACACTGACAGACGGCTGCGACTAAAAAACTGCACGCTGG	45	C	81
KE5	AATCCACGCTGCAGTTTCTTTTAGTCGCA	29	C'	82
KE6	GCGCTGCTGTCAGTGTCTGTCAGTTCACACGGAAAACTTCAACAGATTGGA	50	C'	83
KE7	GATATTCATGCTCAGAGTAAACGGTGCCTTCTTGAATCCCAAGGTGGTTT	50	C'	84
KE8	TATCATTAGCCACTTTGCCTTCCAGAGTGAAGTTTTCAGAACATATTCGCTTTACCGGTAC	63	C'	85
<i>Eco</i> RI - <i>Bam</i> HI フラグメント				

10

20

30

40

【表 4 - 2】

EB1	AAATCCAAAACTTCTACTTTTAACCAATTAGCGTTAACAGCAAAAAA	45	C	86
EB2	ACTACCCAGCTGGTGTTCACATAAACAAGACACGATCACTGTGCAGAAATA	50	C	87
EB3	CGACTCCAACGGCACCAACTTAGAAGGCACGGCAGTCGAAAAATAAAACCC	50	C	88
EB4	TTGATGAACTGAAAAACGCGCTGAAATAAAGCTGAGCG	40	C	89
EB5	GATCCGCTCAGCTTAATTCAGCGCGTTTTCAGTTCATCAAGGGTTTTTAATTTCGACTGCC	60	C'	90
EB6	GTGCCTTCTAAGTTGGTGCCGTTGGAGTCGTATTTCTGACACAGTGATCGT	50	C'	91
EB7	GTCTTGTTTAGTGAACACCAGCTGGGTAGTTTTTTTGCTGTTAACGCTAA	50	C'	92
EB8	TGGTTAAAGTAGAAGTTTTGG	21	C'	93

* 単一のアミノ酸変化をPCRにより導入し、lipB sos pA 1／2は、変化を導入する前の構築物の名称であり、lipB sos pA 1／2⁵¹は変化を導入した後の名称である。
L 塩基のオリゴヌクレオチド長
S 鎖、C（コーディング）または相補的な（C'）

【表 5 - 1】

【表 5】 l i p B s O s p A 5 / 3 遺伝子フラグメントに対するオリゴヌクレオチド

名称	配列(5'-3')	L	S	配列番号
<i>Nde I</i> - <i>Hin dIII</i> フラグメント				
N51	TAATGCGTCTGTTGATCGGCTTTGCTTTGGCGCTGGCTTTAAATCGGCTG	48	C	94
N52	TGCACAGAAAGGTGCTGAGTCTAATGGTTCCGTTTCTGTAGATCTGCCCG	50	C	95
N53	GGGGTATGAAAGTTCTGTAAAGCAAAAGAAAAAGACAAAAACGGTAAATAC	50	C	96
N54	AGCTGATGGCAACCGTAGAAAAAGCTGGAGCTTAAAGGCACTTCTGATAA	50	C	97
N55	AAACAACGGTTCTGGCACCCCTGGAAAGGTGAAAAAACTAACAAAAAGCAAAAGTAA	53	C	98
N56	AGCTTTACTTTTGTCTTTTGTAGTTTTTTCACCTTCCA	37	C'	99
N57	GGGTGCCAGAACCGTTGTTTTTATCAGAAAGTGCCCTTTAAGCTCCAGCTTT	50	C'	100
N58	TCTACGGTTGCCATCAGGCTGTATTTACCGTTTTTGTCTTTTCTTTGCT	50	C'	101
N59	TACCAGAACTTTCATACCCCCGGGCAGATCTACAGAAACGGAACCAATAG	50	C'	102
N510	ACTCAGCACCTTTCTGTGCACAGCCGATTA	30	C'	103
N511	AAGCCAGCGCCAAAGCAAGCCGATCAACAGACGCA	36	C'	104

10

20

30

40

【表 5 - 2】

<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I フラグメント		47	C	105
H51	AGCTTACTATTGCTGAGGATCTGAGCAAAACACCTTTGAAATCTTC	50	C	106
H52	AAAGAAAGATGGCAAAACTCTGGTATCTAAAAAGTAAACCTTGAAAGACAA	40	C	107
H53	GTCTTCTACCGAAGAAAAATTCAACGAAAGGGTGAATC	32	C	108
H54	TCGAAAAAACTATCGTAATGCGCAATGGTAC	33	C'	109
H55	AAGGTGGTTTGTCTCAGATCCTCAGCAATAGTA	30	C'	110
H56	AGAGTTTGGCACTCTCTTTGAAGATTTCA	50	C'	111
H57	ATTTTCTTCGGTAGAAGACTTGCTTTTCAGGGTTACTTTTTCAGATACC	48	C'	112
H58	CAITTGCCATACGATAGTTTTCAGAGATTTACCCCTTTTCGTTGA			
<i>Kpn</i> I - <i>Eco</i> R I フラグメント		48	C	113
K51	CCGTCTGGAATACACCGACATCAAAAGCGATAAAACCGGCAAAAGCTAA	50	C	114
K52	ATACGTTCTGAAAGACTTTTACTCTGGAAGGCAC'TCTGGCTGCTGACGGCA	50	C	115
K53	AAACCACTCTGAAAGTTACCGAAGGCAC'TGTACTCTGAGCAITGAACAT	50	C	116
K54	TCTAAATCCGGCGAAATCACCCGTTGCAC'TGGATGACACTGACTCTAGCGG	50	C	117
K55	CAATAAAAATCCGGCACCTGGGATTTCTGATACTTCTACTTTTAACCAITTA	31	C	118
K56	GCAAAACAGCCAGAAAACTAAACAGCTGGG	31	C'	119
K57	GCTTTTGATGTCGGTGTATTCCAGACGGGTAC	50	C'	120
K58	CCTTCCAGAGTAAAGTCTTTTCAGAACGTATTTAGCTTTGCCGGTTTATC	50	C'	121
K59	CAGTCCCTTCGGTAAC'TTTCAGAGTGGTTTGGCCGTCAGCAGCAGTG	50	C'	122
K510	CAGTGCAACGGTGATTTCCGCCGATTTAGAAATGTTCACTCAGAGTAA	50	C'	123
K511	TCAGAAATCCAGGTGCCGGATTTTATTTGCCGCTAGAGTCAGTGTCTATC	55	C'	124
K512	AATTCACAGCTGTTTAGTTTCTGGCTGTTTGTGCTAATGGTTAAAGTAGAAAGTA			
<i>Eco</i> R I - <i>Bam</i> H I フラグメント				
E51	AATTCAAACAGCTGGTATTACCAAAAGAAAAACATAICACCGTAC	45	C	125
E52	AGAACTATAAACCGTGCAGGCAATGCGCTGGAAGGCAGCCC	40	C	126
E53	GGCTGAATTAATAAGATCTGGCAGAGCTGAAAGCCGCTTTGAAATAAGCTGAGCG	54	C	127
E54	GATCCGCTCAGCTTATTTCAAAGCGGCT	28	C'	128
E55	TTCAAGCTCTGCCAGATCTTTTAATTTCAGCCGGGCTGCCCTCCAGCGCAT	50	C'	129
E56	GCCTGCACGGTTATAGTTCTCTGTACGGTGATAGTGTCTTTCTTTGGTGAATACCAAGCTGTTTG			

L 塩基のオリゴヌクレオチド長

S 鎖、C (コーディング) または相補的な (C')

10

20

30

40

【表 6 - 1】

【表 6】 l i p B s O s p A 6 / 4 遺伝子フラグメントのオリゴヌクレオチド

名称	配列(5'-3')	L	S	配列番号
<i>Nde I</i> - <i>Hin</i> dIII フラグメント				
KNH1	TATGCGTCTGTTGATCGGCTTTGCTCTGGCGCTGGCTCTGATCGGCTG			131
KNH2	CGCACAGAAAGGTGCTGAGTCTATTGTTCCGTTTCTGTAGATCTGCCCG	48	C	132
KNH3	GTGGCATGACCGTTCTGGTCAGCAAGAAAAAGACAAAAACG	50	C	133
KNH4	GTAAATACAGCCTCGAGGCGACCGTCGACA	42	C	134
KNH5	AGCTTGTGACGGTTCGCTCGAGGCTGATTTACCGTTTTTGTCTTTTGTGCT	30	C	135
KNH6	GACCAGAACGGTTCATGCCACCGGGCAGATCTACAGAAACG	56	C'	136
KNH7	GAACCAATAGACTCAGCACCTTTCTGTGGCAGCGCATCAGAGCCAGCGC	40	C'	137
KNH8	CAGAGCAAGCCGATCAACAGACGCA	50	C'	138
<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I フラグメント				
KHK1	AGCTTGAGTGAAAGGCACCTCTGTGATAAAACAAACGGTTCGGGACCCCTG	50	C	139
KHK2	GAAGGTGAAAAAATAACAAAGCAAAAGTGAAGTGAACCATTTGCTGAT	48	C	140
KHK3	GACCTCAGCCAGACCAATTCGAAATTTTCAAGAAAGATGCCAAAAACCTT	50	C	C
KHK4	AGTATCCAAAAAAGTGACCCCTGAAAGACAAAGTCTCTACCCGAAGAAAAAT	50	C	142
KHK5	TCAAAGAAAGGGTGAAACCTCTGAAAAAACCATCGTAATGGCAATGGTAC	52	C	143
KHK7	CATTGGCAATACGAAGGTTTTTTCAGA	28	C'	144
KHK8	GGTTTCACCCCTTTTCGTGAATTTTCTTCGGTAGAGGAC	40	C'	145
KHK9	TTGTCTTCAGGGTCACTTTTGGATACTAAGGTTTGGCAATCTTCTTT	50	C'	146
KHK10	GAAAAATTCGAATTTGGTCTGGCTGAGGTCAATCAGCAATGGTCAAGTTTCA	50	C'	147
KHK11	CTTTGCTTTTGTGTTAGTTTTTTCACCTTCAGGGTGCCGGA	40	C'	148
KHK12	ACCGTTGTTTTTATCAGAGGTGCTTTCAGCTCA	34	C'	149
<i>Kpn</i> I - <i>Eco</i> R I フラグメント				
KKE1	CCGTCGTGGAATACACCCGACATCAAAAGCGATGGCTCCGGCAAGCCAA	48	C	150
KKE2	ATACGTTCTGAAAGACTTCACCCCTGGAAGGCAACCCCTCGCTGCCGACGG	48	C	151
KKE3	CAAAACCACTTGAAAGTTACCGAAGGCACTGTGTTTAAAG	42	C	152
KKE4	CATGAACATCTTAAATCCGGTGAAATCACCGTTGCGCTG	40	C	153
KKE5	GATGACTCTGACACCACTCAGGCCACTAAAAAACCGGCAATGGGATTC	50	C	154
KKE6	TAACACTTCCACTCTGACCATCAGCGTG	28	C	155
KKE7	AATTCACGCTGATGCTCAGAGTGGAAGTGTAGAAATCCCATTTGCCG	47	C'	156
KKE8	GTTTTTTTAGTGGCTGAGTGGTGTGAGAGTCAATCCAGCGCAACGGTGAATTCAC	55	C'	157
KKE9	CGGATTTTAAAGATGTTCACTGCTTAAACAACAGTGCCTTCGGTAACTTTC	50	C'	158
KKE10	AAGGTGTTTTTGCCGTCGCGCAGCGAGGGTGCTTCCAGGG	40	C'	159
KKE11	TGAAGTCTTTTCAGAACGTATTTGGCTTTGCCGGAGCCATC	40	C'	160

10

20

30

40

【表 6 - 2】

KKE12	GCTTTTGAATGTCGGTGTATTCAGACGGGTAC	32	C'	161
<i>EcoR</i> I - <i>Bam</i> H I フラグメント				
KEB1	AATTCCAAAAAACTAAAAACATCGTGTTCACCAAAAGAACACCATCACCG			162
KEB2	TCCAGAAATACGACTCTGCGGGCACCAACCTCGAAAGGCAACGCAGTCGAA	52	C	163
KEB3	ATCAAAACCCCTGGATGAACGTGAAAAACGCTCTGAAATAAGCTGAGCG	50	C	164
KEB4	GATCCGCTCAGCTTATTCAGAGCGTTTTTCAGTTCATCCAGGGTTTTGATTT CGACTGCGTTGCCCTTCGA	47	C	165
KEB5	GGTTGGTGCCCGCAGAGTCGTATTTCTGGACGGTGATGGTGTCTTCTTTTG	71	C'	166
KEB6	GTGAACACGATGTTTTTAGTTTTTTTTTGG	50	C'	167

L塩基のオリゴヌクレオチド長
S鎖、C（コーディング）または相補的な（C'）

【0251】

大腸菌コンピテント細胞の調製。単一コロニーを使用して、5 ml 改変 LB 培養液（5 . 5 g NaCl、5 g 酵母抽出物、10 g 大豆ペプトン（動物または遺伝的に修飾され
た植物源から得たものではない）、水 1 リットル当たり）に播種した。培養物を濁るまで
インキュベートし、その後、培養物を予熱した改変 LB 培養液で希釈して、25 ml の体

積とした。培養物を、0.2～0.6のOD600nmに到達するまで(40～60分)さらにインキュベートし、希釈して125mlの体積とし、500mlのフラスコに移し、0.6のOD600nmに到達するまでインキュベートした。培養物を5分間、氷浴中で穏やかに振盪させることにより直ちに冷却し、細胞を直接ペレット化し(Beckman遠心機、4000rpmで10分間)、TfBI緩衝液(Teknova Hollister, CA)(30mM K-アセテート、50mM MnCl₂、100mM KCL、10mM CaCl₂、15%グリセロール)で注意深く洗浄し、5mlのTfBII(10mM Na-MOPS、75mM CaCl₂、10mM KCL、15%グリセロール)に再懸濁させ、氷上で15分間保持した。細胞をその後、ピペットで取って100μlアリコートとし、直接ドライアイス中で急速凍結させた。

10

【0252】

OspA遺伝子フラグメントを形成させるためのオリゴヌクレオチド混合物のアニールング(デノボ合成)。3つの合成OspA遺伝子を、血清型1および2のOspA(lipB sOspA 1/2)、血清型6および4のOspA(lipB sOspA 6/4)、ならびに血清型5および3のOspA(lipB sOspA 5/3)由来の防御エピトープを有するOspA分子をコードするように設計した。各新規OspA遺伝子(脂質付加)に対し、4つの組の30～60塩基対のオリゴヌクレオチドを合成した(表4～6を参照されたい)。図16～18は、公開された配列から予測されたヌクレオチド配列とアライメントした構築物の各々に対するコドン最適化配列を示す)。各オリゴヌクレオチドは、8～12の相補的なオーバーラップオリゴヌクレオチドからなった。各組からのオリゴヌクレオチドを、別々の実験で、共にアニールさせ、いずれかの端に特異的な制限酵素認識部位を有する二本鎖DNAフラグメント、すなわちフラグメントN-H(Nde I-Hind III)、H-K(Hind III-Kpn I)、K-E(Kpn I-EcoR I)、およびE-B(EcoR I-BamH I)を生成させた。

20

【0253】

凍結乾燥させたオリゴヌクレオチドを蒸留水で再構成させ、OD260nmを測定し、濃度を10μMに調節した。各OspAフラグメントに対し、2μlの各オリゴヌクレオチドを、1μlのT4ポリヌクレオチドキナーゼおよびT4 DNAリガーゼ緩衝液(10x)と共に混合し、混合物を室温で30分間インキュベートして、オリゴのリン酸化を可能にした(lipB sOspA 6/4構築物では、オリゴは既にリン酸化されていたため、このステップは省略された)。混合物を95℃まで1分間加熱し(変性ステップ)、その後、混合物を室温まで徐々に冷却させることによりオリゴをアニールさせた。アニールさせた混合物は、連結に直接使用したか、またはさらに必要とされるまで-20℃で保管した。

30

【0254】

OspA遺伝子フラグメントのクローニング。個々の合成OspA遺伝子を構築するのに必要とされる4つのフラグメントの各々を、独立してpUC18にクローニングし、大腸菌宿主DH5αに形質転換した(図1を参照されたい)。

【0255】

各新規OspA遺伝子に対し、4つの組の30～60塩基のオリゴヌクレオチドを合成した。各オリゴヌクレオチドは、8～12の相補的なオーバーラップオリゴヌクレオチドからなった。各組からのオリゴヌクレオチドを、別々の実験で、共にアニールさせ、いずれかの端に特異的な制限酵素認識部位を有する二本鎖DNAフラグメント、すなわち、フラグメントN-H(Nde I-Hind III)、H-K(Hind III-Kpn I)、K-E(Kpn I-EcoR I)、およびE-B(EcoR I-BamH I)を生成させた。4つの(4)フラグメントの各々を、独立して、対応する制限酵素で切断されたpUC18にクローニングし、大腸菌宿主DH5αに形質転換し、その後、クローニングされたフラグメントの配列を確認した。

40

【0256】

50

プラスミドDNA (pUC18) を、一晚、QIAGEN プラスミド精製系を用いて、製造者プロトコルに従い、大腸菌培養物 (LB 培養液) から精製した。ベクターDNA をその後、製造者プロトコルに従い制限酵素対で消化させた; Nde I と Hind III、Hind III と Kpn I、Kpn I と EcoR I、EcoR I と BamH I。消化させた試料を 0.8% アガロースゲルに適用し、電気泳動的に分離した。直線化されたベクターDNA を切除し、市販のゲル溶出キット (QIAquick Gel 抽出キット、Qiagen) を用いて製造者プロトコルに従い溶出させ、T4 DNA リガーゼを用いて、アニールさせたオリゴヌクレオチド混合物に連結させた。連結生成物を大腸菌 DH5 コンピテント細胞に形質転換し、プラスミドを含有する形質転換体を、アンピシリン (100 µg/ml) を含有する LB 寒天上で選択した。

10

【0257】

クローニングベクター、pUC18 中の予測される寸法のインサートの存在を、プラスミドDNA を精製し、クローニングに使用された酵素でDNA を消化させ、アガロースゲル電気泳動により、前に記載された手順を使用してDNA フラグメントを分析することによって、確認した。クローニングされたDNA フラグメントは、精製プラスミドDNA をDNA 鋳型として、ならびに配列決定プライマー 5' - TCGGGGCTGGCTTAACTATG - 3 (配列番号14) および 5' - GCTTCCGGCTCGTAT (配列番号15) (これらは、pUC18 ベクター中、複数のクローニング部位の外側、それぞれ、bp130~150 および bp530~515 にある) を用いて配列決定した。配列決定反応は、自動配列決定装置 (ABI 310) で実施した。配列は、配列エディタを用いて編集し、配列を分析のためにベクターNTIに取り込んだ。正確な配列を有するクローンのみを、全長OspA遺伝子を構築するための構成単位として使用した。

20

【0258】

lipB sOspA 5/3 遺伝子については、異なる戦略を使用した。これは、好適な固有の内部部位が、Kpn I - BamH I フラグメント内に見い出されず、アミノ酸配列は内部EcoR I部位の使用を認めなかったためである (図14を参照されたい)。Pvu II 部位はKpn I - BamH I フラグメント内に存在するが、しかしながらpUC18ベクターには2つのPvu II 部位が存在し、これは、フラグメントのpUC18への直接クローニングが可能ではないことを意味する。したがって、構築物のためのオリゴは、Pvu II 部位の外側で、これに隣接して挿入されたEcoR I 部位を有するように設計され、Kpn I - EcoR I および EcoR I - BamH I フラグメントのpUC18へのクローニングが可能になった。その後のKpn I、EcoR I および BamH I による挿入フラグメントの消化により、フラグメントが生成され、これらは、その後、Pvu II により消化された。Pvu II 消化フラグメント (Kpn I - Pvu II および Pvu II - BamH I) を、その後、Kpn I および BamH I で切断されたpUC18ベクターDNA との三重連結で使用されて、Kpn I - BamH I フラグメントが生成された。

30

【0259】

全長OspA遺伝子の構築。次のステップでは、個々の合成OspA遺伝子を構築するのに必要とされる4つのフラグメントの各々を、pUC18ベクターから切除し、単一ステップで、pUC18ベクターに再クローニングして、全長OspA遺伝子を作製した (図1を参照されたい)。

40

【0260】

全長遺伝子を作製するために必要とされる4つのフラグメントをミニプレップから切除した。DNA を、オリジナルクローニングステップのために使用された同じ制限酵素を使用して単離した。消化された試料をアガロースゲルに適用し、電気泳動的に分離した。個々の4つのインサートフラグメントのそれぞれに対するDNA を切除し、市販のゲル溶出キット (QIAquick Gel 抽出キット) を用いて製造者プロトコルに従い溶出させ、T4 DNA リガーゼを用いて、Nde I および BamH I で消化された直線化されたベクターDNA に連結させ、QIAquick Gel 抽出キットを用いて精製し

50

た。連結DNAを大腸菌DH5 コンピテント細胞に形質転換し、プラスミドを含有するクローンを、アンピシリン(100 µg/ml)を含むLB寒天上で選択した。コロニーを、予測される寸法(約830 bp)のインサートの存在について、PCRによりスクリーニングした。

【0261】

単一コロニーを、10X緩衝液(15 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂)、200 µM dNTP、1.25 U Ampli taq DNAポリメラーゼ、400 nM順方向プライマー5'-TCGGGGGCTGGCTTAACCTATG-3'(配列番号14)、および400 nM逆方向プライマー5'-GCTTCCGGCTCGTATG(配列番号15)を含むPCR反応において、鋳型DNAとして使用した。PCR反応条件は次の通りであった; 94 で5分、35 x (94 で30秒、48 で30秒、72 で1分30秒)、続いて72 で5分の浸漬、および4 で維持。PCR産物は、直接使用したか、またはさらなる使用まで-15 以下で保管した。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動により、正しい寸法(約980 bp)のインサートの存在について分析した。正しい寸法のインサートの配列決定を実施し、誤差が導入されていないことを確認した、すなわち、配列決定反応を、一晚培養物(LB amp 培養液)から単離されたプラスミドDNA(QIAGENプラスミド精製キット)、およびクローニング部位(5'-TCGGGGGCTGGCTTAACCTATG-3'(配列番号14)および5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTTGT-3'(配列番号16)、それぞれ、bp 130~150および530~510)に隣接する配列決定プライマーを使用して、設定した。配列決定反応は、自動配列決定装置(ABI 310)で実施した。配列は、配列エディタを用いて編集し、配列を分析のためにベクターNTIに取り込んだ。

【0262】

新規OspA遺伝子のpET30a発現ベクターへのサブクローニング。全長OspA遺伝子がpUC18において確認された時点で、OspA遺伝子を、次いで、制限酵素Nde IおよびBamH Iを用いてpET-30a発現ベクターにサブクローニングし、大腸菌宿主HMS174(DE3)に形質転換した。

【0263】

正しい配列を有するpUC18クローン由来のミニプレップDNAを、Nde IおよびBamH Iで消化させた。同様にpET30aベクターDNAを、Nde IおよびBamH Iで消化させた。消化させたDNAをアガロースゲル上で泳動させ、電気泳動的に分離した。約830 bpのインサートフラグメントおよび直線化されたベクターDNAを、前述のように切除し、精製した。ベクターおよびインサートDNAを、T4 DN Aリガーゼを用いて連結させ、連結生成物を、大腸菌HMS174(DE3)(Novagen)コンピテント細胞に形質転換させた。形質転換体を、カナマイシン(30 µg/ml)を含有するLBプレート上に蒔いた。単一コロニーを、プライマー5'-TTATGCTAGTTTATTGCTCAGCG-3'(配列番号17)および5'-TTCCTCCTCTAGAAATAATTTTGT-3'(配列番号18)を使用してPCRによりスクリーニングした。PCR産物を、アガロースゲルに適用し、電気泳動的に分離した。正確な寸法(約1 kb)の生成物を産生したコロニーを、その後一晚培養物を設定するために使用し、そこから、ミニプレップDNAを、QIAGENプラスミド精製キットを用いて製造者プロトコルに従い単離した。配列を再び確認し(プライマー5'-TTATGCTAGTTTATTGCTCAGCG-3'(配列番号17)および5'-TTCCTCCTCTAGAAATAATTTTGT-3'(配列番号18)、それぞれ、bp 65~86および395~373を使用して)、コロニーを発現試験のために選択した。

【0264】

lipB sOspA 1/2²⁵¹からのlipB sOspA 1/2の生成。単一のアミノ酸を、lipB sOspA 1/2構築物において変化させ、すなわち、251位のアミノ酸アラニンを、アスパラギン残基に変化させ、免疫原性を増強させた。ア

ミノ酸変化は、PCRにより導入した。最初に、PCRを、外部順方向プライマーおよび内部逆方向プライマーを用いて設定し、導入されたアミノ酸変化を有する約730bpの生成物を産生させた(図15を参照されたい)。第2に、PCRを、内部順方向プライマーおよび外部逆方向プライマーを用いて設定し、導入されたアミノ酸変化を含有する100bpの生成物を産生させた。2つのPCR産物は、配列がオーバーラップしており、その後、外部順方向および外部逆方向プライマーによる最終PCR反応において鋳型DNAとして使用され、導入されたアミノ酸変化を含有する最終全長OspA生成物が産生された。

【0265】

pET30a構築物を鋳型DNA源として使用した。10X緩衝液[15mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂]、200μm dNTP、1.25U Ampli taq DNAポリメラーゼ、および400nMの各プライマー対(プライマー対5'-GGA ATT CCA TAT GCG TCT GTT GAT CGG CT(配列番号19)および5'-TTG GTG CCT GCG GAG TCG(配列番号20)ならびにプライマー対5'-AAT ACG ACT CCG CAG GCA CC(配列番号21)および5'-CTG-GGA TCC GCT CAG CTT ATT TCA(配列番号22))を含むPCR反応を設定した。PCR反応を、次の条件で設定した; 94 で5分、35x(94 で30秒、48 で30秒、72 で1分30秒)、続いて72 で5分の浸漬および4 で維持。反応により2つの別個のオーバーラップ生成物が産生し、これらの2つの生成物を、外部プライマー5'-GGA ATT CCA TAT GCG TCT GTT GAT CGG CT(配列番号19)および5'-CTG-GGA TCC GCT CAG CTT ATT TCA(配列番号22)(Nde IおよびBamH Iの制限部位を組み込む)を使用する第3のPCR反応における鋳型DNAとして使用した。反応条件は、94 で60秒、続いて35サイクル(30秒 94 、60秒 49 、90秒 72)、続いて72 で5分とした。増幅産物を、QiaQuick精製キット(Qiagen)を用いて製造者の仕様書に従い精製し、生成物をNde IおよびBamH Iで消化させ、Nde IおよびBamH Iで切断されたpET30aベクターDNAに連結させた。連結生成物を、大腸菌DH5 コンピテント細胞に形質転換させた。形質転換体を、カナマイシン(30μg/ml)を含有するLBプレート上に蒔いた。単一コロニーを、プライマー5'-TTATGCTAGTTATTGCTCAGCG-3'(配列番号17)および5'-TTCCTCTAGAAATAATTTTGT-3'(配列番号18)を使用してPCRによりスクリーニングした。PCR産物を、アガロースゲルに適用し、電気泳動的に分離した。正しい寸法(約1kb)の生成物を産生したコロニーを、その後、一晚培養物を設定するために使用し、そこから、ミニプレップDNAを、QIAGENプラスミド精製系を用いて製造者プロトコルに従い単離した。配列を確認し(プライマー5'-TTATGCTAGTTATTGCTCAGCG-3'(配列番号17)および5'-TTCCTCTAGAAATAATTTTGT-3'(配列番号18)を使用して)、結果として得られた構築物を、大腸菌HMS174(DE3)コンピテント細胞に形質転換させ、得られた陽性形質転換体を、lipB ospA 1/2²⁵¹と命名した。

【0266】

リーダー配列を有さない構築物の生成。構築物を、lipBリーダー配列を用いて調製し、これには、脂質部分が、典型的にアミノ末端システイン残基に付着している。組換え脂質付加されたOspAの実験的試験は、脂質部分の存在を確認した。しかしながら、lipBリーダー配列を含有しない構築物もまた調製した。lipBリーダー配列を含有しない構築物は、PCR増幅により、3つのlipB構築物(pET30a中)の各々から、リーダー配列をコードする核酸配列を有さず、システイン残基のためのコドンがメチオニン残基のためのコドンと置換されている、769~771bpの最終生成物を生成するように選択されたプライマーを使用して作製させた。

10

20

30

40

50

【0267】

PCR反応は、10X緩衝液[15mM Tris-HCl (pH 8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂]、200μm dNTP、1.25U Ampli taq DNAポリメラーゼ、400nM順方向プライマー5'-CGTGCGTACC ATATGGCACAGAAAGGTGCTGAGTCT-3' (配列番号23)および400nM逆方向プライマー5'-CTGGGATCCGCTCAGCTTATTTCA-3' (配列番号22)、ならびに鋳型DNAを含んだ。PCR条件は次の通りであった；94 で5分、35x(94 で30秒、48 で30秒、72 で1分30秒)、続いて72 で5分の浸漬、および4 で維持。PCR反応物は、直接使用したか、またはさらなる使用まで15 以下で保管した。

10

【0268】

PCR産物を、QiaQuick PCR精製キット(Qiagen)を使用して精製し、Nde IおよびBamH Iで消化し、Nde IおよびBamH Iで消化させたpET30aベクターDNAに連結させた。連結混合物を使用して、大腸菌HMS174(DE3)を形質転換し、組換えプラスミドを含有するコロニーを、そのカナマイシン耐性により選択し、配列をPCR産物から確認した。

【0269】

大腸菌HMS174(DE3)における発現の評価。選択したコロニーを、それぞれの新規OspAタンパク質を発現する能力について試験した。各場合において、単一コロニーを使用してカナマイシン(30μg/ml)を含有するLB培養液に播種し、37 で1~5時間、OD(600nm)値が0.6超、1未満に到達するまで、インキュベートした。この時点で、培養物から1つ試料を保持し(誘導されていない試料を表す)、培養物の残りをIPTGの添加により1mMの最終濃度に誘導した。誘導されていない試料(1ml)を遠心分離し、ペレットを保持し、-20 で保管した。誘導された培養物を、さらに3時間増殖させ、その後、1mlの試料を取り、OD(600nm)を測定し、試料を遠心分離し、ペレットを保持し、-20 で保管した。

20

【0270】

初代細胞の調製。初代細胞を、3つの脂質付加された構築物の各々および3つの脂質付加されていない構築物の各々に対し調製した。初代細胞は、それぞれのOspAを発現するpET30aプラスミドを有する大腸菌細胞(HMS174(DE3))を含んだ。初代細胞の調製では、それぞれののストック由来の単一のコロニーを、カナマイシン(30μg/ml)およびリファンピシン(200μg/ml)を含有するプレートから採取し、これを使用して500μlのSMK培地(SOP8114)に播種し、一晚インキュベートした。100μlのこの培養物を、その後使用して、100mlのSMK培地に播種し(2連に)、培養物を17~20時間、37 で振盪しながらインキュベートした。滅菌グリセロールを、次いで、最終濃度15%で培養物に添加し、材料をピペットで500μl量のアリコートに取り、60アンブルとし、したがって60アンブルの初代細胞を得、これを直接-80 で保管した。

30

【0271】

3つの合成OspA遺伝子を、血清型1および2のOspA(lipB sOspA 1/2251)、血清型6および4のOspA(lipB sOspA 6/4)、ならびに血清型5および3のOspA(lipB sOspA 5/3)由来の防御エピトープを有するOspA分子をコードするように設計した。これらの分子の一次アミノ酸配列およびそれらの設計に組み込まれる主な特徴を、下記実施例において記載する。

40

【0272】

実施例3:

脂質付加された1/2²⁵¹OSPA(LIPB SOSPA1/2²⁵¹)の説明

この研究の目的は、血清型1および2を含む新規OspA抗原、脂質付加された1/2²⁵¹OspA(lipB sOspA 1/2²⁵¹)を設計することであった。lipB sOspA 1/2²⁵¹は、血清型2の配列(株Pko、GenBank受託番

50

号 S 4 8 3 2 2) の遠位部に融合された血清型 1 の O s p A 配列 (株 B 3 1 、 G e n B a n k 受託番号 X 1 4 4 0 7) の近位部を含む。型 2 の血清型に固有の配列の開始は、2 1 6 位のリジン (K) 残基である。構築物は、元々は、2 5 1 位のアミノ酸アラニン (A) をコードするように設計された。しかしながら、構築物はその後、P C R により、アスパラギン (N) 残基 (P k o からの公表された配列中の実際の残基) をコードするように変化され、免疫原性が増強され、l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} と命名された。

【 0 2 7 3 】

l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} の二次特徴を、図 2 において注釈が付けられた l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} のアミノ酸配列において示し、これは下記を含む：

分子の近位部 (アミノ酸 1 6 1 ~ 1 8 5) における、推定関節炎誘導性エпитープ (G r o s s e t a l . , 1 9 9 8) 、 h L F A - 1 (Y V L E G T L T A) (配列番号 2 4) と、血清型 2 の O s p A 配列 (株 P k o ; G e n B a n k 受託番号 S 4 8 3 2 2) 由来の同等の配列 (イタリアク体および隣接する配列に示される) : h L F A - 1 エピトープとは異なる配列との置換；

O s p B リーダー配列 (図 2 のアミノ酸 1 ~ 1 5) および先行技術を回避するための様々な置換。4 4 および 4 6 位のアスパラギン (N) およびアスパラギン酸 (D) 残基は、それぞれ、アスパラギン酸 (D) およびアスパラギン (N) で置換され、配列 K E K D K N (配列番号 2 5) が生成された。7 8 および 7 9 位のアラニン (A) およびアスパラギン酸 (D) 残基は、それぞれ、スレオニン (T) およびアスパラギン (N) と置換され、配列 K T N K S K (配列番号 2 6) が生成された；

国際特許公開第 W O 0 2 / 1 6 4 2 1 A 2 号 (L u f t & D u n n) に記載される安定化突然変異。例えば、メチオニン (M) がアミノ酸 1 3 6 でアルギニン (R) と置き換わり (R 1 3 9 M) 、チロシン (Y) がアミノ酸 1 5 7 でグルタミン酸 (E) と置き換わり (E 1 6 0 Y) 、およびメチオニン (M) がアミノ酸 1 8 6 でリジン (K) と置き換わった (K 1 8 9 M) ; ならびに

追加の安定化突然変異。例えば、スレオニン (T) がアミノ酸 1 7 3 でバリン (V) に置き換わった (本開示の a a 1 7 6) 。B . ブルグドルフェリ配列を B . アフゼリ配列で置換することによる推定関節炎誘導性エピトープ (1 6 1 ~ 1 8 5 位) の除去は、アミノ酸 1 7 3 と 1 7 4 (本開示の a a 1 7 6 と 1 7 7) との間の水素結合を妨害した。これは、防御モノクローナル抗体への結合を減少させた (1 0 5 . 5 および L A - 2 (J i a n g e t a l . , J . I m m u n o l . 1 4 4 : 2 8 4 - 9 , 1 9 9 0 ; G o l d e e t a l . , I n f e c t . I m m u n . 6 5 : 8 8 2 - 9 , 1 9 9 7 、ならびに D i n g e t a l . , J . M o l . B i o l . 3 0 2 : 1 1 5 3 - 6 4 , 2 0 0 0) 。スレオニン (T) が、バリン (V) の代わりに 1 7 3 位に導入されて水素結合が回復し、防御モノクローナル抗体 1 0 5 . 5 および L A 2 への反応性が増加した。

【 0 2 7 4 】

加えて、アミノ酸 1 6 ~ 2 5 (成熟タンパク質の開始) は、O s p B 配列 (G e n B a n k 受託番号 X 7 4 8 1 0) と同一である。

【 0 2 7 5 】

l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図 3 に示す。リーダー配列 (緑) は、タンパク質分泌中に切断される。成熟 O s p A タンパク質の配列は、システイン残基 (下線) で開始し、これはタンパク質の脂質アンカーのための付着部位を形成する。

【 0 2 7 6 】

実施例 4 :

脂質付加された 6 / 4 O S P A (L I P B S O S P A 6 / 4) の説明

この研究の目的は、血清型 4 および 6 を含む新規 O s p A 抗原、脂質付加された s O s p A 6 / 4 O s p A (l i p B s O s p A 6 / 4) を設計することであった。L i p B s O s p A 6 / 4 は、血清型 4 の配列 (株 p T r o B ; G e n B a n k 受託番号 I 4 0 0 8 9) の遠位部に融合された血清型 6 の O s p A 配列 (株 K 4 8 、 G e n B a

n k 受託番号 I 4 0 0 9 8) の近位部を含む。型 4 の血清型に固有の配列の開始は、2 1 7 位のアスパラギン (N) 残基である。二次特徴を、図 4 において注釈が付けられた l i p B s O s p A 6 / 4 のアミノ酸配列において示し、下記を含む：

国際特許出願第 W O 0 2 / 1 6 4 2 1 A 2 号 (L u f t および D u n n) に記載される安定化突然変異：アミノ酸 1 3 6 でのアルギニン (R) の代わりにメチオニン (M)、アミノ酸 1 5 7 でのグルタミン酸 (E) の代わりにチロシン (Y)、およびアミノ酸 1 8 7 でのリジン (K) の代わりにメチオニン (M)；ならびに

上記の l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} のように、O s p B リーダー配列が使用され (図 4 のアミノ酸 1 ~ 1 5)、アミノ酸 1 6 ~ 2 5 は、O s p B (G e n B a n k 受託番号 X 7 4 8 1 0) 由来の配列と同一である。

10

【 0 2 7 7 】

ペプチド配列 K E K N K D (配列番号 2 7) は、親 O s p A 6 型配列 (K E K D K D) (配列番号 2 8) にはなかったが、4 6 位のアスパラギン酸 (D) 残基は、l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} 構築物になされた同等の変化に従ってアスパラギン残基 (N) と置換され、配列 K E K D K N (配列番号 2 5) が生成された。

【 0 2 7 8 】

ペプチド配列 K A D K S K (配列番号 2 9) は親 O s p A 6 型配列 (K T D K S K) (配列番号 3 0) にはなかったが、7 9 位のアスパラギン酸 (D) 残基は、l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} 構築物になされた同等の変化に従ってアスパラギン残基 (N) と置換され、配列 K T N K S K (配列番号 2 6) が生成された。

20

【 0 2 7 9 】

アミノ酸 3 7 は、親配列 (株 K 4 8 ; G e n B a n k 受託番号 I 4 0 0 9 8) に存在するように、グルタミン酸 (E) からバリン (V) に変化された、というのも、ほとんど全ての 6 型配列はこの位置にバリンを有するからである。

【 0 2 8 0 】

l i p B s O s p A 6 / 4 のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図 5 に示す。リーダー配列 (緑) は、タンパク質分泌中に切断される。成熟 O s p A タンパク質の配列は、システイン残基 (下線、図 5 を参照されたい) で開始し、これはタンパク質の脂質アンカーのための付着部位を形成する。

【 0 2 8 1 】

30

実施例 5：

脂質付加された 5 / 3 O S P A (L I P B S O S P A 5 / 3) の説明

この研究の目的は、血清型 3 および 5 を含む新規 O s p A 抗原、脂質付加された s O s p A 5 / 3 O s p A (l i p B s O s p A 5 / 3) を設計することであった。L i p B s O s p A 5 / 3 は、配列番号 5 および 6 に示されるように修飾を有する、血清型 3 の配列 (株 P B r ; G e n b a n k 受託番号 X 8 0 2 5 6、B . ガリニ O s p A 遺伝子) の遠位部に融合された血清型 5 の O s p A 配列 [D a t a b a s e 受託番号 e m b | X 8 5 4 4 1 | B G W A B O S P A、B . ガリニ O s p A 遺伝子 (W A B S o u s u b 株)] の近位部を含む。型 3 の血清型に固有の配列の開始は、2 1 6 位のアスパラギン (D) 残基である。二次特徴を、図 6 において注釈が付けられた l i p B s O s p A 5 / 3 のアミノ酸配列において示し、これは下記を含む：

40

国際特許出願第 W O 0 2 / 1 6 4 2 1 A 2 (L u f t および D u n n) 号に記載される安定化突然変異：アミノ酸 1 3 6 でアルギニン (R) の代わりにメチオニン (M)、アミノ酸 1 5 7 でのグルタミン酸 (E) の代わりにチロシン (Y)、およびアミノ酸 1 8 7 でのリジン (K) の代わりにメチオニン (M)；ならびに

上記 l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} および l i p B s O s p A 6 / 4 のように、O s p B リーダー配列が使用され (図 6 のアミノ酸 1 ~ 1 5)、アミノ酸 1 6 ~ 2 5 は、O s p B (G e n B a n k 受託番号 X 7 4 8 1 0) 由来の配列と同一である。

【 0 2 8 2 】

ペプチド配列 K E K N K D (配列番号 2 7) は、親 O s p A 型 5 配列 (K E K D K D)

50

(配列番号28)にはなかったが、46位のアスパラギン酸(D)残基は、lipB s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} 構築物になされた同等の変化に従ってアスパラギン残基(N)と置換され、配列K E K D K N (配列番号25)が生成された。

【0283】

ペプチド配列K A D K S K (配列番号29)は、親O s p A型5配列(K T D K S K) (配列番号30)にはなかったが、79位のアスパラギン酸(D)残基は、lipB s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} 構築物になされた同等の変化に従ってアスパラギン残基(N)と置換され、配列K T N K S K (配列番号26)が生成された。

【0284】

lipB s O s p A 5 / 3のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図7に示す。リーダー配列(緑)は、タンパク質分泌中に切断される。成熟O s p Aタンパク質の配列は、システインコドン(下線、図7を参照されたい)で開始し、これはタンパク質の脂質アンカーのための付着部位を形成する。

10

【0285】

実施例6:

大腸菌における高レベル発現のためのコドン使用頻度の最適化

大腸菌においてめったに使用されないコドンの存在が、外来遺伝子の高レベル発現を妨げる可能性があることが知られているため、使用率の低いコドンを、大腸菌において高度に発現される遺伝子により使用されるコドンと置換させた。新規O s p A遺伝子のヌクレオチド配列は、高度に発現されるクラスIIの大腸菌遺伝子の中で最も頻繁に見い出されるコドン(好ましいコドン)を使用するように設計された(Gu er d o u x - J a m e t e t . a l . , D N A R e s e a r c h 4 : 2 5 7 - 6 5 , 1 9 9 7)。新規O s p A遺伝子間のコドン使用頻度、および高度に発現されるクラスIIの大腸菌遺伝子に対するデータを、表7および8にまとめて示す。tRNA分子が律速となる可能性が低い、より頻度の低いアミノ酸に対するデータ(表7)を、最も頻繁に起こるアミノ酸に対するデータ(表8)と別々に示す。

20

【表 7】

【表 7】 新規O s p A遺伝子におけるコドン使用頻度(あまり一般的でないアミノ酸*)

アミノ酸	コドン	OspA 1/2 AA 計数			OspA 5/3 AA 計数			OspA 6/4 AA 計数			クラス II 計数(%)
		合計	コドン	%	合計	コドン	%	合計	コドン	%	
Gln	CAA	5	1	20.0	4	0	0.0	4	0	0.0	18.7
	CAG		4	80.0		4	100.0		4	100.0	81.4
Phe	TTT	5	1	20.0	6	3	50.0	6	1	16.7	29.1
	TTC		4	80.0		3	50.0		5	83.3	70.9
Met	ATG	4	4	100.0	5	5	100.0	4	4	100.0	100.0
Tyr	TAT	4	1	25.0	4	1	25.0	4	0	0.0	35.2
	TAC		3	75.0		3	75.0		4	100.0	64.8
Arg	CGT	2	2	100.0	3	3	100.0	2	2	100.0	64.3
	CGC		0	0.0		0	0.0		0	0.0	33.0
	CGA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	1.1
	CGG		0	0.0		0	0.0		0	0.0	0.8
	AGA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	0.6
	AGG		0	0.0		0	0.0		0	0.0	0.3
Cys	TGT	1	0	0.0	1	1	100.0	1	0	0.0	38.9
	TGC		1	100.0		0	0.0		1	100.0	61.2
Pro	CCT	1	0	0.0	2	0	0.0	1	0	0.0	11.2
	CCC		1	100.0		1	50.0		1	100.0	1.6
	CCA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	15.3
	CCG		0	0.0		1	50.0		0	0.0	71.9
Trp	TGG	1	1	100.0	1	1	100.0	1	1	100.0	100.0

* すなわち、機械的に、個々に、合計のアミノ酸の 2 . 5 % 未満を占めるアミノ酸。

10

20

30

【表 8 - 1】

【表 8】 新規O s p A遺伝子のコドン使用頻度（より一般的なアミノ酸）

アミノ酸	コドン	OspA 1/2 AA 計数			OspA 5/3 AA 計数			OspA 6/4 AA 計数			クラス II 計数(%)
		合計	コドン	%	合計	コドン	%	合計	コドン	%	
Lys	AAA	40	30	75.0	40	36	90.0	40	37	92.5	78.6
	AAG		10	25.0		4	10.0		3	7.5	21.5
Thr	ACT	32	13	40.6	31	15	48.4	34	7	20.6	29.1
	ACC		14	43.8		16	51.6		27	79.4	53.6
	ACA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	4.7
	ACG		5	15.6		0	0.0		0	0.0	12.7
Leu	CTT	27	3	11.1	28	2	7.1	28	1	3.6	5.6
	CTC		3	11.1		0	0.0		4	14.3	8.0
	CTA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	0.8
	CTG		17	63.0		21	75.0		18	64.3	76.7
	TTA		2	7.4		2	7.1		3	10.7	3.4
	TTG		2	7.4		3	10.7		2	7.1	5.5
Ser	TCT	25	9	36.0	25	12	48.0	23	8	34.8	32.4
	TCC		8	32.0		3	12.0		8	34.8	26.6
	TCA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	4.8
	TCG		0	0.0		0	0.0		0	0.0	7.4
	AGT		0	0.0		0	0.0		0	0.0	4.5
	AGC		8	32.0		10	40.0		7	30.4	24.3
Gly	GGT	22	11	50.0	23	8	34.8	22	9	40.9	50.8
	GGC		11	50.0		14	60.9		13	59.1	42.8
	GGA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	2.0
	GGG		0	0.0		1	4.3		0	0.0	4.4
Val	GTT	22	8	36.4	15	6	40.0	18	7	38.9	39.8
	GTC		4	18.2		0	0.0		4	22.2	13.5
	GTA		3	13.6		9	60.0		3	16.7	20.0
	GTG		7	31.8		0	0.0		4	22.2	26.8
Glu	GAA	21	16	72.7	22	18	81.8	21	18	85.7	75.4
	GAG		5	23.8		4	18.2		3	14.3	24.7
Asp	GAT	17	8	47.1	16	9	56.3	19	8	42.1	46.1
	GAC		9	52.9		7	43.8		11	57.9	54.0
Ala	GCT	16	6	37.5	18	9	50.0	17	6	35.3	27.5

10

20

30

40

【表 8 - 2】

	GCC		0	0.0		1	5.6		4	23.5	16.1
	GCA		5	31.3		6	33.3		3	17.6	24.0
	GCG		5	31.3		2	11.1		4	23.5	32.3
Asn	AAT	13	3	23.1	13	3	23.1	13	2	15.4	17.3
	AAC		10	76.9		10	76.9		11	84.6	82.8
Ile	ATT		4	33.3		5	38.5		3	23.1	33.5
	ATC	12	8	66.7	13	8	61.5	13	10	76.9	65.9
	ATA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	0.6

10

【0286】

新規 O s p A 遺伝子（一般的なアミノ酸のみ）に対して選択されるコドン使用頻度および大腸菌クラス I I 遺伝子間の高い一致度は明らかである（すなわち、クラス I I 遺伝子に対する表 8 からのパーセンテージ値の個々の新規 O s p A 遺伝子に対するプロット；図 8 を参照されたい）。3 つの脂質付加された構築物では、オリジナル配列は 32.8% ~ 33.8% の範囲の G C 含量を有したが、コドン - 最適化配列は、43.8% ~ 46.8% の範囲の G C 含量を有し、これは、大腸菌の 50% G C 含量に類似する。

【0287】

実施例 7：

20

合成の脂質付加されていない O S P A 遺伝子の構築

l i p B リーダー配列を含有しない構築物もまた調製した。2 組の構築物（脂質付加された、および脂質付加されていない）が、発酵槽における製造の容易さを評価するために（バイオマス、安定性、生成収率等）、どれくらい容易に異なる型の抗原を精製することができるか評価するために、それらの生物学的特性（安全性プロファイルおよび防御能力）を比較するために、必要である。

【0288】

構築物（配列番号 7、9、および 11）を、3 つの l i p B O s p A 構築物（配列番号 1、3、および 5）の各々から制限部位が組み込まれた P C R プライマーを用いて、P C R 増幅により生成した。P C R 産物を精製し、N d e I および B a m H I で消化し、消化させた p E T 30 a ベクター DNA に連結させた。連結混合物を使用して、大腸菌 D H 5 を形質転換し、O s p A 配列を確認した。ミニプレップ DNA を調製し、単離し、H M S 174 (D E 3) 宿主細胞を形質転換するために使用した。脂質付加されていない誘導体の配列は、リーダー配列をコードする最初の 45 塩基対を欠き、脂質付加されたバージョンにおけるシステインコドンと置き換わるメチオニンコドンを含む N d e I 部位を含むことを除き、脂質付加されたバージョンと同一である（図 9 を参照されたい）。

30

【0289】

実施例 8：

新規組換え O S P A 抗原の発現

40

抗原目的のための新規組換え O s p A 遺伝子の発現 / 生成のために、バクテリオファージ T7 R N A ポリメラーゼにより制御された大腸菌発現系 (S t u d i e r e t a l . , J . M o l . B i o l . 189 : 113 - 30 , 1986) を使用した。この発現系では、新規 O s p A 遺伝子を、p E T シリーズプラスミドの 1 つ（例えば、p E T 30 a）中の複数のクローニング部位にクローニングさせた。外来遺伝子の発現は、バクテリオファージ T7 プロモーター（大腸菌 R N A ポリメラーゼにより認識されない）の制御下にあるため、発現は、T7 R N A ポリメラーゼ源に依存する。この酵素は、組換えプラスミドが適切な発現宿主、例えば大腸菌 H M S 174 (D E 3) (T7 R N A ポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを含有する) 中に移行された時に提供される。染色体に取り込まれた T7 R N A ポリメラーゼ遺伝子の発現は、l a c U V 5 プロモーターの制御下に

50

あり、これは、イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (I P T G) またはラクトースの付加により作動 (すなわち、誘導) され得る (図 10 を参照されたい) 。結果として、外来遺伝子の発現はまた、インデューサー分子の付加により調節される。

【 0 2 9 0 】

細胞を後期対数期に誘導し、誘導後 3 ~ 4 時間で収集した。誘導された細胞では、キメラ O s p A 抗原が、細胞可溶化物の S D S - P A G E により決定される、最も高度に発現したタンパク質であった。O s p A キメラのほとんどが上清中に見い出された。混入する大腸菌タンパク質をアニオン交換クロマトグラフィーにより除去し、空隙容量に溶出したキメラ O s p A タンパク質を限外濾過により濃縮した。

【 0 2 9 1 】

10

構築物の各々からの新規組換え O s p A タンパク質の発現を試験し、誘導されたおよび誘導されていない培養物からの試料を S D S ポリアクリルアミドゲル上で泳動させた (図 11) 。脂質付加された (配列番号 2、4、および 6) および脂質付加されていない (配列番号 8、10、および 12) 抗原について、約 31 k D a の帯域がそれぞれの場合に観察された (図 11 を参照されたい) 。タンパク質を特徴付けし、決定した分子量は末端メチオニンが切断されたと推定する理論分子量と相関 (+ / - 0.5 ダルトン) した。図 11 は、発現された組換えの脂質付加された O s p A タンパク質は、少なくとも 10 % の総タンパク質収率を含むことを示し、構築物は、それらの本来の目的に有用であることが確認される。

【 0 2 9 2 】

20

実施例 9 :

単一の組換え O S P A 抗原 (R O S P A 1 / 2) は、狭義の B . ブルグドルフェリ および B . アフゼリによる感染に対し防御する

この研究の目的は、O s p A 血清型 1 および 2 の防御特性を保持するように設計された単一の組換え抗原 (r O s p A 1 / 2 ; 配列番号 2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) を含むポリペプチド) が、マウスを狭義の B . ブルグドルフェリ (O s p A 血清型 1) または B . アフゼリ (O s p A 血清型 2) のいずれかによる感染から防御する抗体応答を誘導することができるかを決定することであった。追加の r O s p A 抗原の含有が、r O s p A 1 / 2 抗原により提供される防御免疫に対し拮抗効果を有さなかったことを示す証拠が提供される。

30

【 0 2 9 3 】

r O s p A 1 / 2 の設計および構築。外来病原体の導入の危険を排除するために、相補的なオーバーラップ合成オリゴヌクレオチドを使用して、共に連結されベクター p E T 30 a にクローニングされた D N A フラグメントを作製し、配列を確認した。このアプローチにより、コドン使用頻度を、O s p A 遺伝子を発現するために使用される大腸菌宿主 H M S 174 (D E 3) に対し最適化させることが可能になった。新規遺伝子は、血清型 2 の配列 (アミノ酸 219 ~ 273、株 P K o ; 受託番号 S 48322) の遠位部に融合された血清型 1 の O s p A 配列 (アミノ酸 29 ~ 218、株 B 31 ; G e n B a n k 受託番号 X 14407) の近位部に基づく。B . ブルグドルフェリ株 B 31 由来の 25 個のアミノ酸フラグメント (a a 164 ~ 188) を、B . アフゼリ株 P K o 由来の配列 (a a 164 ~ 188) と置換したが、これは、B 31 O s p A (a a 165 - 173) のこの領域が、h L F A - 1 エピトープ (a a 332 - 340) を含む領域に高度に関連するからである。脂質付加されたタンパク質の発現を最適化するために、リーダー配列および最初の 11 アミノ酸を含む N 末端配列を、O s p B (株 B 31 ; G e n B a n k 受託番号 X 74810) から誘導した。r O s p A 1 / 2 分子の免疫原性および立体配座安定性を改善するために他の特定の アミノ酸変化を行い、r O s p A 1 / 2 (l i p B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1}) の配列を配列番号 2 に設定する。

40

【 0 2 9 4 】

動物試験。異なる O s p A 抗原を発現する、ボレリアの 2 つの種による感染を防止する単一の組換え O s p A 抗原 (r O s p A 1 / 2) の能力を、0.2 % (w / v) 水酸化

50

アルミニウムをアジュバントとして用いて製剤化した精製 O s p A 抗原 (0 . 1 μ g または 0 . 0 3 μ g 用量) により皮下に (0 および 2 8 日目) 免疫化した C 3 H / H e J マウスにおいて評価した。マウスに、ブースター免疫化の 2 週間後に皮内注射 (針負荷 ; 7 × 1 0 ⁴ 細胞) または自然の感染経路 (マダニ負荷) のいずれかにより負荷を行った。後者の実験では、マウス 1 匹当たり 8 匹の幼虫マダニを適用し、最大 5 日間摂食させた。幼虫は、ライム病がよく見られる地域である B u d w e i s (チェコ共和国) 近辺で収集した。これらのマダニの大多数が、P C R により摂食させていないマダニを試験することにより決定すると、B . アフゼリに感染していた。マウスの感染状態を 4 週間後に決定した。マダニ負荷実験では、ボレリアの存在は、培養 (膀胱) により、およびリアルタイム P C R (心臓) によるボレリア D N A の検出により確認した。動物実験を動物実験に関するオーストリアの法律および国際ガイドライン (A A A L A C および O L A W) に従い実施し、I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e による審査を受け、オーストリア規制当局による承認を得た。免疫原性。r O s p A 1 / 2 抗原に対する抗体応答 (μ g I g G / m l) を、r O s p A 1 / 2 をコーティング抗原として、規定された I g G 含量を有する O s p A 特異的モノクローナル抗体 (社内調製) を標準物として使用して E L I S A により決定した。

10

20

30

40

50

【 0 2 9 5 】

診断手順。針負荷実験では、表面露出リポタンパク質 V l s E タンパク質中の保存エпитープ (C 6 E L I S A ; I m m u n e t i c s (登録商標) C 6 L y m e E L I S A (商標) からのコーティングプレート) または O s p A 免疫源以外のボレリア抗原 (ウェスタンブロッティング) に対する抗体の存在を、感染の診断に使用した。ウェスタンブロッティングでは、狭義の B . ブルグドルフェリ株 Z S 7 から調製した細胞可溶化物を使用した、というのも、これが負荷生物であったからである。動物は、両方のアッセイにおいて陽性であった場合、感染したと見なした。

【 0 2 9 6 】

マダニ負荷実験では、C 6 E L I S A およびウェスタンブロッティングもまた実施した。しかしながら、ウェスタンブロッティングでは、感染生物の同一性がわかっていなかったため、狭義の B . ブルグドルフェリ Z S 7、B . アフゼリ A C A 1、および B . ガリニ K L 1 1 由来の可溶化物を使用した。動物は、両方のアッセイが陽性であった場合にのみ、セロコンバージョンを受けたと考えた。加えて、ボレリア感染を、膀胱由来の培養により、ならびに O s p A の 5 ' - 領域を標的とするリアルタイム P C R アッセイおよび 1 6 S r R N A 遺伝子に基づくアッセイを用いた、心臓組織から抽出したゲノム D N A 中の広義の B . ブルグドルフェリ核酸の検出により、評価した。動物は、両方のアッセイにより P C R 産物が検出された場合にのみ、P C R - 陽性としてスコア化した。全体的に、動物を感染したと判断するためには、マウスは、培養、P C R、または血清学のいずれかにより陽性である必要があった。

【 0 2 9 7 】

感染するボレリアの特徴付け。可能な場合、感染生物を培養し、O s p A 配列および推定アミノ酸配列を、O s p A の残基 3 8 ~ 2 6 2 (B . アフゼリ V S 4 6 1、G e n B a n k 受託番号 Z 2 9 0 8 7) に対して決定した。この情報を、O s p A 参照配列と比較し、それによって、O s p A 型およびボレリア種を推測することができる。単一の O s p A 血清型を発現する種では、種に対する株型の O s p A 配列を、参照、例えば、B . アフゼリ V S 4 6 1 または B . バライシアナ V S 1 1 6 (G e n B a n k 受託番号 Z 2 9 0 8 7 ; A F 0 9 5 9 4 0) として選択した。B . ガリニは複数の O s p A 型を有するため、O s p A 遺伝子型 3 ~ 7 の O s p A 配列を使用した (すなわち、株 P B r、P T r o b、W A B S o u、T l s I、および T 2 5 ; それぞれ、G e n B a n k 受託番号 X 8 0 2 5 6、X 8 0 1 8 6、X 8 5 4 4 1、X 8 5 4 4 0、および X 8 0 2 5 4)。リアルタイム P C R に基づく分類では、G e n B a n k に預けられた 1 2 4 の広義の B . ブルグドルフェリ種の O s p A 遺伝子の配列アライメントを、血清型特異的配列について検査し、好適なプライマーとプローブの組み合わせを、P r i m e r E x p r e s s 3 . 0 (A p p

lied Biosystems)を用いて設計した。全てのアッセイは、ABI Prism (登録商標) 7900HT 配列検出装置で、普遍的サイクリング条件を用いて実施した。

【0298】

rOspA 1/2での免疫化による狭義のB・ブルグドルフェリ(OspA血清型1)感染の防止。低用量の2つの異なるロットのrOspA 1/2抗原で免疫化したマウスは全て、ELISAにより決定すると、免疫源に特異的なIgG抗体を発現した。水酸化アルミニウムを含有するワクチン製剤緩衝液で処理した対照マウスでは、抗体は検出されなかった。この免疫応答が狭義のB・ブルグドルフェリ、血清型1のOspAをコードする種による感染を防止する能力を評価するために、マウスに、狭義のB・ブルグドルフェリ株ZS7の 7×10^4 細胞を皮内注射した。アジュバントを含有する緩衝液で処理した対照マウスは全て、C6 ELISAおよびウェスタンブロッティングにより示されるように、感染の血清学的証拠を示した。rOspA 1/2抗原で免疫化したマウスは感染せず、これらのマウス由来の血清はいずれのアッセイでも陰性であった。アジュバントとして水酸化アルミニウムと共に製剤化し、2用量の免疫化レジメンで投与した場合、0.03 µgという少量のrOspA 1/2抗原が病原性の狭義のB・ブルグドルフェリ株ZS7での針負荷に対し100%防御を与えた($P < 0.0001$ 、Fisher直接両側検定)。

10

【0299】

rOspA 1/2での免疫化によるB・アフゼリ(OspA血清型2)感染の防止。rOspA 1/2抗原による免疫化がB・アフゼリ、血清型2のOspAをコードする種による感染を防止する能力を評価するために、マウスを、2つの別々の実験において、上記の針負荷実験で使用したのと同じ抗原ロットおよび研究設計を用いて免疫化した。しかしながら、この場合では、免疫化したマウスに、主にB・アフゼリに感染したことが知られている野生マダニ(幼虫)により負荷を行った。これらの野生マダニが広義のB・ブルグドルフェリをマウスに伝染させる能力は、免疫化していない対照動物に負荷を行うことにより確認した。

20

【0300】

対照マウスのほとんど(総計11/14、79%)が感染した。感染した対照動物は、2つの独立したリアルタイムPCRアッセイ(16S rRNAおよびOspA遺伝子)で、ボレリアDNAに対し陽性であった。10/11の場合において、膀胱の培養によりボレリアを単離することが可能であった。残りのマウスは血清学およびPCRにより陽性であった。10の培養分離株のうちの9つについて、OspA配列が回収され、全てがB・アフゼリとして分類された(99%を超えるOspA配列同一性)。さらに、全ての感染生物は、特異的に血清型2のOspA遺伝子を標的とするリアルタイムPCRアッセイを用いた心臓から抽出したDNAのPCR分析により、B・アフゼリとして分類された。これらのデータにより、B・アフゼリは、感染した野生マダニからそれらのマウス宿主に伝染される主なボレリア種であることが確認された。

30

【0301】

rOspA 1/2で免疫化したマウスのほとんど(総計3/32、9%)が感染しなかった。これらの3匹のマウスのうち1匹は、3つ全ての診断基準(血清学、PCR、および培養)により決定すると、感染しており、配列分析により、感染生物はB・ガリニ血清型6(99%を超えるOspA配列同一性)であることが明らかになった。感染したとみなされた残りの2匹の動物は、3つの基準のうちの2つのみで陽性であった。1匹のマウスは、血清学およびPCRにより陽性であった。しかしながら、感染生物は、培養において回収できなかった。それにもかかわらず、この生物は、血清型7のOspA遺伝子に特異的なPCRを用いた心臓から抽出したDNAのPCR分析によりB・ガリニ血清型7として分類することができた。第3のマウスはPCRおよび培養に陽性であったが、血清学的に陰性であった。このマウスから培養した分離株は、配列決定により決定すると、B・パラシアナであった(B・パラシアナ株VS116とのOspA配列同一性)。重

40

50

要なことに、免疫化したマウスのいずれも (0 / 3 2) B . アフゼリに感染しなかった。アジュバントとして水酸化アルミニウムと共に製剤化し、2 用量の免疫化レジメンで投与した場合、0 . 0 3 μ g という少量の r O s p A 1 / 2 抗原が野生マダニにより伝染される B . アフゼリに対し完全防御を与えた。

【0302】

結論。2つの異なる O s p A 血清型 (1 および 2) 由来の防御要素を含有するように設計された単一の組換え細胞表面タンパク質 A (O s p A) 抗原は、マウスを狭義の B . ブルグドルフェリ (O s p A 血清型 1) または B . アフゼリ (O s p A 血清型 2) のいずれかによる感染から防御する抗体応答を誘導することができた。狭義の B . ブルグドルフェリ株 Z S 7 による感染に対する防御は、針負荷モデルにおいて証明された。B . アフゼリ種に対する防御は、野生マダニを使用したマダニ負荷モデルで見られた。いずれのモデルにおいても、0 . 0 3 μ g という少量の抗原が、水酸化アルミニウムをアジュバントとして用いる 2 用量の免疫化スケジュールで投与した場合に、標的とされる種に対する完全防御を提供するのに十分であった。予想されるように、この新規抗原により認められる防御は、抗原が B . ガリニおよび B . パライシアナ株による感染に対し防御を提供することができないことから証明されるように、他のボレリア種に及ばなかった。この原理研究の証拠は、防御エピトープの情報は、より少ない O s p A 抗原を必要とする有効な遺伝子組換えワクチンの合理的設計のために使用することができることを証明し、このアプローチが、世界的利用のための O s p A ワクチンの開発を促進し得ることを示唆する。

10

20

【0303】

実施例 10 :

マウス抗 O S P A 抗体が生ボレリアの表面に結合するまたはその増殖を阻害する効率は、狭義の B . ブルグドルフェリ型 1 株を使用した針負荷に対する防御と相関する

この研究の目的は、狭義のボレリアブルグドルフェリ O s p A 型 1 株を使用した針負荷モデルにおいて、r O s p A 1 / 2 抗原で免疫化したマウスに対する防御の関連要因を確立することであった。分析したパラメータは、生ボレリアの表面に結合する、またはボレリアの増殖を阻害する抗 O s p A 抗体の効力であった。

【0304】

98 匹のマウスを、負荷した際に防御および感染動物の両方が観察されるように、ブライム - ブースターレジメンにおいて、準最適 3 n g 用量の r O s p A 1 / 2 抗原で、0 . 2 % A I (O H) 3 をアジュバントとして使用して、計画的に免疫化した (実施例 9 で使用した低用量よりも 10 倍低かった)。ワクチン接種を、皮下で 0、14、および 28 日目に、100 μ l の用量体積を用いて実施した。38 日目に、負荷前血清試料を 96 匹のマウスから採取し、10 日後、動物に 19 . 4 x I D₅₀ の培養増殖させた狭義の B . ブルグドルフェリ Z S 7 を負荷し、感染状態を 4 週間後に決定した。96 匹のマウスのうち 71 匹 (72 %) が、この低用量の抗原での免疫化後に防御されることが見いだされた。

30

【0305】

負荷 4 週間後に血液を採取し、狭義の B . ブルグドルフェリ株 Z S 7 の膜画分に対しこれらの血清をウェスタンブロッティングすることにより、感染したマウスを同定した。使用した負荷用量では、感染したマウスのみが O s p A 以外の株 Z S 7 の膜抗原に対する抗体応答を有した (ワクチンにより誘導された O s p A に対する応答はスコア化しなかった)。

40

【0306】

生ボレリアの表面に結合する O s p A 抗体の定量。このアッセイでは、O s p A 型 1 を発現する狭義の B . ブルグドルフェリ株 B 3 1 を、補体活性化を防止するために E D T A の存在下、室温で、負荷前のマウス血清と共に固定希釈 (1 : 100) でインキュベートした。洗浄して非結合抗体を除去した後、細胞表面に特異的に結合した抗体を、処理細胞を r - フィコエリトリン結合抗マウス I g ポリクローナル抗体と共にインキュベートすることにより標識した。その後、赤色蛍光を発し、それによって検出を増強する、D N A 染

50

色 (L D S - 7 5 1) を使用し、細菌を、次いで、フローサイトメトリー (F A C S C a l i b u r 、 B e c k t o n - D i c k i n s o n) により分析した。細胞表面に付着された抗体分子の数と相関する蛍光強度を、少なくとも 2 , 0 0 0 の個々のボレリアに対して記録し、蛍光強度 (M F I) の平均を計算した。正常マウス血清は、抗体の非特異的表面結合の程度を評価するための陰性対照として機能し、一方で O s p A 血清型 1 特異的 m A b は、O s p A 型の同一性を確認し、細菌培養における細胞の O s p A 発現レベルを確認するための陽性対照として機能した。

【 0 3 0 7 】

細菌増殖阻害アッセイ。負荷前血清がボレリアの増殖を阻害する効力を測定するために、O s p A 型 1 を発現する狭義の B . ブルグドルフェリ株 B 3 1 を、3 3 で段階希釈の熱不活性化負荷前または非免疫マウスの血清 (陰性対照) の存在下、補体 (正常モルモット血清) の存在下で培養した。顕微鏡により決定されるように、非免疫血清と共にインキュベートした対照培養物中の細菌が十分に増殖した時に、正確な細胞計数を、フローサイトメトリー分析により実施した。細胞培養物を、明確な数の蛍光標識ビーズを含有する溶液と混合し、DNA 染料を、ボレリア細胞を蛍光標識するために添加した。試料を、1 0 0 ビーズが計数されるまで F A C S C a l i b u r フローサイトメーターを用いて処理し、ビーズを規定するゲートにおけるイベント数と、ボレリアを規定するゲートにおけるものとを比較することにより、絶対細胞濃度を計算した (細胞 / m l) 。細菌増殖を 5 0 % 阻害した血清希釈を、N M S 対照と比較して計算し、G I - 5 0 力価として報告した。標準血清調製物を使用して、異なるアッセイ間で力価を正規化した。測定した血清パラメータの分布を感染および防御動物間で、ノンパラメトリックマンホイットニー U 検定 (G r a p h p a d P r i s m V e r s . 5 . 0) により比較した。

【 0 3 0 8 】

この研究の結果 (図 1 9 を参照されたい) により、負荷時の免疫血清の機能的抗体含量と、高用量 (1 9 . 4 x I D ₅₀) の狭義の B . ブルグドルフェリ (Z S 7) の針負荷での感染に対する防御との間には極めて大きな相関があることが明確に証明される。O s p A 型 1 を発現する生ボレリアの F A C S に基づく蛍光強度測定は、細胞表面に付着された抗 O s p A 抗体分子の数を反映し、固定希釈で負荷前血清と共に細菌をインキュベートした後に実施されたが、これは防御と最もよく相関した (p < 0 . 0 0 0 1 マンホイットニー U 検定) 。しかしながら、増殖阻害力価もまた、極めて大きく防御と相関した (p = 0 . 0 0 0 2 マンホイットニー U 検定、図 1 9) 。

【 0 3 0 9 】

実施例 1 1 :

マウス抗 O S P A 抗体が生ボレリアの表面に結合するまたはその増殖を阻害する効率は、B . アフゼリ型 2 株を用いたマダニ負荷に対する防御と相関する

この研究の目的は、マダニ負荷モデルにおいてキメラ O s p A 1 / 2 抗原で免疫化したマウスの防御の関連要因を確立することであったが、この場合、マウスに感染させるためにチェコ共和国の B u d w e i s から収集した野生マダニを使用することによる自然感染経路を用いる。この流行地由来の幼虫マダニは、主に B . アフゼリに感染するため、B . アフゼリ O s p A 型 2 株負荷を提供すると考えられる。実施例 1 0 に示されるように、分析したパラメータは、生ボレリアの表面に結合する、またはボレリアの増殖を阻害する抗 O s p A 抗体の効力であり、これらはいずれも狭義のボレリアブルグドルフェリでの針負荷に対しよく相関することが示された。したがって、この研究は、欧州において最も顕著なヒト疾患関連遺伝種である B . アフゼリの自然感染に対する防御の関連要因として、2 つのパラメータを使用する適用性を拡大するように機能する。

【 0 3 1 0 】

4 0 匹のマウスを、プライム - ブースターレジメンにおいて、準最適 3 n g 用量の r O s p A 1 / 2 抗原で、0 . 2 % A l (O H) 3 をアジュバントとして使用して、免疫化した (実施例 9 で使用した低用量よりも 1 0 倍低かった) 。実施例 1 0 のように、この準最適用量は、防御および感染動物の両方が負荷後に確実に観察されるように選択した。ワ

クチン接種を、皮下で0、14、および28日目に、100 μ lの注射体積を用いて実施した。40日目に、個々の血液試料をマウスから採取し、負荷前血清を生成させた。入手可能なマダニの数は限られており、40匹全てのマウスに負荷を行うことはできなかったため、広範囲の応答をカバーするために表面結合および抗2型IgG濃度に基づいて20匹のマウスを選択した。8匹のマダニを各マウスに適用し、マウス上で5日間摂食させた。負荷4週間後にマウスを殺処分し、免疫化および対照マウスの感染状態を、狭義のB・ブルグドルフェリ、B・アフゼリ、およびB・ガリニ由来の膜抗原に対する血清のウェスタンブロッティング；膀胱由来のボレリア生物の培養；ならびに膀胱から抽出したDNAからのボレリアのリアルタイムPCR検出により決定した。

【0311】

生ボレリアの表面に結合するOspA抗体の定量。このアッセイでは、OspA型2を発現するB・アフゼリ株Arc onを、補体活性化を防止するためにEDTAの存在下、室温で負荷前マウス血清と共に固定希釈(1:100)でインキュベートした。洗浄して非結合抗体を除去した後、細胞表面に特異的に結合した抗体を、処理細胞をr-フィコエリトリン結合抗マウスIgポリクローナル抗体と共にインキュベートすることにより標識した。アッセイにおけるその後のステップは全て、実施例10に記載されるものと類似した。正常マウス血清は非特異的抗体結合のための陰性対照として機能した。高力価マウス血清は3成分rOspAワクチン製剤に対し産生され、OspA血清型2特異的mAbと共に、陽性対照として機能し、OspA血清型特異性および細菌培養物における細胞のOspA発現レベルが確認された。

【0312】

細菌増殖阻害アッセイ。負荷前血清がボレリアの増殖を阻害する効力を測定するために、OspA型2を発現するB・アフゼリ株Arc onを、33℃で段階希釈の熱不活性化負荷前または非免疫マウス血清(陰性対照)の存在下、補体なしで培養した。顕微鏡により決定されるように、非免疫血清と共にインキュベートした対照培養物中の細菌が十分増殖した時に、正確な細胞計数を、フローサイトメトリー分析により実施した。細菌を計数するために使用する手順は、実施例10において増殖阻害アッセイについて前述したものに類似した。細菌増殖を50%阻害した血清希釈を、NMS対照と比較して計算し、GI-50力価として報告した。標準血清調製物を使用して、異なるアッセイ間で力価を正規化した。

【0313】

統計分析。測定した血清パラメータの分布を感染および防御動物間で、ノンパラメトリックマンホイットニーU検定(Graphpad Prism Version 5.0)により比較した。

【0314】

結果。0.003 pgのrOspA 1/2で3回免疫化し、8匹の野生マダニにより負荷した20匹の動物のうち、7/20(35%)が感染したことが見い出された。マダニの入手可能性が制限されているため、非免疫化マウスの対照群を負荷することによる負荷の正確な感染率を決定することができなかった。しかしながら、この負荷は本研究の目的のために必要ではなく、典型的には70~80%の感染率が、Budweis由来の野生マダニによる負荷実験において達成されている。

【0315】

表面結合($p = 0.007$)および増殖阻害($p = 0.03$)アッセイの結果について、防御および感染群の間で有意な差が検出された(図20)。

【0316】

結論。この研究では、負荷時のマウス血清中の機能的抗体含量とマウス1匹当たり8匹のマダニを適用した野生マダニ負荷による感染に対する防御の間には統計学的に有意の相関が存在することが示された。OspA型2を発現する生ボレリアのFACSに基づく蛍光強度測定は、細胞表面に付着された抗OspA抗体分子の数を反映し、固定希釈で負荷前血清と共に細菌をインキュベートした後に実施されたが、これは防御と最もよく相関し

10

20

30

40

50

た。増殖阻害力価もまた、防御とよく相関した。効率的な殺滅のために補体が必要とされる狭義のボレリアブルグドルフェリ株とは対照的に、r O s p A 1 / 2 抗原は、補体が存在しなくても、ボレリア増殖を効果的に阻害する抗体を誘導した。

【 0 3 1 7 】

実施例 1 0 および 1 1 に示される研究の結果は、まとめると、生ボレリアへの表面結合抗体の平均蛍光強度 (M F I) および免疫マウス血清 G I - 5 0 力価のインビトロパラメータを、能動的マウス防御モデルが現在利用できる両方の例 (例えば、すなわち、狭義の B . ブルグドルフェリ O s p A 型 1 株のための針負荷モデルおよび B . アフゼリ O s p A 型 2 株のためのマダニ負荷モデル) における「防御の関連要因」として確立させる。さらに、O s p A 型 3 ~ 6 を発現する相同 B . ガリニ株に対する防御を評価するための信頼できる能動的防御モデルがない場合、推論によって、前述のモデルを、全てのワクチン相同 O s p A 型を発現する株のため、さらに異種 O s p A 型を発現するもののための様々なワクチン製剤の防御可能性および交差株カバレッジを評価するためのインビトロ「防御の代替マーカー」として使用することができる。実際、機能的免疫応答アッセイを使用する研究を、3 成分キメラ r O s p A ワクチン製剤で免疫化したマウス由来の免疫血清に対し実施した場合、同程度の M F I および G I - 5 0 力価が、B . ガリニ (O s p A 型 3 、 4 、 5 、 6) に得られ (実施例 1 3 を参照されたい) 、よって、これらの防御の代替マーカーにより、防御反応が、現在能動的マウス防御モデルが存在しない株に対しても達成されたことが示される。さらに (a) 個々のキメラ r O s p A 抗原 ; (b) 可能な 2 成分キメラ r O s p A 抗原ワクチン製剤組み合わせのうちのいずれか 1 つ ; または (c) 3 成分キメラ r O s p A 抗原製剤のうちのいずれかで免疫化したマウスの免疫応答を比較することにより、後者の 3 成分ワクチンが O s p A 型 1 ~ 6 を発現する株を最適にカバーするのに要求されることを示すことが可能であった (実施例 1 4) 。さらに、これらのインビトロ代替マーカーアッセイの使用により、3 成分キメラ r O s p A ワクチン製剤 (r O s p A 1 / 2 、 r O s p A 6 / 4 、および r O s p A 5 / 3) でマウスを免疫化した後に生成される免疫応答は、ワクチン内に存在する相同 O s p A 型 1 ~ 6 (実施例 1 6 を参照されたい) 以外に、今まで試験された型 1 、 2 、 3 、 5 、および 6 の型内変異体 (またはサブタイプ) 全てに (実施例 1 5 を参照されたい) ならびにさらに異種 O s p A 型に対する機能的免疫応答を誘導することを示すことが可能であった。

【 0 3 1 8 】

実施例 1 2 :

3 つの抗原 (1 / 2 、 6 / 4 、および 5 / 3) を含む多価組換え O S P A 製剤はマウスにおいて高度に免疫原性である

多価 O s p A ワクチン (r O s p A 1 / 2 、 r O s p A 5 / 3 、および r O s p A 6 / 4) をマダニ負荷モデルにおいて評価した。O s p A 血清型 1 および 2 (配列番号 2) 、 O s p A 血清型 6 および 4 (配列番号 4) 、ならびに O s p A 血清型 5 および 3 (配列番号 6) 由来の防御エピトープを含有する 3 つの組換え O s p A 抗原を 1 つのワクチン内で組み合わせた。

【 0 3 1 9 】

1 0 匹の雌 C 3 H / H e J マウス (免疫化年齢 : 1 1 週) の群を、0 および 2 8 日目に、固定用量の 0 . 3 μ g の多価ワクチン (0 . 1 μ g の各 r O s p A 1 / 2 、 r O s p A 5 / 3 、および r O s p A 6 / 4) で皮下に免疫化した。マダニ負荷を、本明細書に上述されるように、チェコ共和国の B u d w e i s 由来のマダニを用いて実施した。野生マダニが広義の B . ブルグドルフェリをマウスに伝染させる能力は、非免疫化対照動物に負荷することにより確認した。負荷したマウスの感染状態は、ウェスタンブロッティング、リアルタイム P C R 、および培養により決定した。

【 0 3 2 0 】

中間血液試料を 4 1 日目に眼窩穿刺により採取した。最終血液試料 (7 0 / 7 1 日目) を心臓穿刺により収集した。個々の血清を全血から遠心分離 (1 0 分 ; 1 0 0 0 - 2 0 0 0 \times G ; R T) により調製した。血清を、使用するまで - 2 0 以下で保管した。

【0321】

この実験では、マウスに負荷するために使用された同じバッチからとった摂食させていないマダニを特徴付けし、全体の感染率を決定し、感染生物の種を確認した。80匹の幼虫マダニを、16S rRNAリアルタイムPCRにより、広義のB.ブルグドルフェリDNAの存在について試験し、32.5% (26/80) が感染したことが見い出された。OspA血清型は26匹の感染した幼虫のうち22匹に対しPCR-ELISAにより決定することができ、86% (19/22) はB.アフゼリとして、14% (3/22) は狭義のB.ブルグドルフェリとして分類した。

【0322】

非免疫化対照マウスは全て (100% ; 10/10) 感染し、一方、多価rOspAワクチンで免疫化したマウスの1匹だけが感染した (10% ; 1/10)。感染したマウスを同定するために使用した異なる方法間で100%一致した。多価rOspAワクチンでは、対照群に比べ、統計的に極めて大きな防御が得られた ($p = 0.00012$; Fisher 直接両側検定)。

【0323】

これらのデータは、rOspA 1/2 抗原を含有する多価rOspAワクチンによる免疫化は、B.アフゼリ、血清型2のOspAを発現するボレリア種による感染を防止することができることを示す。さらに、追加のrOspA 抗原を含んでも、rOspA 1/2 抗原により与えられる防御免疫に拮抗作用を有する証拠はない。

【0324】

このワクチンは、OspA 1/2 抗原により見られるものと同等であるB.アフゼリによるマダニ媒介性感染に対する防御を提供した；0.2% Al(OH)₃と共に製剤化され、2用量のスケジュールで投与された0.3 µgのワクチン (0.1 µgの各抗原) は、ウェスタンブロット、ボレリアの培養、およびPCRによるボレリアDNAの検出により決定されるように、90%防御を提供した。

【0325】

実施例13：

3成分ワクチン (OSP A 1/2、OSP A 6/4、およびOSP A 5/3) を含むワクチンは、OSP A 型1~6を発現するボレリア株に結合し、その増殖を阻害する高レベルの機能的抗OSP A抗体を誘導する

表面結合 (MFI) および増殖阻害 (GI - 50力価) はいずれも、針負荷 (狭義のB.ブルグドルフェリ) モデル (実施例10) およびマダニ負荷 (B.アフゼリ) マウスモデル (実施例11) において良好な防御の関連要因であることが示されているため、本研究は、ワクチンの有効性を調査するために有効なインビボ防御モデルがない、B.ガリニOspA血清型3~6に対する3成分キメラrOspA抗原ワクチン製剤により同等の機能的免疫応答が誘導されるかどうかを決定するために着手した。

【0326】

マウス免疫化。10匹の雌C3H/HeJマウスの群を皮下に3回 (0日目、14日目、28日目)、rOspA - 1/2、rOspA - 6/4、およびrOspA - 5/3) の1:1:1混合物を、3つの異なる用量で (1用量当たり1、0.1、0.03 µg タンパク質)、0.2% Al(OH)₃をアジュバントとして併用して免疫化した。血清を40日目に採った血液試料から生成させた。

【0327】

生ボレリアの表面に結合するOspA抗体の定量。このアッセイでは、OspA型1~6を発現する6つの代表的なボレリア株 (狭義のB.ブルグドルフェリB31/OspA - 1 ; B.アフゼリArcon/OspA - 2 ; B.ガリニPBr/OspA - 3 ; B.ガリニDK6/OspA - 4 ; B.ガリニW/OspA - 5 ; およびB.ガリニKL11/OspA - 6) のインピトロで増殖させた培養物を、補体活性化を防止するためにEDTAの存在下、室温で、ピーク力価マウス血清のプールによる固定希釈 (1:100) で、インキュベートした。その後の洗浄、標識、検出、および分析手順は、実施例10に記

10

20

30

40

50

載されるものと類似した。正常マウス血清は、抗体の非特異的結合のための陰性対照として機能した。

【0328】

細菌増殖阻害アッセイ。負荷前血清がボレリアの増殖を阻害する効力を測定するために、O s p A 型 1 ~ 6 を発現する 6 つの代表的な株 (B 3 1、A r c o n、P B r、D K 6、W、および K L 1 1) を、3 3 で、熱不活性化ピーク力価血清プールまたは非免疫マウス血清 (陰性対照) の段階希釈の存在下で培養した。B 3 1 を補体 (モルモット血清) の存在下で培養し、他の 5 つの株は補体なしで試験した。再び、増殖阻害アッセイを実施例 1 0 に記載されるように実施した。標準血清調製物を使用して、異なるアッセイ間で力価を正規化した。

10

【0329】

抗 O s p A 抗体応答の表面結合および増殖阻害効率。3 成分ワクチンの 1 : 1 0 0 希釈での異なる免疫化用量群 (1 用量あたり 1 . 0、0 . 1、および 0 . 0 3 μ g タンパク質) 由来の 3 つの血清プールを用いて試験した場合、5 0 ~ 2 0 0 の範囲の M F I 値を有する強い蛍光染色が、6 つ全てのボレリア株に対し観察された (図 2 1)。3 つの用量群由来の血清プールをそれらが細菌増殖を阻害する能力に対して試験した場合、3 成分ワクチンはまた、6 つ全ての O s p A 型株に対し、1 0 0 0 (型 4 株、0 . 0 3 μ g 用量) ~ 2 0 , 0 0 0 (型 6 株) の範囲の強い G I - 5 0 力価を誘導したことが見い出された。

【0330】

結論。まとめると、これらの結果は r O s p A 抗原が高度に免疫原性であり、大量の機能的抗体を誘導し、これは生ボレリアの表面に結合し、ボレリアの増殖を阻害することができることを証明する。試験した 6 つの株の間のカバレッジは、高い蛍光強度および高い増殖阻害力価が検出され、O s p A 型 1 および 2 に観察されたレベルに匹敵したため、完全であった。要するに、この研究で示される結果は、3 成分 r O s p A ワクチン (1 / 2 + 5 / 3 + 6 / 4) により誘導された抗体応答は、A 1 (O H) 3 と共に製剤化された場合、O s p A 型 1 ~ 6 を発現する株による感染を防止し、これは、疫学調査が示しているように、理論的には欧州および北米においてヒト疾患を引き起こす分離株の 9 9 % を上回ってカバーし、したがって、ライムボレリア症を防止するのに非常に有効である。

20

【0331】

実施例 1 4 :

3 成分ワクチン (O S P A 1 / 2、O S P A 6 / 4、および O S P A 5 / 3) を含むワクチンは、O S P A 型 1 ~ 6 を発現するボレリアを最適にカバーするために必要とされる

30

この研究の目的は、r O s p A ライムボレリア症ワクチンの単一および多成分製剤により誘導された機能的表面結合および / または増殖阻害抗体の免疫原性および交差株カバレッジを、再び、抗 O s p A 抗体の生ボレリアの表面に結合するおよびインビトロでのボレリアの増殖を阻害する効率を防御の関連要因として使用して、調査、比較することであった。

【0332】

マウスの免疫化。1 群当たり 1 0 匹の雌マウス (C 3 H) を、0 . 1 μ g の、r O s p A 1 / 2 抗原、r O s p A 6 / 4 抗原、もしくは r O s p A 5 / 3 抗原を含む単一成分ワクチン ; 0 . 1 μ g の、1 / 2 + 5 / 3 抗原、1 / 2 + 6 / 4 抗原、もしくは 5 / 3 + 6 / 4 抗原両方を含む 2 成分ワクチン ; または 0 . 1 μ g の、3 つ全ての 1 / 2 + 5 / 3 + 6 / 4 抗原の組み合わせをアジュバントとして 0 . 2 % A I (O H) 3 と共に含む 3 成分ワクチンにより、プライム - ブースターレジメンで免疫化した。ワクチン接種を、皮下で 0、1 4、および 2 8 日目に、2 0 0 μ l の用量体積を用いて実施した。4 2 日目に、個々の血液試料をマウスから採取し、血清を生成させた。

40

【0333】

抗体表面結合および増殖阻害アッセイ。表面結合アッセイのわずかに修正したバージョンを使用して、抗 O s p A I g G の生ボレリアの表面に結合する効率を決定した。明確

50

な M F I 力価を有する血清プールの段階希釈を分析で含み、標準曲線を作製し、これから、試験血清の相対力価を、非線形回帰曲線を用いて補間した後に読み取った。O s p A 型 1 ~ 6 を発現する個々の株に対する標準血清の M F I 力価は、ボレリアの蛍光強度が正常マウス血清で観察される蛍光強度を少なくとも 3 倍超える最高希釈として規定された。全ての定量は 2 連に実施した。

【0334】

図 2 2 に示される散布図は、単一 r O s p A 抗原または r O s p A 抗原組み合わせのいずれかで免疫化した後の個々の C 3 H マウスの免疫血清に対し観察される相同 O s p A 型を発現する 6 つの株に対する M F I 力価を比較する。結果から、3 つ全ての r O s p A 抗原 (1 / 2 、 5 / 3 、 および 6 / 4) を含有する製剤は、O s p A 型 1 ~ 6 を発現する 6 つ全てのボレリア株に対して高 M F I 力価を誘導するのに必要であったこと、2 つの r O s p A 抗原からなる製剤 (すなわち 4 つの株をカバーする) は、製剤中に存在しない 2 つの O s p A 型を発現する株を完全にはカバーしなかったことが示された。

10

【0335】

様々なワクチン組み合わせの、増殖阻害抗体を誘導する効力を決定するために、それぞれ、O s p A 型 1 ~ 6 を発現する 6 つの代表的なボレリア株 (B 3 1 、 A r c o n 、 P B r 、 D K 6 、 W 、 K L 1 1) を、3 3 で、熱不活性化免疫または非免疫マウス血清プールの存在下で培養した。全ての血清を単一希釈で試験した。下記希釈を使用した : B 3 1 、 P B r 、 および K L 1 1 は 1 : 2 0 0 、 A r c o n 、 D K 6 、 および W は 1 : 1 0 0 。 P B r を 2 0 % 補体なしで培養したが、他の 5 つの株は補体存在下で試験した。仔ウサギ補体を、D K 6 、 W 、 および K L 1 1 に使用したが、モルモット血清を B 3 1 および A r c o n では使用した。顕微鏡によって決定されるように、非免疫血清と共にインキュベートした対照培養物中の細菌が十分増殖した時に、正確な細胞計数を前に記載したように実施した (実施例 1 0 を参照されたい) 。細菌増殖阻害のパーセンテージを、正常マウス血清対照に対して試験血清で観察された細胞計数から計算した。試験した異なる製剤に対して観察される全体の増殖阻害を、その後、5 0 % を超える増殖阻害を示した 1 0 匹の C 3 H マウスの異なる群間の動物の数として示した (図 2 3) 。結果から、3 成分製剤が、O s p A 型 1 ~ 6 を発現する 6 つ全ての代表的な株に対して高力価の増殖阻害抗体を誘導することができる唯一の製剤であることが証明された (図 2 3) 。全ての場合において、3 成分ワクチン製剤は、9 0 % を超えるの免疫化動物において 5 0 % を超える増殖阻害を提供した。2 成分ワクチン製剤は、ワクチン中に存在しない O s p A 型を発現する 2 つの株を完全にはカバーしなかった。r O s p A 1 / 2 + 6 / 4 を含む製剤は、型 3 株をカバーせず ; r O s p A 1 / 2 + 5 / 3 製剤を含む製剤は、型 4 または 6 をカバーせず ; r O s p A 5 / 3 + 6 / 4 を含む製剤は型 1 をカバーしなかった。

20

30

【0336】

実施例 1 5 :

多価 O S P A ワクチン製剤は、O S P A 型 1 ~ 6 の型内変異体またはサブタイプを発現するボレリアをカバーする

ボレリア O s p A 型 1 ~ 6 を、多価 r O s p A ワクチンの設計および構築のための基礎として選択したが、型 1 、 2 、 3 、 5 、 および 6 の O s p A タンパク質変異体が発現するボレリアもまた単離されている。これらの変異体は、同じ型内にあると分類されるが、わずかに変化したヌクレオチド遺伝子配列およびアミノ酸タンパク質配列を有する。したがって、型内変異体またはサブタイプが O s p A 型 1 、 2 、 3 、 5 、 および 6 の間に存在する (図 2 4 を参照されたい) 。O s p A 型 4 では、型内変異体またはサブタイプがまだ観察されていない。

40

【0337】

この研究の目的は、3 成分多価 r O s p A ワクチンでマウスを免疫化することにより生成された免疫血清が、これらの型内変異体またはサブタイプを発現する生ボレリアの表面に結合することができる機能的抗体を含有することを確認することであった。

【0338】

50

この研究のために、プールしたマウス免疫血清を、70匹の雌C3Hマウスを3回、0.3 µgの3成分多価rOspAワクチンで、0、14、および28日目に免疫化することにより生成させた。42日目にマウスを出血させ、血清を採取し、プールした。プールした免疫血清をその後使用して、生ボレリア表面への抗体の結合について試験した。ボレリア培養物を、免疫血清プールまたは対照正常マウス血清と1:100で2連にインキュベートし、細菌への抗OspA抗体の結合を測定するボレリアの蛍光強度を、本明細書に上述されるようにFACS分析によりモニタリングした。

【0339】

1:100の血清希釈での高レベルの表面結合抗体（非免疫化マウス対照血清に対して観察されるものの10倍超の蛍光強度として規定される）が、OspAサブタイプ1~6を発現する株のほとんどに対して検出された。特に、高レベルの抗体結合が、OspAサブタイプ1a、1b、1c、1d、1f、1h、1j、1k、および1l；2a、2b、2e、2g、2k、2l、および2n；3a、3c、3d、および3e；5aおよび5c；ならびに6a、6e、6f、6g、および6kを発現するボレリア株で観察された（図24）。より弱い結合（非免疫化マウス対照血清に対して観察されるものの2~10倍の蛍光強度として規定される）が、OspAサブタイプ1g、2j、2m、3b、5d、および6lを発現するボレリア株で観察された（図24）が、このより弱い結合は、主に使用した増殖条件下でのOspAタンパク質の低い発現によるものであった。

10

【0340】

結論。3成分キメラrOspAワクチンは、C3Hマウスにおいて、OspA型1、2、3、5、および6の全ての型内変異体またはサブタイプに対して機能的、表面結合抗体を誘導する。

20

【0341】

実施例16：

多価OSP Aワクチン製剤は、OSP A型1~6を発現するものに加えてボレリアの他の型に対する防御を提供する

この研究の目的は、3成分キメラrOspA抗原ワクチン製剤（3つ全てのキメラ抗原1/2、6/4、および3/5を含む）が相同OspA型1~6以外のOspA型を発現するボレリアに対しても防御を提供することができるかを決定することであった。40匹のC3Hマウスを3回、0.3 µgの3成分ワクチンで、0、14、および28日目に免疫化した。42日目にマウスを出血させ、血清プールを作製し、これを使用して、異種OspA型を発現する株に対する表面結合および増殖阻害の効率を評価した。

30

【0342】

この研究の結果は、3成分キメラrOspAワクチンが、ボレリアの表面に結合し、ボレリアの他の型、例えばB.スピエルマニイ、B.パラシアナ、B.ルシタニアエ、およびB.ジャポニカの株（表9を参照されたい）の増殖を阻害する抗体を誘導することを示した。OspA型7を発現するB.ガリニの場合、弱い表面結合のみが観察され、増殖阻害はほとんどまたは全く観察されなかった；しかしながら、この弱い結合および少量の増殖阻害は、免疫血清抗体の結合の欠如よりも、使用されるインビトロ培養条件下でのOspAの低い発現レベルによるものであり得る。

40

【表 9】

【表 9】 ボレリアの他の型に対する表面結合および増殖阻害

遺伝子型	B.スピエル		B.バライシア		B.ルシタニア		B.ジャポニ	
	B.g.OspA-7	マニイ	ナ	エ	エ	カ	カ	カ
表面結合	(+)	+	+	+	+	+	+	+
増殖阻害	-	+	+	+	+	+	+	+

＋：有意な表面結合および／または増殖阻害

－：有意な結合／増殖阻害なし

(＋－)：強度の低い表面結合

10

【0343】

実施例 17：

多価OSP Aワクチン製剤は、全てのOSP Aを発現するボレリア株に対する防御に寄与することができる、OSP A分子のN末端の共通エピトープに対する抗体を誘導する

多価キメラrOsp A製剤の防御効率を調査する過程中、モノクローナル抗体が(F237/BK2)が、rOsp A-1/2およびrOsp A-6/4を含む2成分rOsp Aワクチンに対して生成された。F237/BK2は、抗Osp A ELISAにより、これまで調査した全てのOsp A型(Osp A型1~7)、ならびに3つのキメラrOsp A抗原(rOsp A-1/2、rOsp A-5/3、およびrOsp A-6/4)に結合することが示された。そのような結果から、F237/BK2が全てのOsp A分子上で見られる共通エピトープを認識することが示される。さらに、予備的エピトープマッピング研究は、この共通エピトープが分子のより可変性の低いN末端半分(すなわち、アミノ酸130のN末端)に位置し、そこではOsp A配列相同性が最も一般的に観察されることを示す。

20

【0344】

興味深いことに、F237/BK2はまた、C末端型特異的エピトープに対して作られるモノクローナル抗体よりも効率が低い、相同Osp A型1~6および異種Osp A型、例えばB.スピエルマニイ、B.バライシアニア(B. valaisiana)、およびB.ジャポニカにより発現されるものを発現するボレリアの表面に結合することが示された。前の実施例に記載されるものと同様の方法を用いて、F237/BK2はまた、Osp A型1、2、4、5、および6を発現する代表的な株の増殖を阻害することが見出された。

30

【0345】

F237/BK2をマウスにおいてインビボ受動防御モデルで試験した場合、F237/BK2は、B.アフゼリ型2の負荷に対応する野生マダニ負荷に対して防御を与えることが観察された。マダニは、Wundschuh (Styria、オーストリア)において収集し、これは、主にB.アフゼリに感染することが知られている。10匹の雌C3Hマウスに、500 µgの親和性精製したmAb F237/BK2を腹腔内注射した。2時間後、動物1匹当たり8匹のマダニを、10匹の受動免疫化マウスならびに10匹の偽免疫化動物に適用した。4日後、摂食させたマダニを除去した。90日目に、本明細書に上述されるように、マウスを殺処分し、血清学的試験、PCR分析、およびボレリア培養により感染について分析した。F237/BK2で処理した群では、動物は感染していなかったが、対照群では5匹の動物(50%)がB.アフゼリに感染した。したがって、モノクローナル抗体F237/BK2は、偽免疫化対照マウスに比べ、マダニ負荷に対し統計学的に有意な(p=0.0325)受動防御を提供した。分子のN末端半分の共通エピトープに結合するモノクローナル抗体が、防御に関与していることが報告されたのはこれが初めてである。さらに、ワクチンがこの共通エピトープを認識する抗体を誘導することができる場合、そのような抗体はワクチンの交差防御効率に確実に寄与するであろう。

40

【0346】

50

そのような抗体が実際に3成分キメラrOspAワクチン製剤により誘導されたか試験するために、ペルオキシダーゼ標識F237/BK2を使用してモノクローナル抗体阻害ELISAを実施した。これらの実験では、GST-OspA型3タンパク質をコーティング抗原として使用し、正常マウス血清または3成分キメラrOspAワクチンで3回免疫化したC3Hマウス由来の血清プールのいずれかを、1:100の希釈でウェルに添加した。60分後、ペルオキシダーゼ標識F237/BK2を、予め最適化した濃度で添加し、最終的には非阻害正常マウス血清対照に対し約1の光学密度(OD)値を与え、インキュベーションをさらに60分続けた。最後に、ELISAプレートを洗浄し、TMB基質で発現させた。

【0347】

10

このモノクローナル抗体阻害ELISAアッセイを使用して、3成分キメラrOspA製剤が、実際にmAb F237/BK2により認識されるエピトープと同一のまたはすぐ近くのエピトープに結合する抗体を誘導することが証明されるであろう。OD値は、非阻害正常マウス血清対照に比べ、抗OspA免疫血清により著しく減少した(例えば、典型的には20~30%)。

【0348】

結論。この研究は、3成分キメラrOspAワクチンが型特異的および広い交差防御免疫応答の両方を誘導することができることを示す。

【0349】

20

実施例18:

追加の合成OSPA核酸およびポリペプチド分子

この研究の目的は、それぞれ、血清型1および2、6および4、ならびに5および3を含む追加の新規OspA抗原を設計することであった。3つの合成OspA遺伝子(配列番号168(orig OspA 1/2)、170(orig OspA 6/4)、および172(orig OspA 5/3))を、ボレリアのOspA血清型1および2(orig OspA 1/2)、OspA血清型6および4(orig OspA 6/4)、ならびにOspA血清型5および3(orig OspA 5/3)に由来する防御エピトープを有するOspAポリペプチド分子をコードするように設計した。これらの分子の一次アミノ酸配列(それぞれ、配列番号169、171、および173)を表1で提供する。これらの配列はオリジナルキメラ構築物を含む、すなわち変異およびコドン最適化を有さない。

30

【0350】

実施例19:

3つの抗原(1/2、6/4、および5/3)を含む多価組換えOSPA製剤は、マウスにおいて免疫原性である

コドン最適化および変異を有さないオリジナル構築物製剤(orig OspA 1/2、orig OspA 5/3、およびorig OspA 6/4)を含む多価OspAワクチンを、マダニ負荷モデルにおいて評価する。OspA血清型1および2(配列番号169)、OspA血清型6および4(配列番号171)、ならびにOspA血清型5および3(配列番号173)由来の防御エピトープを含有する3つの組換えOspA抗原を1つのワクチン内で組み合わせる。

40

【0351】

10匹の雌C3H/HeJマウス(免疫化年齢:11週)の群を、0および28日目に、固定用量の0.3μgの多価ワクチン(0.1μgの各orig OspA 1/2、orig OspA 5/3、およびorig OspA 6/4)で皮下に免疫化する。マダニ負荷を、本明細書に上述されるように、チェコ共和国のBudweis由来のマダニを用いて実施する。野生マダニが広義のB.ブルグドルフェリをマウスに伝染させる能力は、非免疫化対照動物に負荷することにより確認する。負荷したマウスの感染状態は、ウェスタンブロッティング、リアルタイムPCR、および培養により決定する。

【0352】

50

中間血液試料を41日目に眼窩穿刺により採取する。最終血液試料(70/71日目)を心臓穿刺により収集する。個々の血清を全血から遠心分離(10分; 1000 - 2000 x G; RT)により調製する。血清を、使用するまで-20℃以下で保管する。

【0353】

この実験では、マウスに負荷するために使用された同じバッチからとった摂食させていないマダニを特徴付けし、全体の感染率を決定し、感染生物の種を確認する。

【0354】

実施例20:

3成分ワクチン(ORIG OSPA 1/2、ORIG OSPA 6/4、および ORIG OSPA 5/3)を含むワクチンは、OSPA型1~6を発現するボレリア株に結合し、その増殖を阻害する高レベルの機能的抗OSPA抗体を誘導する

実施例13に示される結果は、3成分rOspAワクチン(lipB sOspA 1/2 + lipB sOspA 5/3 + lipB sOspA 6/4)により誘導される抗体応答は、Al(OH)3と共に製剤化された場合、OspA型1~6を発現する株による感染を阻害し、したがって、ライムボレリア症を防止するのに有効である。したがって、本研究は、同等な機能的免疫応答がキメラオリジナル(orig)OspA抗原(Orig sOspA 1/2 + Orig sOspA 5/3 + Orig sOspA 6/4)を含む3成分OspAワクチンにより誘導されるかを決定するために実施される。

【0355】

マウス免疫化。10匹の雌C3H/HeJマウスの群を皮下に3回(0日目、14日目、28日目)、Orig sOspA 1/2 + Orig sOspA 5/3 + Orig sOspA 6/4)の1:1:1混合物を、3つの異なる用量で(1用量当たり1、0.1、0.03 µgタンパク質)、0.2% Al(OH)3をアジュバントとして併用して免疫化する。血清を40日目に採った血液試料から生成させる。

【0356】

生ボレリアの表面に結合するOspA抗体の定量。このアッセイでは、OspA型1~6を発現する6つの代表的なボレリア株(狭義のB.ブルグドルフェリB31/OspA-1; B.アフゼリArcon/OspA-2; B.ガリニPBr/OspA-3; B.ガリニDK6/OspA-4; B.ガリニW/OspA-5; およびB.ガリニKL11/OspA-6)のインビトロで増殖させた培養物を、補体活性化を防止するためにEDTAの存在下、室温で、ピーク力価マウス血清のプールによる固定希釈(1:100)でインキュベートする。その後の洗浄、標識、検出、および分析手順は、実施例10および13に記載されるものと類似する。正常マウス血清は、抗体の非特異的結合のための陰性対照として機能する。

【0357】

細菌増殖阻害アッセイ。負荷前血清がボレリアの増殖を阻害する効力を測定するために、OspA型1~6を発現する6つの代表的な株(B31、Arcon、PBr、DK6、W、およびKL11)を、33℃で、熱不活性化ピーク力価血清プールまたは非免疫マウス血清(陰性対照)の段階希釈の存在下で培養する。B31を補体(モルモット血清)の存在下で培養し、他の5つの株は補体なしで試験する。増殖阻害アッセイを実施例10および13に記載されるように実施する。標準血清調製物を使用して、異なるアッセイ間で力価を正規化する。

【0358】

抗OspA抗体応答の表面結合および増殖阻害効率。3成分ワクチンの1:100希釈での異なる免疫化用量群(1用量当たり1、0.1、および0.03 µgタンパク質)由来の3つの血清プールを用いて試験した場合、蛍光染色を6つ全てのボレリア株に対し測定する。

【0359】

実施例21:

3成分ワクチン (O S P A 1 / 2、O S P A 6 / 4、およびO S P A 5 / 3) を含むワクチンは、O S P A 型 1 ~ 6 を発現するボレリアを最適にカバーするために必要とされる

この研究の目的は、O r i g s O s p A ライムボレリア症ワクチンの単一および多成分製剤により誘導された機能的表面結合および / または増殖阻害抗体の免疫原性および交差株カバレッジを、抗 O s p A 抗体の生ボレリアの表面に結合するおよびインビトロでのボレリアの増殖を阻害する効率を防御の関連要因として使用して、調査、比較することである。

【 0 3 6 0 】

マウスの免疫化。1群当たり10匹の雌マウス (C 3 H) を、0 . 1 μ g の、O r i g s O s p A 1 / 2 抗原、O r i g s O s p A 5 / 3 抗原、もしくはO r i g s O s p A 6 / 4 抗原を含む単一成分ワクチン；0 . 1 μ g の、1 / 2 + 5 / 3 抗原、1 / 2 + 6 / 4 抗原、もしくは5 / 3 + 6 / 4 抗原両方を含む2成分ワクチン；または0 . 1 μ g の、3つ全ての1 / 2 + 5 / 3 + 6 / 4 抗原の組み合わせをアジュバントとして0 . 2 % A I (O H) 3 と共に含む3成分ワクチンにより、プライム - ブースターレジメンで免疫化する。ワクチン接種を、皮下で0、14、および28日目に200 μ l の用量体積を用いて実施する。42日目に、個々の血液試料をマウスから取り、血清を生成させる。

10

【 0 3 6 1 】

抗体表面結合および増殖阻害アッセイ。上述の表面結合アッセイのわずかに修正したバージョンを使用して、抗 O s p A I g G の生ボレリアの表面に結合する効率を決定する。明確な M F I 力価を有する血清プールの段階希釈を分析で含み、標準曲線を作製し、これから、試験血清の相対力価を、非線形回帰曲線を用いて補間した後に読み取る。O s p A 型 1 ~ 6 を発現する個々の株に対する標準血清の M F I 力価は、ボレリアの蛍光強度が正常マウス血清で観察される蛍光強度を少なくとも3倍超える最高希釈として規定される。全ての定量は2連に実施する。

20

【 0 3 6 2 】

様々なワクチン組み合わせの、増殖阻害抗体を誘導する効力を決定するために、それぞれ、O s p A 型 1 ~ 6 を発現する6つの代表的なボレリア株 (B 3 1、A r c o n、P B r、D K 6、W、K L 1 1) を、33 で、熱不活性化免疫または非免疫マウス血清プールの存在下で培養する。全ての血清を単一希釈で試験する。下記希釈を使用する：B 3 1、P B r、およびK L 1 1 は1 : 200、A r c o n、D K 6、およびWは1 : 100。P B r を20%補体なしで培養するが、他の5つの株は補体存在下で試験する。仔ウサギ補体を、D K 6、W、およびK L 1 1 に使用するが、モルモット血清を、B 3 1 および A r c o n では使用する。顕微鏡によって決定されるように、非免疫血清と共にインキュベートした対照培養物中の細菌が十分増殖した時に、正確な細胞計数を前に記載したように実施する (実施例 10 を参照されたい)。細菌増殖阻害のパーセンテージを、正常マウス血清対照に対して試験血清で観察された細胞計数から計算する。試験した異なる製剤に対して観察される全体の増殖阻害を、その後、50%を超える増殖阻害を示した10匹のC 3 H マウスの異なる群間の動物の数として示す。

30

40

【 0 3 6 3 】

実施例 2 2 :

多価 O S P A ワクチン製剤は、O S P A 型 1 ~ 6 の型内変異体またはサブタイプを発現するボレリアをカバーする

この研究の目的は、3成分多価 o r i g O s p A ワクチン (o r i g s O s p A 1 / 2、o r i g s O s p A 6 / 4、および o r i g s O s p A 5 / 3) でマウスを免疫化することにより生成された免疫血清が、これらの型内変異体またはサブタイプを発現する生ボレリアの表面に結合することができる機能的抗体を含有することを確認することであった。

【 0 3 6 4 】

50

この研究のために、プールマウス免疫血清を、70匹の雌C3Hマウスを3回、0.3 µgの3成分多価os p Aワクチンで、0、14、および28日目に免疫化することにより生成させる。42日目にマウスを出血させ、血清を採取し、プールする。プールした免疫血清をその後使用して、生ボレリア表面への抗体の結合について試験する。ボレリア培養物を、免疫血清プールまたは対照正常マウス血清と1:100で2連にインキュベートし、細菌への抗os p A抗体の結合を測定するボレリアの蛍光強度を、本明細書に上述されるようにFACS分析によりモニタリングする。

【0365】

実施例23:

多価OSPAワクチン製剤の投薬量、安全性、免疫原性、および機能的抗体応答

lip B s O s p A 1 / 2 ^{2 5 1} (配列番号2)、lip B s O s p A 6 / 4 (配列番号4)、およびlip B s O s p A 5 / 3 (配列番号6)を、Al(OH)₃ アジュバントありおよびなしで含む、3つの用量レベル(30、60、および90 µg)の三価(すなわち、3成分多価)ワクチンを、年齢が18~70歳の対象における用量漸増研究で試験した。ワクチン製剤を、二重盲検の無作為化した多角的用量漸増研究において、安全性、免疫原性、抗体持続性、およびブースター応答に関して試験した。対象に、1か月間隔で3回のワクチン接種を受容させた(1日目、29日目、57日目)。ブースターを、9~12か月で、選択された対象に投与した。

【0366】

一次免疫後の安全性

一次免疫後に、安全性を評価した。アジュバントを含む製剤は、全身反応に関して、アジュバントを含まない製剤と比べ優れた耐容性を示した。全身反応について、アジュバントを含む製剤に有意な用量効果はなかった。局所反応については、有意な用量またはアジュバント効果はなかった。アジュバントを含まない製剤90 µgは、耐容性の理由で、ブースター投与から除外した。したがって、予備的結果は、安全情報は、アジュバントを含む製剤の方がアジュバントを含まないものより優れていることを示す。

【0367】

一次免疫後の免疫原性

3回用量でのプライミング後に、実質的な抗体応答があった。アジュバントを含む製剤は、全てのos p A型に対して、アジュバントを含まない製剤と比べ有意に低い免疫原性を示した(ANCOVA分析)。全てのos p A型に関して、85日目に、アジュバントを含む製剤では統計学的に有意な用量効果は存在しなかった。

【0368】

アジュバントを含む製剤30 µgおよび60 µg(予備として)を、より大きな血清反応陰性および血清反応陽性の対象集団におけるさらなる試験に選択した。データは、アジュバントを含む用量30 µgが、免疫原性であり、より高い用量レベルで有意な改善がないことを示す。データは、アジュバントを含む製剤に優れた耐容性があったことを示す。血清反応陰性/血清反応陽性の対象におけるブースターワクチン接種または一次ワクチン接種後に、何らかの優れた応答が示されるかどうかを決定するため、アジュバントを含む用量60 µgを、続けた行った。

【0369】

血清持続性を、最初のワクチン接種の9ヶ月後(271日目)まで観察した。実際には、271日目の抗体持続性は、アジュバントを含む3つの用量レベルで同程度であり、アジュバントを含む90 µgの製剤が、わずかに優れた血清持続性を呈した。アジュバントを含まない製剤により誘導された抗体は、いくらか高いレベルで持続した。

【0370】

ブースターワクチン接種後の免疫原性

ブースターワクチン接種後に、抗体力価に実質的な増加があった。ELISA力価に対し、アジュバントを含むことの統計学的に有意なプラス効果があった。ブースター後のELISA力価には年齢の影響はなかった。機能的抗体力価は、ELISA力価と良好に相

10

20

30

40

50

関した。

【0371】

機能的抗体応答データ

機能的抗体応答を、表面結合アッセイ、モノクローナル抗体の競合的阻害 (mAb CI ELISA)、およびボレリア殺滅 / 増殖阻害アッセイにより測定した。表面結合アッセイは、生ボレリアの表面に結合する試験血清内の抗体のレベルを定量する、フローサイトメトリーに基づくアッセイである。mAb CI ELISA は、マウス抗 O s p A 型特異的 mAb によって規定される、既知の防御的または殺ボレリア特異的エピトープに結合する、試験血清内の抗体の量を測定する。ボレリア殺滅 / 増殖阻害アッセイは、高度に選択的なルシフェラーゼ発光アッセイを用いて ATP レベルに基づき培養物中の生存の数を定量することによって、補体存在下における試験血清の殺滅 / 増殖阻害を測定する。

10

【0372】

一般的に、一次応答および 6 か月の抗体持続性レベルは、アジュバントを含まない製剤よりもわずかに優れていた。しかしながら、ブースター後の機能的抗体応答は、アジュバントを含む製剤では、より優れてはいないものの、同等であった。ブースター後のアジュバントを含む機能的抗体の力価は、(1) 表面結合アッセイではピーク一次応答レベルよりも 10 ~ 12 倍高く、(2) ボレリア殺滅 / 増殖阻害アッセイでは、ピーク一次応答レベルよりも 7 ~ 8 倍高く、(3) mAb CI ELISA アッセイでは一次応答よりも 2 ~ 3 倍高かった。

20

【0373】

ブースターワクチン接種後の安全性

ブースターワクチン接種後に、安全性を評価した。アジュバントを含む製剤およびアジュバントを含まない製剤の両方に、低い割合で全身反応が生じた。全身反応の大半は、軽度であった (中等度の反応は 2 つのみ)。アジュバントありおよびなしの 30 μg の用量群には、軽度の反応のみが報告された。ブースター後 7 日以内に、重度の局所反応は生じなかった。この研究では、これまでのところ、いずれの用量 / 製剤に関連 SAE は存在しない。

【0374】

実施例 24 :

多価 O s p A ワクチン製剤による第 3 相研究の用量の提案

アジュバントありおよびなしの 3 つの用量レベルを、多価 O s p A ワクチン製剤の第 1 / 2 相研究で、様々な対象において試験した。これらの研究は、アジュバントを含む製剤では 3 つの用量でのプライミング後のより良好な耐容性および実質的な抗体応答があることを示した。アジュバントを含む製剤間で、抗体持続性には臨床的に意義のある差はなかった。ブースターワクチン接種後に、アジュバントを含むことに関して抗体力価に対する有意なプラス効果があり、ブースターワクチン接種後の最適な免疫応答は、アジュバントを含む 30 μg の製剤に見られ、より高い用量レベルでも有意な改善はなかった。機能的抗体の結果は、抗 O s p A I g G ELISA 結果を確認した。

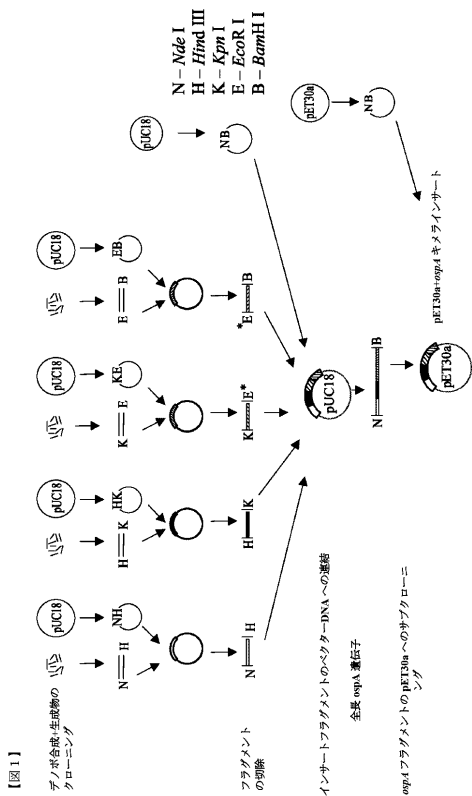
30

【0375】

本発明について、本発明の実施のための特定の様式を含むことが見い出された、またはそのように提案された特定の実施形態の観点から説明してきた。記載した発明の様々な改変および変更が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明を特定の実施形態に関連して記載してきたが、特許請求される本発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。実際に、本発明を実施するための記載された様式の様々な改変は、関連分野の当業者には明らかであり、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

40

【図 1】



【図 1】

【図 3 A】

+1 M R L L I G F A L A L A L I G C
 NdeI
 1 CATATGCGTC TGTGATCGG CTTTGTCTG GCGCTGGCTC TGATCGGCTG
 GTATACGCAG ACAACTAGCC GAAACAGAGC CGCGACCGAG ACTAGCCGAC
 +1 A Q K G A E S I G S V S V D L P
 51 CGCACAGAAA GGTGCTGAGT CTATTGGTTC CTTTCTGTGA GATCTGCCCG
 GCGTGTCTTT CCACGACTCA GATAACCAAG CAAAGACAT CTAGACGGGC
 +1 G E M K V L V S K E K D K N G K Y
 101 GTGAAATGAA GGTTCCTGGT AGCAAGAGAA AAGACAAGAA CGCAAGTAC
 CACTTACTT CCAAGACCAC TCGTTCCTTT TTCTGTCTT GCCGTTCATG
 +1 D L I A T V D K L E L K G I S D K
 151 GATCTCATCG CAACGTCGA CAAGCTGGAG CTGAAAGGTA CTTCTGATAA
 CTAGAGTAGC GTTGGCAGCT GTTCGACCTC GACTTTCAT GAAGACTATT
 +1 N N G S G V L E G V K I N K S K
 201 AAACAACGGC TCTGTGTGTC TGAAGGCGT CAAACTAAC AAGACAAAG
 TTTGTTGCCG AGACACACAG ACCTCCCGCA GTTTGATTG TTCTCGTTTC
 +1 V K L T I S D D L G Q T T L E V F
 HindIII
 251 TAAAGCTTAC GATCTCTGAC GATCTCGGTC AGACCAAGCT GGAAGTTTTC
 TATTGGAATG CTAGAGACTG CTAGAGCCAG TCTGTGCGCA CCTTCAAAAG
 +1 K E D G K T L V S K K V T S K D K
 301 AAAGAGGATG GCAAGACCTT CGTGTCCAAA AAAGTAACTT CCAAGACAA
 TTCTCTCTAC CGTCTCGGGA GCACAGGTTT TTTCATTGAA GGTTCIGITT
 +1 S S T E E K F N E K G E V S E K
 351 GTCCCTACG GAAGAAAAAT TCACGAAAA AGTGAGGTG TCTGAAAGA
 CAGGAGATGC CTTCTTTTAA AGTTGCTTIT TCCACTCCAC AGACTTTTCT
 +1 I I T M A D G T R L E Y T G I K S
 401 TCATCACCAT GGCAGACGCG ACCCGCTTIG AATACACCGG TATTAAAAAG
 AGTAGTGGA CCGTCTGCGG TGGCAGAAC TTATGTGGCC ATAATTTCG
 +1 D G T G K A K Y V L K N F T L E G
 KpnI
 451 GATGGTACCG GTAAAGCGAA ATATGTTCTG AAAAATCTCA CTCTGGAAGG
 CTACCATGGC CATTTGCGCT TATACAAGAC TTTTGAAGT GAGACCTTCC
 +1 K V A N D K I T L E V K E G T V
 501 CAAAGTGGCT AATGATAAAA CCACCTTGGA AGTCAAGGAA GGCACCGTTA
 GTTCCACGGA TTAATATTTT GGTGAACCT TCAAGTTCCT CCGTGGCAAT

【図 2】

【図 2】

1 MRLIGFALA LALIGCAQKG AESIGSVSVD LPGEMKVLVS KEKDKNGKYD
 51 LIATVDKLEL KGTSDKNNGS GVLEGVKTNK SKVKLTISDD LGQTTLEVFK
 101 EDGKTLVSKK VTSKDKSSTE EKFNKGEVS EKIITMADGT RLEYTGKSD
 151 GTGKAKYVLK NTFLEGKVAN DKTTLEVKEG TVTILSMNISK SGEVSVELND
 201 TDSSAATKKT AAWNSKSTL TISVNSKKT QLVTQDITI TVQKYDSAGT
 251 NLEGTAVEIK TLDELKNALK

(配列番号 2)

【図 3 B】

+1 T L S M N I S K S G E V S V E L N
 551 CTCTGAGCAT GAATATCTCC AAATCTGGTG AAGTTCCGT TGAAGTGAAC
 GAGACTCGTA CTTATAGAGG TTAGACCAC TTCAAGGCA ACTTGACTTG
 +1 D T D S S A A T K K T A A W N S K
 EcoRI
 601 GACACTGACA GCAGCGCTGC GACTAAAAAA ACTGCAGCGT GGAATTCCAA
 CTGTGACTGT CGTCGCGACG CTGATTTTTT TGACGTCGCA CCTTAAGGTT
 +1 T S T L T I S V N S K K T T Q L
 651 AACTTCTACT TTAACCAITA GCGTTAACAG CAAAAAACT ACCCAGCTGG
 TTGAAGATGA AATTGGTAAT CGCAATTGTC GTTTTTTTGA TGGGTCGACC
 +1 V F T K Q D T I T V Q K Y D S A G
 701 TGTTCACTAA ACAAGACACG ATCACTGTGC AGAAATACGA CTCGCGAGGC
 ACAAGTGATT TGTTCGTGTC TAGTGACACG TCTTTATGCT GAGGCGTCCG
 +1 T N L E G T A V E I K T L D E L K
 751 ACCAAGCTAG AAGGCACGCG AGTCGAAAT AAACCCCTTG ATGAAGTGA
 TGGTTGAATC TTCCGTGCGG TCAGCTTTAA TTTTGGGAAC TACTTGACTT
 +1 N A L K *
 Bpu1102I BamHI
 801 AAACGCGCTG AAATAAGCTG AGCGGATCC
 TTTGCGCGAC TTTATTCGAC TCGCCTAGG

lipB sOspA 1/2²⁹¹ スクレオチド配列(配列番号 1)、およびアミノ酸配列(配列番号 2)相補的ヌクレオチド配列(配列番号 48)

【図 4】

1 MRLIGFALA LALIGCAQKG AESIGSVSVD LPGGMTVLVS KEKDKNGKYS
 51 LEATVDKLEL KGTSDKNNGS GTLEGEKTNK SKVKLTIAAD LSQTKFEIFK
 101 EDAKTLVSKK VTLKDKSSTE EKFNKGETS EKTIVMANGT RLEYTDIKSD
 151 GSGKAKYVLK DFTLEGLAA DGKTTLVKTE GTVVLNMIL KSGEITVALD
 201 DSDTTQATKK TGKWDNSTST LTIISVNSKKT KNIVFTKEDT ITVQKYDSAG
 251 TNLEGNAVEI KTLDELKNAL

(配列番号 4)

【図 5 A】

【図 5 A】

```
+1 M R L L I G F A L A L A L I G C
NdeI
-----
1 CATATGCGTC TGTGTATCGG CTTTGCTCTG GCGCTGGCTC TGATCGGCTG
GTATACGCAG ACAACTAGCC GAAACGAGAC CGCGACCGAG ACTAGCCGAC

+1 A Q K G A E S I G S V S V D L P
51 CGCACAGAAA GGTGCTGAGT CTATTGGTTC CGTTTCTGTA GATCTGCCCG
GCGTGTCTTT CCACGACTCA GATAACCAAG GCAAAGACAT CTAGACGGGC

+1 G G M T V L V S K E K D K N G K Y
101 GTGGCATGAC CGTTCGTGTC AGCAAGAGAA AAGACAAAA CGGTAATATC
CACCGTACTG GCAAGACGAC TCGTTTCTTT TTCTGTTTT GCATTATATG

+1 S L E A I V D K L E L K G T S D K
HindIII
-----
151 AGCCTCGAGG CGACCGTCGA CAAGCTTGAG CTGAAGGCA CCTCTGATAA
TCGGAGCTCC GCTGGCAGCT GTTCGAAGTC GACTTCCGT GGAGACTATT

+1 N N G S G T L E G E K T N K S K
201 AAACAACGGT TCCGSCACCC TGGAAAGTGA AAAAAGTAAC AAAAGCAAAG
TTTGTGCA AGGCGGTGGG ACCTTCCACT TTTTGTATTG TTTTGTGTTT

+1 V K L T I A D D L S Q T K F E I F
251 TGAACCTGAC CATTCGTGAT GACCTCAGCC AGACCAAAAT CGAAATTTTC
ACTTTGACTG GTAACGACTA CTGGAGTCGG TCTGGTTTAA GCTTTAAAG

+1 K E D A K T L V S K K V T L K D K
301 AAAGAAGATG CCAAAACCTT AGTATCCAAA AAAGTGACCC TGAAGACAAA
TTTCTTCTAC GGTTTTGAAA TCATAGGTTT TTCTACTGGG ACITTCTGTT

+1 S S T E E K F N E K G E T S E K
351 GTCTCTTACC GAAGAAAAAT TCAACGAAAA GGGTGAAACC TCTGAAAAAA
CAGGAGATGG CTTCCTTTTA AGTTGCTTTT CCCACTTTGG AGACTTTTTT

+1 T I V M A N G T R L E Y T D I K S
KpnI
-----
401 CCATCGTAAAT GGCAAAATGGT ACCCGTCTGG AATACACCGA CAICAAAAGC
GGTAGCATT ACGTTTACCA TGGCAGACC TTATGTGGCT TAGTTTTTCG

+1 D G S G K A K Y V L K D F T L E G
451 GATGGCTCCG GCAAGGCCAA ATACGTTCTG AAGAGCTTCA CCTTGGAAGG
CTACCGAGGC CGTTTCGGTT TATGCAAGAC TTCTGAAAT GGGACCTTCC

+1 T L A A D G K T T L K V T E G T
501 CACCTCGCT GCGGACGCGA AAGCCACTT GAAAGTTACC GAAGGCACTG
GTGGGAGCGA CGGCTGCCST TTTGGTGGAA CTTTCAATGG CTTCCGTGAC
```

【図 5 B】

【図 5 B】

```
+1 V V L S M N I L K S G E I T V A L
551 TTGTTTAAAG CATGAACATC TTAATAATCCG GTGAAATCAC CGTTGCGCTG
AACAAAAATC GTACTGTAG AATTTTAGGC CACTTTAGTG GCAACGCGAC

+1 D D S D T T Q A T K K T G K W D S
601 GATGACTCTG ACACCACTCA GGGCACTAAA AAAACCGGCA AATGGGATTC
CTACTGAGAC TGTGGTGAGT CCGGTGATTT TTTGGCCGT TTACCTTAAG

+1 N T S T L T I S V N S K K T K N
EcoRI
-----
651 TAACACTTCC ACTCTGACCA TCAGCGTGAA TTCCAAAAAA ACTAAAAACA
ATTGTGAAGG TGAGACTGGT AGTCGCACCTT AAGGTTTTTT TGATTTTGT

+1 I V F T K E D T I T V Q K Y D S A
701 TCGTGTTCAC CAAAGAAGAC ACCATCACC TCCAGAAAA CGACTCTGCG
AGCACAAAGT GTTCTTCTG TGGTAGTGGC AGGTCTTTAT GCTGAGACGC

+1 G T N L E G N A V E I K T L D E L
751 GGCACCAACC TCGAAGGCAA CGCAGTCGAA ATCAAAACCC TGGATGAAC
CCGTGCTGG AGCTTCGGT GCGTCAGCTT TAGTTTGGG ACCTACTTGA

+1 K N A L K *
Bpu1102I BamHI
-----
801 GAAAAACGCT CTGAAATAAG CTGAGCGGAT CC
CTTTTGCGA GACTTTAATC GACTCGCCTA GG
```

lipB sOspA 6/4-ヌクレオチド配列(配列番号 3)、およびアミノ酸配列(配列番号 4): 相補のヌクレオチド配列(配列番号 49)

【図 6】

【図 6】

```
1 MRLLIGFALA LALIGCAQKG AESIGSVSVD LPGGMKVLVS KEKDNGKYS
51 LMATVEKLEL KGISDKNNGS GTLEGEKTNK SKVKLTIAED LSKTIFEIFK
101 EDGKILVSKK VTLKDKSSTE EKFNEKGEIS EKTIVMANGT RLEYDIDKSD
151 KITGAKYVLK DFTELGTLAA DGKTTILKYTE GTVTLNMNIS KSGEITVALD
201 DTDSSGNKKS GTWDSDTSL TISKNSQKTK QLVTFKENTI TVQNYNRAGN
251 ALEGSFAEIK DLAEKKAALK
```

(配列番号 6)

【図 7 A】

【図 7 A】

```
+1 M R L L I G F A L A L A L I G C
NdeI
-----
1 CATATGCGTC TGTGTATCGG CTTTGCTTIG GCGCTGGCTT TAATCGGCTG
GTATACGCAG ACAACTAGCC GAAACGAGAC CGCGACCGAA ATTAGCCGAC

+1 A Q K G A E S I G S V S V D L P
51 TGCACAGAAA GGTGCTGAGT CTATTGGTTC CGTTTCTGTA GATCTGCCCG
ACGTGTCTTT CCACGACTCA GATAACCAAG GCAAAGACAT CTAGACGGGC

+1 G G M K V L V S K E K D K N G K Y
101 GGGGTATGAA AGTTTCTGTA AGCAAGAGAA AAGACAAAA CGGTAATATC
CCCCATACTT TCAAGACCAT TCGTTTCTTT TTCTGTTTT GCATTATATG

+1 S L M A T V E K L E L K G T S D K
151 AGCCTGATGG CAACCGTAGA AAAGCTGGAG CTTAAAGGCA CTTCTGATAA
TCGGACTACC GTTGGCATCT TTTGCACTCT GAATTTCCGT GAAGACTATT

+1 N N G S G T L E G E K T N K S K
201 AAACAACGGT TCTGGCACC TGGAAAGTGA AAAAAGTAAC AAAAGCAAAG
TTTGTGCA AGACCGTGGG ACCTTCCACT TTTTGTATTG TTTTGTGTTT

+1 V K L T I A E D L S K T T F E I F
HindIII
-----
251 TAAAGCTTAC TATTGCTGAG GATCTGAGCA AAACCACTTI TGAATCTTTC
ATTTCGAATG ATAACGACTC CTAGACTCGT TTTGGTGGAA ACTTTAGAAG

+1 K E D G K T L V S K K V T L K D K
301 AAAGAAGATG GCAAAATCTT GGTATCTAAA AAAGTAACCC TGAAGACAAA
TTTCTTCTAC CGTTTGTAGA CCATAGATTT TTCTATTGGG ACITTCTGTT

+1 S S T E E K F N E K G E I S E K
351 GTCTTCTACC GAAGAAAAAT TCAACGAAAA GGGTGAAATC TCTGAAAAAA
CAGAAGATGG CTTCCTTTTA AGTTGCTTTT CCCACTTTAG AGACTTTTTT

+1 T I V M A N G T R L E Y T D I K S
KpnI
-----
401 CTATCGTAAAT GGCAAAATGGT ACCCGTCTGG AATACACCGA CAICAAAAGC
GATAGCATT ACGTTTACCA TGGCAGACC TTATGTGGCT GTAGTTTTTCG

+1 D K T G K A K Y V L K D F T L E G
451 GATAAAACCG GCAAGGCTAA ATACGTTCTG AAAGACTTTA CTTCTGGAAGG
CTATTTTGGC CGTTTCGATT TATGCAAGAC TTCTGAAAT GAGACCTTCC

+1 T L A A D G K T T L K V T E G T
501 CACTCTGGCT GCTGACGGCA AAACCACTCT GAAAGTTACC GAAGGCACTG
GTGAGACGGA CGACTGCCST TTTGGTGAAG CTTTCAATGG CTTCCGTGAC
```

【図 7 B】

【図 7 B】

```
+1 V T L S M N I S K S G E I T V A L
551 TTACTCTGAG CATGAACATT TCTAAATCCG GCGAAATCAC CGTTGCACTG
AATGAGACTC GTACTGTAA AGATTTAGGC CGCTTTAGTG GCAACGTGAC

+1 D D T D S S G N K K S G T W D S D
601 GATGACACTG ACTCTAGCGG CAATAAAAAA TCCGCGACCT GGGATTCTGA
CTACTGTGAC TGAGATCGCC GTTATTTTTT AGGCGGTGGA CCCTAAGACT

+1 T S T L T I S K N S Q K T K Q L
PvuII
-----
651 TACTTCTACT TTAACCATTA GCAAAAACAG CCAGAAAACT AAACAGCTGG
ATGAAGATGA AATTGGTAAT CGTTTTTGTG GGTCTTTTGA TTTGTCGACC

+1 V F I K E N T I I T V Q N Y N R A G
701 TATTACCAA AGAAAAACAT ATCACCCTAC AGAACTATAA CCGTGCAGGC
ATAAGTGGTT TCTTTTGTGA TAGTGGCAIG TCTTGATATT GGCACGTCCG

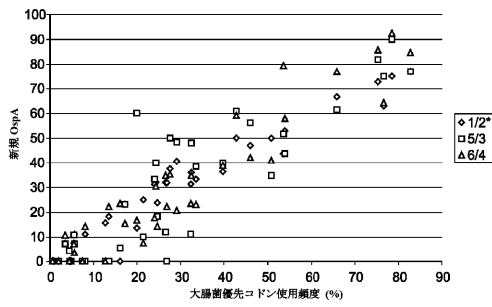
+1 N A L E G S P A E I K D L A E L K
751 AATGCGCTGG AAGGCAGCCC GGCTGAAATT AAAGATCTGG CAGAGCTGAA
TTACGCGACC TTCCGTCGGG CCGACTTTAA TTCTAGACC GTCTGCACTT

+1 A A L K *
Bpu1102I BamHI
-----
801 AGCCGCTTTG AAATAAGCTG AGCGGATCC
TCGGCGAAGC TTTATTGACG TCGCTTAGG
```

lipB sOspA 5/3-ヌクレオチド配列(配列番号 5)、およびアミノ酸配列(配列番号 6): 相補のヌクレオチド配列(配列番号 50)

【図 8】

【図 8】



【図 9】

【図 9】

脂質付加された構築物の 5'配列 (配列番号 31)
 アミノ酸配列 (配列番号 33)
 相補的ヌクレオチド配列 (配列番号 51)

```

+1  M R L L I G F A L A L A L I G C A Q K
NdeI
1  CATATGGCTC TGTGTATCGG CTITGCTCTG GCGCTGGCTC TGAATCGGCTG CCGACAGAAA
   GTATACGCAG ACAACTAGCC GAAACGAGAC GCGACCGAG ACTAGCCGAC GCGTGTCTTT

```

脂質付加されていない構築物の 5'配列 (配列番号 32)
 アミノ酸配列 (配列番号 34)
 相補的ヌクレオチド配列 (配列番号 52)

```

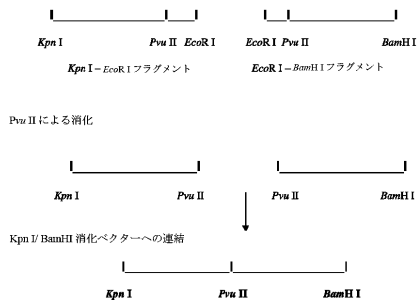
+1  M A Q K
NdeI
1  CATATG**** ***** *GCAC AGAAA
   GTATAC**** ***** *CGTG TCITT

```

【図 14】

【図 14】

デノボ合成生成物のクローニング



最終 lipB sOspA 5/3 構築物 (配列番号 35) において必要とされる配列; 相補的ヌクレオチド配列 (配列番号 53)

```

          PvuII
671      ~~~~~      720
GCAAAACAG CCAGAAACT AAACAGCTGG TATTCACCAA AGAAACACT
CGTITTTGTC GGTCTTTTGA TTGTGCGACC ATAAGTGGIT TCTTTTGTGA

```

Kpn I-EcoRI フラグメントの 3'末端のためのオリゴ (外部 EcoRI 部位を取り込む) (配列番号 36); 相補的ヌクレオチド配列 (配列番号 54)

```

GCAAAACAG CCAGAAACT AAACAGCTGG
CGTITTTGTC GGTCTTTTGA TTGTGCGACCTTAA

```

EcoRI-BamHI フラグメントの 5'末端のためのオリゴ (外部 EcoRI 部位を取り込む) (配列番号 37); 相補的ヌクレオチド配列 (配列番号 55)

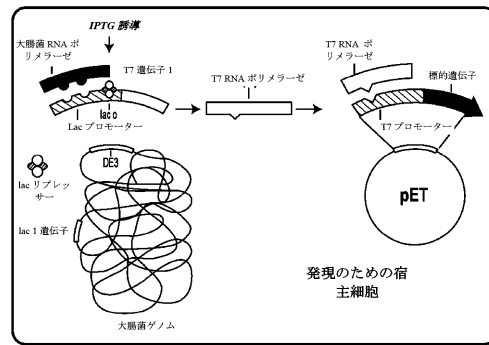
```

AATTC AAACAGCTGG TATTCACCAA AGAAACACT
G TTGTGCGACC ATAAGTGGIT TCTTTTGTGA

```

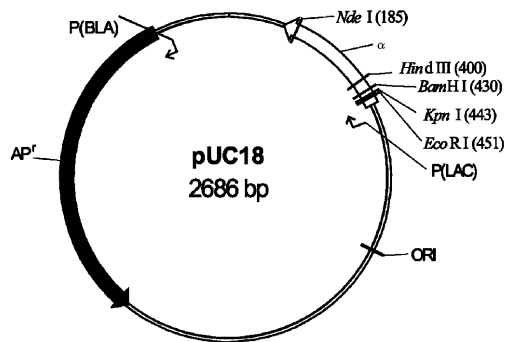
【図 10】

【図 10】



【図 12】

【図 12】



【図 16 A】

【図 16 A】

Blip OspA/BPBP/Al と修飾分子 lipB sOspA 1/2⁵³ との OspA 配列のアライメント

```

M R L L I G F A L A L A L I G C A
1  ATGAGATFAT TAATAGGATT TGCTTTAGCG TTACCTTTAA TAGGATCTGC
1  ATGCGCTCTGT TGAATGCGCTT TGCTCTGCGC CTGGCTCTGA TCGGCTGCGC

Q K G A E S I G S V S V D L P G
51  ACAAAAAGGT GCTGAGTCAA TTGGATCCGT TTACAGTAGAT TTGCTTGGTG
51  ACAGAAAAGGT GCTGAGTCTA TTGGTTCGGT TTCTGTAGAT CTGCGCCGGT

E M K V L V S K E R D K N G K Y D
101  AAATGAAGCT TCTGTGAGC AAAGAAAAG ACAAAAACGG CAAGTACGAT
101  AAATGAAGCT TCTGTGAGC AAAGAAAAG ACAAAAACGG CAAGTACGAT

L I A T V D K L E L K G T S D K N
151  CTAATTGCAA CAGTAGACAA GTCTGAGCTT AAAGGAAGCT CTGATAAAAA
151  CTATCGCAA CCGTCGACAA GTCTGAGCTT AAAGGTACTT CTGATAAAAA

N G S G V L E G V K T N K S K V
HindIII
~
201  CAATGAGTCT GGAGTACITG AAGCGGTAAA AACTAACAAA AGTAAAGTAA
201  CAACGCGTCT GGTGTGCTGG AGGCGCTCAA AACTAACAG AGCAAGTAA

K L T I S D D L G Q T T L E V F K
HindIII
~
251  AATTACAAAT TTCTGACGAT CTAGGTCAAA CCACACTTGA AGTITTCAAA
251  AGCTTACGAT CTCTGACGAT CTGCGTCAAG CCACGCTGGA AGTITTCAAA

E D G K I L V S K K V T S K D K S
301  GAAGATGGCA AAACACTAGT ATCAAAAAAA GTAACITCCA AAGACAGCT
301  GAGGATGGCA AGACCTCTGT GTCCAAAAAA GTACTTCCA AAGACAGCT

S T E E K F N E K G E V S E K I
351  ATCAACAGAA GAAAAATTCA ATGAAAAAGG TGAAGTATCT GAAAAATAA
351  CTCTACGGAA GAAAAATTCA ACAGAAAAGG TGAGGTGTCT GAAAAATCA

I T M A D G T R L E Y T G I K S D
401  TAACATGGC AGACGGAACC AGACTTGAAT ACACAGGAAT TAAAGCGAT
401  TCACCATGGC AGACGGAACC CGTCTTGAAT ACACCGGTAT TAAAGCGAT

G T G K A K Y V L K N F T L E G K
KpnI
~
451  GGAAGCTGAA AAGCTAAATA TGTITTAATA AATTITACTC TTGAAGGAAA
451  GGTACCGGTA AAGCGAATA TGTITTAATA AACTTCACTC TGGAAGGAAA

V A N D K T T L E V K E G T V T
501  AGTAGCTAAT GATAAACAA CATGGGAAGT AAAAGAGGA ACCGTACTT
501  AGTGGCTAAT GATAAACAA CTTGGAAGT CAAGGAAGGC ACCGTACTT

```

【図 16B】

【図16B】

```
      L S M N I S K S G E V S V E L N D
551  TAAGTATGAA TATTTC AAAA TCTGGGGAAG TTTCAGTTGA ACITTAATGAC
551  TGAGCATGAA TAICTCCAAA TCTGTTGAAG TTTCGGTTGA ACTGAACGAC

      T D S S A A T K K T A A W N S K T
      EcoRI
      ~~~~~
601  ACTGACAGTA GTGCTGCTAC TAAAAAACT GCAGCTTGA ATTCAAAAAC
601  ACTGACAGCA GCGCTGCGAC TAAAAAACT GCAGCTTGA ATTCAAAAAC

      S I L T I S V N S K K T T Q L V
651  TTCTACTTTA ACAATTAGTG TTAACAGCAA AAAAACTACA CAACTTGTGT
651  TTCTACTTTA ACCATTAGCG TTAACAGCAA AAAAACTACC CAGCTGTGT

      F T K Q D T I T V Q K Y D S A G T
701  TTACTAAACA AGACACAATA ACTGTACAAA AATACGACTC CAACGGTACC
701  TCATAAACA AGACACGATC ACTGTGCGA AATACGACTC CGCAGGCACC

      N L E G T A V E I K T L D E L K N
751  AATTIAGAAG GCACAGCAGT CGAAATTAAA ACACCTTGATG AACTTAAAAA
751  AACTIAGAAG GCACGGCAGT CGAAATTAAA ACCCTTGATG AACTGAAAAA

      A L K *
      Bpu1102I BamHI
      ~~~~~
801  CGCTTTAAAA TAA
801  CGCGCTGAAA TAAGCTGAGC GGATCC
```

上の鎖はオリジナル配列(配列番号 42)であり、下の鎖は最適化配列(配列番号 43)である。
アミノ酸配列(配列番号 2)。

注:配列の最初の3つの塩基(CAT)は示されておらず、それらは、*Nde* I 部位 CATATG の一部を形成する。

【図 17B】

【図17B】

```
+3 V L S M N I L K S G E I T V A L
551  TGTITTAAGC AAGAACATTT TAAAATCCGG AGAAATAACA GTTGCACTTG
551  TGTITTAAGC ATGAACATCT TAAAATCCGG TGAAATCACC GTTGCGCTGG

      D D S D T T Q A T K K T G K W D S
601  ATGACTCTGA CACTACTCAG GCTACTAAAA AAAGTGGAAA ATGGGATTTA
601  ATGACTCTGA CACCACTCAG GCACCTAAAA AAACCGGCAA ATGGGATTTCT

      N T S T L T I S V N S K K T K N I
      EcoRI
      ~~~~~
651  AATACTTCCA CTTTAACAAT TAGTGGAAT AGCAAAAAAA CTAAAAACAT
651  AACACTTCCA CTCTGACCAT CAGCGTGAAT TCCAAAAAAA CTAAAAACAT

      V F T K E D T I T V Q K Y D S A
701  TGIATTTACA AAGAAGACA CAATAACAGT ACAAAAAATC GACTCAGCAG
701  CGTGITCACC AAGAAGACA COATACCGT CCAGAAATAC GACTCTGGCG

      G T N L E G N A V E I K T L D E L
751  GCACCAATCT AGAAGGCAAC GCAGTCGAAA TTAACACACT TGATGAACCT
751  GCACCAACCT CGAAGGCAAC GCAGTCGAAA TCAAAACCTT GGATGAACCTG

      X N A L K *
      BamHI
      ~~~~~
801  AAAAAACGCTT TAAAAATA
801  AAAAAACGCTC TGAATAAAGC TGAGCGGATC C
```

上の鎖はオリジナル配列(配列番号 44)であり、下の鎖は最適化配列(配列番号 45)である。
アミノ酸配列(配列番号 4)。

注:配列の最初の1つの塩基(C)は示されておらず、これは、*Nde* I 部位 CATATG の一部を形成する。

【図 17A】

【図17A】

Blip OspA KT と修飾分子 lipB sOspA 6/4 との OspA 配列のアライメント

```
      M R L L I G F A L A L A L I G C
1  ATATGAGATT ATTAATAGGA TTTGCTTTAG CGTTAGCTTT AATAGGATGT
1  ATATGCGTCT GTTGATCGGC TTTGCTCTGG CGCTGGCTCT GATCGGCTGC

      A Q K G A E S I G S V S V D L P G
51  GCACAAAAAG GTGCTGAGTC AATGGATGCC GTTTCAGTAG ATTACCTGG
51  GCACAGAAAG GTGCTGAGTC TATTGGTTCC GTTCTGTAG ATCTGCCCGG

      G M T V L V S K E K D K N G K Y
101  TGGAAATGACA GTTCTTGTA G7AAAGAAA AGACAAAGAC GGTAAATACA
101  TGGCATGACC GTTCTGGTCA GCAAAAGAAA AGACAAAAAC GGTAAATACA

      S L E A T V D K L E L K G T S D K
      HindIII
      ~~~~~
151  GCTAGAGGC AACAGTAGAC AAGCTTGAGC TTAAGGAAC TTCTGATAAA
151  GCTCGAGGC GACCGTCGAC AAGCTTGAGC TGAAGGCAC CTCTGATAAA

      N N G S G T L E G E K T N K S K V
201  AACACCGGTT CTGGAACACT TGAAGGTGAA AAAACTGACA AAGTAAAGT
201  AACACCGGTT CCGGCACCTT GGAAGGTGAA AAAACTGACA AAGCAAAAGT

      K I T I A D D L S Q T K F E I F
251  AAAATTAAAC ATTGCTGATG ACCTAAGTCA AACTAAATT GAAATTTTC
251  GAAACTGACC ATTGCTGATG ACCTCAGCCA GACCAATTC GAAATTTTCA

      K E D A K T L V S K K V T L K D K
301  AAGAAGATGC CAAAACATTA GTATCAAAA AAGTAACCTT TAAAGACAAG
301  AAGAAGATGC CAAAACCTTA GTATCAAAA AAGTAACCTT TAAAGACAAG

      S S T E E K F N E K G E T S E K T
351  TCATCAACAG AAGAAAAATT CAACGAAAG GGTCAACAT CTGAAAAAC
351  TCCTCTACCG AAGAAAAATT CAACGAAAG GGTCAACAT CTGAAAAAC

      I V M A N G T R L E Y T D I K S
      KpnI
      ~~~~~
401  AATAGTAAGA GCAAAATGGA CCAGACTTGA ATACACAGAC ATAAAAAGCG
401  CATCGTAATG CAAATGGTA CCGCTTGGA ATACACCGAC ATCAAAAGCG

+3 D G S G K A K Y V L K D F T L E G
451  ATGGATCCGG AAAGCTTAA GAAGTTTAA AAGACTTAC TCTTGAAGA
451  ATGGCTCCGG CAAAGCCAAA TACGTTCTGA AAGACTTAC CCTGGAAGGC

+3 T L A A D G K T T L K V T E G T V
501  ACTCTAGCTG CTGACGGCAA AACACATTG AAGTTACAG AAGGCACTGT
501  ACCCTGCGTG CCGACGGCAA AACACCTTG AAGTTACCG AAGGCACTGT
```

【図 18A】

【図18A】

Blip OspA 5/3 と修飾分子 lipB sOspA 5/3 との OspA 配列のアライメント

```
      M R L L I G F A L A L A L I G C
NdeI
~~~~~
1  CATATGAGAT TATTAATAGG ATTTGCTTIA CGGTTAGCTT TAATAGGATG
1  CATATGCGTC TGTGATCGG CTTTGCTTTG CGCGTGCTT TAATCGGCTG

      A Q K G A E S I G S V S V D L P
51  TGCACAAAA GGTGCTGAGT CAAATGGATC CGTTTCAGTA GATTACCTGT
51  TGCACAAAA GGTGCTGAGT CTAATGGTTC CGTTTCTGTA GATCTGCCGG

      G G M K V L V S K E K D K N G K Y
101  TGGAAATGAA AGTTCCTTGA AGTAAAGAAA AAGACAAAAG TGTAAATATC
101  GGGGTATGAA AGTTCCTGTA AGCAAGAAA AAGACAAAAC CGTAAATATC

      S L M A T V E K L E L K G T S D K
151  AGTCTAATGG CAACAGTAGA AAAGCTTGAG CTTAAGGAAA CTCTTGATAA
151  AGCCTGATGG CAACCGTAGA AAAGCTGGAG CTTAAGGAAA CTCTTGATAA

      N N G S G T L E G E K T N K S K
201  AAACACCGGT TCTGGAACAC TTGAAGGTGA AAAACTGAC AAAGTAAAG
201  AAACACCGGT TCTGGCACCC TGAAGGTGTA AAAACTTAC AAAGCAAAAG

      V K L T I A E D L S K T T F E I F
      HindIII
      ~~~~~
251  TAAAATTAAAC AATTGCTGAG GATCTAAGTA AAACCAATTT TGAATCTTTC
251  TAAAGCTTAC TATTGCTGAG GATCTAGCA AAACCAATTT TGAATCTTTC

      K E D G K T L V S K K V T L K D K
301  AAAGAAGATG GCAAAACATT AGTATCAAAA AAGTAACCC TTAAGACAAA
301  AAAGAAGATG GCAAAACTCT GGTATCTAAA AAGTAACCC TGAAGACAAA

      S S T E E K F N E K G E T S E K
351  GTCATCAACA GAAGAAAAAT TCAACGAAA GGTGAATTC TGTAAAAAA
351  GTCTTCTACC GAAGAAAAAT TCAACGAAA GGTGAATTC TGTAAAAAA

      T I V M A N G T R L E Y T D I K S
      KpnI
      ~~~~~
401  CAATAGTAAG AGCAAAATGA ACCAGACTTG AATACACAGA CATAAAAAGC
401  CTATCGTAAT GGCAAATGTT ACCCGCTGGG AATACACCGA CATCAAAAGC

      D K T G K A K Y V L K D F T L E G
451  GATAAAACCG GAAAGCTTAA AGAATTTTAA AAGACTTTA CTCTTGAAGG
451  GATAAAACCG GCAAAAGCTAA ATACGTTTTC AAGACTTTA CTCTTGAAGG

      T L A A D G K T T L K V T E G T
501  AACTCTAGCT GCTGACGGCA AAACACACTT GAAAGTTACC GAAGGCACTG
501  CACTCTGGCT GCTGACGGCA AAACACACTT GAAAGTTACC GAAGGCACTG
```

【図 18 B】

【図 18 B】

```
V T L S M N I S K S G E I T V A L
551 TTACTTTAAG CAAGAACATT TCAAAATCCG GAGAAATAAC AGTTGCACTT
551 TTACTCTGAG CATGAACATT TCTAAATCCG GCGAAATCAC CGTTGCACTG

D D T D S S G N K K S G T W D S D
601 GATGACACTG ACTCTAGCGG CAATAAAAAA TCCGGAAACAT GGGATTTCAGA
601 GATGACACTG ACTCTAGCGG CAATAAAAAA TCCGGACACT GGGATTCTGA

I S T L T I S K N S Q K T K Q L
FvuII
~~~~~
651 TACTTCTACT TTAACAATTA GTAAAAACAG TCAAAAAACT AAACAACCTTG
651 TACTTCTACT TTAACCAATTA GCAAAAAACAG CCAGAAAACT AAACAGCTGG

V F I K E N T I T V Q N Y N R A G
701 TAITCACAAA AGAAAAACACA ATAACAGTAC AAAACTATAA CAGAGCAGGC
701 TAITCACCAA AGAAAAACACT ATCACCCTAC AGAACTATAA CCGTGCAGGC

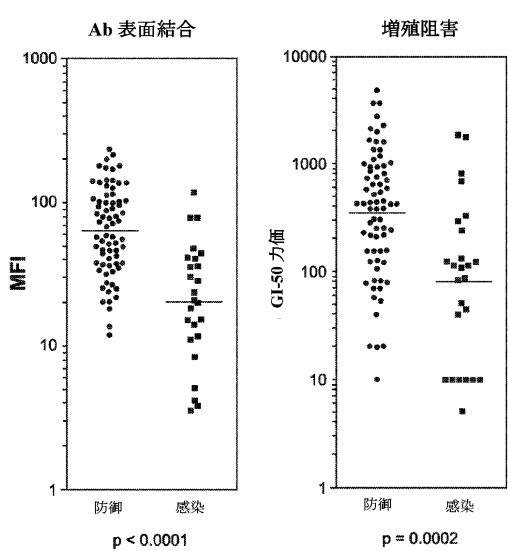
N A L E G S P A E I K D L A E L K
751 AATGCGCTTG AAGGCAGCCC AGCTGAAATT AAAGAICTTG CAGAGCTTAA
751 AATGCGCTGG AAGGCAGCCC GGCTGAAATT AAAGAICTGG CAGAGCTGAA

A A L K *
BamHI
~~~~~
801 AGCCGCTTIA AAATAA
801 AGCCGCTTTG AAATAAGCTG AGCGGATCC
```

上の鎖はオリジナル配列(配列番号 46)であり、下の鎖は最適化配列(配列番号 47)である。
アミノ酸配列(配列番号 6)。

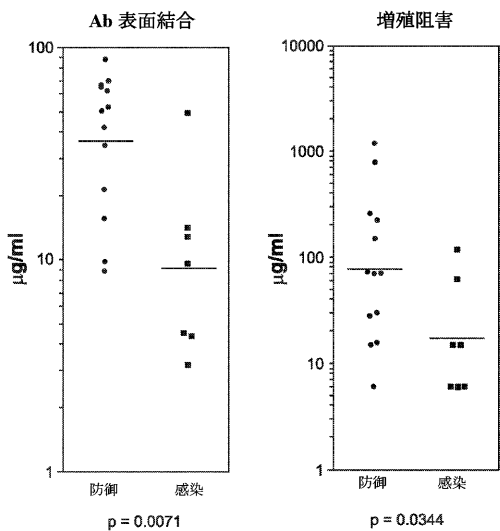
【図 19】

【図 19】



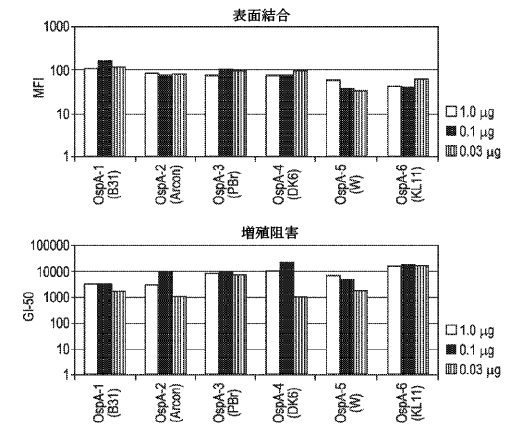
【図 20】

【図 20】



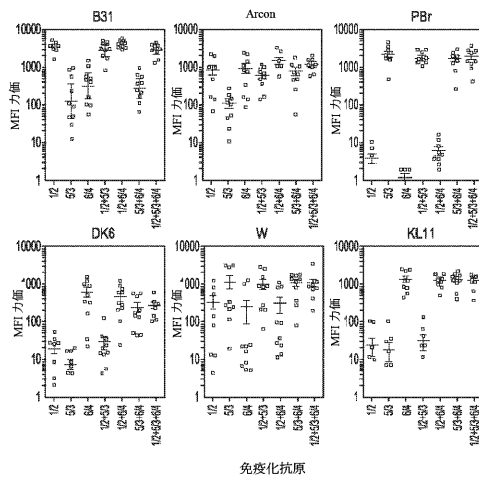
【図 21】

【図 21】



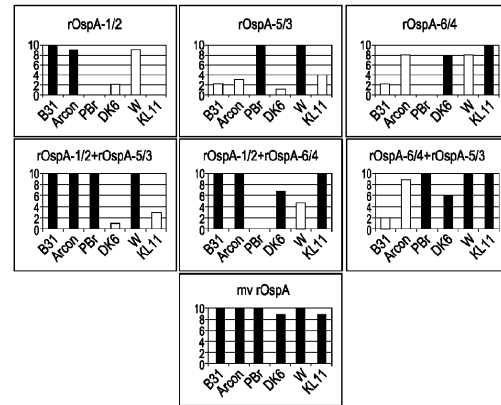
【図 2 2】

【図 2 2】



【図 2 3】

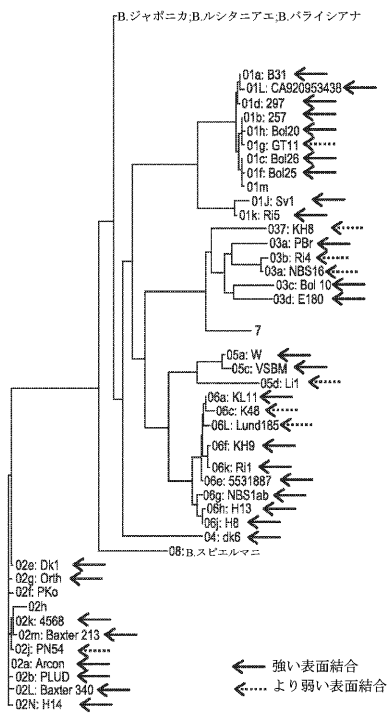
【図 2 3】



■ 使用されたワクチンに相同性の株

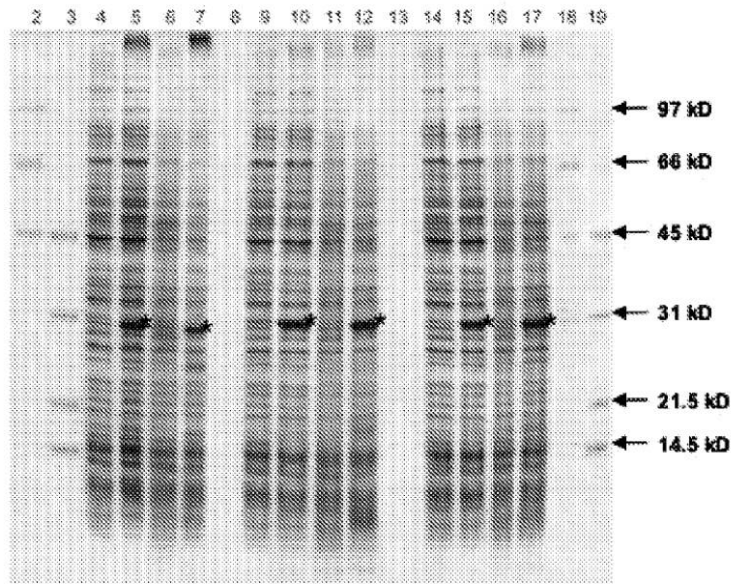
【図 2 4】

【図 2 4】



【図 1 1】

【図 1 1】



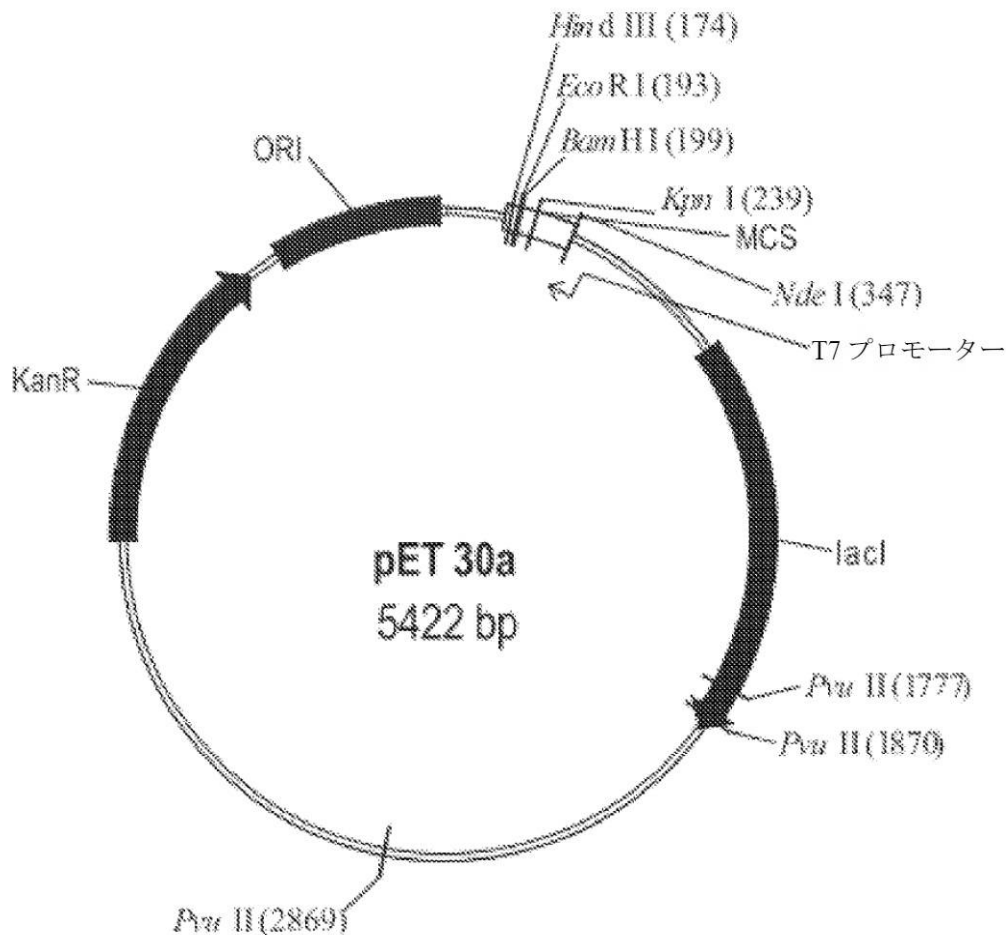
レーン	構築物/試料	誘導 ¹
2	高いマーカー	-
3	低いマーカー	-
4	WCB ² lipB sOspA 1/2 ²⁵¹	-
5	WCB lipB sOspA 1/2 ²⁵¹	+
6	PC ³ sOspA 1/2 ²⁵¹	-
7	PC sOspA 1/2 ²⁵¹	+
8	-	-
9	WCB lipB sOspA 5/3	-
10	WCB lipB sOspA 5/3	+
11	PC sOspA 5/3	-
12	PC sOspA 5/3	+
13	-	-
14	WCB lipB sOspA 6/4	-
15	WCB lipB sOspA 6/4	+
16	PC sOspA 6/4	-
17	PC sOspA 6/4	+
18	高いマーカー	-
19	低いマーカー	-

¹ 1mM IPTG で 3 時間誘導、-は誘導なしを示す² WCB:ワーキングセルバンク³ PC:初代細胞

* OspA

【図 13】

【図 13】



【図 15】

【図 15】

lipB sOspA 1/2²⁵¹ (配列番号 39)におけるアミノ酸変化を強調するアライメントおよび変化を誘導するために使用した PCR プライマー配列(配列番号 21 および 41)

lipB OspA 1/2 mod(配列番号 38);コンセンサス配列(配列番号 40)

		719	I T V Q K Y D S A G T N L E G T A V	774
lipB OspA 12 mod	(701)	GATCAGTGTGCAGAAATACGACTCCAAACGGCACCAACTAGAAAGGCACGGCAGTC		
lipB sOspA 1/2 251	(700)	GATCACTGTGCAGAAATACGACTCCGACGGCACCAACTAGAAAGGCACGGCAGTC		
コンセンサス	(701)	GATCACTGTGCAGAAATACGACTCC GGCACCAACTTAGAAAGGCACGGCAGTC		

内部順方向プライマー → AATACGACTCCGACGGCACC (配列番号 21)
 内部逆方向プライマー → CGSCTCCGACGGCACCAA (配列番号 41)
 外部順方向プライマー → bp 1~21 + NdeI 部位
 外部逆方向プライマー → bp 808~ 828 + BamHI 部位

【配列表】

2015524802000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/050058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/02 C07K16/12 A61P31/04
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X L	WO 2011/143617 A1 (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; CROWE BRIAN A [AT]; LIVEY) 17 November 2011 (2011-11-17) 100% identity with seq.2,4,6,8,10,12; sequences 2,4,6,8,10,12 examples 3-5,9,15-17,22 -----	1-59
X,P	WRESSNIGG NINA ET AL: "Safety and immunogenicity of a novel multivalent OspA vaccine against Lyme borreliosis in healthy adults: a double-blind, randomised, dose-escalation phase 1/2 trial.", THE LANCET INFECTIOUS DISEASES AUG 2013, vol. 13, no. 8, 10 May 2013 (2013-05-10), pages 680-689, XP002714295, ISSN: 1474-4457 the whole document ----- -/--	1-59

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

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2013

Date of mailing of the international search report

21/10/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Covone-van Hees, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/050058

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WILSKE BETTINA ET AL: "Molecular analysis of the outer surface protein A (OspA) of <i>Borrelia burgdorferi</i> for conserved and variable antibody binding domains", MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 181, no. 4, 1992, pages 191-207, XP008165257, ISSN: 0300-8584 the whole document	1-59
A	----- WORMSER G P: "Lyme disease vaccine", INFECTION, SPRINGER, vol. 24, no. 2, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 203-207, XP008139265, ISSN: 0300-8126 the whole document	1-59
A	----- WO 00/78345 A1 (MILKHAUS LAB INC [US]) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/050058

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011143617 A1	17-11-2011	AU 2011252844 A1	29-11-2012
		AU 2011252850 A1	29-11-2012
		CA 2798331 A1	17-11-2011
		CA 2799181 A1	17-11-2011
		CN 103108652 A	15-05-2013
		CN 103118701 A	22-05-2013
		EP 2569008 A1	20-03-2013
		EP 2569009 A1	20-03-2013
		JP 2013529077 A	18-07-2013
		JP 2013529078 A	18-07-2013
		KR 20130062954 A	13-06-2013
		US 2011293652 A1	01-12-2011
		US 2012020973 A1	26-01-2012
		WO 2011143617 A1	17-11-2011
		WO 2011143623 A1	17-11-2011
WO 0078345 A1	28-12-2000	AU 4800500 A	09-01-2001
		US 6592875 B1	15-07-2003
		WO 0078345 A1	28-12-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/20 (2006.01) C 0 7 K 14/20

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

(71)出願人 501453189
バクスター・ヘルス케어・ソシエテ・アノニム
Baxter Healthcare SA
スイス国 8 1 5 2 グラットパーク (オブフィコン), サーガウアーシュトラッセ 1 3 0

(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 バレット, ベー. ノエル
オーストリア国 アー - 3 4 0 0 クロスターノイブルク/ヴァイトリンク, シュタインヴァン
トガッセ 6 アー

(72)発明者 アイヒンガー, ゲラルド
オーストリア国 アー - 1 1 9 0 ウィーン, フリンメルガッセ 6

(72)発明者 クロウ, ブライアン アー.
オーストリア国 アー - 2 1 0 0 レオベンドルフ, ヌスアレー 4

(72)発明者 リビー, イアン
オーストリア国 アー - 1 2 2 0 ウィーン, フザーレンヴェーク 7 1

(72)発明者 ヴレスニヒ, ニーナ
オーストリア国 アー - 1 0 2 0 ウィーン, ヴァイントラウベンガッセ 1 1 / ヴェー 1 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA07 DA06 EA04 GA11 HA01
4C085 AA03 BA15 DD61 FF02
4H045 AA11 BA41 CA11 DA86 EA31 FA74