



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103118701 B

(45)授权公告日 2017. 10. 24

(21)申请号 201180033682.0

(22)申请日 2011.05.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103118701 A

(43)申请公布日 2013.05.22

(30)优先权数据

61/334,901 2010.05.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.01.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/036533 2011.05.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/143623 EN 2011.11.17

(73)专利权人 百深公司

地址 美国伊利诺伊州

专利权人 百深有限责任公司

纽约州立大学研究基金会

布鲁克海文科学联合有限责任公司

(72)发明人 布莱恩·A·克洛维 伊安·利维

马利亚·欧洛尔科

迈克尔·施文丁格

约翰·J·杜恩

本杰明·J·拉夫特

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

(51)Int.Cl.

A61K 39/02(2006.01)

G07K 14/20(2006.01)

(56)对比文件

EP 1939294 A1,2008.07.02,摘要、说明书
第0015,0025-0027,0147-0149段、表V.

US 6143872 A,2000.11.07,全文.

WO 02/16421 A2,2002.02.28,摘要、说明书
第5页第2段,第6页第2段,第26页最后一段,第
27页倒数第2段,第28页第1-3段,第30页第3段
至第32页第2段,第67页第9行至69页第7行、表
III.

审查员 张蕾

权利要求书2页 说明书76页

序列表75页 附图25页

(54)发明名称

OSPA嵌合体及其在疫苗中的用途

(57)摘要

本发明涉及用于莱姆病或疏螺旋体病疫苗中的嵌合OspA分子的开发。更明确来说,所述嵌合OspA分子包含来自一个OspA血清型的近端部分连同来自另一个OspA血清型的远端部分,同时保留了这两个亲本多肽的抗原性质。所述嵌合OspA分子被单独或以组合形式递送以便提供针对多种疏螺旋体属同基因型种的保护。

1. 一种分离的核酸分子,其由SEQ ID NO:5中阐述的核苷酸序列组成。
2. 一种分离的核酸分子,其由编码以下多肽的核苷酸序列组成,所述多肽由SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列组成。
3. 一种分离的核酸分子,其由SEQ ID NO:11中阐述的核苷酸序列组成。
4. 一种分离的核酸分子,其由编码以下多肽的核苷酸序列组成,所述多肽由SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽组成。
5. 一种载体,其包含如权利要求1至4中任一项所述的核酸分子。
6. 一种宿主细胞,其包含如权利要求5所述的载体。
7. 如权利要求6所述的宿主细胞,其是真核细胞。
8. 如权利要求6所述的宿主细胞,其是原核细胞。
9. 一种产生多肽的方法,其包括在适于表达所述多肽的条件下培养如权利要求6所述的宿主细胞,并且任选地使所述多肽与培养物分离。
10. 一种组合物,其包含如权利要求1至4中任一项所述的核酸分子或如权利要求5所述的载体(vector)以及药学上可接受的载体(carrier)。
11. 一种组合物,其包含如权利要求1至4中任一项所述的核酸分子,由选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11的核苷酸序列组成的至少一种其它的核酸分子,和药学上可接受的载体,其中所述核酸分子具有不同的核苷酸序列。
12. 如权利要求11所述的组合物,其中所述组合物包含SEQ ID NO:1、3以及5中阐述的核苷酸序列的组合,或者SEQ ID NO:7、9以及11中阐述的核苷酸序列的组合。
13. 一种分离的多肽,其由SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列组成。
14. 一种分离的多肽,其由SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列组成。
15. 一种组合物,其包含如权利要求13或14所述的多肽和药学上可接受的载体。
16. 一种组合物,其包含如权利要求13或14所述的多肽中的至少一种,由选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的至少一种其它的多肽,和药学上可接受的载体,其中所述多肽具有不同的序列。
17. 如权利要求16所述的组合物,其中所述组合物包含分别由SEQ ID NO:2、4以及6中阐述的氨基酸序列组成的多肽的组合,或者分别由SEQ ID NO:8、10以及12中阐述的氨基酸序列组成的多肽的组合。
18. 一种免疫原性组合物,其包含
 - (a) 如权利要求10所述的组合物;
 - (b) 如权利要求11所述的组合物,其中存在SEQ ID NO:5和11中至少之一,以及要么(i) SEQ ID NO:1和7中至少之一,要么(ii) SEQ ID NO:3和9中至少之一;
 - (c) 权利要求15所述的组合物;或者
 - (d) 权利要求16所述的组合物,其中存在SEQ ID NO:6和12中至少之一,以及要么(i) SEQ ID NO:2和8中至少之一,要么(ii) SEQ ID NO:4和10中至少之一;和药学上可接受的载体。
19. 一种免疫原性组合物,其包含
 - (a) 权利要求11所述的组合物,其中存在SEQ ID NO:5和11中至少之一,SEQ ID NO:1和

7中至少之一,以及SEQ ID NO:3和9中至少之一;

(b) 权利要求12所述的组合物;

(c) 权利要求16所述的组合物,其中存在SEQ ID NO:6和12中至少之一,SEQ ID NO:2和8中至少之一,以及SEQ ID NO:4和10中至少之一;或者

(d) 权利要求17的组合物;和

药学上可接受的载体。

20. 一种疫苗组合物,其包含如权利要求18所述的免疫原性组合物和药学上可接受的载体。

21. 一种疫苗组合物,其包含如权利要求19所述的免疫原性组合物和药学上可接受的载体。

22. 一种联合疫苗组合物,其包含如权利要求20所述的疫苗组合物联合至少一种第二疫苗组合物。

23. 一种联合疫苗组合物,其包含如权利要求21所述的疫苗组合物联合至少一种第二疫苗组合物。

24. 如权利要求22或23所述的联合疫苗组合物,其中所述第二疫苗组合物防御蜱传疾病。

25. 如权利要求24所述的联合疫苗组合物,其中所述蜱传疾病是落基山斑疹热、巴贝斯虫病、回归热、科罗拉多蜱热、人单核细胞埃立克体病(HME)、人粒细胞埃立克体病(HGE)、南方蜱叮咬相关的皮疹疾病(STARI)、兔热病、蜱瘫痪、波瓦桑脑炎、寇热病、克里米亚刚果出血热、胞裂虫病、南欧斑疹热或蜱传脑炎。

26. 如权利要求24所述的联合疫苗组合物,其中所述第二疫苗组合物是选自由以下组成的组的疫苗:蜱传脑炎疫苗、日本脑炎疫苗以及落基山斑疹热疫苗。

27. 如权利要求22或23所述的联合疫苗组合物,其中所述第二疫苗组合物具有与针对疏螺旋体属感染的免疫相容的季节性免疫程序。

28. 权利要求18或19所述的组合物在制备用于诱导受试者体内的免疫反应的药物中的应用。

29. 权利要求20或22的疫苗组合物在制备用于预防受试者体内的伽氏疏螺旋体感染的药物中的应用。

30. 如权利要求29所述的应用,其中所述伽氏疏螺旋体感染导致莱姆病。

31. 权利要求21或23的疫苗组合物在制备用于预防受试者体内的疏螺旋体属感染的药物中的应用。

32. 如权利要求31所述的应用,其中所述疏螺旋体属感染导致莱姆病。

OSPA嵌合体及其在疫苗中的用途

发明领域

[0001] 本发明总体上涉及嵌合OspA多肽、编码所述多肽的核酸、包含这些分子的组合物以及其使用方法。

[0002] 发明背景

[0003] 莱姆病(Lyme disease)是由广义伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.))引起的蜱传疾病。这种疾病的典型特征在于:在蜱虫叮咬部位处的扩散红疹的发展,之后可能是包括脑膜炎、心脏炎或关节炎的全身并发症。莱姆病的几乎所有病例都是由三个同基因型种阿氏疏螺旋体(*Borrelia afzelii*)、伽氏疏螺旋体(*Borrelia garinii*)以及狭义伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi sensu stricto* (s.s.))中的一个引起的。在欧洲,发现了感染人类的所有这三种种类。然而,在北美洲仅发现了单一个种类:狭义伯氏疏螺旋体。伯氏疏螺旋体是疏螺旋体属(*Borrelia*)的螺旋体类的革兰氏阴性菌的一个种类。针对莱姆病的抗生素治疗通常是有效的,但一些患者发展成涉及关节或神经系统的慢性致残形式的疾病,所述疾病甚至在肠胃外抗生素治疗之后都未得到实质性改善,由此凸显了高危人群对于疫苗的需要。

[0004] 外膜蛋白A(OspA)是存在于硬蜱属蜱虫的中肠中的由广义伯氏疏螺旋体种类表达的31kDa抗原。已证实OspA在预防北美洲的莱姆病中是有效的(Steere等, *N. Engl. J. Med.* 339:209-15, 1998; Sigal等, *N. Engl. J. Med.* 339:216-22, 1998; *N. Engl. J. Med.* 339:571, 1998中的正误表)。经过完全加工的OspA的氨基末端是用三个脂肪酰基链进行翻译后修饰的半胱氨酸残基,这三个脂肪酰基链将蛋白锚定到细菌膜的外表面上(Bouchon等, *Anal. Biochem.* 246:52-61, 1997)。据报道OspA的脂质化可稳定分子(Luft, 个人通信)并且在不存在强效的佐剂下对保护作用来说是至关重要的(Erdile等, *Infect. Immun.* 61:81-90, 1993)。缺少氨基末端脂质膜锚的可溶重组形式的蛋白被与凝集型小鼠单克隆抗体的Fab片段一起共结晶以便确定OspA的结构,该结构被显示包含后接单个 α 螺旋的21个反平行 β 链(Li等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3584-9, 1997)。

[0005] 基于OspA的单价疫苗(LYMERIX®)在美国有售,用于预防莱姆病。然而,在欧洲,横跨三个基因种的OspA序列的异质性妨碍了基于来自单一菌株的OspA的疫苗的广泛保护作用(Gern等, *Vaccine* 15:1551-7, 1997)。在欧洲分离物中已经识别出七个主要的OspA血清型(指定为血清型1至7,Wilske等, *J. Clin. Microbiol.* 31:340-50, 1993)。OspA血清型与种类相关联;血清型1对应于狭义伯氏疏螺旋体,血清型2对应于阿氏疏螺旋体并且血清型3至7对应于伽氏疏螺旋体。

[0006] 通过用OspA免疫获得的保护性免疫是少有的,因为宿主的免疫反应与病原体之间的相互作用不会发生在宿主体内,而是发生在蜱虫载体的中肠中。就莱姆病而论,蜱虫充当莱姆病从动物传播到人类的载体(vector或carrier)。在受感染的蜱虫的进食期间获得的OspA特异性抗体防止广义伯氏疏螺旋体传播到被免疫的哺乳动物宿主(de Silva等, *J. Exp. Med.* 183:271-5, 1996)。保护作用是抗体介导的并且主要通过杀菌性抗体而受到影响,尽管阻碍螺旋体附接至蜱虫肠道上皮组织的内层上的受体的抗体也可能是有效的(Pal

等, J. Immunol. 166:7398-403, 2001)。

[0007] 有效OspA疫苗的合理开发要求鉴定保护性表位, 如由保护性单克隆抗体LA-2限定的表位 (Golde等, Infect. Immun. 65:882-9, 1997)。X射线晶体学和NMR分析已被用来鉴定OspA中的在免疫学上重要的高变域并且已将LA-2表位定位到氨基酸203-257 (Ding等, J. Mol. Biol. 302:1153-64, 2000; Luft等, J Infect Dis. 185 (增刊1):S46-51, 2002)。

[0008] 本领域中存在开发OspA疫苗的需要, 所述OspA疫苗能够提供针对在美国、欧洲以及其它地方存在的疏螺旋体属的多种种类的广泛保护。以下公开描述了这种疫苗的细节。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明解决了本领域中与莱姆病或莱姆疏螺旋体病的预防和治疗相关的一个或多个需求。

[0011] 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由SEQ ID NO:1、3以及5中阐述的序列组成的组的核苷酸序列。在一些方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其由选自由SEQ ID NO:1、3以及5中阐述的序列组成的组的核苷酸序列组成。在其它方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由以下组成的组的核苷酸序列: (a) 与包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5中阐述的核苷酸序列的核酸分子具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核苷酸序列; 和 (b) 与 (a) 互补的核苷酸序列。在其它方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由以下组成的组的核苷酸序列: (a) 编码多肽的核苷酸序列, 所述多肽与包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性; 和 (b) 与 (a) 互补的核苷酸序列。在甚至其它方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由以下组成的组的核苷酸序列: (a) 编码包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有1至25个保守氨基酸的取代; (b) 编码包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有1至25个保守氨基酸的插入; (c) 编码包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有1至25个保守氨基酸的内部缺失; (d) 编码包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有1至25个氨基酸的C末端和/或N末端截短; (e) 编码包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有1至25个氨基酸的修饰, 所述修饰选自氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失、C末端截短或N末端截短; 以及 (f) 与 (a) 至 (e) 中任何一个互补的核苷酸序列。

[0012] 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由SEQ ID NO:7、9以及11中阐述的序列组成的组的核苷酸序列。在一些方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其由选自由SEQ ID NO:7、9以及11中阐述的序列组成的组的核苷酸序列组成。在其它方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由以下组成的组的核苷酸序列: (a) 与包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11中阐述的核苷酸序列的核酸分子具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核苷酸序列; 和 (b) 与 (a) 互补的核苷酸序列。在其它方面, 本发明包括一种分离的核酸分子, 其包含选自由以下组成的组的核苷酸序列: (a) 编码多肽的核苷酸序列, 所述多肽与包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序

列同一性；和 (b) 与 (a) 互补的核苷酸序列。在甚至其它方面，本发明包括一种分离的核酸分子，其包含选自以下组成的组的核苷酸序列：(a) 编码包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，所述多肽具有1至25个保守氨基酸的取代；(b) 编码包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，所述多肽具有1至25个保守氨基酸的插入；(c) 编码包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，所述多肽具有1至25个保守氨基酸的内部缺失；(d) 编码包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，所述多肽具有1至25个氨基酸的C末端和/或N末端截短；(e) 编码包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列，所述多肽具有1至25个氨基酸的修饰，所述修饰选自氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失、C末端截短或N末端截短；以及 (f) 与 (a) 至 (e) 中任何一个互补的核苷酸序列。

[0013] 本发明包括载体、宿主细胞以及通过培养本文论述的宿主细胞来产生多肽的方法。在一些方面，本发明包括包含本文描述的任何核酸分子的载体。在其它方面，本发明包括包含所述载体的宿主细胞。在一些方面，宿主细胞是真核细胞。在其它方面，宿主细胞是原核细胞。在各个方面，产生多肽的方法包括在适于表达多肽的条件下培养本文描述的宿主细胞，并且任选地使多肽与培养物分离。在各个方面，本发明包括包含这些嵌合核酸分子中的任何嵌合核酸分子或包含所述核酸分子的任何载体和一种或多种药学上可接受的载体的组合物。

[0014] 本发明包括组合物，其包含本文论述的核酸分子中的任一种或本文论述的载体 (vector) 中的任一种以及药学上可接受的载体 (carrier)。在一些方面，本发明包括组合物，其包含本文论述的核酸分子中的至少两种和药学上可接受的载体，其中所述核酸分子具有不同的核苷酸序列。在具体方面，本发明包括组合物，其包含SEQ ID NO:1、3以及5中阐述的核苷酸序列的组合。

[0015] 本发明包括一种分离的多肽，其包含选自SEQ ID NO:2、4以及6中阐述的序列组成的组的氨基酸序列。在一些方面，本发明包括一种分离的多肽，其由选自SEQ ID NO:2、4以及6中阐述的序列组成的组的氨基酸序列组成。在其它方面，本发明包括一种分离的多肽，其包含具有至少200个氨基酸残基的氨基酸序列，所述氨基酸序列与包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中阐述的氨基酸序列的多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在其它方面，本发明包括一种分离的多肽，其包含选自SEQ ID NO:8、10以及12中阐述的序列组成的组的氨基酸序列。在甚至其它方面，本发明包括一种分离的多肽，其由选自SEQ ID NO:8、10以及12中阐述的序列组成的组的氨基酸序列组成。在一些方面，本发明包括一种分离的多肽，其包含具有至少200个氨基酸残基的氨基酸序列，所述氨基酸序列与包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中阐述的氨基酸序列的多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0016] 本发明包括组合物，其包含本文论述的多肽中的任一种和药学上可接受的载体。在一些方面，本发明包括组合物，其包含本文论述的多肽中的至少两种和药学上可接受的载体，其中所述多肽具有不同的氨基酸序列。在具体方面，本发明包括组合物，其包含多肽

的组合,所述多肽包含SEQ ID NO:2、4以及6中阐述的氨基酸序列。

[0017] 本发明包括免疫原性组合物。在一些方面,本发明的免疫原性组合物包含本文论述的组合物中的任何组合物和药学上可接受的载体。在各个方面,所述免疫原性组合物具有诱导产生特异地结合外膜蛋白A (OspA) 蛋白的抗体的性质。在某些方面,所述免疫原性组合物具有诱导产生特异地结合疏螺旋体属的抗体的性质。在特定方面,所述免疫原性组合物具有诱导产生中和疏螺旋体属的抗体的性质。在某些方面,疏螺旋体属是广义伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi sensu lato*)。在特定方面,疏螺旋体属是阿氏疏螺旋体 (*Borrelia afzelii*)、伽氏疏螺旋体 (*Borrelia garinii*) 或狭义伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*)。在其它方面,疏螺旋体属是日本疏螺旋体 (*Borrelia japonica*)、安德森疏螺旋体 (*Borrelia andersonii*)、比塞蒂疏螺旋体 (*Borrelia bissonii*)、西尼伽疏螺旋体 (*Borrelia sinica*)、土德疏螺旋体 (*Borrelia turdus*)、塔卢基疏螺旋体 (*Borrelia tanukii*)、法雷斯疏螺旋体 (*Borrelia valaisiana*)、卢西塔尼疏螺旋体 (*Borrelia lusitaniae*)、斯柏曼疏螺旋体 (*Borrelia spielmanii*)、宫本疏螺旋体 (*Borrelia miyamotoi*) 或孤星疏螺旋体 (*Borrelia lonestari*)。在一些方面,抗体是由动物产生。在其它方面,动物是哺乳动物。在甚至其它方面,哺乳动物是人类。

[0018] 本发明包括疫苗组合物。在一些方面,本发明的疫苗组合物包含本文论述的任何免疫原性组合物和药学上可接受的载体。在各个方面,本发明包括联合疫苗。在某些方面,本发明的联合疫苗包含本文论述的任何疫苗组合物联合至少一种第二疫苗组合物。在一些方面,第二疫苗组合物防御蜱传疾病。在各个方面,所述蜱传疾病是落基山斑疹热 (Rocky Mountain Spotted Fever)、巴贝斯虫病 (Babesiosis)、回归热、科罗拉多蜱热 (Colorado tick fever)、人单核细胞埃立克体病 (HME)、人粒细胞埃立克体病 (HGE)、南方蜱叮咬相关的皮疹疾病 (STARI)、兔热病 (Tularemia)、蜱瘫痪、波瓦桑脑炎 (Powassan encephalitis)、寇热病、克里米亚刚果出血热 (Crimean-Congo hemorrhagic fever)、胞裂虫病 (Cytauxzoonosis)、南欧斑疹热 (boutonneuse fever) 或蜱传脑炎。在其它方面,所述第二疫苗组合物是选自由以下组成的组的疫苗:蜱传脑炎疫苗、日本脑炎疫苗以及落基山斑疹热疫苗。在各个方面,所述第二疫苗组合物具有与针对疏螺旋体属感染或莱姆病的免疫相容的季节性免疫程序 (seasonal immunization schedule)。

[0019] 本发明包括用于诱导受试者体内的免疫反应的方法。在各个方面,所述方法包括向受试者施用有效诱导免疫反应的量的本文论述的免疫原性组合物或疫苗组合物中的任一种的步骤。在某些方面,免疫反应包括产生抗OspA抗体。本发明包括特异地结合本文描述的任何多肽的抗体或其片段。

[0020] 本发明包括用于预防或治疗受试者体内的疏螺旋体属感染或莱姆病的方法。在各个方面,所述方法包括向受试者施用有效预防或治疗疏螺旋体属感染或莱姆病的量的本文论述的疫苗组合物中的任一种或本文论述的联合疫苗中的任一种的步骤。在其它方面,所述方法包括向受试者施用有效预防或治疗疏螺旋体属感染或莱姆病的量的本文论述的抗体中的任一种的步骤。在其它方面,所述方法包括向受试者施用有效预防或治疗所述疏螺旋体属感染或莱姆病的量的抗体或其片段的步骤,所述抗体或其片段是通过用如权利要求28至34中任一项所述的疫苗组合物使哺乳动物免疫来产生。在其它方面,所述抗体或其片

段是高免疫血清、高免疫血浆或其纯化的免疫球蛋白部分。

[0021] 本发明包括用于被动地预防受试者体内的疏螺旋体属感染或莱姆病的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用有效预防所述疏螺旋体属感染或莱姆病的量的抗OspA抗体或其片段,所述抗OspA抗体或其片段是通过用本文论述的疫苗组合物中的任一种使哺乳动物免疫来产生,其中所述抗体或其片段是纯化的免疫球蛋白制剂或免疫球蛋白片段制剂。

[0022] 本发明包括用于预防受试者体内的疏螺旋体属感染或莱姆病的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用有效预防所述疏螺旋体属感染或莱姆病的量的抗OspA单克隆抗体或其片段,所述抗OspA单克隆抗体或其片段是在用本文论述的疫苗组合物中的任一种使受试者免疫之后产生。在一些方面,所述单克隆抗体或其片段是人源化的。在一个特定方面,所述单克隆抗体是F237/BK2。

[0023] 本发明包括本发明的组合物用于制备药剂的用途。在本发明中还提供了其它相关方面。

[0024] 以上概述不意图限定本发明的每个方面,并且其它方面被描述于其它章节如以下详细描述中。整个文件意图被关联成统一公开,并且应理解的是,涵盖本文描述的特点的所有组合,即使这些特点的组合未在本文件的同一句子或段落或章节中被一起发现。从以下的详细描述中将会明了本发明的其它特点和优点。然而,应理解的是,指示本发明的具体实施方案的详细描述和具体实施例仅是通过说明方式给出的,这是因为本领域技术人员从这一详细描述中将会明了在本发明的精神和范围内的各种改变和变更。

[0025] 附图简述

[0026] 图1是用于制备脂质化OspA嵌合体构建体的示意性概述。

[0027] 图2是lipB sOspA 1/2²⁵¹的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0028] 图3示出lipB sOspA 1/2²⁵¹的核苷酸(SEQ ID NO:1)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0029] 图4是lipB sOspA 6/4的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。

[0030] 图5示出lipB sOspA 6/4的核苷酸(SEQ ID NO:3)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。

[0031] 图6是lipB sOspA 5/3的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。

[0032] 图7示出lipB sOspA 5/3的核苷酸(SEQ ID NO:5)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。

[0033] 图8描绘了优化密码子的使用用于高水平表达。

[0034] 图9示出在脂质化构建体与非脂质化构建体之间的序列差异。

[0035] 图10是T7表达系统的描述。

[0036] 图11是示出来自诱变培养物和非诱变培养物的新型重组OspA蛋白的表达的SDS-PAGE。

[0037] 图12是质粒pUC18的图谱。

[0038] 图13是质粒pET30a的图谱。

[0039] 图14示出用于产生lipB sOspA 5/3Kpn I-Bam HI片段的策略。

[0040] 图15是凸显lipB sOspA 1/2²⁵¹中的氨基酸变化(SEQ ID NO:39)的比对和用于引

入所述变化的PCR引物序列 (SEQ ID NO:21和41) (lipB0spA 1/2mod (SEQ ID NO:38);共有序列 (SEQ ID NO:40))。

[0041] 图16是Blip 0spA BPBP/A1与被修饰的分子lipB s0spA 1/2²⁵¹的0spA序列比对。上部链是原始序列 (SEQ ID NO:42) 并且下部链是优化序列 (SEQ ID NO:43)。注意:未示出序列起始处的三个碱基 (CAT);这些碱基形成Nde I位点CATATG的一部分。

[0042] 图17是Blip 0spA KT与被修饰的分子lipB s0spA 6/4的0spA序列的比对。上部链是原始序列 (SEQ ID NO:44) 并且下部链是优化序列 (SEQ ID NO:45)。注意:未示出序列起始处的一个单一的碱基 (C);这些碱基形成Nde I位点CATATG的一部分。

[0043] 图18是Blip 0spA 5/3与被修饰的分子lipB s0spA 5/3的0spA序列的比对。上部链是原始序列 (SEQ ID NO:46) 并且下部链是优化序列 (SEQ ID NO:47)。

[0044] 图19示出在用狭义伯氏疏螺旋体B31菌株攻击之前,在用3ng的0spA 1/2进行免疫的受保护和受感染的动物之中的抗体表面结合和生长抑制测定中的功能性抗0spA反应的分布。曼-惠特尼 (Mann-Whitney) p值证明了在受保护与受感染的动物之间的功能性抗体含量的高度显著的差异。

[0045] 图20示出在用野生蜱虫攻击之前,在用3ng的0spA 1/2进行免疫的受保护和受感染的动物之中的抗体表面结合和生长抑制测定中的功能性抗0spA反应的分布。曼-惠特尼p值证明了在受保护与受感染的动物之间的功能性抗体含量的高度显著的差异。

[0046] 图21示出在用三个剂量的3-组分嵌合0spA疫苗免疫之后,池集的小鼠血清中的表面结合 (平均荧光强度 (MFI)) 和生长抑制 (GI-50效价)。检测针对所有六种疏螺旋体属菌株的有效的表面结合和生长抑制,所述六种疏螺旋体属菌株表达与在疫苗中的0spA类型 (1至6类型) 同源的0spA类型。

[0047] 图22示出在表面结合测定 (SBA) 中使用来自用r0spA疫苗的组合进行免疫的单独小鼠的第42天的血清所获得的平均荧光强度 (MFI) 效价。结果显示多价疫苗中要求所有三种r0spA组分 (1/2、6/4以及5/3) 以便在C3H小鼠体内诱导针对所有六种菌株的高效价表面结合IgG抗体。2-组分疫苗无法完全覆盖两种缺少的菌株。

[0048] 图23示出使用来自用r0spA疫苗的组合进行免疫的单独小鼠 (10只为一组) 的第42天的血清的疏螺旋体属的生长抑制。只有多价疫苗 (该疫苗包含所有三种菌株) 在大于90%的动物 (n=10) 中给出大于50%的生长抑制。黑色直条 (实心直条) 指示与使用的疫苗同源的菌株。

[0049] 图24示出表达0spA的型内变体的疏螺旋体属的覆盖度。表面结合分类成强式结合 (荧光增加大于10倍) 或弱式结合 (荧光增加2至10倍)。

[0050] 发明详述

[0051] 本发明提供可用作抗原的嵌合0spA分子,所述嵌合0spA分子可以作为免疫原性组合物或疫苗组合物进行递送以用于莱姆病或疏螺旋体属感染。在详细解释本发明的任何实施方案之前,应理解的是,本发明的应用不限于在以下描述中阐述或附图和实施例中说出的组分的构建细节和安排细节。本文使用的章节标题仅是出于组织性目的并且不应视为是限制所描述的标的。本申请中引用的所有参考文献都被以引用方式明确并入本文中。

[0052] 本发明包涵其它实施方案并且以各种方式来实践或进行。而且,应理解的是,本文使用的措辞和术语是出于描述目的并且不应认为具有限制性。术语“包括”、“包含”或“具

有”以及其变型意欲涵盖其后所列的项目和其等效项目以及其它项目。

[0053] 本发明的实施方案是在编码三种相异的脂质化OspA分子的三种嵌合OspA编码序列的设计和合成中进行例证,所有三种相异的脂质化OspA分子共有一些共同的特点。每个嵌合编码序列代表两个OspA血清型并且所述嵌合编码序列被设计成编码安全且高度免疫原性的稳定的嵌合OspA分子,并且向受试者提供针对广义伯氏疏螺旋体感染的保护。

[0054] 在一方面,嵌合OspA分子包含来自一个OspA血清型的近端部分连同来自另一个OspA血清型的远端部分,同时保留了两个亲本多肽的保护性质。嵌合OspA核酸分子被表达在大肠杆菌(E.coli)中以便提供抗原,该抗原可以被配制成联合疫苗以便提供针对与在欧洲的莱姆病或疏螺旋体属感染相关联的所有六种流行的血清型(血清型1至6)和针对与在北美洲的莱姆病或疏螺旋体属感染相关联的单个OspA血清型的保护。由于包含血清型1至6的疫苗提供针对阿氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体以及伯氏疏螺旋体的保护,所以疫苗被设计成全球通用。

[0055] 本发明还包括通过去除编码产生脂质化OspA分子所需要的前导序列的核酸序列来制备第二组嵌合OspA编码序列,在一方面,该组嵌合OspA编码序列源自于第一组三种基因。需要对这两组构建体(产生脂质化和非脂质化多肽)进行以下操作:评估所述构建体在发酵罐中产生的难易程度(生物量、稳定性、产物产率等)、评定不同类型的抗原可以纯化的容易程度以及比较所述构建体的生物特征(安全状况和保护效力)。

[0056] 本发明包括包含本发明的嵌合OspA分子的免疫原性组合物。本发明同样包括包含所述OspA分子的疫苗和疫苗试剂盒、用于制作免疫原性组合物和疫苗的方法以及免疫原性组合物和疫苗在人类和兽医医学治疗和预防中的用途。本发明进一步包括使用本文描述的OspA组合物来进行免疫对抗莱姆病或疏螺旋体属感染的方法和OspA组合物在制造用于预防莱姆病或疏螺旋体属感染的药剂中的用途。

[0057] 定义

[0058] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的相同的含义。以下参考文献为技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的通用定义:Singleton等,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULARBIOLOGY(1994第二版);THE CAMBRIDGE DICTIONARY OFSCIENCE AND TECHNOLOGY(1988Walker编);THE GLOSSARY OFGENETICS,第五版,R.Rieger等(编),Springer Verlag(1991);以及Hale&Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY(1991)。

[0059] 贯穿全文使用以下缩写。

[0060]	AA	氨基酸
[0061]	Amp	安比西林
[0062]	bp	碱基对
[0063]	B.afzelii	阿弗西尼疏螺旋体
[0064]	B.burdorferi	伯氏疏螺旋体
[0065]	B.garinii	伽氏疏螺旋体
[0066]	DNA	脱氧核糖核酸
[0067]	dNTPs	脱氧核苷酸三磷酸

[0068]	E.coli	大肠杆菌
[0069]	GC content	含有鸟嘌呤和胞嘧啶碱基的序列的百分比
[0070]	hLFA-1	人类白细胞功能相关抗原-1
[0071]	HPLC	高效液相色谱法
[0072]	IP	知识产权
[0073]	IPTG	异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷
[0074]	Kan	卡那霉素
[0075]	kDa	千道尔顿
[0076]	LB	卢里亚肉汤 (Luria Broth)
[0077]	Lip B	来自外膜蛋白B的前导序列
[0078]	Mab	单克隆抗体
[0079]	OD	光密度
[0080]	OspA	外膜蛋白A
[0081]	OspB	外膜蛋白B
[0082]	PCR	聚合酶链反应
[0083]	RNA	核糖核酸
[0084]	s.l.	广义
[0085]	s.s.	狭义
[0086]	SDS	十二烷基硫酸钠
[0087]	SMK	用于大肠杆菌的生长培养基 (酮戊二酸山梨醇培养基)
[0088]	tRNA	转移核糖核酸
[0089]	WCB	工作细胞库

[0090] 此处应注意,如在本说明书和随附权利要求书中所使用,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个(a)”、“一个(an)”以及“该(the)”包括复数引用。

[0091] 如在此所使用,除非另外规定,否则以下术语具有赋予给它们的含义。

[0092] 术语“基因”是指编码包含一个或多个多肽、蛋白或酶中的全部或部分的氨基酸序列的DNA序列,并且可以或可以不包括内含子,和调控DNA序列,如影响例如基因表达的条件启动子或增强子序列、5'未翻译区或3'未翻译区。在本公开中,OspA基因是细菌基因并且因此不存在内含子。术语“编码序列”是指编码氨基酸序列但不含有内含子或调控序列的DNA序列。同样地,在本公开中,OspA编码序列不含有调控序列。

[0093] “核酸”或“核酸序列”或“核酸分子”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语涵盖了含有已知核苷酸类似物或被修饰的骨架残基或连接部分的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的以及非天然存在的,它们具有与参考核酸相似的结合性质,并且它们以与参考核苷酸相似的方式进行新陈代谢。所述类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。所述术语涵盖了由DNA和RNA的任何已知碱基类似物形成的分子,所述碱基类似物诸如但不限于4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺嘌呤、吡丙啶基-胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基-甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异-戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧

啉、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基-鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧氨基-甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基Q核苷(mannosylqueosine)、5'-甲氧羰基-甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫基胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫基胞嘧啶以及2,6-二氨基嘌呤。

[0094] 除非另外指示,否则一个特定核酸序列也隐含地涵盖其经过保守性修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补序列,以及明确指示的序列。明确来说,在一些方面,简并密码子取代是通过产生序列来实现,在所述序列中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991); Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。术语核酸可以与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸以及多核苷酸互换使用。

[0095] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白”在本文中可互换使用以便指代经由肽键连接的氨基酸残基的聚合物。所述术语应用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。术语“蛋白”典型地是指较大多肽。术语“肽”典型地是指短多肽。合成多肽可以例如使用自动化的多肽合成仪来进行合成。

[0096] 术语“Osp A分子”或“嵌合OspA分子”在一方面是指包含SEQ ID NO:1(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:3(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:5(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:7(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:9(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:11(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:168(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:170(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:172(orig sOspA 5/3)的核苷酸序列的“OspA核酸”,或者在另一方面是指包含SEQ ID NO:2(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipBsOspA 5/3)、SEQ ID NO:8(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:12(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)的氨基酸序列的“OspA多肽”。

[0097] 术语“lipB sOspA分子”在一方面是指包含SEQ ID NO:1(lipBsOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:3(lipB sOspA 6/4)或SEQ ID NO:5(lipBsOspA 5/3)的核苷酸序列的“OspA核酸”,或者在另一方面是指包含SEQ ID NO:2(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB sOspA 6/4)或SEQ ID NO:6(lipB sOspA 5/3)的氨基酸序列的“OspA多肽”。SEQ ID NO:7、9以及11的核酸序列缺少编码lipB前导序列(MRLLIGFALALALIG (SEQ ID NO:13)的核酸序列。此外,代替SEQ ID NO:2、4以及6中的lipB前导序列的羧基末端处存在的半胱氨酸残基,SEQ ID NO:7、9以及11的核酸序列对在SEQ ID NO:8、10以及12的氨基末端处的甲硫氨酸残基进行编码。

[0098] 术语“orig sOspA分子”或“原始sOspA分子”在一方面是指包含SEQ ID NO:168(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:170(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:172(orig sOspA 5/3)的核苷酸序列的“OspA核酸”,或者在另一方面是指包含SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)的氨基酸序列的“OspA多肽”。这些“原始”分子是不具有突变并且不具有密码子优化的嵌合构建体。

[0099] 本发明包括“脂质化OspA”和“非脂质化OspA”嵌合分子。在各个方面，脂质化将佐剂性质赋予OspA。在本发明的一些方面，脂质化OspA分子包含OspB前导序列。在本发明的一些方面，所述OspB前导序列包含氨基酸MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO:13)。在其它方面，OspB前导序列包含其它氨基酸。

[0100] 如在本领域中已知的术语“一致的”或“同一性”百分比是指两个或更多个多肽分子或者两个或更多个核酸分子的序列之间的如通过比较这些序列来确定的关系。在本领域中，“同一性”也意指核酸分子或多肽之间的序列相关性的程度，所述程度看情形而定，如通过两个或更多个核苷酸序列或者两个或更多个氨基酸序列的链条之间的匹配度来确定。通过特定的数学模型或计算机程序（即，“算法”）来解决，“同一性”测量间隙对准（如果有的话）的两个或更多个较小序列之间的一致匹配的百分比。“大致同一性”是指序列与指定序列具有至少约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的序列同一性。在一些方面，同一性存在于长度至少约为50至100个氨基酸或核苷酸的区域中。在其它方面，同一性存在于长度至少约为100至200个氨基酸或核苷酸的区域中。在其它方面，同一性存在于长度至少约为200至500个氨基酸或核苷酸的区域中。在某些方面，序列同一性百分比是使用选自以下组成的组的计算机程序来确定：GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit以及Smith-Waterman算法。

[0101] 还应明确理解的是，本文引用的任何数值包括从下限值至上限值的所有值，即，在本申请中认为明确陈述了在已列举的最低值与最高值之间的数值的所有可能的组合。例如，如果浓度范围被陈述为约1%至50%，那么意图在本申请中明确列举一些值如2%至40%、10%至30%或1%至3%等。上文列出的值仅是明确意图的值的实例。

[0102] 在各个方面，范围在本文中被表达为从“约”或“近似”一个特定值和/或至“约”或“近似”另一个特定值。在通过使用先行词“约”将值表达为近似值时，应理解的是，一些变化量被包括在所述范围内。

[0103] 术语“相似性”是相关的概念，但与“同一性”相比是指包括一致匹配和保守性取代匹配的相似性的量度。如果两个多肽序列例如具有10/20的一致氨基酸并且剩余部分是所有的非保守性取代，那么同一性百分比和相似性百分比将都是50%。在同一实施例中，如果存在其中存在保守性取代的多余的五五个位置，那么同一性百分比仍然是50%，但相似性百分比将是75% (15/20)。因此，在存在保守性取代的情况下，两个多肽之间的相似性百分比的程度将大于在那两个多肽之间的同一性百分比。

[0104] 术语“分离的核酸分子”是指本发明的核酸分子，(1) 所述核酸分子已从当从源细胞分离总DNA时，可天然地被一起发现的蛋白、脂类、碳水化合物或其它材料分离成任何程度；(2) 所述核酸分子未连接至所述“分离的核酸分子”天然连接的多核苷酸的全部或一部分；(3) 所述核酸分子被操作地连接至它天然并不连接的多核苷酸；或者(4) 所述核酸分子并不是天然存在作为较大核苷酸序列的一部分。如本文使用的大致地不含指示核酸分子不含在它的自然环境中发现的任何其它污染性核酸分子或其它污染物，所述污染性核酸分子或其它污染物会干扰所述核酸分子在多肽产生中的用途或所述核酸分子的治疗、诊断、预防或研究用途。

[0105] 术语“分离的多肽”是指本发明的多肽，(1)所述多肽已从当它从源细胞分离时，可天然地被一起发现的多核苷酸、脂类、碳水化合物或其它材料分离成任何程度；(2)所述多肽未连接(通过共价或非共价相互作用)至所述“分离的多肽”天然连接的多肽的全部或部分；(3)所述多肽被操作地连接(通过共价或非共价相互作用)至它天然并不连接的多肽；或者(4)所述多肽天然并不存在。在一方面，分离的多肽大致上不含在它的自然环境中发现的任何其它污染性多肽或其它污染物，所述污染性多肽或其它污染物会干扰所述多肽的治疗、诊断、预防或研究用途。

[0106] 如本文使用的多肽的“片段”是指多肽的小于全长多肽或蛋白表达产物的任何部分。片段典型地是全长多肽的缺失类似物，其中一个或多个氨基酸残基已从全长多肽的氨基末端和/或羧基末端去除。因此，“片段”是下文描述的缺失类似物的子集。

[0107] 如本文使用的“类似物”是指在结构上大致相似并且具有相同的生物活性的多肽，尽管在某些情况下在不同程度上，是指天然存在的分子。基于一种或多种突变，与衍生类似物的天然存在的多肽相比，类似物在它们的氨基酸序列的组成上是不同的，所述一种或多种突变包括(i)在多肽(包括如上文描述的片段)的一个或多个末端处和/或天然存在的多肽序列的一个或多个内部区域处缺失一个或多个氨基酸残基；(ii)在多肽的一个或多个末端(典型是“添加”类似物)处和/或天然存在的多肽序列的一个或多个内部区域(典型是“插入”类似物)处插入或添加一个或多个氨基酸；或者(iii)用一个或多个氨基酸取代天然存在的多肽序列中的其它氨基酸。取代基于被替换的氨基酸和替换它的氨基酸的物理化学相关性或功能性相关性是保守性的或非保守性的。

[0108] “保守性修饰的类似物”应用于氨基酸序列与核酸序列。对于特定的核酸序列来说，保守性修饰的核酸是指编码一致的或基本上一致的氨基酸序列或其中核酸未将氨基酸序列编码成基本上一致的序列的那些核酸。大量功能上一致的核酸由于遗传密码的简并性而对任何给出的蛋白进行编码。例如，密码子GCA、GCC、GCG以及GCU都对氨基酸丙氨酸进行编码。因此，在丙氨酸由密码子指定的每个位置处，在不改变被编码的多肽的情况下可以将密码子改变为描述的任何相应的密码子。所述核酸变异是“沉默变异”，是保守性修饰的类似物的一个种类。在本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每个可能的沉默变异。技术人员将认识到在核酸(除了通常为甲硫氨酸仅有的密码子的AUG和通常为色氨酸仅有的密码子的TGG)中的每个密码子都可以被修饰以便产生功能上一致的分子。因此，编码多肽的核酸的每个沉默变异均暗含于每个描述的序列中。

[0109] 至于氨基酸序列，技术人员将认识到在被编码的序列中改变、添加或缺失单一个氨基酸或小百分比的氨基酸的针对核酸、肽、多肽或蛋白序列的单独取代、插入、缺失、添加或截短是“保守性修饰的类似物”，其中改变造成氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守性取代表在本领域中是熟知的。除了这类经过保守性修饰的变体之外，不排除本发明的多态变体、种间同源物以及等位基因。

[0110] 以下八个组各自含有互为彼此的保守性取代的氨基酸：

[0111] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；

[0112] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

[0113] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；

[0114] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)；

[0115] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；

[0116] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；

[0117] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；以及

[0118] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M) (参见,例如Creighton,Proteins(1984))。

[0119] 如本文使用的“变体”是指包含至少一个氨基酸取代、缺失、插入或修饰的多肽、蛋白或其类似物,前提是所述变体保留了天然多肽的生物活性。

[0120] 如本文使用的“等位基因变体”是指占据同一基因座的基因的两个或更多个多态形式中的任何一种。等位基因变异通过突变而天然出现,并且在一些方面导致群体中的表型多态。在某些方面,基因突变是沉默的(经过编码的多肽中无变化)或者在其它方面,对具有改变的氨基酸序列的多肽进行编码。“等位基因变体”也是指源自于遗传等位基因变体的mRNA转录本的cDNA以及由cDNA编码的蛋白。

[0121] 术语“衍生物”是指通过偶联到治疗剂或诊断剂、标记(例如,用放射性核素或各种酶)、共价聚合物附加如PEG化(用聚乙二醇衍生化)以及通过非天然氨基酸的化学合成而进行的插入或取代来进行共价修饰的多肽。在一些方面,衍生物被修饰以便包含正常情况下不是分子的一部分的其它化学部分。在各个方面,所述部分调节分子的溶解性、吸收和/或生物半衰期。在其它各个方面,所述部分可选地降低了分子的毒性并且消除或弱化分子的任何不合意的副作用等。雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(1980)中公开了能够介导所述作用的部分。将所述部分连接至分子的程序在本领域中是熟知的。例如,在一些方面,OspA衍生物是具有赋予所述蛋白较长体内半衰期的化学修饰的OspA分子。在一个实施方案中,多肽是通过添加本领域中已知的水溶性聚合物来进行修饰。在一个相关的实施方案中,多肽是通过糖基化、PEG化和/或多唾液酸化来进行修饰。

[0122] 在参考例如细胞或核酸、蛋白或载体来一起使用时,术语“重组”指示细胞、核酸、蛋白或载体已通过引入异源核酸或蛋白或者改变天然核酸或蛋白来进行修饰,或者指示细胞源自于经过如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式中未发现的基因或者表达以其它形式异常表达、表达不充分或完全未表达的天然基因。

[0123] 如本文使用的“可选标记”是指编码赋予细胞或有机体的酶或其它蛋白的基因,在所述细胞或有机体中,所述基因表达为可鉴定的表型变化如对药物、抗生素或其它试剂的抗性,这样使得标记的表达或活性被选择用于(例如但不限于阳性标记如neo基因)或对抗(例如并且不限于阴性标记如白喉基因)。“异源可选标记”是指已被插入动物的基因组的可选标记基因,在所述动物中通常无法发现所述可选标记基因。

[0124] 可选标记的实例包括但不限于抗生素抗性基因如新霉素(neo)、嘌呤霉素(Puro)、白喉毒素、磷酸转移酶、潮霉素磷酸转移酶、黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶、第一型单纯疱疹病毒胸苷激酶、腺嘌呤磷酸核糖基转移酶以及次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthinephosphoribosyltransferase)。本领域普通技术人员将理解本领域已知的任何可选标记都可用于本文描述的方法中。

[0125] 在参考核酸部分一起使用时,术语“异源”指示核酸包含彼此在性质上未找出相同关系的两个或更多个子序列。例如,核酸典型地是进行重组来产生,从而使来自不相关基因的两个或更多个序列被安排,以便制作新的功能性核酸,例如,来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区。相似地,异源蛋白指示蛋白包含彼此在性质上未找出相同关系的

两个或更多个子序列(例如,融合蛋白)。

[0126] 如本文使用的术语“同源”是指拥有“共同的进化起源”的蛋白之间的关系,所述蛋白包括来自超家族(例如,免疫球蛋白超家族)的蛋白和来自不同物种(例如,肌球蛋白轻链等)的同源蛋白(Reeck等,Cell50:667,1987)。所述蛋白(和它们的编码基因)具有如通过它们的序列相似性来反映的序列同源性,所述序列相似性是就在相似性百分比而论,或是就在保守位置处特定残基或基元的存在而论。

[0127] 进行用于比较的序列的最佳比对,最佳比对是例如但不限于通过Smith等,Adv.Appl.Math.2:482,1981的局部同源性算法;通过Needleman等,J.Mol.Biol.48:443,1970的同源性比对算法;通过Pearson等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,1988的相似性搜索方法;通过这些算法的计算机化实施(威斯康星州麦迪逊(Madison,WI)的575Science Dr.的Genetics Computer Group的Wisconsin遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA以及TFASTA)或者通过目测检查(通常参见上文的Ausubel等)。适于确定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的另一个实例是BLAST算法,该算法被描述在Altschul等,J.Mol.Biol.215:403-410,1990中。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。除计算出序列同一性百分比之外,BLAST算法还进行在两个序列之间的相似性的统计分析(参见,例如Karlin等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787,1993)。

[0128] 术语“载体”用于指用来将编码信息转移到宿主细胞的任何分子(例如,核酸、质粒或病毒)。

[0129] “克隆载体”是其中可以插入外来DNA片段的一小片DNA。将片段插入克隆载体是通过用同一限制酶来处理运载物和外来DNA,然后将片段连接在一起来进行。存在许多类型的克隆载体并且所有类型的克隆载体都用于本发明中。遗传工程改造的质粒和细菌噬菌体(如,噬菌体 λ)可能最常用于这一目的。其它类型的克隆载体包括细菌人工染色体(BAC)和酵母菌人工染色体(YAC)。

[0130] “表达载体”是重组或合成产生的核酸构建体,所述核酸构建体具有允许特定的核酸在宿主细胞中进行转录的一系列指定的核酸元件。表达载体可以是质粒、病毒或核酸片段的一部分。在某些方面,表达载体包括待被转录操作地连接至启动子的核酸。

[0131] 术语“编码序列”在本文中被定义为转录成mRNA的核酸序列,所述mRNA在处于适当的控制序列的控制下时被翻译成多肽。编码序列的边界总体上是由通常为mRNA的5'末端处的开放读码框的起点的ATG起始密码子和恰好位于mRNA的3'末端处的开放读码框的下游的转录终止序列来确定。编码序列可以包括但不限于基因组DNA序列,cDNA序列,半合成序列、合成序列以及重组的核酸序列。在一方面,启动子DNA序列被定义为位于与其相关的编码序列的上游的DNA序列并且能够控制这一编码序列的表达。

[0132] “启动子”被定义为指引核酸转录的一系列核酸控制序列。如本文使用的启动子包括在转录的起始位点附近的必要的核酸序列,如在聚合酶II类型启动子情况下的TATA元件。启动子还任选地包括可以位于距离转录的起始位点多达数千碱基对处的远端增强子或阻遏元件。“组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下呈活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节情况下呈活性的启动子。

[0133] 术语“操作地连接”是指在核酸表达控制序列(如启动子或一系列转录因子结合位点)与第二核酸序列之间的功能性连接,其中表达控制序列指引对应于第二序列的核酸的转录。

[0134] 术语“转导”是用于指通常通过噬菌体将核酸从一种细菌转移到另一种细菌。“转导”还指通过逆转录病毒获得并且转移真核细胞序列。

[0135] 术语“转染”是用于指通过细胞摄取外来或外源DNA,并且细胞在外源DNA已被引入细胞膜内时已经被“转染”。本领域中熟知并且在本文中公开了许多转染技术。参见,例如Graham等,Virology,52:456(1973);Sambrook等,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,ColdSpring Harbor Laboratories,New York,(1989);Davis等,Basic Methods inMolecular Biology,Elsevier,(1986);以及Chu等,Gene,13:197(1981)。所述技术可以用来将一个或多个外源DNA部分引入适合的宿主细胞。

[0136] 如在此使用的术语“转化”是指细胞遗传特征的改变,并且细胞在经过修饰而含有新的DNA时已经被转化。例如,在细胞从它的天然状态进行遗传修饰时,所述细胞已被转化。在转染或转导之后,转化DNA可以通过物理地并入细胞的染色体来与细胞的DNA重组。在一些情况下,DNA被短暂地维持为游离元件而不被复制,或者它独立地复制为质粒。在DNA随着细胞分裂而进行复制时,认为细胞已经被稳定转化。

[0137] 术语“内源的”是指在宿主有机体内天然地表达或起源于细胞、组织或有机体内的多肽或多核苷酸或其它化合物。“外源的”是指起源于细胞、组织或有机体之外的多肽、多核苷酸或其它化合物。

[0138] 术语“试剂”或“化合物”描述具有影响本发明中的生物学参数的能力的任何分子,例如,蛋白或药物。

[0139] 如本文使用的“对照”可以是指活性、阳性、阴性或媒介物对照。如将为本领域技术人员所理解,对照是用来建立实验结果的相关性并且为测试条件提供比较。

[0140] 在提及莱姆或莱姆病的症状时,术语“降低严重程度”意指症状具有延迟的发作,降低的严重程度或对受试者产生较小损害。通常来说,将症状的严重程度与例如未接受活性预防性或治疗性组合物的对照相比较。在所述情况下,与症状的对照水平相比,如果所述症状被降低了10%、25%、30%、50%、80%或100%(即,实质上消除),那么则说组合物可以降低莱姆症状的严重程度。

[0141] 术语“抗原”是指能够由选择性结合剂如抗体来结合并且另外能够用于受试者以便产生能够接合到每个抗原的表位的抗体的分子或分子的一部分。在各个方面,抗原具有一个或多个表位。

[0142] 术语“抗体”是指具有针对OspA多肽的特异性的一个或多个分子。如在此使用的术语“特异的”、“特异性”以及“特异地结合”是指抗体接合到OspA多肽和不结合到非OspA多肽的能力。在某些方面,抗体是“中和抗体”,其中抗体与感染剂发生反应并且破坏或抑制它的感染性或毒力。本发明包括包含“中和”疏螺旋体属的抗体的免疫原性组合物。

[0143] 如在此使用的术语“药学上可接受的载体”或“生理学上可接受的载体”是指适于实现或增强作为药用组合物的OspA多肽、OspA核酸分子或OspA抗体的递送的一种或多种配制材料。

[0144] 术语“稳定剂”是指保护疫苗的免疫原性组合物不受不利条件(如在加热或冷冻期

间产生的那些条件)的影响和/或延长免疫原性组合物在稳定和免疫原性的条件或状态下的稳定性或保质期的物质或疫苗赋形剂。稳定剂的实例包括但不限于糖类,如蔗糖、乳糖以及甘露糖;糖醇如甘露醇(manitol);氨基酸如甘氨酸或谷氨酸;以及蛋白如人血清清蛋白,或明胶。

[0145] 术语“抗菌性防腐剂”是指被添加至免疫原性组合物或疫苗的任何物质,所述物质抑制在反复刺穿多剂量小瓶(如果使用所述容器)时可能引入的微生物的生长。抗菌性防腐剂的实例包括但不限于如硫柳汞、2-苯氧基乙醇、苄索氯铵以及苯酚的物质。

[0146] 术语“免疫原性组合物”是指包含抗原(产生针对它的抗原特异性抗体)(例如,嵌合OspA分子)、刺激受试者宿主的免疫反应的佐剂以及适合的免疫惰性的药学上可接受的载体的组合物。任选地,免疫原性组合物包含一种或多种稳定剂。任选地,免疫原性组合物包含一种或多种抗菌性防腐剂。

[0147] 术语“疫苗”或“疫苗组合物”是指改善对特定疾病(例如,莱姆病或疏螺旋体属感染)的免疫性的生物制剂。疫苗典型地含有与引起疾病的微生物类似的试剂(例如,疏螺旋体属的嵌合OspA分子(抗原))。所述试剂刺激机体的免疫系统来将所述试剂识别为外来物,破坏所述试剂并且“记住”所述试剂,这样使得免疫系统可以更容易地识别并且破坏它后来碰到的这些微生物中的任何微生物。在各个方面,疫苗是预防性的(预防或改变通过任何天然或“野生”病原体引起的未来感染的作用)或治疗性的(针对本感染的疫苗)。如上文所阐述,所述疫苗组合物包括包含药学上可接受的载体的制剂。任选地,疫苗还包含一种或多种稳定剂和/或一种或多种抗菌性防腐剂。

[0148] 术语“有效量”和“治疗有效量”各自是指用于支持如本文所阐述的OspA多肽的一种或多种生物活性的可观察水平的核酸分子、多肽、组合物或抗体的量。例如,在本发明的一些方面,有效量将是预防、中和或降低疏螺旋体属感染所必要的量。

[0149] 术语“组合”是指本发明的两个或更多个核酸分子或本发明的两个或更多个多肽。在一些方面,施用本发明的分子的组合来提供免疫力或抵抗来自本文描述的疏螺旋体属的六种血清型(1至6)中的至少四种血清型的感染。在各个方面,使用了本发明的两个或三个分子或多肽的组合。在某些方面,向受试者施用本发明的分子的组合来提供针对来自本文描述的疏螺旋体属的所有六种血清型(1至6)的免疫性。后一种组合已显示出提供针对表达核酸分子或多肽的组合中不存在的OspA类型的疏螺旋体属的异源菌株的免疫性。

[0150] 术语“联合疫苗”是指含有针对一种或多种疾病的一种以上疫苗组合物或一种以上保护性抗原的疫苗制剂。除了针对一种或多种其它疾病的抗原之外,本发明还包括包含针对莱姆病或疏螺旋体属的OspA嵌合抗原的联合疫苗。在各个方面,一种或多种其它疾病是蜱传疾病。在某些方面,其它蜱传疾病是落基山斑疹热、巴贝斯虫病、回归热、科罗拉多蜱热、人单核细胞埃立克体病(HME)、人粒细胞埃立克体病(HGE)、南方蜱叮咬相关的皮疹疾病(STARI)、兔热病、蜱瘫痪、波瓦桑脑炎、寇热病、克里米亚刚果出血热、胞裂虫病、南欧斑疹热或蜱传脑炎。在特定方面,本发明包括包含一种或多种疫苗的联合疫苗,所述一种或多种疫苗包括蜱传脑炎疫苗、日本脑炎疫苗以及落基山斑疹热疫苗。在一些方面,联合疫苗包含具有与针对疏螺旋体属感染或莱姆病的免疫相容的季节性免疫程序的疫苗组合物。在更特定的方面,联合疫苗可用于预防多种疾病,用于这些疾病流行的地理位置。

[0151] 术语“疏螺旋体属”是指疏螺旋体属的螺旋体类的革兰氏阴性细菌的一个种类。在

一个方面,“广义伯氏疏螺旋体”是指较宽意义上的伯氏疏螺旋体。莱姆病或疏螺旋体病的几乎所有病例都是由三个同基因型种阿氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体以及狭义伯氏疏螺旋体(其是指狭义上的伯氏疏螺旋体)中的一个引起的。疏螺旋体属的OspA血清型与种类相关联;血清型1对应于狭义伯氏疏螺旋体,血清型2对应于阿氏疏螺旋体并且血清型3至7对应于伽氏疏螺旋体。在各个方面,本发明的免疫原性组合物或疫苗组合物还提供了针对其它种类的疏螺旋体属的保护作用,所述其它种类的疏螺旋体属包括但不限于日本疏螺旋体、安德森疏螺旋体、比塞蒂疏螺旋体、西尼伽疏螺旋体、土德疏螺旋体、塔卢基疏螺旋体、法雷斯疏螺旋体、卢西塔尼疏螺旋体、斯柏曼疏螺旋体、宫本疏螺旋体或孤星疏螺旋体。

[0152] “受试者”被给予了非植物、非原生生物的生物的常规含义。在大多数方面,受试者是动物。在特定方面,动物是哺乳动物。在更特定方面,哺乳动物是人类。在其它方面,哺乳动物是宠物或伴侣动物、驯养家畜或动物园动物。在某些方面,哺乳动物是猫、狗、马或牛。在其它各个方面,哺乳动物是鹿、小鼠、花栗鼠、松鼠、负鼠或浣熊。

[0153] 莱姆病(疏螺旋体病或莱姆疏螺旋体病)

[0154] 在一些方面,本发明包括嵌合OspA分子和包含这些分子的组合物以预防莱姆病或疏螺旋体属感染。莱姆病在本领域中又称为疏螺旋体病或莱姆疏螺旋体病,因此,所有这些术语都包括在本发明内。同样地,本发明包括预防或治疗莱姆病的方法,所述方法包括施用本文描述的嵌合OspA分子。莱姆病或疏螺旋体病是由属于疏螺旋体属的至少三种革兰氏阴性细菌引起的感染性疾病。存在已发现的至少13种疏螺旋体属种类,已知其中三种是与莱姆病相关的。引起莱姆病的疏螺旋体属种类被统称为广义伯氏疏螺旋体,并且显示大量基因多样性。广义伯氏疏螺旋体组是由可能造成绝大多数的病例的三个紧密相关的种类构成。狭义伯氏疏螺旋体是美国莱姆病(但所述莱姆病还存在于欧洲)的主要病因,而阿氏疏螺旋体和伽氏疏螺旋体引起了欧洲的大多数病例。一些研究还提出疏螺旋体属种类(例如,比塞蒂疏螺旋体、斯柏曼疏螺旋体、卢西塔尼疏螺旋体以及法雷斯疏螺旋体)有时可能会感染人类。虽然这些种类看起来似乎不是疾病的重要病因,但针对这些种类的免疫保护也被包括在本发明内。

[0155] 莱姆病是北半球最常见的蜱传疾病。所述疾病是以康乃狄格州(Connecticut)的村庄莱姆来命名的,在1975年在所述村庄中鉴定出许多病例。疏螺旋体属通过属于硬蜱属(“硬蜱”)的一些种类的受感染的蜱虫的叮咬传播到人类。在一些情况下,早期症状包括发热、头痛、疲劳、抑郁以及称为游走性红斑的特征性圆形皮肤红疹。如果不治疗,那么稍后的症状经常可以涉及关节、心脏以及中枢神经系统。在大多数情况下,感染和其症状可通过抗生素(尤其是疾患早期治疗时)来消除。然而,过晚、延迟或不充分的治疗可以导致更严重的症状,所述症状可能致残并且难以治疗。症状如在感染之后持续的关节炎有时通过抗生素来消除。

[0156] 一些团体辩称,“慢性”莱姆病造成在识别出的晚期莱姆病的症状之外的一系列医学上无法解释的症状,并且需要另外的长期抗生素治疗。然而,长期治疗是备受争议的并且关于所述治疗的争论已产生了针对治疗指南的立法行动。

[0157] 莱姆病被分类成动物传染病,这是因为莱姆病是通过蜱虫从包括啮齿动物和鸟类的天然储存宿主传播到人类,而所述蜱虫是以啮齿动物和鸟类这两组宿主为生。硬蜱属的硬体蜱虫是莱姆病的主要载体。大多数的人类感染是由处于幼虫阶段的蜱虫引起的,这是

因为蜱虫幼虫十分之小并且可能进食很长一段时间,而不被检测到。蜱虫叮咬因处于幼虫阶段的蜱虫的较小体型以及防止宿主感觉到因叮咬而产生的任何瘙痒或疼痛的蜱虫分泌物而经常不被察觉。

[0158] 莱姆病基于症状、客观身体上的发现(如游走性红斑、面神经麻痹或关节炎)、可能暴露于受感染的蜱虫的经历以及血清学血液测试而进行临床诊断。接近一半的莱姆病患者将发展成特征性靶心状红疹,但许多患者可能都不会联想到蜱虫叮咬。对于没有莱姆病症状的人来说,不推荐进行实验室测试。

[0159] 因为在实验室中很难培养疏螺旋体属细菌,所以莱姆病的诊断典型地是基于临床检查发现结果和暴露于地方性莱姆区的经历。认为仅出现在所有病例的约50%中的游走性红斑(EM)红疹就足以确立莱姆病的诊断,即便是在血清学血液测试是阴性的情况下。血清学测试可以用于支持临床上疑似的病例但其自身并没有诊断性。晚期莱姆病的诊断经常因可能模仿许多其它疾病的症状的多方面表现而变得困难。为此原因,评论家将莱姆称为新的“伟大模仿者”。在一些情况下,莱姆病被误诊为多发性硬化症、类风湿性关节炎、纤维肌痛、慢性疲乏综合征(CFS)、狼疮或其它自体免疫和神经变性疾病。因此,本领域中对预防或治疗莱姆病的疫苗存在很大的需求。

[0160] 疏螺旋体属的外膜蛋白A(OspA)

[0161] 在各个方面,本发明包括疏螺旋体属的嵌合OspA分子和包含这些分子的组合物以预防和治疗莱姆病或疏螺旋体属感染。在过去十年中已鉴定了数种疏螺旋体属外膜蛋白,所述外膜蛋白在这种螺旋体被从蜱虫传播到哺乳动物时通过体温和/或哺乳动物的宿主特异性信号来进行上调。

[0162] 伯氏疏螺旋体的主要外膜蛋白OspA因它作为疫苗候选物潜力而成为特别受关注的脂蛋白。来自疏螺旋体属的欧洲和北美洲菌株的OspA的血清型和基因分析已证明了抗原异质性和结构异质性。OspA被描述于已公布的PCT专利申请W0 92/14488、Jiang等(Clin.Diagn.Lab.Immunol.1:406-12,1994)中并且在本领域中是已知的。在小鼠、仓鼠以及狗的攻击研究中已显示OspA诱导保护性免疫。人类的临床试验已显示OspA的制剂在人体中是安全的并且具有免疫原性(Keller等,JAMA(1994)271:1764-1768)。

[0163] 虽然OspA表达在来自北美洲的伯氏疏螺旋体的绝大多数临床分离物中,但从欧洲的临床疏螺旋体属分离物的检查中出现了不同的景象。在欧洲,莱姆病主要是由疏螺旋体属的三种同基因型种,即伯氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体以及阿氏疏螺旋体引起的。本发明涉及提供针对疏螺旋体属的所有同基因型种的保护性免疫的嵌合OspA分子。本发明描述了编码共有共同特点的三种相异的脂质化OspA分子的三种嵌合OspA基因的设计和合成。每个基因代表两个OspA血清型并且这些基因被设计成编码安全且高度免疫原性,并且向受试者提供针对广义伯氏疏螺旋体感染的保护的稳定的OspA分子。本发明还描述了不具有突变和不具有密码子优化的三种原始嵌合OspA基因,所述基因编码共有共同特点的三种相异的脂质化OspA分子。每个基因代表两个OspA血清型并且编码向受试者提供针对广义伯氏疏螺旋体感染的保护的分子。

[0164] 已识别出欧洲分离物之中的七个主要的OspA血清型(指示为血清型1至7,Wilske等,J.Clin.Microbiol.31:340-50,1993)。OspA血清型与种类相关联;血清型1对应于狭义伯氏疏螺旋体,血清型2对应于阿氏疏螺旋体并且血清型3至7对应于伽氏疏螺旋体。欧洲疏

螺旋体属分离物的流行病学研究指示基于OspA类型1、2、3、4、5以及6的疫苗在欧洲将提供98.1%的莱姆病的理论覆盖率并且覆盖96.7%的侵袭性疾病分离物。本发明提供可以提供针对所有六种血清型1至6的保护性免疫的六种嵌合OspA核酸分子(SEQ ID NO:1、3以及5和SEQ ID NO:168、170以及172)和六种嵌合OspA多肽分子(SEQ ID NO:2、4以及6和SEQ ID NO:169、171以及173)。六种合成OspA基因被设计成编码OspA分子,所述OspA分子具有来自以下的保护性表位:OspA血清型1和2(lipB sOspA 1/2²⁵¹(SEQ ID NO:1(核酸)和2(氨基酸)) 和orig sOspA 1/2(SEQ ID NO:168(核酸)和169(氨基酸))) ;OspA血清型6和4(lipB sOspA 6/4(SEQ ID NO:3(核酸)和4(氨基酸)) 和orig sOspA 6/4(SEQ ID NO:170(核酸)和171(氨基酸))) ;以及OspA血清型5和3(lipB sOspA 5/3(SEQ ID NO:5(核酸)和6(氨基酸)) 和orig sOspA 5/3(SEQ ID NO:172(核酸)和173(氨基酸)))。嵌合OspA基因是使用合成的重叠寡核苷酸来制作的。在某些方面,以高产率和纯度产生这些重组蛋白,并且在各个方面,可操纵所述重组蛋白来最大化合意的活性并最小化不合意的活性。

[0165] 嵌合OspA核酸分子和多肽分子

[0166] 在各个方面,本发明包括疏螺旋体属的嵌合OspA核酸和多肽分子。本发明的OspA核酸包括核酸分子,所述核酸分子包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:如SEQ ID NO:1(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:3(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:5(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:7(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:9(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:11(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:168(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:170(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:172(orig sOspA 5/3)中阐述的核苷酸序列或如SEQ ID NO:2(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:8(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:12(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)中阐述的编码多肽的核苷酸序列。

[0167] SEQ ID NO:7、9以及11的核酸序列缺少编码lipB前导序列(MRLLIGFALALALIG(SEQ ID NO:13)的核酸序列。此外,代替在SEQ ID NO:2、4以及6中的lipB前导序列的羧基末端处存在的半胱氨酸残基,SEQ ID NO:7、9以及11的核酸序列对在SEQ ID NO:8、10以及12的氨基末端处的甲硫氨酸残基进行编码。SEQ ID NO:1、3以及5是lipB sOspA多核苷酸,并且SEQ ID NO:2、4以及6是lipB sOspA多肽。

[0168] 在一些方面,本发明包括不具有突变并且不具有密码子优化的疏螺旋体属的原始(“orig”)嵌合OspA核酸分子和多肽分子。因此,本发明的OspA核酸包括核酸分子,所述核酸分子包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:如SEQ ID NO:168(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:170(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:172(orig sOspA 5/3)中阐述的核苷酸序列或如SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)中阐述的编码多肽的核苷酸序列。

[0169] 下表1中陈述了用于嵌合OspA分子的DNA和氨基酸序列的序列鉴定编号。

[0170] 表1. 嵌合OspA DNA和氨基酸序列

	序列	DNA	氨基酸	互补链
		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
	lipB sOspA 1/2 ²⁵¹	1	2	48
	lipB sOspA 6/4	3	4	49
	lipB sOspA 5/3	5	6	50
[0171]	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	
[0172]	lipB sOspA 1/2 ²⁵¹			
[0173]	氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)			
[0174]	MRLLTGFALALALTGCAQKGAESIGSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKNGKYDLLATVDKLELKGTSKDNNGS			
[0175]	GVLEGVKTNKS VKLTISDDL GQTTLVFKEDGKTLVSKKVT SKDKS STEEFNEKGEVSEKIITMADGT			
[0176]	RLEYTGIKSDGTGKAKYVLKNFTLEGKVANDKTTLEVKEGTVTL SMNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKT			
[0177]	AAWNSKTSTLTI SVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK			
[0178]	DNA序列 (SEQ ID NO:1)			
[0179]	catatgcgtctgttgatcggttttgcctctggcgctggctctgatcggtgcgcacagaaaggtgctgagt			
[0180]	ctattggttccgtttctgtagatctgcccgggtgaaatgaaggttctggtagcaaaagaaaaagacaagaa			
[0181]	cggcaagtacgatctcatcgcaaccgtcgacaagctggagctgaaaggtacttctgataaaaacaacggc			
[0182]	tctggtgtgctggaggcgctcaaaactaacaagagcaaaagtaaagcttacgatctctgacgatctcggtc			
[0183]	agaccacgtggaagttttcaaagaggatggcaagaccctcgtgtccaaaaagtaacttccaaagacaa			
[0184]	gtcctctacggaagaaaaattcaacgaaaaaggtgaggtgtctgaaaagatcatcaccatggcagacggc			
[0185]	accgctcttgataacacgggtattaaaagcgatggtaccggtaaagcgaaatatgttctgaaaaacttca			
[0186]	ctctggaaggcaagtggttaataataaaaccaccttggaagtcaaggaaggcaccgttactctgagcat			
[0187]	gaatatctccaaatctggtgaagtttccgttgaaactgaacgacactgacagcaqcgctqcgactaaaaaa			
[0188]	actgcagcgtggaattccaaaacttctactttaaccattagcgtaacagcaaaaaaactacccagctgg			
[0189]	tgttcactaaacaagacacgatcactgtgcagaaatagactccgcaggcaccaacttagaaggcacgqc			
[0190]	agtcgaaattaaaacccttgatgaactgaaaaacgcgctgaaataagctgagcggtacc			
[0191]	互补链 (SEQ ID NO:48)			
[0192]	catatgcgtctgttgatcggttttgccttggcgctggctttaatcggtgtgacacagaaaggtgctgagt			
[0193]	ctattggttccgtttctgtagatctgcccgggggtatgaaagttctggtaagcaaaagaaaaagacaaaaa			
[0194]	cggtaaatacagcctgatggcaaccgtagaaaagctggagcttaaaggcacttctgataaaaacaacggt			
[0195]	tctggcaccctggaaggtgaaaaaactaacaaaagcaaaagtaaagcttactattgctgaggatctgagca			
[0196]	aaaccacctttgaaatcttcaaagaagatggcaaaactctggtatctaaaaaagtaaccctgaaagacaa			

[0197] gtctttctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaaatctctgaaaaactatcgtaatggcaaatggt
[0198] acccgctctggaatacacccgacatcaaaagcgataaaaccggcaaagctaaatacgttctgaaagacttta
[0199] ctctggaaggcactctggctgctgacggcaaaaccactctgaaagttaccgaaggcactgttactctgag
[0200] catgaacattttctaaatccggcgaaatcacggttgacactggatgacactgactctagcggcaataaaaaa
[0201] tccggcacctgggattctgatacttctactttaaccattagcaaaaacagccagaaaactaaacagctgg
[0202] tattcaccaaagaaaacactatcacggtacagaactataaccgtgcaggcaatgcgctggaaggcagccc
[0203] ggctgaaattaaagatctggcgagactgaaagccgctttgaaataagctgagcggatcc
[0204] lipB s0spA 6/4
[0205] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)
[0206] MRLLLGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPSGMTVLVSKEKDKNSKYSLEATVDKLELKGTSDKNNGS
[0207] GTLEGEKTNKSKVKLTIADDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGETSEKTI VMANGT
[0208] RLEYTDIKSDGSGKAKYVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSMNILKSGETVALDDSDTTQATKK
[0209] TGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
[0210] DNA序列 (SEQ ID NO:3)
[0211] catatgcgtctgttgatcggttttgcctctggcgctggctctgatcggtgcgcacagaaagggtgctgagt
[0212] ctattggttccgtttctgtagatctgcccgggtggcatgaccgttctggtcagcaaaagaaaaagacaaaaa
[0213] cggtaaaacagcctcgaggcgaccgtcgacaagcttgagctgaaaggcacctctgataaaaacaacggt
[0214] tccggcaccttgaagggtgaaaaaactaacaaaagcaaagtgaactgaccattgctgatgacctcagcc
[0215] agaccaaattcgaaattttcaaagaagatgccaaaaccttagtatccaaaaagtgacctgaaagacaa
[0216] gtctctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaaacctctgaaaaaacctcgtaatggcaaatggt
[0217] acccgctctggaatacacccgacatcaaaagcgatggctccggcaaagccaaatacgttctgaaagacttca
[0218] ccctggaaggcacctctgctgcccagggcaaaaccaccttgaaagttaccgaaggcactgtttgttttaag
[0219] catgaacatcttaaaatccgggtgaaatcacggttgcgctggatgactctgacaccactcaggccactaaa
[0220] aaaaccggcaaatgggattctaacacttccactctgaccatcagcgtgaattccaaaaaactaaaaaca
[0221] tcgtgttcaccaaagaagacaccatcacggtccagaaatacactctgcgggcaccaacctcgaaggcaa
[0222] cgcagtcgaaatcaaaacctggatgaactgaaaaacgctctgaaataagctgagcggatcc
[0223] 互补链 (SEQ ID NO:49)
[0224] ggatccgctcagcttatttcagcgcgtttttcagttcatcaagggttttaatttcgactgccgtgccttc
[0225] taagttgggtgcctgcggagtcgtattttctgcacagtgatcgtgtcttgttttagtgaacaccagctgggta
[0226] gtttttttgcgtttaacgctaattggttaaagtagaagttttggaattccacgctgcagtttttttagtcg
[0227] cagcgtgctgtcagtgctgttcagttcaacggaaacttcaccagatttgagatattcatgctcagagt
[0228] aacggtgccttccttgacttccaaggtggttttatcatttagccactttgccttcagagtgaagtttttc
[0229] agaacatatttcgctttaccgggtaccatcgcttttaataccgggtgtattcaagacgggtgccgtctgcca
[0230] tggatgatcttttcagacacctcaactttttcgttgaaattttcttcgtagaggacttgccttttgga
[0231] agttacttttttgacacgagggctttgccatcctctttgaaaacttcagcgtggctctgaccgagatcg
[0232] tcagagatcgtaagctttactttgctctttagttttgacgccctccagcacaccagagcggttgtttt
[0233] tatcagaagtacctttcagctccagcttgtcgacggttgcatgagatcgtaacttgccgttcttgtcttt
[0234] ttctttgtcaccagaaccttcatttcaccgggcagatctacagaaacggaaccaatagactcagcacct
[0235] ttctgtgcgcagccgatcagagccagcggccagagcaaagccgatcaacagacgcataatg

- [0236] lipB s0spA 5/3
- [0237] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)
- [0238] MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGGMKVLSKEKDKNGKYSLMATVEKLELKGTSKNNGS
- [0239] GTLEGEKTNKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSTEEFNEKGEISEKTIVMANGT
- [0240] RLEYTDIKSDKTGKAKYVLKDFLTLEGTAAADGKTTLVTEGTVTSLMNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS
- [0241] GTWSDSTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALESSPAEIKDLAELKAALK
- [0242] DNA序列 (SEQ ID NO:5)
- [0243] catatgcgtctgttgatcggcctttgctttggcgctqqctttaatcggctgtgcacagaaaggtgctgagt
- [0244] ctattgggtccgtttctgtagatctgcccgggggtatgaaagtcttggaagcaaaagaaaaagacaaaaa
- [0245] cggtaaacacagcctgatggcaaccgtagaaaagctggagcttaaaggcacttctgataaaaacaacggt
- [0246] tctggcatcctggaaggtgaaaaaactaacaaaagcaaaagtaaagcttaGtattgctgaggatctgagca
- [0247] aaaccacctttgaaatcttcaaagaagatggcaaaactctggtatctaaaaagtaaccctgaaagacaa
- [0248] gtcttctaccgaagaaaaattcaacgaaaaggggtgaaatctctgaaaaaactatcgtaatggcaaatggt
- [0249] acccgtctggaatacacccgacatcaaaagcgataaaaccggcaaaagctaaatacgttctgaaagacttta
- [0250] ctctggaaggcactctggctgctgacggcaaaaccactctgaaagtaccgaaggcactgttactctgag
- [0251] catgaacatttctaaatccggcgaaatcaccttgactggatgacactgactctagcggcaataaaaaa
- [0252] tccggcacctgggattctgatacttctactttaaccattagcaaaaacagccagaaaactaaacagctgg
- [0253] tattcaccaaaagaaaacactatcacctgaaagaactataaccgtgcaggcaatgcgctggaaggcagccc
- [0254] ggctgaaattaaagatctggcagagctgaaagccgctttgaaataagctgagcggatcc
- [0255] 互补链 (SEQ ID NO:50)
- [0256] ggatccgctcagcttatttcagagcggtttttcagttcatccagggttttgatttcgactgcgttgccctc
- [0257] gaggttgggtgcccgcagagtcgtatcttctggacgggtgatgggtgtcttctttggtgaacacgatgtttta
- [0258] gtttttttggaaattcacgctgatggctcagagtggaaagtgttagaatcccatttgccgggttttttagtggt
- [0259] cctgagtgggtgtcagagtcattccagcgcaacgggtgatttcaccggattttaagatgttcatgcttaaaac
- [0260] aacagtgccttcggtaactttcaaggtggttttgccgtcggcagcgagggtgccttcagggtgaagtct
- [0261] ttcagaacgtatttggctttgcccggagccatcgcttttgatgtcgggtgtattccagacgggtaccatttg
- [0262] ccattacgatggttttttcagaggtttcacccttttcgttgaaattttcttcggtagaggacttgtcttt
- [0263] cagggtcacttttttgataactaagggttttgcatcttctttgaaaatttcgaatttggtctggctgagg
- [0264] tcatcagcaatggtcagtttcaactttgcttttgtagttttttcaccttcagggtgccggaaccgttgt
- [0265] ttttatacagaggtgcctttcagctcaagcttgcgacgggtcgctcgaggtgtatttaccgtttttgtc
- [0266] tttttctttgctgaccagaacgggtcatgccaccgggcagatctacagaaacggaaccaatagactcagca
- [0267] cttttctgtgcgcagccgatcagagccagcgccagagcaaaagccgatcaacagacgcataatg
- [0268] s0spA 1/2²⁵¹
- [0269] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)
- [0270] MAQKGAESIGSVSVDLPGEMKIVLSKEKDKNGKYDLIATVDKLELKGTSKNNSGVLEGVKTNKS VKL
- [0271] TISDDLQTTLEVFKEGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIIITMADGTRLEYTGIKSDGTGKA
- [0272] KYVLKNFTLEGKVANDKTTLEVKEGTVTSLMNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSKTSTLTISVN
- [0273] SKKTTQLVFTKQDTTTVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK
- [0274] DNA序列 (SEQ ID NO:7)

- [0275] catatggcacagaaaggtgctgagtcctattggttccgtttctgtagatctgcccgggtgaaatgaaggttc
[0276] tggtagagcaaaagaaaaagacaagaacggcaagtacgatctcatcgcaaccgtcgacaagctggagctgaa
[0277] aggtacttctgataaaaacaacggctctggtgtgctggagggcgtcaaaactaacaagagcaaagtaaag
[0278] cttacgatctctgacgatctcggtcagaccacgctggaagttttcaaagaggatggcaagaccctcgtgt
[0279] ccaaaaaagtaacttccaaagacaagtcctctacggaagaaaaattcaacgaaaaaggtgaggtgtctga
[0280] aaagatcatcaccatggcagacggcaccctcttgaaatacaccggtattaaaagcgatgggtaccggtaaa
[0281] gcgaaatatgttctgaaaaacttcactctggaaggcaaagtggctaatgataaaaccaccttggaagtca
[0282] aggaaggcaccgttactctgagcatgaatatctccaaatctggtgaagtttccgttgaaactgaacgacac
[0283] tgacagcagcgtgctgactaaaaaaactgcagcgtggaattccaaaacttctactttaaccattagcgtt
[0284] aacagcaaaaaaactaccagctgggtgttactaaacaagacacgatcactgtgcagaaaatagactcca
[0285] acggcaccaacttagaaggcacggcagtcgaaattaaaacccttgatgaactgaaaaacgcgctgaaata
[0286] agctgagcggatcc
[0287] 互补链 (SEQ ID NO:56)
[0288] gtataccgtgtctttccacgactcagataaccaaggcaaagacatctagacgggccactttacttccaag
[0289] accactcgtttcttttctgttcttgcggttcattgctagagtagcgttggcagctgttcgacctgactt
[0290] tccatgaagactattttgttgcgagaccacacgacctcccgaqttttqattqttctcgtttcatttc
[0291] gaatgctagagactgctagagccagtcctggtgcgaccttcaaaagtttctctaccgttctgggagcaca
[0292] ggttttttcatggaaggttctgttcaggagatgccttcttttaagttgctttttccactccacagact
[0293] tttctagtagtggtaccgtctqccgtgggcagaacttatgtggccataattttcgctaccatggccattt
[0294] cgctttatacaagactttttqaagtgcgaccttccgtttcaccgattactattttgggtggaaccttcagt
[0295] tccttccgtggcaatgagactcgtacttatagaggttagaccacttcaaaggcaacttgacttgcgtgtg
[0296] actgtcgtcgcgacgctgattttttgacgtcgcaccttaaggttttgaagatgaaattggtaatcgcaa
[0297] ttgtcgttttttgatgggtcgaccacaagtgatttgttctgtgctagtgacacgtctttatgctgaggt
[0298] tgccgtggttgaaatcttccgtgcgctcagctttaattttgggaactacttgactttttgcgcgactttat
[0299] tcgactcgcctagg
[0300] s0spA 6/4
[0301] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:10)
[0302] MAQKGAESIGSVSDLPGGMTVTVSKEKDKNGKYSLEATVDKLELKSTSDKNNSSSTLESEKTNKSKVKL
[0303] TIADDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGETSEKTIVMANSTRLEYTDIKSDGSGKA
[0304] KYVLKDFTLGTLAADGKTTLVTEGTVVLSMNLKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWSNTSTLTISV
[0305] NSKKTKNIVFTKEDTTTVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
[0306] DNA序列 (SEQ ID NO:9)
[0307] catatggcacagaaaggtgctgagtcctattggttccgtttctgtagatctgcccgggtggcatgaccgttc
[0308] tggtcagcaaaagaaaaagacaaaaacggtaatacagcctcgaggcgaccgtcgacaagcttgagctgaa
[0309] aggcacctctgataaaaacaacggttccggcaccctggaaggtgaaaaaactaacaaaagcaaagtgaaa
[0310] ctgaccattgctgatgacctcagccagaccaaattcgaaattttcaaagaagatgccaaaaccttagtat
[0311] ccaaaaaagtgacctgaaagacaagtcctctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaaacctctga
[0312] aaaaacctcgtaattggcaaatggtaccctctggaatacaccgacatcaaaagcgatgggtccggcaaa
[0313] gccaaatagtttctgaaagacttcacctggaaggcaccctcgctgccgacggcaaaaccaccttgaaag

- [0314] ttaccgaaqgcactgttgttttaaqcatgaacatcttaaaatccggtgaaatcacggttqcqctqgatga
[0315] ctctgacaccactcaggccactaaaaaaaccggcaaatgggattctaacacttccactctgaccatcage
[0316] gtgaattccaaaaaactaaaaacatcggttccacaaagaagacaccatcacggtccagaaatacgact
[0317] ctgcgggcaccaacctcgaaggcaacgcagtcgaaatcaaaacctggatgaactgaaaaacgctctgaa
[0318] at aagct gagcggat cc
[0319] 互补链 (SEQ ID NO:57)
[0320] gtataccgtgtctttccacgactcagataaccaaggcaaagacatctagacgggccaccgtactggcaag
[0321] accagtcgtttcttttctgtttttgccatttatgtcggagctccgctggcagctgttcgaactcgactt
[0322] tccgtggagactatttttgttgccaaggccgtgggaccttccacttttttgattgttttcgtttcacttt
[0323] gactggtaacgactactggagtcggctctggttttaagctttaaaagtttcttctacggttttggaaata
[0324] ggttttttcactgggactttctgttcaggagatggcttctttttaagtgtcttttccactttggagact
[0325] tttttggtagcattaccgtttaccatgggcagaccttatgtggctgtagttttcgctaccgaggccgttt
[0326] cggtttatgcaagactttctgaagtgggaccttccgtgggagcgacggctgccgttttggaggaaactttc
[0327] aatggcttccgtgacaacaaaattcgtactttagaattttaggccacttttagtggaacgcgacctact
[0328] gagactgtggtgagtcgggtgattttttggccgtttaccctaagattgtgaaggtgagactgqtagtcg
[0329] cacttaaggttttttgattttttagcacaagtgttttcttctgtgtagtggcaggtctttatgctga
[0330] gacgcccggtgttgagcttccgttgcgtcagcttttagtttgggacctacttgactttttgcgagactt
[0331] tattcgactcgcctagg
[0332] s0spA 5/3
[0333] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)
[0334] MAQKGAESIGSVSDLPGGMKVLVSKEKDKNGKYSLSMATVEKLELKGTSKNNSGTLEGEKTNKSKVKL
[0335] TTAEDLSKTTFETFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGEISEKTIVMANGTRLEYTDKSDKTGKA
[0336] KYVLKDFTLGTLAADGKTTLVTEGTVTLSMNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSgtWSDTSTLTISKN
[0337] SQKTKQLVFTKENTTTVQYNRAGNALEGSPAELKDLAELKAALK
[0338] DNA序列 (SEQ ID NO:11)
[0339] catatggcacagaaaggtgctgagtcatttggttccgtttctgtagatctgcccgggggtatgaaagtcc
[0340] tggtaagcaaaagaaaaagacaaaaacggttaatacagcctgatggcaaccgtagaaaaagctggagcttaa
[0341] aggcacttctgataaaaacaacggttctggcaccttggaaggtgaaaaaactaacaaaagcaaagtaaag
[0342] ctactatttctgaggatctgagcaaaaccacctttgaaatcttcaaagaagatggcaaaactctggtat
[0343] ctaaaaaagtaaccctgaaagacaagtcttctaccgaagaaaaattcaacgaaaagggtgaaatctctga
[0344] aaaaactatcgtaatggcaaatgggtaccgctctggaatacaccgacatcaaaagcgataaaaaccggcaaa
[0345] gctaaatacgttctgaaagactttactctggaaggcactctggctgctgacggcaaaaccactctgaaag
[0346] ttaccgaaggcactgttactctgagcatgaacatttctaaatccggcgaaatcacggttgcactggatga
[0347] cactgactctagcggcaataaaaaatccggcacctgggattctgatacttctactttaaccattagcaaa
[0348] aacagccagaaaactaaacagctgggtattGaccaaagaaaacactatcacggtacagaactataaccgtg
[0349] caggcaatgcgtggaaggcagcccggtgaaattaaagatctggcagagctgaaagccgctttgaaata
[0350] agctqacqcatcc
[0351] 互补链 (SEQ ID NO:58)
[0352] gtataccgtgtctttccacgactcagataaccaaggcaaagacatctagacgggccccatactttcaag

[0353] accattcgtttctttttctgtttttgccatttatgtcggactaccgttggcatcttttcgacctcgaatt
[0354] tccgtgaagactatttttgttgccaagaccgtgggaccttccacttttttgattgttttcgtttcatttc
[0355] gaatgataacgactcctagactcgttttggtggaaactttagaagtttcttctaccgttttgagaccata
[0356] gattttttcattgggactttctqttcagaagatqcttctttttaagttgcttttccacttttagagact
[0357] tttttgatagcattaccgtttaccatgqqcagaccttatgtggctgtagtttctgctattttggccgttt
[0358] cgatttatgcaagactttctgaaatgagaccttccgtgagaccgacgactgccgttttggtgagactttc
[0359] aatggcttccgtgacaatgagactcgtacttgtaaagatttaggccgttttagtggcaacgtgacctact
[0360] gtgactgagatcgccgttattttttaqccgtggaccctaagactatgaagatgaaattggtaatcgttt
[0361] ttgtcgggtcttttgatttgtcgaccataagtggtttcttttgtgatagtggtcatgtcttgatattggcac
[0362] gtccgttacgcgaccttccgtcgggccgactttaatttctagaccgtctcgactttcggcgaaactttat
[0363] tcqactcqcctaqq
[0364] Origs0spA 1/2
[0365] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:169)
[0366] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLEL
[0367] KGTSDKNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKF
[0368] NEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLISK
[0369] NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSKTSTLTISVNSKKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAG
[0370] TNLEGTAVEIKTLDELKNALK
[0371] DNA序列 (SEQ ID NO:168)
[0372] atgaaaaaatattttattgggaataggtcctaatttagccttaatagcatgtaagcaaaatgt
[0373] tagcagccttgacgagaaaaacagcgtttcagtagatttgccctggtgaaatgaaagtcttg
[0374] taagcaaaagaaaaaaacaaagacggcaagtacgatcctaattgcaacagtagacaagcttgag
[0375] cttaaaggaacttctgataaaaaacaatggatctggagtacttgaaggcgtaaaagctgacaa
[0376] aagtaaagtaaaattaacaatttctgacgatctaggtcaaaccacacttgaagttttcaaag
[0377] aagatggcaaaacactagtatcaaaaaaagtaacttccaaagacaagtcataacagaaqaa
[0378] aaattcaatgaaaaaggtgaagtatctgaaaaaataataacaagagcagacggaaccagact
[0379] tgaatacacaggaattaaaagcqaatggatctqgaaaagctaaagaggttttaaaaaacttta
[0380] ctcttgaaaggaaaagtagctaataataaaagtaacattggaagtaaaagaaggaaccgttact
[0381] ttaagtaaaaaatatttcaaaatctggggaagtttcagttgaacttaattgacactgacagtag
[0382] tgctgctactaaaaaaactgcagcttggaattcaaaaacttctactttaacaattagtqttta
[0383] acagcaaaaaaactacacaacttggtgtttactaaacaagacacaataactgtacaaaaatac
[0384] gactccgcaggtaccaattttagaaggcacagcagtcgaaattaaaacacttgatgaacttaa
[0385] aaacgcttttaaaatag
[0386] Orig s0spA 6/4
[0387] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:171)
[0388] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSTLDEKNSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLE
[0389] LKGTSDKNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIADDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLKDKSSTEE
[0390] KFNEKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLKVTEGTV
[0391] VLSKNILKSGETVALDDSDTTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQK

- [0392] YDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
- [0393] DNA序列 (SEQ ID NO:170)
- [0394] atgaaaaaatattttattgggaataggtcctaattagccttaatagcatgtaagcaaaatgt
- [0395] tagcacgcttgatgaaaaaaatagcggttcagtagatttacctgggtggaatgacagttcttg
- [0396] taagtaaagaaaaagacaaagacggtaaatacagtcctagaggcaacagtagacaagcttgag
- [0397] cttaaaggaacttctgataaaaaacaacggttctggaacacttgaaggtgaaaaaactgacaa
- [0398] aagtaaagtaaaattaacaattgctgatgacctaaagtcactaaatttgaaatcttcaaag
- [0399] aagatgccaaaacatttagtatcaaaaaaagtaacccttaaagacaagtcataacagaagaa
- [0400] aaattcaacgaaaagggtgaaacatctgaaaaaacaatagtaagagcaaatggaaccagact
- [0401] tgaatacacagacataaaaaagcgatggatccggaagctaaagaagtttttaaagacttta
- [0402] ctcttgaaaggaactctagctgctgacggcaaaacaacattqaaagttacagaaggcactggt
- [0403] gttttaagcaagaacattttaaaatccggagaaataacagttgcacttgatgactctgacac
- [0404] tactcaggctactaaaaaaactggaaaatgggattcaatacttccactttaacaattaqtg
- [0405] tgaatagcaaaaaaactaaaaacattgtatttcaaaaagaagacacaataacagtacaaaaa
- [0406] tacgactcagcaggcaccaatctagaaggcaacgcagtcgaaattaaaacacttgatgaact
- [0407] taaaaacgctttaaaataa
- [0408] Origs0spA 5/3
- [0409] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:173)
- [0410] MKKYLIGLILALIAcKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMLMATVEKLE
- [0411] LKGTSDKNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEE
- [0412] KFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLKVTEGTV
- [0413] TLSKNISKSGETVALDDTDSSGNKSGTWSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNY
- [0414] NRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK
- [0415] DNA序列 (SEQ ID NO:172)
- [0416] atgaaaaaatattttattgggaataggtcctaattagccttaatagcatgtaagcaaaatgt
- [0417] tagcacgcttgatgaaaaaaatagcggttcagtagatttacctgggtggaatgaaagttcttg
- [0418] taagtaaagaaaaagacaaagatggtaaatacagtcctaattggcaacagtaqaaaagcttgag
- [0419] cttaaaggaacttctgataaaaaacaacggttctggaacacttgaaggtgaaaaaactgacaa
- [0420] aagtaaagtaaaattaacaattgctgaggatctaagtaaaaccacatttgaaatcttcaaag
- [0421] aagatggcaaaacatttagtatcaaaaaaagtaacccttaaagacaagtcataacagaagaa
- [0422] aaattcaacgaaaagqqtqaaatatctqaaaaaacaataqtaaaqcaaatgqaaccagact
- [0423] tgaatacacagacataaaaaagcgataaaaccggaaaagctaaagaagtttttaaagacttta
- [0424] ctcttgaaaggaactctagctgctgacggcaaaacaacattgaaagttacagaaggcactggt
- [0425] actttaagcaagaacattttcaaaaatccggagaaataacagttgcacttgatgacactgactc
- [0426] tagcggcaataaaaaatccggaacatgggattcagatacttctactttaacaattagtaaaa
- [0427] acagtcaaaaaactaaacaacttgattcacaaaagaaaacacaataacagtacaaaactat
- [0428] aacagagcaggcaatgcgcttgaaggcagcccagctgaaattaaagatcttgcagagcttaa
- [0429] agccgctttaaaataa
- [0430] 本发明的0spA多肽包括包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:2

(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB sOspA6/4)、SEQ ID NO:6(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:8(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:12(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)的氨基酸序列和相关多肽。相关多肽包括OspA多肽类似物、OspA多肽变体以及OspA多肽衍生物。在一些方面,OspA多肽取决于制备它们的方法而具有氨基末端甲硫氨酸残基。在相关方面,本发明的OspA多肽包含OspA活性。

[0431] 在一个实施方案中,相关核酸分子包含以下或由以下组成:与如SEQ ID NO:1(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:3(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:5(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:7(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:9(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:11(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:168(orig sOspA1/2)、SEQ ID NO:170(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:172(orig sOspA5/3)中所示的核苷酸序列具有约百本之七十(70%)的同一性或相似性的核苷酸序列,在某些方面,所述相关核酸分子包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与如SEQ IDNO:2(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:8(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(sOspA6/4)、SEQ ID NO:12(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)中阐述的多肽具有约百分之七十(70%)的同一性。在各个实施方案中,核苷酸序列与如SEQ ID NO:1(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:3(lipBsOspA 6/4)、SEQ ID NO:5(lipB sOspA 5/3)、SEQ ID NO:7(sOspA1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:9(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:11(sOspA 5/3)、SEQ IDNO:168(orig sOspA 1/2)、SEQ ID NO:170(orig sOspA 6/4)或SEQ IDNO:172(orig sOspA 5/3)中示出的核苷酸序列具有约70%或约71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%或79%,或约80%,或约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%,或约90%,或约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,或者所述核苷酸序列对多肽进行编码,所述多肽与如SEQ ID NO:2(lipB sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB sOspA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipBsOspA 5/3)、SEQ ID NO:8(sOspA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(sOspA 6/4)、SEQ ID NO:12(sOspA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig sOspA 1/2)、SEQ IDNO:171(orig sOspA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig sOspA 5/3)中阐述的多肽序列具有约70%,或约71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%或79%,或约80%,或约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%,或约90%,或约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0432] 在一些实施方案中,确定序列同一性和/或相似性的方法被设计成给出被测试的序列之间的最大匹配度。可公开获得的计算机程序中描述了确定同一性和相似性的方法。在一些方面,确定两个序列之间的同一性和相似性的计算机程序方法包括但不限于GCG程序包,所述GCG程序包包括GAP(Devereux等,Nucl. Acid. Res., 12:387(1984);威斯康星州麦迪逊的威斯康星大学(University of Wisconsin)的Genetics Computer Group的BLASTP、BLASTN以及FASTA(Altschul等,J. Mol. Biol., 215:403-410(1990))。BLASTX程序可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)和其它来源(BLAST手册,Altschul等,NCB/NLM/NIHBethesda,MD 20894;上文的Altschul等(1990))公开获得。熟知的SmithWaterman算法也用于确定同一性。

[0433] 在一些方面,用于比对两个氨基酸序列的某些比对方案使得仅两个序列的较短区

域匹配,并且这一较小的对准区域可能具有十分高的序列同一性,即使在两个全长序列之间不存在显著的关系。因此,在一个实施方案中,选择的比对方法(GAP程序)将导致跨越靶标多肽的至少50个邻接的氨基酸的对准。例如,使用计算机算法GAP(威斯康星州麦迪逊的威斯康星大学的Genetics Computer Group),使序列同一性百分比将被确定的两个多肽对准以用于它们各自的氨基酸的优化匹配(如通过算法确定的“匹配跨度”)。间隙开放罚分(其被计算为平均对角线值的3倍;“平均对角线值”是所使用的比较矩阵的对角线值的平均值;“对角线值”是通过特定的比较矩阵分配给每个绝佳的氨基酸匹配的分值或数值)和间隙扩展罚分(其通常是间隙开放罚分的1/10)以及比较矩阵如PAM 250或BLOSUM 62与算法一起结合使用。算法还使用标准比较矩阵(对于PAM 250比较矩阵,见Dayhoff等,Atlas of ProteinSequence and Structure,5(3)(1978);对于BLOSUM 62比较矩阵,见Henikoff等,Proc.Natl.Acad.Sci USA,89:10915-10919(1992))。

[0434] 在各个方面,用于多肽序列比较的参数包括以下:

[0435] 算法:Needleman等,J.Mol.Biol.,48:443-453(1970);

[0436] 比较矩阵:来自上文的Henikoff等,(1992)的BLOSUM 62;

[0437] 间隙罚分:12

[0438] 间隙长度罚分:4

[0439] 相似性阈值:0

[0440] GAP程序可与以上参数一起使用。前述参数是使用GAP算法用于多肽比较(同时末端间隙不存在罚分)的默认参数。

[0441] 在一些方面,用于核酸分子序列比较的参数包括以下:

[0442] 算法:上文的Needleman等,(1970);

[0443] 比较矩阵:匹配=+10,失配=0

[0444] 空隙罚分:50

[0445] 空隙长度罚分:3

[0446] GAP程序也可与以上参数一起使用。前述参数是用于核酸分子比较的默认参数。本领域技术人员使用了其它示例性算法、空隙开放罚分、空隙扩展罚分、比较矩阵、相似性阈值等,包括在1997年9月的第9版威斯康星包的程序手册中(Program Manual,Wisconsin Package,Version 9,September,1997)阐述的那些。待做出的特定选择对于本领域技术人员来说将变得清楚并且将取决于待做出的特定比较,如DNA与DNA、蛋白与蛋白、蛋白与DNA;并且此外,无论比较是在给定的序列对之间(在该情况下通常优选GAP或BestFit)还是在一个序列与序列的一个大数据库之间(在该情况下优选FASTA或BLASTA)。

[0447] 在一些方面,核酸序列的差异导致氨基酸序列相对于SEQ ID NO:2(lipB s0spA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB s0spA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipB s0spA 5/3)、SEQ ID NO:8(s0spA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(s0spA 6/4)、SEQ ID NO:12(s0spA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig s0spA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig s0spA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig s0spA 5/3)的氨基酸序列的保守性和/或非保守性修饰。

[0448] 对SEQ ID NO:2(lipB s0spA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB s0spA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipB s0spA 5/3)、SEQ ID NO:8(s0spA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(s0spA 6/4)、SEQ ID NO:12(s0spA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig s0spA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig s0spA 6/4)或

SEQ ID NO:173(orig s0spA 5/3)的氨基酸序列的保守性修饰(和对编码核苷酸的相应修饰)将产生具有与天然存在的OspA多肽的功能性和化学特征相似的功能性和化学特征的OspA多肽。相比之下,OspA多肽的功能性和/或化学特征的实质性修饰是通过选择SEQ ID NO:2(lipB s0spA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:4(lipB s0spA 6/4)、SEQ ID NO:6(lipB s0spA 5/3)、SEQ ID NO:8(s0spA 1/2²⁵¹)、SEQ ID NO:10(s0spA 6/4)、SEQ ID NO:12(s0spA 5/3)、SEQ ID NO:169(orig s0spA 1/2)、SEQ ID NO:171(orig s0spA 6/4)或SEQ ID NO:173(orig s0spA 5/3)的氨基酸序列中的取代来实现,所述取代在它们维持以下的作用方面显著不同:(a)取代区中的分子骨架的结构,例如,作为薄片或螺旋构型,(b)在靶标位点处的分子的带电性或疏水性或者(c)侧链的本身。

[0449] 例如,在一些方面,“保守性氨基酸取代”包括用非天然残基取代天然氨基酸残基,这样使得在那个位置处几乎没有或没有对氨基酸残基的极性或带电性的影响。此外,在某些方面,如先前已针对“丙氨酸扫描突变”所描述,在多肽中的任何天然残基也由丙氨酸取代。

[0450] 保守性氨基酸取代还涵盖典型地通过化学肽合成而非通过生物系统中的合成而被并入的非天然存在的氨基酸残基。这些非天然存在的氨基酸残基包括类肽物和其它逆转或倒转形式的氨基酸部分。

[0451] 在各个方面,天然存在的残基基于共有的侧链性质而被划分成以下类别:

[0452] 1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0453] 2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0454] 3) 酸性:Asp、Glu;

[0455] 4) 碱性:His、Lys、Arg;

[0456] 5) 影响链的取向的残基:Gly、Pro;以及

[0457] 6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0458] 例如,在一些方面,非保守性取代包括用这些类别中的一个类别的成员交换来自另一个类别的成员。在各个方面,所述取代的残基被引入与OspA多肽垂直同源区同源或相似的OspA多肽的区域,或者被引入分子的非同源区域。

[0459] 在做出所述改变时,经常考虑氨基酸的亲水指数。基于每个氨基酸的疏水性和带电性特征而将亲水指数分配给每个氨基酸。所述指数是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);以及精氨酸(-4.5)。

[0460] 本领域中理解到氨基酸亲水指数在将交互性生物功能赋予蛋白中的重要性。Kyte等,J.Mol.Biol.,157:105-131(1982)。已知的是,某些氨基酸可以取代具有相似亲水指数或分值的其它氨基酸并且仍然保留相似的生物活性。在基于亲水指数而做出改变时,亲水指数在±2内的氨基酸的取代在某些方面是优选的,亲水指数在±1内的那些氨基酸的取代在其它方面是特别优选的,并且亲水指数在±0.5内的那些氨基酸的取代在各个方面是更特别优选的。

[0461] 本领域中还应理解的是,类似氨基酸的取代可以基于亲水性而有效地进行,特别

是在由此产生的生物功能等效蛋白或肽是部分意图用于免疫实施方案中时,如在本情况下。如由它的邻近氨基酸的亲水性掌控的蛋白的最大局部平均亲水性与它的免疫原性和抗原性相关联,即与蛋白的生物性质相关联。

[0462] 以下亲水性值被分配给了这些氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸酯(+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 $\pm$ 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)以及色氨酸(-3.4)。在基于相似的亲水性值而做出改变时,亲水性值在 ± 2 内的氨基酸的取代在某些方面是优选的,亲水性值在 ± 1 内的那些氨基酸的取代在其它方面是特别优选的,并且亲水性值在 ± 0.5 内的那些氨基酸的取代在各个方面是更特别优选的。技术人员还基于亲水性鉴定出来自一级氨基酸序列的表位。这些区域又称为“表位核心区”。

[0463] 本领域技术人员可以在希望进行所述取代时确定所希望的氨基酸取代(无论是保守性的还是非保守性的)。例如,如本文所描述,氨基酸取代可以用于鉴定OspA多肽的重要残基,或者提高或降低OspA多肽对它们的底物的亲和力。

[0464] 在一些方面,本发明包括在核苷酸序列中的核苷酸和在氨基酸序列中的氨基酸的取代。所述取代包括1至5、1至10、1至15、1至20、1至25、1至30、1至35、1至40、1至45、1至50、1至55、1至60、1至65、1至70、1至75、1至80、1至85、1至90、1至95、1至100、1至150以及1至200个核苷酸。同样地,取代包括1至5、1至10、1至15、1至20、1至25、1至30、1至35、1至40、1至45、1至50、1至55、1至60、1至65、1至70、1至75、1至80、1至85、1至90、1至95以及1至100个氨基酸。在各个方面,所述取代是保守性的或非保守性的。

[0465] 表2中阐述了示例性氨基酸取代。

[0466] 表2.氨基酸取代

[0467]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
原始残基	示例性取代	优选取代
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、正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸、Ile、 Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、1,4 二氨基丁酸、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、正亮氨酸	Leu

[0468] 技术人员可以使用熟知的技术来确定SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、169、171或173中阐述的多肽的适合的类似物或变体。为了鉴定出在不破坏活性的情况下可能发生改变的分子的适合的区,本领域技术人员可以靶向相信对活性来说不重要的区。例如,在已知来自同一种类或来自其它种类的具有相似活性的相似多肽时,本领域技术人员可以比较OspA多肽的氨基酸序列与所述相似的多肽。用所述比较,可以鉴定出在相似多肽中保守的分子的残基和部分。应理解的是,相对于所述相似的多肽,不保守的OspA多肽区中的改变不太可能对OspA多肽的生物活性和/或结构造成不利的影响。本领域技术人员还会了解到,即使在相对保守的区域中,可以用化学上相似的氨基酸来取代天然存在的残基,同时保留活性(保守

性氨基酸残基取代)。

[0469] 在一些实施方案中, OspA多肽变体包括糖基化变体, 其中与SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171或173中阐述的氨基酸序列相比, 已改变了糖基化位点的数目和/或类型。在一个实施方案中, OspA多肽变体包含比SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171或173中阐述的氨基酸序列更大或更小的N键联的糖基化位点。N键联的糖基化位点的特征在于以下序列: Asn-X-Ser或Asn-X-Thr, 其中指定为X的氨基酸残基可以是除脯氨酸之外的任何氨基酸残基。产生这一序列的氨基酸残基的取代提供了潜在的新位点以用于添加N键联的糖链。作为替代方案, 消除这一序列的取代将去除现存的N键联的碳水化合物链。还提供了N键联的碳水化合物链的重排, 其中消除了一个或多个N键联的糖基化位点(典型地是天然存在的那些位点)并且产生了一个或多个新的N键联的位点。另外的OspA变体包括半胱氨酸变体, 其中与SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171或173中阐述的氨基酸序列相比, 一个或多个半胱氨酸残基缺失, 或取代另一种氨基酸(例如, 丝氨酸)。半胱氨酸变体在如在不溶性包涵体分离之后, OspA多肽必须被再折叠成生物活性构象时是有用的。半胱氨酸变体通常具有比天然蛋白更少的半胱氨酸残基, 并且典型地具有偶数的半胱氨酸残基以便最小化由未成对的半胱氨酸导致的相互作用。

[0470] 本发明进一步提供包含如在SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171或173中示出的蛋白的携带表位部分的多肽。术语“表位”是指抗体可以结合的蛋白的区域。参见, 例如Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1984)。表位可以是线性的或是具有构象的, 后者主要由在蛋白折叠时形成表位的蛋白的不连续区域组成。线性表位的长度通常为至少6个氨基酸残基。模拟部分蛋白序列的相对较短的合成肽常规上能够引出与部分模拟的蛋白发生反应的抗血清。参见Sutcliffe等, Science 219:660-666 (1983)。识别短的线性表位的抗体在采用变性蛋白的如蛋白质印迹法的分析和诊断应用中尤其有用。参见Tobin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4356 (1979)。短肽的抗体在某些情况下也识别处于天然构象的蛋白并且因此可用于监视蛋白表达和蛋白分离, 并且可用于如通过ELISA或在免疫沉淀研究中检测溶液中的OspA蛋白。

[0471] 嵌合OspA核酸分子和多肽分子的合成

[0472] 核酸分子编码包含OspA多肽的氨基酸序列的多肽并且可以容易地以多种方式获得, 所述方式包括但不限于重组DNA方法和化学合成。

[0473] 重组DNA方法通常是在Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) 和/或Ausubel等编, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. 和Wiley and Sons, NY (1994) 中阐述的那些方法。在各个方面, 按照根据下文阐述的描述来进行的重组表达技术来产生这些多核苷酸并表达被编码的多肽。例如, 通过将编码OspA多肽的氨基酸序列的核酸序列插入适当的载体, 本领域技术人员可以容易地产生大量所希望的核苷酸序列。然后, 所述序列可以用于产生检测探针或扩增引物。作为替代方案, 可以将编码OspA多肽的氨基酸序列的多核苷酸插入表达载体。在一些方面, 通过将表达载体引入适当的宿主, 大量产生被编码的OspA多肽或OspA多肽。

[0474] 同样地, 本领域中熟知核酸和多肽的化学合成, 如由Engels等, Angew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734 (1989) 描述的那些化学合成。这些方法尤其包括用于核

酸合成的磷酸三酯、亚磷酰胺以及H-磷酸酯法。在一方面,用于所述化学合成的方法是使用标准的亚磷酰胺化学法的聚合物支持的合成。典型地,编码OspA多肽的氨基酸序列的DNA的长度将是数百个核苷酸。使用这些方法将大于约100个核苷酸的核酸合成为数个片段。然后将所述片段连接在一起以便形成本发明的全长核苷酸序列。在特定方面,编码多肽的氨基末端的DNA片段具有编码甲硫氨酸残基的ATG。

[0475] 在本发明的特定方面,嵌合OspA编码序列是使用合成的重叠寡核苷酸来制作的。由于未使用来自疏螺旋体属细胞的DNA,所以合成方法的另一个益处是避免了疏螺旋体属培养基中存在的动物源性材料(即,血清或血清白蛋白)中含有的外来试剂的污染。这一策略大致上还减少了制作嵌合基因所需的操纵次数,这是因为所述策略允许在单一个步骤内进行序列改变,如优化表达(OspB前导序列)的修饰,引入限制性位点以便促进克隆的修饰,或避免潜在的知识产权问题的修饰。所述策略还使密码子使用被优化用于大肠杆菌宿主,这是因为已知很少用于大肠杆菌中的密码子的存在会对外来基因的高水平表达的呈现阻碍(Makoff等,Nucleic Acids Res.17:10191-202,1989;Lakey等,Infect.Immun.68:233-8,2000)。也使用技术人员已知的其它方法。

[0476] 在某些实施方案中,核酸变体含有已经被改变来用于在给定的宿主细胞中优化表达OspA多肽的的密码子。特定的密码子改变取决于被选择用于表达的一个或多个OspA多肽和一个或多个宿主细胞。所述“密码子优化”可以通过多种方法来进行,例如,通过选择优选用于在给定的宿主细胞中高度表达的基因的密码子。在一些情况下,使用并有高度表达的细菌基因的密码子偏好性的密码子频率表如“Ecohigh.cod”的计算机算法并且,所述算法由威斯康星州麦迪逊的Genetics Computer Group的Wisconsin包9.0版提供。其它有用的密码子频率表包括“Celegans_high.cod”、“Celegans_low.cod”、“Drosophila_high.cod”、“Human_high.cod”、“Maize_high.cod”以及“Yeast_high.cod.”。

[0477] 在某些方面,使用标准的连接技术将编码OspA多肽的氨基酸序列的核酸分子插入适当的表达载体。典型地选择在采用的特定宿主细胞中能够发挥作用的载体(即,载体可与宿主细胞的机制相容,这样使得可以进行基因的扩增和/或基因的表达)。在各个方面,编码OspA多肽的氨基酸序列的核酸分子是在原核、酵母菌、昆虫(杆状病毒系统)和/或真核宿主细胞中进行扩增/表达。宿主细胞的选择部分取决于OspA多肽是会被翻译后修饰(例如,糖基化和/或磷酸化)。如果是,那么优选酵母菌、昆虫或哺乳动物宿主细胞。对于表达载体的评论,参见Meth.Enz.,第185卷,D.V.Goeddel编.,Academic Press Inc.,San Diego,CA (1990)。

[0478] 克隆载体包括本领域中已知的所有载体。参见,例如Sambrook,Fritsch&Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版.Cold Spring Harbor,N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。在一个方面,pUC18用作所有中间步骤的克隆载体,这是因为用这种质粒比用载体pET30a更易于进行基因操纵和测序。主要特点显然是编码LacZ α 肽的lacZ基因片段是从碱基对149至469(lac启动子在碱基对507处),编码氨苄西林抗性决定子的bla基因是从碱基对1629至2486(bla启动子在碱基对2521处),复制起点在碱基对867处,以及多个克隆位点是从碱基对185至451(图12)。

[0479] 表达载体包括本领域中所有已知的载体,包括但不限于并有重组的多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸或脂质体中含有的质粒)以及病毒。使用本领域中已知的技术经由转化或

转染将表达载体插入(例如,经由转化或转导)适当的宿主细胞中以便表达多核苷酸和多肽。参见,例如Sambrook,Fritsch&Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版.Cold Spring Harbor,N.Y:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。在一方面,pET30a(Novagen)是用作用于最终完整的OspA基因插入的表达载体。在pET载体中,基因是在T7启动子的控制下进行克隆并且通过在宿主细胞中提供T7RNA聚合酶的来源来诱导表达(直到提供T7RNA聚合酶的来源时才发生表达)。主要特点是编码卡那霉素抗性(kan)的基因在碱基对4048至4860处,lacI基因在碱基对826至1905处、F1复制起点在碱基对4956至5411处,以及多个克隆位点是从碱基对158至346(图13)。

[0480] 在已构建载体并且已将编码OspA多肽的核酸分子插入载体的合适的位点之后,将完整的载体插入适合的宿主细胞以用于扩增和/或多肽表达。在各个方面,OspA多肽的表达载体转化进入选择的宿主细胞是通过熟知的方法如转染、感染、氯化钙介导的转化、电穿孔、微注射、脂转染或DEAE葡聚糖方法或其它已知的技术来完成。选择的方法将部分地随待使用的宿主细胞的类型而变化。这些方法和其它适合的方法为技术人员所熟知并且例如阐述于上文的Sambrook等中。

[0481] 在一些方面,宿主细胞是原核宿主细胞(如大肠杆菌)或真核宿主细胞(如酵母菌、昆虫或脊椎动物细胞)。宿主细胞在适当的条件下进行培养时合成OspA多肽,所述OspA多肽随后可以从培养基进行收集(如果宿主细胞将所述多肽分泌到培养基)或直接从产生所述多肽的宿主细胞进行收集(如果所述多肽未被分泌)。适当的宿主细胞的选择取决于各种因素,如希望的表达水平、活性所需或必要的多肽修饰(如糖基化或磷酸化)以及折叠成生物活性分子的难易程度。所述宿主细胞包括但不限于细菌、酵母菌、真菌、病毒、无脊椎动物以及哺乳动物来源的宿主细胞。对于所述宿主细胞的实例,参见Maniatis等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)。在其它方面,自Maniatis(上文的)手册出版以来本领域中使用的宿主细胞也用于本发明中。

[0482] 在一方面,宿主细胞是大肠杆菌细胞。大肠杆菌的适合的菌株包括但不限于BL21、DH5 α 、HMS174(DE3)、DH10B或E.Cloni 10G(Lucigen,Middleton,Wis.)。在一些实施方案中,将宿主细胞进行工程改造以便增强载体的转化效率和/或维护。

[0483] 在一方面,大肠杆菌菌株DH5 α [基因型: endA1hsdR17(rK-mK+) supE44thi-1recA1gyrA(Nal^r)relA 1D(lacZYA-argF)U 169deoR(F80dlacD(lacZ)M15)](Gibco BRL)用于所有的中间克隆步骤中。这一菌株源自于在基因工程改造中使用最广泛的宿主之一:大肠杆菌菌株K12。菌株为amp⁻,以便允许选择具有含有氨苄西林抗性基因(amp)的载体的转化株。

[0484] 在另一方面,大肠杆菌菌株HMS174(DE3)被用作用于表达的宿主。大肠杆菌HMS174(DE3)宿主细胞[基因型:F-recA1hsdR(rk12-mk12+)Rif^r(DE3)](Novagen)用于本文描述的各种实施例中,以用于最终的克隆步骤。菌株为kan⁻,以便允许选择具有含有卡那霉素抗性基因(kan)的载体的转化株。

[0485] 使用技术人员熟知的标准培养基来培养包含OspA多肽表达载体的宿主细胞。所述培养基通常将含有细胞生长和存活所必要的所有营养素。用于培养大肠杆菌细胞的适合的培养基包括例如卢里亚肉汤(LB)和/或极品肉汤(TB)。用于培养真核细胞的适合的培养基包括罗斯维尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)培养基1640

(RPMI1640)、最低必须培养基(MEM)和/或达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), 在一些情况下, 所有这些培养基被补充有如正在培养的特定细胞系指示的血清和/或生长因子。用于昆虫培养的适合的培养基是必要时由酵母自溶液、水解乳白蛋白和/或胎牛血清补充的格雷氏培养基(Grace's medium)。

[0486] 典型地, 可用于被转化的细胞的选择性生长的抗生素或其它化合物作为补充物被添加至培养基中。待使用的化合物将由存在于转化宿主细胞所用的质粒上的可选标记元件进行规定。例如, 在可选标记元件是卡那霉素抗性时, 添加至培养基的化合物将为卡那霉素。用于选择性生长的其它化合物包括氨基比林、四环素以及新霉素。

[0487] 由宿主细胞产生的OspA多肽的量可以使用本领域中已知的标准方法来进行评估。这类方法包括但不限于蛋白印迹分析、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、非变性凝胶电泳、色谱分离如高效液相色谱法(HPLC)、免疫检测如免疫沉淀和/或活性测定如DNA结合凝胶位移测定。

[0488] 在一些情况下, OspA多肽在分离时不具备生物活性。用于“再折叠”或转换多肽至它的三级结构并且产生二硫键的各种方法被用于恢复生物活性。所述方法包括在特定浓度的促溶剂的存在下将溶解的多肽暴露于通常大于7的pH值。促溶剂的选择与用于包涵体增溶的选择相似, 但促溶剂通常在较低的浓度下使用并且不必与用于增溶的促溶剂相同。在一些情况下, 再折叠/氧化溶液还含有还原剂或具体比例的还原剂+它的氧化形式以便产生特定的氧化还原电位, 从而允许在一个或多个蛋白的半胱氨酸桥的形成过程中发生二硫键移位。一些普遍使用的氧化还原对包括半胱氨酸/胱胺、谷胱甘肽(GSH)/二硫双GSH、氯化亚铜、二硫苏糖醇(DTT)/二噻烷(DTT)以及2-巯基乙醇(bME)/二硫-b(ME)。共溶剂经常被使用来增加再折叠的效率, 并且用于这一目的的更普遍的试剂包括甘油、各种分子量的聚乙二醇、精氨酸等。

[0489] 如果在表达OspA多肽时, 未形成有效程度的包涵体, 那么在细胞匀浆物的离心作用之后主要在上清液中发现所述多肽。使用方法如本文描述的那些方法或本领域中另外已知的方法使多肽进一步从上清液中分离。

[0490] 来自溶液的OspA多肽的纯化可以使用本领域中已知的多种技术来完成。如果多肽已被合成, 使得所述多肽在它的羧基或氨基末端处含有标记物如六聚组氨酸(OspA多肽/六聚His)或其它小肽如FLAG(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)或myc(Invitrogen, Carlsbad, CA), 那么多肽经常在一部法中通过使溶液通过亲和柱得以纯化, 在所述亲和柱中, 柱基质对标记物具有高的亲和力。例如, 聚组氨酸以大的亲和力和特异性结合镍; 因此镍的亲和柱(如Qiagen®镍柱)可以用于纯化OspA多肽/聚合His。参见, 例如Ausubel等编, Current Protocols in Molecular Biology, 第10.11.8节, John Wiley & Sons, 纽约州(1993)。

[0491] 此外, OspA多肽可以通过使用能够特异地识别并且结合OspA多肽的单克隆抗体进行纯化。用于纯化的适合的程序因此包括但不限于亲和色谱法、免疫亲和色谱法、离子交换色谱法、分子筛色谱法、高效液相色谱法(HPLC)、电泳(包括非变性凝胶电泳)之后凝胶洗脱, 以及制备型等电位聚焦(“Isoprime”仪/技术, Hoefer Scientific, San Francisco, CA)。在一些情况下, 组合两种或更多种纯化技术来达成增加的纯度。

[0492] 还使用本领域中已知的技术通过化学合成方法(如固相肽合成)来制备OspA多肽,

如由 Merrifield 等, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)、Houghten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985) 以及 Stewart & Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) 阐述的那些技术。所述多肽被合成, 在氨基末端上具有或没有甲硫氨酸。在一些方面, 使用在这些参考文献中阐述的方法使化学合成的 OspA 多肽氧化以便形成二硫桥。化学合成的 OspA 多肽有望具有可与由重组产生或从天然来源纯化而来的相应 OspA 多肽可比的生物活性, 并且因此经常可与重组 OspA 多肽互换使用。应了解的是, 本领域中已知用于产生核酸和多肽的众多其它的方法, 并且所述方法可以用于产生 OspA 多肽。

[0493] OspA 多肽分子的化学衍生物

[0494] 考虑到本文中以下阐述的公开内容, 本领域技术人员可制备 OspA 多肽的被化学修饰的衍生物。以与天然附接至多肽的分子的类型或位置不同的方式来修饰 OspA 多肽衍生物。在一些方面, 衍生物包括由一个或多个天然附接的化学基团的缺失而形成的分子。在一方面, 包含 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171 或 173 或者 OspA 多肽变体的氨基酸序列的多肽是通过共价附接一种或多种聚合物而被修饰。例如, 所选择的聚合物典型地是水溶性的, 这样使得聚合物附接的蛋白在水相环境如生理环境中不会发生沉淀。适合的聚合物的范围包括聚合物的混合物。在某些方面, 对于最终产物制剂的治疗用途来说, 聚合物将是药学上可接受的。

[0495] 在各个方面, 聚合物各自具有任何的分子量并且具有支链或不具有支链。聚合物各自典型地具有介于约 2kDa 至约 100kDa 之间的平均分子量 (术语“约”指示在水溶性聚合物的制剂中, 一些分子将重于或一些分子将轻于所陈述的分子量)。在各个方面, 每种聚合物的平均分子量是介于约 5kDa 至约 50kDa、介于约 12kDa 至约 40kDa 以及介于约 20kDa 至约 35kDa。

[0496] 适合的水溶性聚合物或其混合物包括但不限于 N 键联或 O 键联的碳水化合物; 糖; 磷酸盐; 聚乙二醇 (PEG) (包括已用于衍生蛋白的 PEG 形式, 包括单- (C1-C10) 氧烷基-或芳氧基-聚乙二醇); 单甲氧基聚乙二醇; 葡聚糖 (如 (例如) 约 6kDa 的低分子量葡聚糖); 纤维素; 或其它基于碳水化合物的聚合物、聚- (N-乙烯吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯多元醇 (polyoxyethylated polyol) (例如, 甘油) 以及聚乙醇醇。本发明还涵盖的是有时用于制备多肽的共价附接多聚体的双功能交联分子, 所述多肽包含 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171 或 173 或者 OspA 多肽变体的氨基酸序列。

[0497] 在一些方面, 化学衍生是在用于使蛋白与活化聚合物分子发生反应的任何适合的条件下进行。用于制备多肽的化学衍生物的方法通常包括以下步骤: (a) 在包含 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、169、171 或 173 或者 OspA 多肽变体的氨基酸序列的多肽被附接至一个或多个聚合物分子的条件下使多肽与活化聚合物分子 (如聚合物分子的反应性酯或醛衍生物) 发生反应, 和 (b) 获得一种或多种反应产物。最佳的反应条件是基于已知的参数和所希望的结果来确定的。例如, 聚合物分子: 蛋白的比例越大, 被附接的聚合物分子的百分比越大。在一个实施方案中, OspA 多肽衍生物在氨基末端处具有单个聚合物分子部分 (参见, 例如美国专利号 5,234,784)。

[0498] 在某些方面, 多肽的 PEG 化具体是通过本领域中已知的任何 PEG 化反应来进行, 例如在以下参考文献中所描述: Francis 等, Focus on Growth Factors, 3:4-10 (1992); EP

0154316;EP 0401384以及美国专利号4,179,337。例如,如本文中所描述,PEG化是经由与反应性聚乙二醇分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷化反应来进行。对于酰化反应来说,所选择的一种或多种聚合物应具有单一个反应性酯基。对于还原烷基化来说,所选择的一种或多种聚合物应具有单一个反应性醛基。例如,反应性醛是水稳定性聚乙二醇丙醛或其单C1-C10烷氧基或芳氧基衍生物(参见美国专利号5,252,714)。

[0499] 在另一个实施方案中,将OspA多肽化学连接至生物素,并且然后允许偶联的生物素/OspA多肽分子结合至抗生物素蛋白,从而产生四价的抗生物素蛋白/生物素/OspA多肽分子。还将OspA多肽共价连接至二硝基苯酚(DNP)或三硝基苯酚(TNP),并且使所得的偶联物与抗DNP或抗TNP-IgM一起沉淀以便形成化合价为10的十聚偶联物。在某些方面,与非衍生分子相比,本文公开的OspA多肽衍生物具有其它活性、增强的或减弱的生物活性或其它特征如增加的或降低的半衰期。

[0500] 免疫原性组合物、疫苗以及抗体

[0501] 本发明的一些方面包括免疫原性组合物和疫苗。本发明的免疫原性嵌合OspA分子与一种或多种抗原组合使用以便在受试者体内引出抗OspA免疫反应(即,充当疫苗)。示例性免疫原性OspA多肽(SEQ IDNO:2、4、6、169、171以及173)被组合递送以便引出针对疏螺旋体属的血清型1至6中的任何一种或多种血清型,并且更通常来说针对如本文论述的疏螺旋体属的许多其它种类的免疫反应。免疫反应还可以通过递送编码本发明的OspA多肽的质粒载体(即,施用“裸DNA”)来产生。在一些方面,OspA核酸分子(SEQ ID NO:1、3、5、168、170以及172)是通过注射、经由脂质体或通过本文描述的其它施用方式来进行递送。一旦接受免疫,受试者就会引出针对疏螺旋体属的血清型1至6和疏螺旋体属的其它种类的OspA蛋白的加强的免疫反应。

[0502] 如上文所陈述,因此包括OspA多肽与OspA核酸分子作为抗原用于本发明的免疫原性和/或疫苗组合物中。在某些方面,将核酸与蛋白都递送给受试者。在特定方面,提出针对核酸疫苗的免疫反应通过同时施用同族蛋白而得以增强(参见WO 99/30733)。核酸和蛋白不需要在相同的组合物中施用。核酸与蛋白必须仅在免疫反应的诱导期期间进行施用,免疫反应在一些方面被掩蔽或阻止直到核酸已激发免疫系统。在特定方面,旨在使疫苗将核酸和蛋白抗原递送至抗原递呈细胞中(参见WO 97/28818)。在各个方面,核酸和蛋白是例如通过共价偶联来进行复合的。在另一些方面,还包括脂质体制剂以便增强疫苗抗原的免疫原性。

[0503] 在某些方面,本发明的免疫原性组合物包括本文描述的任何一种或多种OspA分子组合药学上的载体,其中组合物诱导产生特异地结合外膜蛋白A(OspA)蛋白的抗体。在一些方面,免疫原性组合物还包含稳定剂或抗菌性防腐剂。在特定方面,免疫原性组合物诱导产生特异地结合疏螺旋体属的抗体。在其它方面,组合物诱导产生中和疏螺旋体属的抗体。

[0504] 在一些方面,本发明包括在包含本文描述的嵌合OspA分子(抗原)的免疫原性组合物中使用佐剂。在某些方面,如果抗原与佐剂共同施用,那么免疫原性会显著提高。在一些方面,使用的佐剂为磷酸盐缓冲盐水(PBS)中0.001%至50%的溶液。佐剂增强抗原的免疫原性但本身不必具有免疫原性。

[0505] 在各个方面,佐剂对接种疫苗具有许多正面影响。在一些情况下,佐剂加速稳固的免疫反应在受试者体内的产生。在其它情况下,佐剂增加免疫反应的水平,延长免疫反应的

持续时间并且提高免疫记忆。佐剂经常被用于克服特定受试者组(例如,年长患者或免疫受到抑制的患者)的变弱的免疫性或提高特定“高危组”(如但不限于极为年幼或年长的组)的免疫原性。在各个方面,佐剂的免疫增强作用引起在最终制剂中给出保护性反应所需的抗原的量的减少(即,节省剂量)。

[0506] 通常来说,佐剂基于它们的主导作用机制而被分成两个主要的组:第一组是先天性免疫系统受体或传感器的激动剂,如钟样受体(TLR)激动剂、C型凝集素受体激动剂、视黄酸诱导基因1(RIG-1)样受体(RLR)激动剂以及含有核苷酸结合域和富含亮氨酸的重复的受体(NLR)激动剂。第二组是充当递送系统的又称为TLR独立佐剂的物质。TLR激动剂佐剂的实例是AS04(Glaxo Smith Kline),一种作为佐剂用于商用乙型肝炎和乳头状瘤(papilloma)病毒疫苗中的TLR-4激动剂;Vaxinate,一种鞭毛蛋白融合蛋白TLR-5激动剂;以及众多的TLR-9激动剂佐剂,如使用双链DNA(dsDNA)和寡核苷酸CpG或ODN1a的那些激动剂佐剂。属于这一类别佐剂的其它TLR激动剂包括糖脂类(TLR-1)、脂磷壁酸和脂蛋白(TLR-1/TLR-2和TLR-2/TLR-6)脂多糖、脂寡糖和单磷酰脂质A(MPL)(TLR-4)、双链RNA(TLR-3);肽聚糖(TLR-6)、单链RNA(TLR-7)。两种C型凝集素受体激动剂佐剂的实例包括均源自于真菌细胞壁的 β -葡聚糖(凝集素-1)和甘露聚糖(凝集素-2)。RLR受体激动剂佐剂包括单链病毒RNA和双链病毒DNA,而NLR激动剂佐剂包括肽聚糖降解产物、微生物产物以及非感染性晶体颗粒。在所有情况下,激动剂通过直接激活先天性免疫系统受体以便触发免疫增强炎症反应来起作用。第二组佐剂即TLR独立佐剂大多充当递送系统并且通过抗原递呈细胞增强抗原摄取和抗原呈递。在一些情况下,这些佐剂还可以通过使抗原局部地保留在施用部位附近以便产生促进抗原缓慢而持续地释放到免疫系统的细胞的储库效应来起作用。佐剂还将免疫系统的细胞吸引到抗原储库并且刺激所述细胞以便引出免疫反应。TLR独立佐剂的实例包括矿物盐,如氢氧化铝和磷酸铝(统称为明矾)以及磷酸钙;水包油乳液(例如,MF59、AS03以及ProVax);油包水乳状液(Montanide、TiterMax);生物聚合物(Advax);植物衍生物,尤其是皂苷的部分,所述皂苷的部分是来自南美皂皮树(*Quillaja saponaria*)的树皮的三萜系化合物提取物(SFA-1、QS21、Quil A);主要由皂苷部分、甾醇以及任选地磷脂组成的免疫刺激复合物(ISCOM和ISCOM基质)(ISCOMATRIX和Matrix-M);脂质体,其是具有各种大小和带电性的磷脂球(Vaxfectin和Vaxisome);病毒样颗粒和病毒体,其是含有病毒表面抗原如流行性感血细胞凝集素和神经氨酸苷酶的脂质体;具有各种组成的纳米颗粒;壳聚糖、肽如聚精氨酸以及称为KLK肽的一种肽。

[0507] 单独或组合使用本文以上列出的佐剂。TLR依赖性佐剂和TLR独立佐剂的组合经常优选作为抗原,并且相信TLR依赖性佐剂通过TLR独立佐剂运输至抗原递呈细胞,这同样会刺激摄取和稳定性,而TLR依赖性佐剂将通过激活TLR信号传导来直接增强免疫力。

[0508] TLR依赖性和TLR独立佐剂组合的实例包括AS01:MPL(TLR-4激动剂)、脂质体以及QS-21(均是TLR独立佐剂)的混合物;AS04:MPL(TLR-4激动剂)和氢氧化铝/磷酸盐;IC31:ODN1a(TLR-9激动剂)和KLK肽(TLR独立佐剂);以及费氏完全佐剂(一种结核分枝杆菌(TLR-4激动剂)的膜提取物)与水包油乳液(TLR独立佐剂)。

[0509] 组要由多个TLR独立佐剂组成的组合也被用于最大化加入佐剂的疫苗制剂的免疫增强作用。使用不同衔接子蛋白的TLR激动剂经常进行组合(例如,用于质膜结合TLR-3或TLR-4受体的激动剂与TLR(TLR-7、TLR-8以及TLR-9)激动剂的组合,所述质膜结合TLR-3或

TLR-4受体利用TRIF(含有钟/白介素1受体域的衔接子蛋白诱导INF- β)衔接子途径,所述TLR(TLR-7、TLR-8以及TLR-9)在胞内体细胞器或溶酶体细胞器中进行表达并且利用MyD88(髓性分化原发反应蛋白)衔接子蛋白途径)。

[0510] 这些免疫刺激性试剂或佐剂也提高了疫苗的宿主免疫反应。在一些情况下,物质如脂多糖类可以充当内在佐剂,因为它们通常是用作疫苗的被杀死或减毒细菌的组分。外在佐剂如本文以上列出的那些是典型地非共价连接至抗原并且经过配制来增强宿主免疫反应的免疫调节剂。

[0511] 宽范围的外在佐剂可以激起对抗原的有力的免疫反应。这些佐剂包括复合至膜蛋白抗原的皂苷(免疫刺激性复合物)、普流尼克聚合物与矿物油,含被杀死的分枝杆菌的矿物油、费氏完全佐剂、细菌产物如胞壁酰二肽(MDP)和脂多糖(LPS)以及脂质A和脂质体。在某些方面,为了有效地诱导体液免疫反应(HIR)和细胞介导的免疫性(CMI),免疫原在佐剂中被乳化。

[0512] 理想佐剂的合意特征包括以下任何特征或所有特征:缺乏毒性;刺激持久的免疫反应的能力;制造简易性和长期储存稳定性;引出针对经由各种途径施用的抗原的CMI和HIR的能力;与其它佐剂的协同性;选择性地与抗原呈递细胞(APC)群体进行相互作用的能力;特异地引出适当的 T_H1 或 T_H2 细胞特异性免疫反应的能力;以及针对抗原选择性地增加适当的抗体同种型(例如,IgA)水平的能力。

[0513] 以引用的方式并入本文中的美国专利号4,855,283教导包括N-糖基酰胺、N-糖基脲以及N-糖基氨基甲酸酯的糖脂类似物,所述糖脂类似物各自在糖残基处被氨基酸取代,作为免疫调节剂或佐剂。美国专利号4,855,283报道显示出与天然存在的糖脂如鞘糖脂和甘油糖脂的结构相似性的N-糖脂类似物能够在单纯疱疹病毒疫苗和假狂犬病病毒疫苗中引出强大的免疫反应。一些糖脂已由通过异头碳原子直接与糖连接的长链烷基胺和脂肪酸合成而来,以便模拟天然存在的脂质残基的功能。

[0514] 在一些方面,免疫原性组合物含有足够增强针对免疫原的免疫反应的量的佐剂。适合的佐剂包括但不限于铝盐(磷酸铝或氢氧化铝)、角鲨烯混合物(SAF-1)、胞壁肽、皂苷衍生物、分枝杆菌细胞壁制剂、单磷酸基脂质A、分枝菌酸衍生物、非离子性嵌段共聚物表面活性剂、Quil A、霍乱毒素B亚单位、聚磷腈(Poliphosphazene)和衍生物以及免疫刺激性复合物(ISCOM)如由Takahashi等(Nature 344:873-875,1990)描述的那些。在一些方面,佐剂是合成佐剂。在特定方面,合成佐剂是吡喃葡萄糖基脂质佐剂(GLA)。

[0515] 本发明的另一方面是一种包含本发明的免疫原性组合物和药学上可接受的载体的疫苗。如本文以上所论述,在某些方面,疫苗包括一种或多种稳定剂和/或一种或多种防腐剂。

[0516] 在一方面,提供了包含至少一种重组表达构建体和佐剂的疫苗,所述至少一种重组表达构建体包含操作地连接至编码抗原(本文描述的嵌合OspA多肽)的核酸序列的启动子。在一个实施方案中,重组表达构建体(包含OspA多核苷酸的表达载体)存在于病毒载体中,在另外某些实施方案中存在选自以下的病毒中:腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、慢病毒、痘病毒以及逆转录酶病毒。

[0517] 本发明的另外方面包括本文描述的嵌合OspA分子的抗体。在各个方面,本发明包括嵌合OspA分子以便制作抗OspA抗体并且提供针对疏螺旋体属感染的免疫性。在一些方

面,向受试者(例如,被动免疫)施用这些抗OspA抗体(例如,鼠类、人类或人源化单克隆抗体或单链抗体)以便实现针对疏螺旋体属的血清型1至6中的任何一种或多种血清型的OspA蛋白的免疫反应。如本文所使用,术语“抗体”是指对一种或多种OspA多肽具有特异性的分子。使用本领域中已知的方法来制备适合的抗体。在某些方面,OspA抗体能够结合OspA多肽的某些部分,由此抑制多肽与一种或多种OspA多肽受体的结合。结合本发明的嵌合OspA多肽的抗体和抗体片段是在本发明的范围之内。

[0518] 在一些方面,本发明的抗体包括特异地结合通过用多肽对动物进行免疫而产生的一种或多种OspA多肽的抗体或其片段,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、169、171以及173组成的组的氨基酸序列。在其它方面,本发明包括特异地结合多肽的抗体或其片段,所述多肽由选自由SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、168、170以及172组成的组的核酸序列编码。在各个方面,抗体或其片段是人类的、人源化的、多克隆的或单克隆的。在另一些方面,抗体是Fab或Fab'抗体。在特定方面,抗体包含可检测的标签。在一些方面,抗体是抗体的经过化学修饰的衍生物。

[0519] 根据本发明的嵌合OspA分子的施用刺激人类或动物体内的免疫或抗体反应。在一些方面,一起施用三种嵌合OspA分子(例如,脂质化OspA 1/2²⁵¹、脂质化OspA 6/40spA以及脂质化OspA5/3;或原始OspA 1/2、原始OspA 6/4以及原始OspA 5/3)以便引出针对本文论述的所有六种血清型(1至6)的抗体反应。这种抗体反应意指本发明方法在各个方面仅用于刺激免疫反应(与还为保护性反应相对),因为所得抗体(不具有保护作用)尽管如此也还是有用的。通过本领域中熟知的技术从引出抗体来制备单克隆抗体;并且那些单克隆抗体被用于熟知的抗体结合测定、诊断试剂盒或测试中以便确定广义伯氏疏螺旋体的存在或不存在或者确定是否已简单地刺激了针对螺旋体的免疫反应。在某些方面,单克隆抗体被用于免疫吸附色谱法以便回收或分离疏螺旋体属抗原如OspA。

[0520] 在各个方面,本发明的OspA抗体是多克隆的,包括单特异性多克隆抗体、单克隆(MAbs)抗体、重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体如CDR移植抗体、人类抗体、单链抗体和/或双特异性抗体,以及其片段、变体或衍生物。抗体片段包括结合至OspA多肽上的表位的抗体的那些部分。所述片段的实例包括由全长抗体的酶促裂解产生的Fab和F(ab')的片段。其它结合片段包括由重组DNA技术如含有编码抗体可变区的核酸序列的重组质粒的表达产生的那些片段。

[0521] 针对OspA多肽的多克隆抗体通常是借助于OspA多肽和佐剂的多次皮下注射、肌肉注射或腹膜内注射而在受试者(包括兔、小鼠或其它动物或哺乳动物)体内产生。在某些方面,使本发明的OspA多肽偶联至载体蛋白是有用的,所述载体蛋白在待免疫的物种中具有免疫原性,如钥孔虫戚血兰素、血清、生蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。而且,佐剂如明矾被用于增强免疫反应。在免疫之后,从被免疫的受试者体内抽取血样并且测定血清的抗OspA多肽抗体效价。

[0522] 针对OspA多肽的单克隆抗体是通过使用通过培养物中的连续的细胞系提供抗体分子的产生的任何方法来产生。用于制备单克隆抗体的适合的方法的实例包括Kohler等, Nature, 256:495-497 (1975)的杂交瘤法和Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)与Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51至63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)的人类B细胞杂交瘤法。本发明还提供产生与OspA多

肽发生反应的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0523] 在一些情况下,本发明的单克隆抗体经过修饰用作治疗剂。一个实施方案是“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自于特定的物种或属于特定的抗体类别或子类的抗体中的相应序列一致或同源,而链的剩余部分与源自于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的相应序列一致或同源。还包括所述抗体的片段,只要它们展示出所希望的生物活性即可。参见美国专利号4,816,567和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1985)。

[0524] 在另一个实施方案中,本发明的单克隆抗体是“人源化”抗体。本领域中熟知用于人源化非人类抗体的方法(参见美国专利号5,585,089和5,693,762)。通常来说,人源化抗体具有来自一个非人类来源的一个或多个氨基酸残基被引入所述抗体。例如,可以使用本领域中描述的方法(Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science 239:1534-1536(1988))通过用啮齿动物互补决定区(CDR)的一部分取代人类抗体的相应区域来进行人源化。

[0525] 在一个替代实施方案中,人类抗体由噬菌体展示文库产生(Hoogenboom等,J.Mol.Biol.227:381(1991)和Marks等,J.Mol.Biol.222:581(1991))。这些方法通过展示丝状噬菌体表面上的抗体谱并且随后通过它们与所选抗原的结合来选择噬菌体来模拟免疫鉴定。一种所述技术被描述于PCT申请号PCT/US98/17364(Adams等),该申请描述了使用所述方法来分离针对MPL-和msk-受体的高亲和力和功能上激动的抗体。

[0526] 嵌合、CDR移植以及人源化抗体典型地是通过重组方法来产生。使用本领域中已知的或本文描述的材料和程序将编码抗体的核酸引入宿主细胞并且进行表达。在一个实施方案中,抗体产生于哺乳动物宿主细胞如CHO细胞中。在各个方面,单克隆(例如,人类)抗体是通过重组DNA在宿主细胞中的表达或如本文所描述通过在杂交瘤细胞中表达来产生。在一些方面,单克隆抗体或其片段被人源化。在特定方面,单克隆抗体是如本文描述的F237/BK2。

[0527] 在某些方面,本发明包括用于预防或治疗受试者体内的疏螺旋体属感染或莱姆病的方法,所述方法包括向受试者施用可有效预防或治疗疏螺旋体属感染或莱姆病的量的如本文描述的抗体或其片段的步骤。在特定方面,抗体或其片段是高免疫血清、高免疫血浆或其纯化的免疫球蛋白部分。在其它方面,抗体或其片段是纯化的免疫球蛋白制剂或免疫球蛋白片段制剂。

[0528] 在各个方面,本发明的抗OspA抗体被用于任何已知的测定方法,如竞争性结合测定、直接和间接夹心式测定以及免疫沉淀测定(Sola,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,第147-158页(CRCPress,Inc.,1987)),以用于检测和量化OspA多肽。抗体将以对于所采用的测定方法来说适当的亲和力结合OspA多肽。

[0529] 在某些方面,对于诊断或临床应用来说,抗OspA抗体被标记有可检测部分。可检测部分可以是能够直接或间接产生可检测信号的任何部分。例如,在某些方面,可检测部分是放射性同位素,如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I;荧光化合物或化学发光化合物,如异硫氰酸荧光素、若丹明或萤光素;或酶,如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶(Bayer等,Meth.Enzym.184:138-163(1990))。

[0530] 竞争性结合测定依赖于被标记的标准(例如,OspA多肽或其免疫反应性部分)与测

试样品分析物 (OspA多肽) 竞争结合有限数量的抗OspA抗体的能力。测试样品中OspA多肽的量与结合至抗体的标准的量成反比。为了促进确定结合的标准量,典型地使抗体在竞争之前或之后不溶解,这样使得可方便地分离结合至抗体的标准和分析物与仍未结合的标准和分析物。

[0531] 夹心式测定典型地包括使用两种抗体,每种抗体能够结合至待检测和/或待量化的蛋白的不同免疫原性部分或表位。在夹心式测定中,测试样品分析物典型地是通过固定在固体支撑物上的第一抗体来结合,并且此后第二抗体结合至分析物,从而形成不可溶的三部分复合物。参见,例如美国专利号4,376,110。在一些情况下,第二抗体本身标记有可检测部分(直接夹心式测定)或者第二抗体使用标记有可检测部分的抗免疫球蛋白抗体来进行测量(间接夹心式测定)。例如,一种类型的夹心式测定是酶联免疫吸附测定(ELISA),在该情况下,可检测部分是酶。

[0532] 抗OspA抗体也可用于体内成像。在某些方面,将标记有可检测部分的抗体施用于动物的血流中,并且测定经过标记的抗体在宿主体内的存在和位置。在各个方面,抗体标记有在动物体内可检测的任何部分,无论是通过核磁共振、放射学还是本领域中已知的其它检测手段。在本发明的一些方面,OspA抗体用作治疗剂。

[0533] 嵌合OspA组合物和施用

[0534] 为了将本文描述的OspA嵌合多肽施用于受试者,将OspA多肽配制成包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物。短语“药学上或药理学上可接受的”是指如下文所描述,分子实体和组合物在使用本领域中熟知的途径进行施用时不产生过敏反应或其它不良反应。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临床上有用的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸收延迟剂等。在一些方面,组合物与水或常见有机溶剂形成溶剂合物。同样包括所述溶剂合物。

[0535] 在各个方面,本发明的免疫原性组合物或疫苗组合物进行口服施用、局部施用、经皮施用、肠胃外施用、通过吸入喷雾施用、经阴道施用、直肠施用或通过颅内注射施用。如本文使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、脑池内注射,或输注技术。同样涵盖静脉内注射、真皮内注射、肌肉内注射、乳房内注射、腹膜内注射、鞘内注射、眼球后注射、肺内注射和/或在特定部位处进行外科植入的施用。通常来说,组合物基本上不含有热原以及可能对接受者产生伤害的其它杂质。

[0536] 药用组合物的制剂将根据所选择的施用途径而变化(例如,溶液、乳液)。包含待施用的组合物的适当的组合物是在生理学上可接受的媒介物或载体中进行制备。对于溶液或乳液来说,适合的载体包括例如水或醇的溶液/水溶液、乳液或混悬液,包括盐水和缓冲介质。在一些方面,肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏油或固定油。在某些方面,静脉内媒介物包括各种添加剂、防腐剂,或液体、营养素或电解质补充物。

[0537] 在各个方面,取决于施用途径,在含有OspA多肽作为活性成分的本发明的化合物和方法中有用的药用组合物含有药学上可接受的载体或添加剂。所述载体或添加剂的实例包括水、药学上可接受的有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄胞原、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、双甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士

林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白 (HSA)、甘露醇、山梨醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。取决于本发明的剂量形式,适当时,所使用的添加剂选自但不限于上述物质或其组合。

[0538] 在各个方面,多种水性载体(例如,水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸或水性混悬液)含有与适于制造水性混悬液的赋形剂相混合的活性化合物。这类赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶以及阿拉伯胶;分散剂或润湿剂,在一些情况下,是天然存在的磷脂,例如卵磷脂或环氧烷与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧乙烯硬脂酸酯,或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物,例如十七烯氧基十六醇 (heptadecaethyleneoxycetanol),或环氧乙烷与源自于脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯,或环氧乙烷与源自于脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物,例如聚乙二醇脱水山梨醇单油酸酯 (polyethylene sorbitan monooleate)。在一些方面,水性混悬液含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

[0539] 在一些方面,0spA组合物在使用之前进行冷冻干燥以用于存储并且在适合的载体中进行复原。已显示出这一技术对于常规免疫球蛋白来说是有效的。采用了本领域中已知的任何适合的冷冻干燥和复原技术。本领域技术人员应了解的是,冷冻干燥和复原会引起不同程度的抗体活性损失并且经常要调节用量以便进行补偿。

[0540] 适于通过添加水来制备水性混悬液的可分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂以及一种或多种防腐剂混合的活性化合物。上文已经提及的那些物质示例出适合的分散剂或润湿剂和悬浮剂。

[0541] 在某些方面,在这些制剂中的0spA的浓度差别很大,例如按重量计从小于约0.5% (通常为或至少约1%) 至多达15%或20%,并且根据所选择的特定施用模式,主要基于液体体积、粘度等而进行选择。因此,例如并且在无限制情况下,用于肠胃外注射的典型的药用组合物被制作成含有1ml无菌缓冲水和50mg凝血因子。用于静脉内输注的典型组合物可以被制作成含有多达250ml无菌林格氏溶液和150mg凝血因子。用于制备可肠胃外施用的组合物的实际方法对于所属领域技术人员来说是已知并且显而易见的,并且被更详细描述在例如 Remington's Pharmaceutical Science,第15版,Mack Publishing Company,Easton,Pa. (1980)。每次施用的有效剂量通常在每公斤体重0.01mg至1000mg范围内。

[0542] 在各个方面,药用组合物是呈无菌可注射水性、油质混悬液,分散液或用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末形式。在一些方面,混悬液是根据已知技术使用上文提及的那些适合的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。在某些方面,无菌可注射制剂是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶或混悬液,例如作为1,3-丁二醇中的溶液。在一些实施方案中,载体是溶剂或分散介质,含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇以及液态聚乙二醇等)、其适合的混合物、植物油、林格氏溶液以及等渗氯化钠溶液。此外,无菌固定油常规上被用作溶剂或悬浮介质。在各个方面,为此目的采用了包括合成甘油或甘油二酯的任何温和的固定油。此外,脂肪酸如油酸可用在制备可注射物中。

[0543] 在所有的情况下,所述形式必须是无菌的并且必须是流体性的到存在可易于注射性的程度。合适的流动性通过例如以下得以维持:使用涂层如卵磷脂,在分散液情况下维持所需的粒径以及使用表面活性剂。所述形式在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须防

止微生物如细菌和真菌的污染行为进行保存。对微生物行为的预防通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现,所述抗菌剂和抗真菌剂例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,需要包括等渗剂,例如,糖或氯化钠。在某些方面,可注射组合物的延长吸收通过在组合物中使用延迟吸收剂来实现,所述延迟吸收剂例如,单硬脂酸铝和明胶。

[0544] 在某些方面,可用于施用的组合物是与摄取增强剂或吸收增强剂一起配制以便提高它们的功效。所述增强剂包括(例如)水杨酸、甘氨酸胆酸盐/亚油酸盐、乙醇酸盐(glycholate)、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见,例如Fix(J.Pharm.Sci.,85:1282-1285,1996)和Oliyai等(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.,32:521-544,1993)。

[0545] 此外,用于本发明的化合物和方法中的组合物的亲水性和疏水性性质得到较好的平衡,由此增强了它们对体外和尤其是体内使用的实用性,而缺少所述平衡的其它组合物则具有大为减少的实用性。明确来说,本发明的组合物在水性介质中具有适当程度的溶解性,这允许体内的吸收和生物利用,同时在脂质中还具有一定程度的溶解性,这允许化合物穿过细胞膜到达推定的作用部位。

[0546] 在特定方面,本文描述的OspA多肽被配制到包含佐剂的疫苗组合物中。本领域中已知的任何佐剂皆用于疫苗组合物的各个方面中,所述佐剂包括基于油的佐剂如费氏完全佐剂和费氏不完全佐剂、基于霉菌酸酯的佐剂(例如,海藻糖二霉菌酸酯)、细菌脂多糖(LPS)、肽聚糖(即,胞壁质、粘肽或糖蛋白如N-Opaca、胞壁酰二肽[MDP]或MDP类似物)、蛋白聚糖(例如,从肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)提取的蛋白聚糖)、链球菌制剂(例如,OK432)、BiostimTM(例如,01K2),EP 109 942、EP 180 564以及EP 231 039的“Iscom”,氢氧化铝、皂苷、DEAE-葡聚糖、中性油(如miglyol)、植物油(如花生油)、脂质体、Pluronic®多元醇、Ribi佐剂系统(参见,例如GB-A-2 189 141)或白细胞介素,特别是刺激细胞介导的免疫性的那些佐剂。美国专利号4,877,612中已描述了由无枝酸菌属(*Amycolata*)-放线菌目(*Actinomycetales*)中的细菌属-的提取物组成的替代佐剂。此外,专利佐剂混合物是可商购的。使用的佐剂部分取决于接受的受试者。施用的佐剂的量取决于受试者的类型和体型。最佳剂量通过常规方法可易于确定。

[0547] 疫苗组合物任选地包括疫苗相容性药学上可接受的(即,无菌并且无毒)充当药用媒介物、赋形剂或介质的液体、半固体或固体稀释剂。使用本领域中已知的任何稀释剂。示例性稀释剂包括但不限于聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯、硬脂酸镁、羟苯甲酯和羟苯丙酯、滑石、海藻酸盐、淀粉、乳糖、蔗糖、右旋糖、山梨醇、甘露醇、阿拉伯胶、磷酸钙、矿物油、可可脂以及可可属油。

[0548] 疫苗组合物被包装成便于递送的形式。组合物被封在胶囊、片剂、囊剂、扁囊剂、明胶、药纸或其它容器内。在与免疫原性组合物进入接受有机体相容时,特别是在以单位剂量形式递送免疫原性组合物时,优选这些递送形式。所述剂量单位被包装在例如片剂、胶囊、栓剂、小瓶或扁囊剂内。

[0549] 本发明包括用于诱导受试者体内免疫反应(包括在哺乳动物宿主体内诱导Osp A抗体)的方法,所述方法包括施用有效量的本文描述的Osp A组合物。同样地,本发明包括用于预防或治疗受试者体内的疏螺旋体属感染或莱姆病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文描述的疫苗组合物的步骤。

[0550] 疫苗组合物通过本文以上详细描述的任何常规方法被引入待免疫的受试者中。在

某些方面,在一段时间内以单剂量或多剂量施用组合物(如下文更详细描述)。

[0551] 给予嵌合OspA组合物/用于诱导免疫反应的方法

[0552] 待施用的免疫原性组合物或疫苗组合物的有用剂量将取决于改变药物作用的各种因素而发生变化,例如,受试者的年龄、状况、体重、性别以及饮食,任何感染的严重程度,施用时间,施用模式以及其它临床因素。

[0553] 在一些方面,本发明的制剂或组合物通过初始大丸药,接着在一段时间过去之后加强递送来施用。在某些方面,本发明的制剂是通过初始大丸药,接着进行连续输注以便维持药物产品的治疗性循环水平来施用。在特定方面,本发明的免疫原性组合物或疫苗组合物是在不同时间段之后以疫苗接种方案进行施用。在一些方面,疫苗接种是以对于去往易于受到疏螺旋体属感染的区域的旅行者来说快速的免疫方案来递送。作为另一个实施例,本发明的组合物或制剂是作为一次性剂量被施用。如由良好的医疗实践和个别受试者的临床状况所确定,本领域普通技术人员可易于优化有效的剂量和施用方案。给药频率取决于药剂的药物代谢动力学参数和施用途径。

[0554] 药用制剂是由本领域技术人员根据施用途径和所希望的剂量确定。参见, Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版.(1990,MackPublishing Co.,Easton,PA 18042)第1435-1712页,所述参考文献的公开内容是以引用的方式并入。在一些情况下,所述制剂影响被施用组合物的物理状态、稳定性、体内释放率以及体内清除率。取决于施用途径,在特定方面根据体重、体表面积或器官大小计算出适合的剂量。在一些方面,适当的剂量是通过使用用于确定血水平剂量的已建立的测定法结合适当的剂量-反应数据来确定的。在某些方面,测量个体的抗体效价以便确定最佳剂量和施用方案。最终剂量方案将由主治医生或医师确定,其中考虑改变药用组合物的作用的各种因素,例如,组合物的比活性,受试者的反应性,受试者的年龄、状况、体重、性别和饮食,任何感染的严重程度或恶性状况,施用时间以及其它临床因素。在进行研究时,将出现关于用于预防和/或治疗相关病状的适当剂量水平和治疗持续时间的其它的信息。

[0555] 在某些方面,OspA免疫原性或疫苗组合物包含足以引起受试者体内的免疫反应的任何剂量的OspA核酸分子或多肽。治疗所采用的OspA免疫原性或疫苗组合物的有效量将取决于例如治疗环境和治疗目的。本领域技术人员应理解的是,用于疫苗接种或治疗的适当剂量水平因此将部分地取决于递送的分子、OspA分子使用针对的适应症、施用途径以及患者的体型(体重、体表面积或器官大小)和状况(年龄和总体健康状况)而发生变化。因此,在一些情况下,临床医师滴定剂量并且修改施用途径以便获得最佳治疗效果。

[0556] 在各个方面,取决于上文提及的因素,典型剂量在从约0.1 μ g/kg至多达100mg/kg或更高的范围内。在其它实施方案中,剂量可以在从0.1 μ g/kg至多达约100mg/kg;或1 μ g/kg至多达约100mg/kg;或5 μ g/kg至多达约100mg/kg范围内。举例来说,本发明中有用的OspA多肽的剂量近似是10 μ g/ml,20 μ g/ml,30 μ g/ml,40 μ g/ml,50 μ g/ml,60 μ g/ml,70 μ g/ml,80 μ g/ml,90 μ g/ml,100 μ g/ml,110 μ g/ml,120 μ g/ml,130 μ g/ml,140 μ g/ml,150 μ g/ml,160 μ g/ml,170 μ g/ml,180 μ g/ml,190 μ g/ml,200 μ g/ml,210 μ g/ml,220 μ g/ml,230 μ g/ml,240 μ g/ml,250 μ g/ml,260 μ g/ml,270 μ g/ml,280 μ g/ml,290 μ g/ml,300 μ g/ml,320 μ g/ml,340 μ g/ml,360 μ g/ml,380 μ g/ml,400 μ g/ml,420 μ g/ml,440 μ g/ml,460 μ g/ml,480 μ g/ml,500 μ g/ml,520 μ g/ml,540 μ g/ml,560 μ g/ml,580 μ g/ml,600 μ g/ml,620 μ g/ml,640 μ g/ml。在特定方面,典型剂量包含每位

受试者0.1至5.0ml。在更特定方面,典型剂量包含每位受试者0.2至2.0ml。在某些方面,剂量包含每位受试者0.5至1.0ml。

[0557] 给药的频率将取决于所使用的制剂中的OspA分子的药物代谢动力学参数。典型地,临床医师将施用组合物直到达到达成所希望的效果的剂量。在各个方面,组合物因此以单一剂量或者随着时间的推移以两个或更多个剂量(其可能或可能不含有相同量的所希望的分子),或者以连续输注经由植入设备或导管来进行施用。适当的剂量的进一步细化常规是由本领域普通技术人员来进行的并且在由他们常规进行的工作范围内。适当的剂量经常是通过使用常规获得的适当的剂量反应数据来确定。

[0558] 试剂盒

[0559] 作为另一方面,本发明包括包含用于向受试者施用一种或多种OspA多肽的一种或多种药用制剂的试剂盒,所述制剂以促进它们用于向受试者施用的方式进行包装。

[0560] 在指定实施方案中,本发明包括用于产生单一剂量施用单元的试剂盒。在各个方面,试剂盒各自含有具有干燥蛋白的第一容器和具有水性制剂的第二容器。本发明的范围内还包括含有单室和多室预装填注射器(例如,液体注射器和二室预装填注射器(lyosyringe))的试剂盒。

[0561] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包括本文描述的药用制剂(例如,包含治疗性蛋白或肽的组合物),所述药用制剂被包装在一个容器如密封瓶或器皿中,描述化合物或组合物在实践所述方法中的用法的标签被贴在容器上或被包括在包装中。在一个实施方案中,药用制剂被包装在容器中,以使得容器的顶部空间的量(例如,在液体制剂与容器顶部之间的空气的量)十分之小。优选地,顶部空间的量是可忽视的(即,几乎不存在)。

[0562] 在一方面,试剂盒含有具有治疗性蛋白或肽组合物的第一容器和具有用于该组合物的生理学上可接受的复原溶液的第二容器。在一方面,药用制剂是以单位剂量形式进行包装。试剂盒任选地进一步包括适于根据特定施用途径来施用药用制剂的设备。在一些方面,试剂盒含有描述药用制剂的用法的标签。

[0563] 本文引用的每个公开、专利申请、专利和其它参考文献是在与本公开相一致的程度上以引用的方式全部并入。

[0564] 应理解的是,本文描述的实施例和实施方案仅是出于说明性目的并且根据所述实施例和所述实施方案的各种修改和变化将被提出给本领域技术人员且被包括在本申请的精神和权利范围以及随附权利要求的范围内。本文引用的所有公开案、专利以及专利申请是出于所有目的以引用的方式全部并入。

实施例

[0565] 本发明的其它方面和细节由以下实施例将变得显而易见,所述实施例意欲为说明性的而非限制性的。

[0566] 实施例1

[0567] 分析来自欧洲广义伯氏疏螺旋体菌株(分子流行病学)的OSPA的序列以便确定OSPA疫苗制剂

[0568] 研究的目的是确定用于欧洲的莱姆病OspA疫苗的适合的制剂。该研究是基于来自广义伯氏疏螺旋体大型且多样性的菌株集合的OspA基因的序列分析,所述集合充分代表

了在欧洲的广泛的地理覆盖度,与疾病相关联的各种临床综合症以及与莱姆病相关联的三种致病同基因型种(阿氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体以及伯氏疏螺旋体)中的每一种。莱姆病是由广义伯氏疏螺旋体引起的,广义伯氏疏螺旋体共包含13种同基因型种,其中3种(阿氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体以及狭义伯氏疏螺旋体)被认为在人体中具有致病性。

[0569] 起始时,进行了大规模流行病学研究(参见下表3),所述研究评估了来自欧洲21个国家的莱姆病患者(和蜱虫)的广义伯氏疏螺旋体菌株。共研究了从16个欧洲国家收集的553种欧洲疏螺旋体属分离物。每个种类都是通过PCR使用对于每个种类的16s rRNA基因来说具有特异性的引物组来确定的。

[0570] 来自已知在欧洲引起人类莱姆病的三种疏螺旋体属种类的每一种的分离物被充分描绘:阿氏疏螺旋体(n=309,55.9%)、狭义伯氏疏螺旋体(n=67,12.1%)以及伽氏疏螺旋体(n=173,31.3%)。在359种人类分离物中,有56.8%是阿氏疏螺旋体并且阿氏疏螺旋体是从大多数地点的人类分离物中确定的占优势的种类。相似地,从54.1%的蜱虫分离物中分离出了阿氏疏螺旋体。从11.7%的人类菌株和12.9%的蜱虫分离物中分离出了狭义伯氏疏螺旋体。从来自东南欧尤其是意大利、匈牙利、斯洛文尼亚和奥地利的人类分离物中分离出了狭义伯氏疏螺旋体。伽氏疏螺旋体菌株被从30.4%的人类分离物中分离出并且占蜱虫分离物的33%。从人类和蜱虫分离出来的伽氏疏螺旋体菌株是从遍及欧洲的大多数地理区域中获得。来自这一研究的数据与由其它欧洲研究呈现的数据具有良好的相关性并且表明所研究的分离物的集合代表欧洲莱姆病的精确画面。

[0571] 进行OspA序列测定以便确定用于欧洲的最佳疫苗制剂。基于这一数据,包括OspA类型1至6的疫苗将覆盖98.1%的菌株和96.7%的侵袭性疾病病例。欧洲疏螺旋体属分离物的流行病学研究结果指示基于OspA类型1、2、3、4、5以及6的疫苗在欧洲会提供98%的莱姆病和96.7%的侵袭性神经型疏螺旋体病分离物的理论覆盖率。

[0572] 表3.流行病学研究结果

OspA 类型	人类 分离物	来自侵袭性 疾病病例的分离物	总疫苗覆 盖率 ¹	侵袭性疾病的 疫苗覆盖率 ²
阿氏疏螺旋体类型 2	56.8% (204)	3% (7)	56.8 %	11.7%
狭义伯氏疏螺旋体类型 1	11.7% (42)	17% (7)	68.5%	23.3%
伽氏疏螺旋体类型 6	15.9% (57)	40% (23)	84.4%	61.7%
伽氏疏螺旋体类型 5	7.2% (26)	35% (9)	91.6%	76.7%
伽氏疏螺旋体类型 4	4.5% (16)	44% (7)	96.1%	88.3%
伽氏疏螺旋体类型 3	2.0% (7)	71% (5)	98.1%	96.7%
伽氏疏螺旋体类型 7	0.8% (3)	67% (2)	98.9%	100%
斯柏曼疏螺旋体	1.1% (4)	0%	100%	

[0574] ¹基于分离物的数目预测的疫苗覆盖率;总数是累积的。

[0575] ²来自神经型疏螺旋体病的分离物的预测疫苗覆盖率;总数是累积的。

[0576] 因此,包含三种各自代表2种OspA血清型的新型重组OspA (1/2、6/4以及5/3)的疫苗会保留针对与在欧洲的莱姆螺旋体病相关联的所有六种流行的OspA血清型 (1至6) 和针对与在美国的莱姆螺旋体病相关联的单个OspA血清型的保护所必要的关键结构元件。

[0577] 代表伽氏疏螺旋体OspA血清型5和3 (连同OspA血清型1/2和6/4) 的OspA 5/3构建体的含入应防御98.1%的疾病和96.7%的侵袭性分离物。不具有OspA 5/3的疫苗有望防御仅约88.9%的疾病和仅约73.4%的侵袭性疾病。因此,与仅具有四种血清型的疫苗相比,包含所有六种血清型的疫苗在预防莱姆病中更有效。

[0578] 实施例2

[0579] 构建编码脂质化OSPA的合成OSPA基因的策略

[0580] 研究的目的是由疏螺旋体属的数个菌株制备脂质化OspA嵌合构建体以便制作保护接受者不受由疏螺旋体属的这数种菌株中的任何菌株引起的莱姆病的影响的疫苗。总体策略被总结在图1中并且在下文中进行描述。

[0581] 对于每种新型OspA基因来说,合成四组具有30至60个之间的碱基的寡核苷酸。每个寡核苷酸组由8至12个互补重叠寡核苷酸组成。将来自每组的寡核苷酸在独立的实验中退火在一起,以便产生在每一末端具有特异性的限制酶识别位点的双链DNA片段,即片段N-H (NdeI-Hind III)、H-K (Hind III-Kpn I)、K-E (Kpn I-EcoR I) 以及E-B (EcoRI-BamH I)。将四个片段各自独立地克隆到pUC 18中,用相应的限制酶切割并且转化到大肠杆菌宿主DH5 α 中,之后验证克隆的片段的序列。

[0582] 大肠杆菌菌株DH5 α [基因型: end A1 hsdR17 (rK⁻mk⁺) supE44 thi-lrecA1 gyrA (NaI^r) relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR (Φ 80dlac Δ (lacZ) M15) (Gibco BRL) 被用于所有的中间克隆步骤中。这一菌株源自于在基因工程改造中使用最广泛的宿主之一: 大肠杆菌菌株K12。菌株是amp⁻,以便允许选择具有含有氨苄西林抗性基因 (amp) 的载体的转化株。大肠杆菌HMS174 (DE3) 被选择作为用于表达的宿主。大肠杆菌HMS174 (DE3) 宿主细胞 [基因型: F-recA1 hsdR (rk12⁻mk12⁺) Rif^R (DE3)] (Novagen) 被用于最终的克隆步骤中。菌株是kan⁻,以便允许选择具有含有卡那霉素抗性基因 (kan) 的载体的转化株。

[0583] pUC18 (Gibco BRL, Basel, Switzerland) 用作所有中间步骤的克隆载体,这是因为用这种质粒比用pET30a更易于进行基因操纵和测序。主要特点显然是编码LacZ α 肽的lacZ基因片段是从碱基对149至469 (lac启动子在碱基对507处)、编码氨苄西林抗性决定子的bla基因是从碱基对1629至2486 (bla启动子在碱基对2521处),复制起点在碱基对867处,以及多个克隆位点是从碱基对185至451 (图12)。

[0584] pET30a (Novagen) 是用作用于最终完整的OspA基因插入的表达载体。在pET载体中,基因是在T7启动子的控制下进行克隆并且通过在宿主细胞中提供T7 RNA聚合酶的来源来诱导表达 (直到提供T7RNA聚合酶的来源时才发生表达)。主要特点是编码卡那霉素抗性 (kan) 的基因在碱基对4048至4860处、lacI基因在碱基对826至1905处、F1复制起点在碱基对4956至5411处,以及多个克隆位点是从碱基对158至346 (图13)。

[0585] 将制作全长OspA基因所需的四个片段从少量制备的DNA (DNAminiprep) 中切除。使用与用于最初的克隆步骤相同的限制酶来使DNA从四个克隆中的每个分离。纯化并用Nde I和BamH I切割的pUC18DNA将DNA片段连接在一起,并且将所述DNA片段转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。对在pUC18中克隆的全长OspA基因进行序列测定以便确认这一步骤中并未

引入误差。

[0586] 然后使用限制酶Nde I和BamH I将OspA基因亚克隆到pET-30a表达载体中并且将所述OspA基因转化到大肠杆菌宿主HMS 174 (DE3) 中。在pET30a载体中,OspA基因是由噬菌体T7启动子来控制。

[0587] 三种合成OspA基因被设计成编码具有来自疏螺旋体属的血清型1和2OspA (lipB sOspA 1/2²⁵¹)、血清型6和4OspA (lipB sOspA 6/4) 以及血清型5和3OspA (lipB sOspA 5/3) 的保护性表位的OspA分子。这些分子的一级氨基酸序列 (分别是SEQ ID NO:2、4以及6) 被示于图2至图8中,并且在本文中结合被并入设计的主要特点的完整描述来进行描述。

[0588] lipB sOspA 1/2构建体的寡核苷酸是在ABI 394DNA/RNA合成仪上内部合成。用于lipB sOspA 5/3和lipB sOspA 6/4构建体的寡核苷酸是从GenXpress (Wiener Neudorf, Austria) 进行购买并且经过HPLC纯化。

[0589] 表4.用于lipB sOspA 1/2*基因片段的寡核苷酸

名称	序列(5' - 3')	L	S	SEQ ID NO
<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I 片段				
NH1	TATGCGTCTGTTGATCGGCTTTGCTCTGGCGCTGGCTCTGATCGG	45	C	59
NH2	CTGGGCACAGAAAGTGTCTGAGTCTATTTGGTTCTGTAGATCTGC	50	C	60
NH3	CCGGTGAATGAAAGTTCTGGTGGAGCAAGAAAAAGACAAGAACGGCAAG	50	C	61
NH4	TACGATCTCATCGCAACCGTGGACAAAGCTGGAGCTGAAAAGTACTTCTGA	50	C	62
NH5	TAAAAACAAACGGCTCTGGTGTGCTGGAGGGCGTCAAAACTAACAAGAGCAAAAGTAA	56	C	63
NH6	AGCTTTACTTTGCTCTTTGTTAGTTTGAAGCCCTCCAGCA	40	C	64
NH7	CACCAGAGCCGTTGTTTATATCAGAAAGTACTTTCAGCTCCAGCTTGTGG	50	C	65
NH8	ACGGTTGCGATGAGATCGTACTTGGCGTTCTTGTCTTTTCTTTGCTCAC	50	C	66
NH9	CAGAACCTTCAITTTACACCGGGCAGATCTACAGAAACGGAACCAATAGACT	50	C	67
NH10	CAGCACCTTCTGTGTGCGCAGCCGATCAGAGCCAGCCAGAGCAAAAGCCGATCAACAGACGCA	63	C	68
<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I 片段				
HK1	AGCTTACGATCTTGACGATCTCGGTCAAGACCAC	34	C	69
HK2	GCTGGAAAGTTTCAAAAGAGGATGGCAAGACCCTCGTGTCCAAAAAAGTAA	50	C	70
HK3	CTTCCAAAGACAAAGTCTCTTACGGAAAGAAAAATTCAAAGAAAAAGGTGAG	50	C	71
HK4	GTGTCTGAAAAGATCATCACCATTGGCAGACGGCAACCCGTC	40	C	72
HK5	TTGAATACACCGGTATTTAAAGCGATGTATC	31	C	73
HK6	CAATCGCTTTAATACCGGTGTATTCAGACGGGTGCGGTCTGCCATG	47	C	74
HK7	GTGATGATCTTTTCAGACACCTCACCCTTTTTCGTTGAATTTTCTTCCGT	50	C	75
HK8	AGAGGACTTGTCTTTGGAAGTTACTTTTGTGACACGAGGGTCTTGCCAT	50	C	76
HK9	CCTCTTTGAAAACCTTCCAGCGTGTGTGTGACCGAGATCGTCAAGAGATCGTA	40	C	77

[0590]

Kpn I - EcoR I 片段				
KE1	CGGTAAAGCGAATAATGTTCTGAAAAACTTCACCTCTGGA	39	C	78
KE2	AGGCAAGTGGCTAATGATAAAAACCACCTTGGAAAGTCAAGGAAGGCACCG	50	C	79
KE3	TTACTCTGAGCATGAATATCTCCAAATCTGGTGAAGTTCCGTTGAACTG	50	C	80
KE4	AACGACACTGACAGCAGCGCTGCGACTAAAAAAACTGCAGCGTGG	45	C	81
KE5	AATTCACCGCTGCAGTTTTTTAGTCGCA	29	C [*]	82
KE6	GCGCTGCTGTCAAGTGTGCTTCAGTTCAACGGAAACTTCACCAGATTGGA	50	C [*]	83
KE7	GATATTCAATGCTCAGAGTAACGGGTGCCCTTCCTTGACTTCCAAGGTGGTTT	50	C [*]	84
KE8	TATCATTAAGCCACTTTGCCCTTCCAGAGTGAAGTTTTTCAGAACATATTCGCTTACCGGTAC	63	C [*]	85
EcoR I - BamH I 片段				
EB1	AATTCAAAAACTTCTACTTTAACCAATTAGCGTTAACAGCAAAAAA	45	C	86
EB2	ACTACCCAGCTGGTGTTCACCTAAACAAGACACGATCAGTGCAGAAATA	50	C	87
EB3	CGACTCCAAACGGCACCAACTTAGAAGGCACGGCAGTCGAAATTAACACC	50	C	88
EB4	TTGATGAACCTGAAAAACGGCTGAAATTAAGCTGAGCG	40	C	89
EB5	GATCCGCTCAGCTTAATTTCAAGCGCGTTTTTCAGTTCATCAAGGGTTTAATTCGACTGCC	60	C [*]	90
EB6	GTGCTTCTAAGTTGGTGCCGTTGGAGTCGTAATTTCTGCACAGTGATCGT	50	C [*]	91
EB7	GTCTTGTTAGTGAACACACAGCTGGGTAGTTTTTTTGCTGTTAACGCTAA	50	C [*]	92
EB8	TGTTTAAAGTAGAAGTTTTTG	21	C [*]	93

[0591]

[0592] *通过PCR引入单一个氨基酸变化, lipB s0spA 1/2是引入变化之前的构建体的名称, 并且lipB s0spA 1/2²⁵¹是引入变化之后的名称。

[0593] L寡核苷酸碱基的长度

[0594] S链,C(编码)或互补(C')

[0595] 表5.用于lipB s0spA 5/3基因片段的寡核苷酸

名称	序列(5' - 3')	L	S	SEQ ID NO
<i>Nde I</i> - <i>Hin dIII</i> 片段				
N51	TAATCGCTCTGTGAICGGCTTGCCTTGGCGCTGGCTTAAICGGCTG	48	C	94
N52	TGCACAGAAAGGTGCTGAGTCTATTCGTTCCGTTCTGTAGATCTGCCCG	50	C	95
N53	GGGGTATGAAGTCTCTGGTAAGCAAAAGAAAAAGACAAAACGGTAATAC	50	C	96
N54	AGCTGATGGCAACCGTAGAAAAAGCTGGAGCTTAAAGGCACCTTCTGATAA	50	C	97
N55	AAACAACGGTCTGGCACCCTGGAAAGGTGAAAAAACTAACAAAAGCAAGTAA	53	C	98
N56	AGCTTACTTTGCTTTGTAGTITTTTCACCTTCCA	37	C'	99
N57	GGGTGCCAGAACCGTTGTTTATCAGAAGTGCCTTTAAGCTCCAGCTTT	50	C'	100
N58	TCTACGGTTGCCATCAGGCTGTATTACCGTTTGTCTTTTCTTGTCT	50	C'	101
N59	TACCAGAACTTTCATACCCCGGGCAGATCTACAGAAACGGAACCAATAG	50	C'	102
N510	ACTCAGCACCTTCTGTGTGCACAGCCGATTA	30	C'	103
N511	AAGCCAGCGCCAAAGCAAAAGCCGATCAACAGACGCA	36	C'	104
<i>Hin dIII</i> - <i>Kpn I</i> 片段				
H51	AGCTTACTAATTGCTGAGGATCTGAGCAAAACACCTTTGAAATCTTC	47	C	105
H52	AAAGAAGATGGCAAAACTCTGGTATCTAAAAAAGTAACCTGAAAGACAA	50	C	106
H53	GTTCTTACCGAAGAAAAAATTCACGAAAAAGGGTGAATC	40	C	107
H54	TCTGAATAAACTATCTGAATGGCAATGGTAC	32	C	108
H55	AAGGTGGTTTGTCTCAGATCTCTCAGCAATAGTA	33	C'	109
H56	AGAGTTTGGCATCTTCTTTGAAGATTCA	30	C'	110
H57	ATTTTCTTCGGTAGAAGACTTGTCTTTCAGGGTACTTTTAGATAACC	50	C'	111
H58	CATTGGCCATTACGATAGTTTTTTCAGAGATTTCACCCCTTTTGGTTGA	48	C'	112

[0596]

Kpn I - EcoR I 片段				
K51	CCGCTGGAATACACCGACATCAAAAGCGATAAAACCGGCAAAAGCTAA	48	C	113
K52	ATACGTTCTGAAAGACTTTACTCTGGAAAGGCACCTGTGGCTGCTGACGGCA	50	C	114
K53	AAACCACTCTGAAAGTTACCGAAGGCACCTGTTACTCTGAGCATGAACATT	50	C	115
K54	TCTAAATCCGGCGAAATCACCCTGGGATTCGATACCTGACTCTAGCGG	50	C	116
K55	CAATAAAAAATCCGGCACCTGGGATTCGATACCTGACTCTAACCATTAA	50	C	117
K56	GCATAAAACAGCCAGAAAAACTAAACAGCTGGG	31	C	118
K57	GCTTTGATGTCGGTGTATTCACAGACGGGTAC	31	C	119
K58	CCTTCCAGAGTAAAGTCTTTCAGAAACGTATTTAGCTTTGCCGGTTTATC	50	C	120
K59	CAGTGCCTTCGGTAACCTTTCAGAGTGTGTTTGCCGTCAGCAGCCAGAGTG	50	C	121
K510	CAGTGCACACGGTGATTTCCGCCGGATTTAGAAATGTTCAATGCTCAGAGTAA	50	C	122
K511	TCAGAAATCCCAAGGTGCCCGGATTTTATTTGCCGCTAGAGTCAGTGTCAATC	50	C	123
K512	AATCCCAAGCTGTTTAGTTTCTCTGGCTGTTTTCCTAATGGTTAAAGTAGAAGTA	55	C	124
EcoR I - BamH I 片段				
E51	AATTCAAACAGCTGGTATTCACCAAAAGAAAAACACTAATCAACCGTAC			125
E52	AGAACTATAACCGTGCAGGCCAATGGCTGGAAAGGCAGCCC	45	C	126
E53	GGCTGAATAATTAAGAATCTGGCAGAGCTGAAAAGCCGCTTTGAATAAAGCTGAGCG	40	C	127
E54	GATCCGCTCAGCTTATTTCAAAAGCGGCT	54	C	128
E55	TTCAAGCTCTGCCAGATCTTTAATTTCAAGCCGGGCTGCCCTCCAGCGCAAT	28	C	129
E56	GCCTGCACGGTTATAGTTCTGTACGGGTGATAGTGTCTTCTTTGGTGAATACCAGCTGTTTG	50	C	130

[0598] L寡核苷酸的碱基的长度

[0599] S链,C(编码)或互补(C')

[0600] 表6.用于lipB s0spA 6/4基因片段的寡核苷酸

名称	序列(5' - 3')	L	S	SEQ ID NO
Nde I - <i>Hin</i> dIII 片段				
KNH1	TATGGCTCTGTGATCGGCTTTGCTCTGGCGCTGGCTCTGATCGGCTG			131
KNH2	CGCACAGAAAGGTGCTGAGTCTATTGGTTCGGTTTCTGTAGATCTGCCG	48	C	132
KNH3	GTGGCATGACCGTTCTGCTCAGCAAGAAAAGACAAAACG	50	C	133
KNH4	GTAAATACAGCCTCGAGGCGACCGTCGACA	42	C	134
KNH5	AGCTTGTCGACCGGTCGCCCTCGAGGCTGTATTACCCTTTTGTCCTTTCTTGCT	30	C	135
KNH6	GACCAGAACGGTTCATGCCACCGGGCAGATCTACAGAAACG	56	C*	136
KNH7	GAACCAATAGACTCAGCACCTTCTGTGCGCAGCCGATCAGAGCCAGCGC	40	C*	137
KNH8	CAGAGCAAGCCGATCAACAGACGCA	50	C*	138
<i>Hin</i> dIII - <i>Kpn</i> I 片段				
KHK1	AGCTTGAGCTGAAAGGCACCTCTGATAAAAAACAACGGTCCCGCACCCCTG	50	C	139
KHK2	GAAGGTGAAAAAACTAACAAAAAGCAAAAGTGAACCTGACCAITTGCTGAT	48	C	140
KHK3	GACCTCAGCCAGACCACCAAITTCGAAATTTTCAAGAAGATGCCCAAAACCTT	50	C	141
KHK4	AGTATCCAAAAAAGTGAACCTTGAAAGACAAAGTCTCTACCGAAGAAAAAAT	50	C	142
KHK5	TCAACGAAAAAGGTTGAACCTCTGAAAAAACCAATGTAATGGCAATGTGAC	52	C	143
KHK7	CAITTGCCATTACGATGGTTTTTTCAGA	28	C*	144
KHK8	GGTTTCACCCCTTTTCGTTGAATTTTCTTCGGTAGAGAGAC	40	C*	145
KHK9	TTGTCCTTCAGGGTCACTTTTTCGATACTAAGGTTTGGCATCTTCTTT	50	C*	146
KHK10	GAAAAATTTCGAATTGCTCTGGCTGAGGTCAATCAGCAATGTGTCAGTTTCA	50	C*	147
KHK11	CTTTGCTTTTGTAGTTTTTTCACCTTCCAGGGTGCCGGA	40	C*	148
KHK12	ACCGTGTGTTTTATCAGAGGTGCCCTTTCAGCTCA	34	C*	149

[0601]

Kpn I - EcoR I 片段				
KKE1	CCGCTCTGGAATACACCGACATCAAAAGCGATGGCTCCGGCAAGCCAA	48	C	150
KKE2	ATACGTTCTGAAAGACTTCACCCCTGGAAGGCACCCTCGCTGCCGACGG	48	C	151
KKE3	CAAAACCACCTTGAAAGTTACCGAAGGCACCTGTTGTTTAAAG	42	C	152
KKE4	CATGAACATCTTAAAAATCCGGTGAAATCACCCTTGCCGCTG	40	C	153
KKE5	GATGACTCTGACACCCACTCAGGCCACTAAAAAAACCGGCAATGGGATTC	50	C	154
KKE6	TAACACTTCCACTCTGACCATCAGCGTG	28	C	155
KKE7	AATTCACGCTGATGGTCAGAGTGAAGTGTAGAATCCCATTTGCCG	47	C	156
KKE8	GTTTTTTAGTGGCCTGAGTGGTGTGTCAGAGTCAITCCAGCGCAACGGTGATTTCAC	55	C	157
KKE9	CGGATTTTAAGATGTTCAITGCTTAAAAACAACAGTGCCTTCGGTAACCTTC	50	C	158
KKE10	AAGGTGGTTTTGCCGTCCGCGACGAGGGTGCCCTTCCAGGG	40	C	159
KKE11	TGAAGTCTTTCAGAACGTAITTTGGCTTTGCCGGAGCCATC	40	C	160
KKE12	GCTTTGATGTCGGTGTATTTCCAGACGGGTAC	32	C	161
EcoR I - BamH I 片段				
KEB1	AATTCCAAAAAAACTAAAAAACATCGTGTTCACCAAGAAGACACCATCACCG			162
KEB2	TCCAGAAATACGACTCTGCGGGCACCAACCTCGAAGGCCAACGCAGTCGAA	52	C	163
KEB3	ATCAAAACCCTGGATGAACCTGAAAAAACGCTCTGAAATAAGCTGAGCG	50	C	164
KEB4	GATCCGCTCAGCTTAATTCAGAGCGTTTTTCAGTTTCATCCAGGGTTTGATTT CGACTGCGTTGCCCTTGA	47	C	165
KEB5	GGTTGGTGCCTCGCAGAGTCTGTAITTTCTGGACCGGTGATGGTGTCTTCTTTG	71	C	166
KEB6	GTGAACACGATGTTTTTAGTTTTTTGG	50	C	167

[0602]

- [0603] L寡核苷酸的碱基的长度
- [0604] S链,C(编码)或互补(C')
- [0605] 制备大肠杆菌感受态细胞-使用单一个菌落来接种5ml改良的LB肉汤(每升水具有

5.5g NaCl、5g酵母提取物、10g大豆蛋白胨,所述大豆蛋白胨不是从动物或经过遗传修饰的植物来源获得)。培育培养物直到它变浑浊,之后用预温的改良的LB肉汤将培养物稀释至25ml的体积。进一步培育培养物直到它达到0.2至0.6的OD_{600nm}(40至60分钟),并且将培养物稀释成125ml的体积,转移到500ml烧瓶中并且培育直到达到0.6的OD_{600nm}。通过在冰浴中轻轻振荡5分钟来使培养基快速冷却,并且使细胞直接沉淀(Beckman离心机,4000rpm10分钟),用TfBI缓冲液(Teknova Hollister,CA)(30mM K-乙酸盐、50mM MnCl₂、100mM KCl、10mM CaCl₂、15%甘油)小心地洗涤,在5ml的TfBII(10mM Na-MOPS、75mM CaCl₂、10mM KCl、15%甘油)中进行再悬浮并且保持在冰上15分钟。然后将细胞吸移到100μl等分试样中并且直接在干冰中进行速冻。

[0606] 使寡核苷酸混合物退火以便形成OspA基因片段(从头合成)-三种合成OspA基因被设计成编码具有来自血清型1和20spA(lipB sOspA1/2)、血清型6和40spA(lipB sOspA 6/4)以及血清型5和30spA(lipBsOspA 5/3)的保护性表位的OspA分子。对于每种新型OspA基因(脂质化)来说,合成四组具有30至60个之间的碱基对的寡核苷酸(参见表4至表6)。图16至图18示出每个构建体的与从已公布序列预测的核苷酸序列对准的密码子优化序列。每个寡核苷酸组由8至12个互补重叠寡核苷酸组成。将来自每组的寡核苷酸在独立的实验中退火在一起,以便产生在每一末端具有特异性的限制酶识别位点的双链DNA片段,即片段N-H(Nde I-Hind III)、H-K(Hind III-Kpn I)、K-E(Kpn I-EcoRI)以及E-B(EcoRI-BamH I)。

[0607] 用蒸馏水将冻干的寡核苷酸复原,测量OD_{260nm}并且将浓度调整至10μM。对于每个OspA片段来说,将2μl的每一种寡核苷酸与1μl的T4多核苷酸激酶和T4DNA连接酶缓冲液(10×)混合在一起,并且在室温下将该混合物培育30分钟以便使寡核苷酸磷酸化(对于lipBsOspA 6/4构建体来说,由于寡核苷酸已经磷酸化,所以省略这一步骤)。将混合物加热至95℃,维持1分钟(变性步骤)并且然后通过使混合物缓慢冷却至室温允许寡核苷酸进行退火。将经过退火的混合物直接用于连接中,或者在-20℃下进行储存直到被另外需要。

[0608] 克隆OspA基因片段-构建个别合成OspA基因所需的四个片段被各自独立地克隆到pUC18中并且转化到大肠杆菌宿主DH5α(参见图1)中。

[0609] 对于每种新型OspA基因来说,合成四组具有30至60个之间的碱基的寡核苷酸。每个寡核苷酸组由8至12个互补重叠寡核苷酸组成。将来自每组的寡核苷酸在独立的实验中退火在一起,以便产生在每一末端具有特异性的限制酶识别位点的双链DNA片段,即片段N-H(NdeI-Hind III)、H-K(Hind III-Kpn I)、K-E(Kpn I-EcoRI)以及E-B(EcoRI-BamH I)。将四(4)个片段各自独立地克隆到pUC18中,用相应的限制酶切割并且转化到大肠杆菌宿主DH5α中,之后验证克隆的片段的序列。

[0610] 用QIAGEN质粒纯化系统根据生产商的方案将质粒DNA(pUC18)从过夜大肠杆菌培养物(LB肉汤)中纯化出来。然后,根据生产商的方案用成对的限制酶Nde I&Hind III、Hind III&Kpn I、Kpn I&EcoRI、EcoRI&BamH I消化载体DNA。将消化的样品施加至0.8%的琼脂糖胶并且电泳分离。使用商用凝胶洗脱试剂盒(QIAquick凝胶提取试剂盒,Qiagen)根据生产商的方案将线性化的载体DNA切除并洗脱,并且使用T4DNA连接酶连接至经过退火的寡核苷酸混合物。将连接产物转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中并且在含有氨苄西林(100μg/ml)的LB琼脂上选择含有质粒的转化株。

[0611] 通过纯化质粒DNA,用克隆中使用的酶消化DNA并且使用先前描述的程序通过琼脂

糖凝胶电泳分析DNA片段来确认克隆载体pUC18中期望大小的插入物的存在是。使用纯化的质粒DNA作为DNA模板和序列测定引物5'-TCGGGGCTGGCTTAACTATG-3 (SEQ ID NO:14) 和5'-GCTTCCGGCTCGTAT (SEQ ID NO:15) (所述引物在多个克隆位点之外的pUC18载体中,分别是bp 130-150和bp 530-515) 对经过克隆的DNA片段进行序列测定。序列反应是在自动序列测定仪 (ABI 310) 上进行。使用SequenceEditor编辑序列并且将所述序列导入VectorNTI以用于分析。只有具有正确序列的克隆被用于构建全长OspA基因的构造单元。

[0612] 对于lipB sOspA 5/3基因来说,由于在Kpn I-BamH I片段中未发现适合的独特的内部位点并且氨基酸序列不允许使用内部EcoR I位点,所以采用了不同的策略 (参见图14)。Pvu II位点存在于Kpn I-BamH I片段中,然而,在pUC18载体中存在两个Pvu II位点,这就意味着在pUC18中直接进行片段克隆是不可能的。因此,用于构建体的寡核苷酸被设计成具有插入在外部且邻近Pvu II位点的EcoR I位点,以便允许将Kpn I-EcoR I和EcoR I-BamH I片段克隆到pUC18中。随后用Kpn I、EcoR I以及BamH I消化插入的片段,从而产生了片段,所述片段随后用Pvu II进行消化。然后将Pvu II消化的片段 (Kpn I-Pvu II和Pvu II-BamH I) 用于与用Kpn I和BamH I切割的pUC18载体DNA的三重连接中,以便产生Kpn I-BamH I片段。

[0613] 构建全长OspA基因-在下一个步骤中,用于构建个别合成OspA基因所需的四个片段各自被从pUC18载体中切除并且在单一个步骤中再次克隆到pUC18载体中以便产生全长OspA基因 (参见图1)。

[0614] 将制造全长基因所需的四个片段从少量制备物中切除。使用与最初克隆步骤中使用的相同的限制酶来将DNA分离。将消化的样品施加至琼脂糖胶并且电泳分离。使用商用凝胶洗脱试剂盒 (QiaQuick凝胶提取试剂盒) 根据生产商的方案将对应4个插入片段的每个的DNA切除并洗脱,并且使用T4DNA连接酶连接至用Nde I和BamH I消化且使用QIAquick凝胶提取试剂盒纯化的线性化的载体DNA。将连接的DNA转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中并且在含有氨苄西林 (100 μ g/ml) 的LB琼脂上选择含有质粒的克隆。通过PCR筛选菌落中期望大小 (近似830bp) 的插入物的存在。

[0615] 单一个菌落被用作PCR反应中的模板DNA,所述PCR反应包含10 $\times$ 缓冲液 (15mM Tris-HCl (pH 8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂)、200 μ M dNTPs、1.25U Amplitaq DNA聚合酶、400nM正向引物5'-TCGGGGCTGGCTTAACTATG-3 (SEQ ID NO:14) 以及400nM反向引物5'-GCTTCCGGCTCGTAT (SEQ ID NO:15)。PCR反应条件如下:在94 $^{\circ}$ C下保持5分钟,35 $\times$ (在94 $^{\circ}$ C下保持30秒、在48 $^{\circ}$ C下保持30秒、在72 $^{\circ}$ C下保持1分30秒),之后在72 $^{\circ}$ C下浸泡5分钟并且之后保持在4 $^{\circ}$ C下。PCR产物可被直接使用或者储存在大约 $\leq$ 15 $^{\circ}$ C下直到另外使用。通过琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物中正确大小 (近似980bp) 的插入物的存在。将正确大小的插入物进行序列测定以便确认没有引入误差,即,序列反应是使用从过夜培养物 (LB amp肉汤) 中分离 (QIAGEN质粒纯化试剂盒) 的质粒DNA并且使用侧接克隆位点的序列测定引物 (分别是5'-TCGGGGCTGGCTTAACTATG-3' (SEQ ID NO:14) 和5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGT-3' (SEQ ID NO:16),bp 130-150和530-510) 建立的。序列反应是在自动序列测定仪 (ABI 310) 上进行。使用SequenceEditor编辑序列并且将序列导入VectorNTI以用于分析。

[0616] 新型OspA基因亚克隆至pET β 0a表达载体——一旦在pUC18中验证了全长OspA基因,然后就使用限制酶NdeI和BamH I将OspA基因亚克隆到pET-30a表达载体中并且转化到大肠杆

菌宿主HMS 174 (DE3) 中。

[0617] 用Nde I和BamH I消化来自具有正确序列的pUC 18克隆的少量制备的DNA (Miniprep DNA)。相似地,用Nde I和BamH I消化pET30a载体DNA。将消化的DNA在琼脂糖胶上进行操作并且电泳分离。如前文所述,将近似830bp的插入片段和线性化载体DNA切除并纯化。使用T4DNA连接酶连接载体和插入物DNA,并且将连接产物转化到大肠杆菌HMS174 (DE3) (Novagen) 的感受态细胞中。将转化株铺在含有卡那霉素(30 μ g/ml)的LB盘上。通过PCR使用引物5'-TTATGCTAGTTATTGCTCAGCG-3' (SEQ ID NO:17) 和5'-TTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT-3' (SEQ ID NO:18) 来筛选单个一菌落。将PCR产物施加至琼脂糖胶并且电泳分离。随后将产生正确大小(近似1kb)的产物的菌落用于建立过夜培养物,根据生产商的方案使用QIAGEN质粒纯化试剂盒来使少量制备的DNA从所述过夜培养物分离。再次确认序列(分别使用引物5'-TTATGCTAGTTATTGCTCAGCG-3' (SEQ ID NO:17) 和5'-TTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT-3' (SEQ ID NO:18), bp 65-86和395-373) 并且选择菌落用于表达测试。

[0618] 从lipB sOspA 1/2产生lipB sOspA 1/2²⁵¹-在lipB sOspA 1/2构建体中改变单个氨基酸,即将位置251处的氨基酸丙氨酸改变成天冬酰胺残基,以便增强免疫力。氨基酸变化是由PCR引入的。首先,用外部正向引物和内部反向引物来建立PCR,从而产生具有引入的氨基酸变化的约730bp的产物(参见图15)。其次,用内部正向引物和外部反向因子来建立PCR,从而产生含有引入的氨基酸变化的100bp的产物。然后将序列上重叠的两种PCR产物作为模板DNA与外部正向引物和外部反向引物一起用于最终PCR反应中,以便产生含有引入的氨基酸变化的最终的全长OspA产物。

[0619] 将pET30a构建体用作模板DNA的来源。建立PCR反应,所述反应包含10 $\times$ 缓冲液[15mM Tris-HCl (pH 8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂]、200 μ M dNTPs、1.25U Amplitaq DNA聚合酶以及400nM的每种引物对(引物对5'-GGA ATT CCA TAT GCG TCT GTT GAT CGGCT (SEQ ID NO:19) & 5'-TTG GTG CCT GCG GAG TCG (SEQ ID NO:20) 和引物对5'-AAT ACG ACT CCG CAG GCA CC (SEQ ID NO:21) & 5'-CTG-GGA TCC GCT CAG CTT ATT TCA (SEQ ID NO:22))。PCR反应的建立条件如下:在94 $^{\circ}$ C下保持5分钟,35 $\times$ (在94 $^{\circ}$ C下保持30秒、在48 $^{\circ}$ C下保持30秒、在72 $^{\circ}$ C下保持1分30秒),之后在72 $^{\circ}$ C下浸泡5分钟并且之后保持在4 $^{\circ}$ C下。所述反应产生2种独立的重叠产物并且将这2种产物用作第三PCR反应的模板DNA,所述反应使用外部引物5'-GGA ATT CCA TAT GCG TCT GTT GAT CGG CT (SEQ ID NO:19) 和5'-CTG-GGA TCC GCT CAG CTT ATT TCA (SEQ ID NO:22),所述2种产物并入了Nde I和BamH I的限制性位点。反应条件是:在94 $^{\circ}$ C下保持60秒,之后是(在94 $^{\circ}$ C下保持30秒、在49 $^{\circ}$ C下保持60秒、在72 $^{\circ}$ C下保持90秒)循环35次,之后在72 $^{\circ}$ C下保持5分钟。根据生产商的说明用QiaQuick纯化试剂盒(Qiagen)来纯化扩增的产物并且用Nde I和BamH I来消化产物,并将所述产物连接至用Nde I和BamHI切割的pET30a载体DNA。将连接产物转化到大肠杆菌DH5 α 的感受态细胞中。将转化株铺在含有卡那霉素(30 μ g/ml)的LB盘上。通过PCR使用引物5'-TTATGCTAGTTATTGCTCAGCG-3' (SEQ ID NO:17) 和5'-TTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT-3' (SEQ ID NO:18) 来筛选单个菌落。将PCR产物施加至琼脂糖胶并且电泳分离。随后将产生正确大小(近似1kb)的产物的菌落用于建立过夜培养基,根据生产商的方案使用QIAGEN质粒纯化系统来使少量制备的DNA从所述过夜培养基分离。确认序列(使用引物5'-TTATGCTAGTTATTGCTCAGCG-3' (SEQ ID NO:17) 和5'-TTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT-3' (SEQ ID NO:18)) 并且选择菌落用于表达测试。

17) 和5-TTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT-3' (SEQ ID NO:18)) 并将所得的构建体转化到大肠杆菌HMS174 (DE3) 感受态细胞中, 并且将所得的阳性转化株称为lipB sOspA 1/2²⁵¹。

[0620] 产生不具有前导序列的构建体-构建体被制备成具有lipB前导序列, 脂质部分典型地在氨基末端半胱氨酸残基处附接至所述lipB前导序列。重组脂质化OspA的实验性测试验证了脂质部分的存在。然而, 还制备了不含有lipB前导序列的构建体。不含有lipB前导序列的构建体是通过使用被选择以便产生769-771bp的最终产物的引物, 从三种lipB构建体(在pET30a中) 中的每一种进行PCR扩增来制造, 所述最终产物不具有编码前导序列的核酸并且用于半胱氨酸残基的密码子被用于甲硫氨酸残基的密码子替换。

[0621] PCR反应包含10×缓冲液[15mM Tris-HCl (pH 8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂]、200 μm dNTPs、1.25U Amplitaq DNA聚合酶、400nM正向引物5'-CGTGGTACCATATGGCACAGAAAGGTGCTGAGTCT-3' (SEQ ID NO:23) 和400nM反向引物5'-CTGGGATCCGCTCAGCTTATTTC-3' (SEQ ID NO:22) 以及模板DNA。PCR条件是: 在94℃下保持5分钟, 35× (在94℃下保持30秒、在48℃下保持30秒、在72℃下保持1分30秒), 之后在72℃下浸泡5分钟并且之后保持在4℃下。PCR反应可被直接使用或者储存在大约≤15℃下直到另外使用。

[0622] 将PCR产物使用QiaQuick PCR纯化试剂盒 (Qiagen) 进行纯化, 用Nde I和BamH I进行消化并且连接至用Nde I和BamH I消化的pET30a载体DNA。使用连接混合物转化大肠杆菌HMS174 (DE3) 并且通过对卡那霉素的抗性选择含有重组质粒的菌落, 并且从PCR产物来验证序列。

[0623] 评估大肠杆菌HMS 174 (DE3) 中的表达-就所选择的菌落的表达对应的新型OspA蛋白的能力进行测试。在每一种情况下, 使用单一个菌落来接种含有卡那霉素 (30μg/ml) 的LB肉汤, 并且在37℃下培育1至5小时直到达到OD (600nm) 值大于0.6且小于1。此时, 保留培养物的样品 (代表未诱导的样品) 并且通过添加IPTG至最终浓度为1mM来诱导剩余部分的培养物。离心未诱变的样品 (1ml) 并且将沉淀保留下来, 并储存在-20℃下。允许诱导的培养物另外生长三个小时, 之后取走1ml样品, 测量出OD (600nm) 值, 离心样品并且将沉淀保留下来, 并储存在-20℃下。

[0624] 制备原代细胞-制备三种脂质化构建体中的每一种和三种非脂质化构建体中的每一种的原代细胞。原代细胞包含携带表达对应的OspA的pET30a质粒的大肠杆菌细胞 (HMS174 (DE3))。对于原代细胞的制备来说, 从含有卡那霉素 (30μg/ml) 和利福平 (200μg/ml) 的盘中挑取来自对应储备物的单个一菌落, 并且使用所述菌落来接种500μl的SMK培养基 (SOP 8114), 培育过夜。然后使用100微升的这种培养物来接种100ml的SMK培养基 (一式两份) 并且在37℃振荡下将培养物培育17至20个小时。然后将最终浓度为15%的无菌甘油添加至培养物中, 并且将材料以500μl量的等分试样吸移到60个安瓿中, 因此产生60个原代细胞的安瓿, 将其在-80℃下直接储存。

[0625] 三种合成OspA基因被设计成编码具有来自血清型1和2OspA (lipB sOspA 1/2251)、血清型6和4OspA (lipB sOspA 6/4) 以及血清型5和3OspA (lipB sOspA 5/3) 的保护性表位的OspA分子。以下实施例中陈述了这些分子的一级氨基酸序列和并入它们的设计的主要特点的描述。

[0626] 实施例3

[0627] 脂质化1/2²⁵¹OSPA (LIPB SOSPA1/2²⁵¹) 的描述

[0628] 研究的目的是设计包含血清型1和2的新型OspA抗原,即脂质化1/2²⁵¹ OspA(lipB sOspA 1/2²⁵¹)。LipB sOspA 1/2²⁵¹包含融合到血清型2序列(菌株Pko,基因库登录号S48322)的远端部分的血清型1OspA序列(菌株B31,基因库登录号X14407)的近端部分。对于类型2血清型来说独特的序列的起点是在位置216处的赖氨酸(K)残基。构建体初始被设计成编码在位置251处的氨基酸丙氨酸(A)。然而,随后通过PCR将构建体改变成编码天冬酰胺(N)残基(来自Pko的已公布的序列中的实际残基),以便增强免疫原性,由此命名为lipB sOspA 1/2²⁵¹。

[0629] lipB sOspA 1/2²⁵¹的次要特点被显示在图2的lipB sOspA 1/2²⁵¹的经过注解的氨基酸序列中并且包括:

[0630] ●来自血清型2OspA序列(菌株Pko;基因库登录号S48322)(与hLFA-1表位相异的序列)的等效序列(以斜体和侧接序列示出)替换了分子的近端处(氨基酸161至185)的假定致关节炎性表位(Gross等,1998)hLFA-1(YVLEGLTA)(SEQ ID NO:24);

[0631] ●OspB前导序列(图2的氨基酸1至15)和避免现有技术的各种取代。分别用天冬氨酸(D)和天冬酰胺(N)替换在位置44和46处的天冬酰胺(N)残基和天冬氨酸(D)残基以便产生序列KEKDKN(SEQ ID NO:25)。分别用苏氨酸(T)和天冬酰胺(N)替换在位置78和79处的丙氨酸(A)和天冬氨酸(D)残基以便产生序列KTNKSK(SEQ ID NO:26);

[0632] ●如在国际专利公开号W0 02/16421A2(Luft&Dunn)中所描述,突变性稳定。例如,甲硫氨酸(M)替换在氨基酸136(R139M)处的精氨酸(R);酪氨酸(Y)替换在氨基酸157(E160Y)处的谷氨酸(E);并且甲硫氨酸(M)替换在氨基酸186(K189M)处的赖氨酸(K);以及

[0633] ●其它稳定性突变。例如,苏氨酸(T)替换在氨基酸173(本公开的aa 176)处的缬氨酸(V)。假定致关节炎性表位(位置161至185)通过用阿氏疏螺旋体序列替换伯氏疏螺旋体序列的去除使氨基酸173与氨基酸174(本公开的aa 176和177)之间的氢键断裂。这导致与保护性单克隆抗体的降低的结合(105.5和LA-2(Jiang等,J.Immunol.144:284-9,1990;Golde等,Infect.Immun.65:882-9,1997;和Ding等,J.Mol.Biol.302:1153-64,2000))。替代缬氨酸(V),在位置173处引入苏氨酸(T),以便恢复氢键并且增加对保护性单克隆抗体105.5和LA2的反应性。

[0634] 此外,氨基酸16至25(成熟蛋白的起点)与OspB序列(基因库登录号X74810)一致。

[0635] 图3中示出了lipB sOspA 1/2²⁵¹的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。在蛋白分泌期间前导序列(绿色)被裂解掉。成熟OspA蛋白的序列以半胱氨酸残基(已加下划线)为起点,所述半胱氨酸残基形成了蛋白的脂质锚的附接位点。

[0636] 实施例4

[0637] 脂质化6/40SPA(LIPB SOSPA 6/4)的描述

[0638] 研究的目的是设计包含血清型4和6的新型OspA抗原,即脂质化sOspA 6/4OspA(lipB sOspA 6/4)。LipB sOspA 6/4包含融合到血清型4序列(菌株pTroB;基因库登录号I40089)的远端部分的血清型6OspA序列(菌株K48,基因库登录号I40098)的近端部分。对于类型4血清型来说独特的序列的起点是在位置217处的天冬酰胺(N)残基。次要特点被显示在图4的lipB sOspA 6/4的经过注解的氨基酸序列中并且包括:

[0639] ●在国际专利申请号W0 02/16421A2(Luft&Dunn)中描述的稳定性突变:甲硫氨酸(M)代替在氨基酸136处的精氨酸(R),酪氨酸(Y)代替在氨基酸157处的谷氨酸(E),并且甲

硫氨酸(M)代替在氨基酸187处的赖氨酸(K);以及

[0640] ●与上文描述的lipB s0spA 1/2²⁵¹类似,0spB前导序列被使用(在图4中的氨基酸1至15)并且氨基酸16至25与来自0spB(基因库登录号X74810)的序列一致。

[0641] 虽然亲本0spA类型6序列(KEKDKD)(SEQ ID NO:28)中不存在肽序列KEKNKD(SEQ ID NO:27),但为了与在lipB s0spA 1/2²⁵¹构建体中做出的等效改变相符,用天冬酰胺(N)残基替换在位置46处的天冬氨酸(D)残基,以便于产生序列KEKDKN(SEQ ID NO:25)。

[0642] 虽然亲本0spA类型6序列(KTDKSK)(SEQ ID NO:30)中不存在肽序列KADKSK(SEQ ID NO:29),但为了与在lipB s0spA 1/2²⁵¹构建体中做出的等效改变相符,用天冬酰胺(N)残基替换在位置79处的天冬氨酸(D)残基,以便于产生序列KTNKSK(SEQ ID NO:26)。

[0643] 氨基酸37是从如在亲本序列(菌株K48;基因库登录号I40098)中所存在的谷氨酸(E)改变至缬氨酸(V),这是因为几乎所有的类型6序列在这一位置处都具有缬氨酸。

[0644] 图5中示出了lipB s0spA 6/4的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。在蛋白分泌期间前导序列(绿色)被裂解掉。成熟0spA蛋白序列以半胱氨酸残基(已加下划线,参见图5)为起点,所述半胱氨酸残基形成了蛋白脂质锚的附接位点。

[0645] 实施例5

[0646] 脂质化5/30SPA(LIPB SOSPA 5/3)的描述

[0647] 研究的目的是设计包含血清型3和5的新型0spA抗原,即脂质化s0spA 5/30spA(lipB s0spA 5/3)。LipB s0spA 5/3包含融合到血清型3序列(菌株PBr;基因库登录号X80256,伽氏疏螺旋体0spA基因)的远端部分的血清型50spA序列[数据库登录号emb|X85441|BGWABOSPA,伽氏疏螺旋体0spA基因(WABSou亚菌株)]的近端部分,具有如在SEQ ID NO:5和6中所示的修饰。对于类型3血清型来说独特的序列的起点是在位置216处的天冬氨酸(D)残基。次要特点被显示在图6的lipB s0spA 5/3的经过注解的氨基酸序列中并且包括:

[0648] ●在国际专利申请号W0 02/16421A2(Luft&Dunn)中描述的稳定性突变:甲硫氨酸(M)代替在氨基酸136处的精氨酸(R);酪氨酸(Y)代替在氨基酸157处的谷氨酸(E);并且甲硫氨酸(M)代替在氨基酸187处的赖氨酸(K);以及

[0649] ●与上文描述的lipB s0spA 1/2²⁵¹和lipB s0spA 6/4类似,0spB前导序列被使用(在图6中的氨基酸1至15)并且氨基酸16至25与来自0spB(基因库登录号X74810)的序列一致。

[0650] 虽然亲本0spA类型5序列(KEKDKD)(SEQ ID NO:28)中不存在肽序列KEKNKD(SEQ ID NO:27),但为了与在lipB s0spA 1/2²⁵¹构建体中做出的等效改变相符,用天冬酰胺残基(N)替换在位置46处的天冬氨酸(D)残基,从而给出序列KEKDKN(SEQ ID NO:25)。

[0651] 虽然亲本0spA类型5序列(KTDKSK)(SEQ ID NO:30)中不存在肽序列KADKSK(SEQ ID NO:29),但为了与在lipB s0spA 1/2²⁵¹构建体中做出的等效改变相符,用天冬酰胺残基(N)替换在位置79处的天冬氨酸(D)残基,从而给出序列KTNKSK(SEQ ID NO:26)。

[0652] 图7中示出了lipB s0spA 5/3的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。在蛋白分泌期间前导序列(绿色)被裂解掉。成熟0spA蛋白序列以半胱氨酸密码子(已加下划线,参见图7)为起点,所述半胱氨酸密码子形成了蛋白的脂质锚的附接位点。

[0653] 实施例6

[0654] 优化密码子的使用用于在大肠杆菌中高水平表达

[0655] 由于已知很少用于大肠杆菌中的密码子的存在会对外来基因的高水平表达呈现阻碍,所以使用率低的密码子由在大肠杆菌中高度表达的基因所使用的密码子替换。新型OspA基因的核苷酸序列被设计成利用在高度表达的类别II大肠杆菌基因中出现最频繁的密码子(优选的密码子)(Guerdoux-Jamet等,DNA Research 4:257-65,1997)。表7和表8中总结了在新型OspA基因之中的和用于高度表达的类别II大肠杆菌基因的密码子使用的数据。tRNA分子不太可能是速率限制的不太频繁的氨基酸的数据(表7)与最经常出现的氨基酸的数据(表8)是分开呈现的。

[0656] 表7.在新型OspA基因(不太常见的氨基酸*)中的密码子使用

[0657]

氨基酸	密码子	OspA 1/2 AA 计数			OspA 5/3 AA 计数			OspA 6/4 AA 计数			类别 II 计数(%)
		总数	密码子	%	总数	密码子	%	总数	密码子	%	
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

[0658] *即,数值上各自构成总氨基酸的<2.5%的氨基酸。

[0659] 表8.在新型OspA基因(更为普遍的氨基酸)中的密码子使用

[0660]

氨基酸	密码子	OspA 1/2 AA 计数			OspA 5/3 AA 计数			OspA 6/4 AA 计数			类别 II 计数(%)
		总数	密码子	%	总数	密码子	%	总数	密码子	%	
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
	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	12	4	33.3	13	5	38.5	13	3	23.1	33.5
	ATC		8	66.7		8	61.5		10	76.9	65.9
	ATA		0	0.0		0	0.0		0	0.0	0.6

[0661] 为新型OspA基因 (仅是常见氨基酸) 所选择的和在大肠杆菌类别II基因之中的密码子使用之间的高度一致性是显而易见的 (即, 来自表8的类型II基因相对于单个新型OspA基因的百分比数值的曲线图; 参见图8)。对于三种脂质化构建体来说, 原始序列具有范围为32.8%至33.8%的GC含量, 而密码子优化序列具有范围为43.8%至46.8%的GC含量, 这与大肠杆菌的50%GC含量相似。

[0662] 实施例7

[0663] 构建合成非脂质化OSPA基因

[0664] 还制备了不含有lipB前导序列的构建体。需要对两组构建体 (脂质化和非脂质化) 进行以下操作: 评估所述构它们在发酵罐中的产生难易程度 (生物量、稳定性、产物产率等)、评定不同类型的抗原可以纯化的容易程度以及比较它们的生物特征 (安全状况和保护效力)。

[0665] 构建体 (SEQ ID NO:7、9以及11) 是通过使用PCR引物从三种lipBOspA构建体 (SEQ ID NO:1、3以及5) 中每一种进行PCR扩增来产生, 所述构建体具有并入的限制性位点。将PCR产物纯化, 用Nde I和BamHI将所述产物消化并且将所述产物连接至经过消化的pET30a载体DNA。将连接混合物用于转化大肠杆菌DH5 α 并且验证OspA序列。制备少量制备的DNA, 将所述少量制备的DNA分离并且将所述少量制备的DNA用于转化HMS 174 (DE3) 宿主细胞。非脂质化衍生物的序列与脂质化形式一致, 除了所述非脂质化衍生物的序列缺少编码前导序列的前45个碱基对并且含有Nde I位点之外, 所述Nde I位点含有替换脂质化形式中的半胱氨酸密码子的甲硫氨酸密码子。

[0666] 实施例8

[0667] 表达新型重组OSPA抗原

[0668] 为了表达/产生用于抗原目的的新型重组OspA基因, 使用了由噬菌体T7 RNA聚合酶控制的大肠杆菌表达系统 (Studier等, J.Mol.Biol.189:113-30, 1986)。在这一表达系统中, 将新型OspA基因克隆到在pET系列质粒中的一种质粒 (例如pET30a) 的多个克隆位点中。由于外来基因的表达处于不被大肠杆菌RNA聚合酶识别的噬菌体T7启动子的控制之下, 所以表达取决于T7RNA聚合酶的来源。在重组质粒被转移到含有T7RNA聚合酶基因的染色体拷贝的适当的表达宿主如大肠杆菌HMS174 (DE3) 中时提供酶。染色体整合的T7RNA聚合酶基因的表达处于lacUV5启动子的控制之下, 所述表达可以通过添加异丙基- β -D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 或乳糖来开启 (参见图10)。因此, 外来基因的表达也通过添加诱导分子来调节。

[0669] 在对数晚期诱导细胞并且在诱导3至4个小时后收集所述细胞。在经过诱导的细胞中, 如由细胞溶解产物的SDS-PAGE所确定, 嵌合OspA抗原是最高度表达的蛋白。大多数OspA嵌合体被发现于上清液中。通过阴离子交换色谱法来去除污染性大肠杆菌蛋白并且通过超滤法浓缩在空体积中洗脱出来的嵌合OspA蛋白。

[0670] 对新型重组OspA蛋白从构建体中每一种的表达进行测试, 并且将来自诱导和非诱导培养物的样品在SDS聚丙烯酰胺凝胶上进行操作 (图11)。对于脂质化 (SEQ ID NO:2、4以及6) 和非脂质化 (SEQ ID NO:8、10以及12) 抗原来说, 在每种情况下观察到近似31kDa的带 (参见图11)。对蛋白进行表征并且将被确定与认为末端甲硫氨酸的理论分子量相关联 (+/-0.5道尔顿) 的分子量裂解掉。图11示出经过表达的重组脂质化OspA蛋白构成至少10%

的总蛋白产量,从而验证了构建体对于它们的预期目的来说是有用的。

[0671] 实施例9

[0672] 单一个重组OSP A抗原(R OSP A 1/2)防御狭义伯氏疏螺旋体和阿氏疏螺旋体的感染

[0673] 本研究的目的是确定被设计成保留OspA血清型1和2的保护性质的单一个重组抗原(rOspA 1/2;多肽包含SEQ ID NO:2(lipB sOspA1/2²⁵¹))是否能够诱导保护小鼠免受狭义伯氏疏螺旋体(OspA血清型1)或阿氏疏螺旋体(OspA血清型2)的感染的抗体反应。提供的证据显示出其它rOspA抗原的含入对rOspA 1/2抗原提供的保护性免疫不具有拮抗作用。

[0674] 设计和构建rOspA 1/2-为了消除引入外来试剂的风险,使用互补重叠合成寡核苷酸来产生DNA片段,将所述DNA片段连接在一起且克隆到载体pET30a中的并且验证序列。这一方法还使得密码子使用能够被优化以用于用以表达OspA基因的大肠杆菌宿主HMS174(DE3)。新型基因是基于融合到血清型2序列(氨基酸219至273,菌株PKo;登录号S48322)的远端部分的血清型1OspA序列(氨基酸29至218,菌株B31;基因库登录号X14407)的近端部分。来自伯氏疏螺旋体菌株B31(aa 164至188)的25个氨基酸的片段被来自阿氏疏螺旋体菌株PKo(aa 164至188)的序列替换,因为B31OspA(aa 165至173)这一区域与涵盖hLFA-1表位(aa 332-340)的区域高度相关。包括前导序列的N末端序列和前11个氨基酸是源自于OspB(菌株B31;基因库登录号X74810),以便于优化脂质化蛋白表达。做出其它具体的氨基酸改变来提高rOspA 1/2分子的免疫原性和构象稳定性并且在SEQ ID NO:2中陈述rOspA 1/2(lipB sOspA 1/2²⁵¹)的序列。

[0675] 动物测试-单一个重组OspA抗原(rOspA 1/2)预防疏螺旋体属的表达不同的OspA抗原的两个种类的感染的能力在用纯化的OspA抗原(0.1μg或0.03μg剂量)进行皮下免疫(第0天和第28天)的C3H/HeJ小鼠中进行评定,所述抗原与作为佐剂的0.2%(w/v)氢氧化铝配一起配制。在加强免疫之后,小鼠通过真皮内注射(针攻击;7×10⁴细胞)或通过天然感染途径(蜱虫攻击)被攻击2周。针对后一个实验来说,向每只小鼠应用8只幼蜱虫并且允许所述幼蜱虫进食多达5天。幼虫是从布德斯韦(Budweis)(捷克共和国(Czech Republic)),即莱姆病的地方性区域附近收集的。这些蜱虫中的大多数都感染有阿氏疏螺旋体,如通过PCR测试未进食蜱虫而确定。在四周后确定小鼠的感染状态。在蜱虫攻击实验中,疏螺旋体属的存在通过以下确认:培养物(膀胱)和实时PCR检测疏螺旋体属DNA(心脏)。动物实验根据关于动物实验的奥地利法律和国际准则(AAALAC和OLAW)进行,由实验动物使用与关爱委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)审查,并且由奥地利的监管机构给予批准。免疫原性。通过ELISA使用rOspA 1/2作为涂布抗原和OspA特异性单克隆抗体(内部制备)以规定的IgG含量作为标准来确定对rOspA 1/2抗原的抗体反应(μg IgG/ml)。

[0676] 诊断程序-对于针攻击实验来说,使用以下来诊断感染:是否存在针对在表面暴露脂蛋白VlsE蛋白中的保守表位的抗体(C6ELISA;来自Immunetics®C6Lyme ELISA™的涂板)或者是否存在针对疏螺旋体属抗原而非OspA免疫原的抗体(蛋白质印迹法)。蛋白质印迹法使用从狭义伯氏疏螺旋体菌株ZS7制备而来的细胞溶解产物,因为所述菌株ZS7是攻击有机体。如果动物在两项测定中均呈阳性,那么认为所述动物已受到感染。

[0677] 对于蜱虫攻击实验来说,也进行了C6ELISA和蛋白质印迹法。然而,蛋白质印迹法使用来自狭义伯氏疏螺旋体ZS7、阿氏疏螺旋体ACA1以及伽氏疏螺旋体KL11的溶解产物,因

为感染有机体的身份是未知的。只有在两项测定均呈阳性时,才认为动物已经经历血清转变。此外,疏螺旋体属感染是通过膀胱的培养物并通过使用靶向OspA的5'区域的实时PCR测定和基于16S rRNA基因的测定,检测从心脏组织提取的基因组DNA中的广义伯氏疏螺旋体核酸来进行评定。只有PCR产物在两项测定中被检测到时,动物才能被评为PCR阳性。总而言之,为了判定动物受感染,小鼠需要培养物、PCR或血清学呈阳性。

[0678] 表征感染性疏螺旋体属-可能时,培养感染性有机体并且确定OspA残基38至262(阿氏疏螺旋体VS461,基因库登录号Z29087)的OspA序列和推导的氨基酸序列。将这一信息与OspA参考序列进行比较,这样使得能够推断出OspA类型和疏螺旋体属种类。对于表达单个OspA血清型的种类来说,种类的所述类型菌株的OspA序列被选作参考,例如,阿氏疏螺旋体VS461或法雷斯疏螺旋体VS116(基因库登录号Z29087;AF095940)。由于伽氏疏螺旋体具有多个OspA类型,所以使用OspA基因型3至7的OspA序列(即,菌株PBr、PTrob、WABSou、T1sI以及T25;基因库登录号分别是X80256、X80186、X85441、X85440以及X80254)。对于基于实时PCR的分类来说,针对血清型特异性序列来检查保藏在基因库中的124种广义伯氏疏螺旋体种类的OspA基因的序列比对并且使用Primer Express 3.0(Applied Biosystems)来设计适合的引物-探针组合。所有的测定都使用通用循环条件在ABI Prism®7900HT序列检测单元上进行操作。

[0679] 通过用rOspA 1/2进行免疫来预防狭义伯氏疏螺旋体(OspA血清型1)感染-用低剂量的两种不同批号的rOspA 1/2抗原进行免疫的所有小鼠产生对免疫原特异性的IgG抗体,如由ELISA所确定。在用含有氢氧化铝的疫苗制剂缓冲液处理的对照小鼠中没有检测到抗体。为了评定这一免疫反应预防狭义伯氏疏螺旋体(即编码血清型1OspA的种类)感染的能力,向小鼠皮内注射狭义伯氏疏螺旋体菌株ZS7的 7×10^4 个细胞。用含有佐剂的缓冲液处理的所有对照小鼠都显示出感染的血清学证据,如由C6ELISA和蛋白质印迹法所证明。用rOspA 1/2抗原进行免疫的小鼠都未受到感染并且来自这些小鼠的血清在两项测定中均呈阴性。少至0.03μg的rOspA 1/2抗原在与作为佐剂的氢氧化铝一起配制并且以双剂量免疫方案施用时赋予针对强毒的狭义伯氏疏螺旋体菌株ZS7的针攻击的100%的保护作用($P < 0.0001$, Fisher精确双边检验)。

[0680] 通过用rOspA 1/2进行免疫来预防阿氏疏螺旋体(OspA血清型2)感染-为了评定用rOspA 1/2抗原免疫对预防阿氏疏螺旋体(即编码血清型2OspA的种类)感染的能力,在两个独立的实验中用与上文所描述的针攻击实验中使用的相同抗原批号和研究设计来对小鼠进行免疫。然而,在这种情况下,经过免疫的小鼠被已知主要感染上阿氏疏螺旋体的野生蜱虫(幼虫)攻击。通过攻击未接受免疫的对照动物来确认这些野生蜱虫将广义伯氏疏螺旋体传播到小鼠的能力。

[0681] 大多数对照小鼠(总计11/14, 79%)受到感染。所有受感染的对照动物通过两项独立的实时PCR测定(16S rRNA和OspA基因)对于疏螺旋体属DNA来说呈阳性。在10/11个病例中,可能通过膀胱的培养而使疏螺旋体属分离。剩余小鼠通过血清学和PCR呈现出阳性。对于9/10的培养分离物来说,获取OspA序列并且所有序列均被分类成阿氏疏螺旋体(>99% OspA序列同一性)。此外,使用特异靶向血清型2OspA基因的实时PCR测定,所有感染性有机体通过从心脏提取的DNA的PCR分析被分类成阿氏疏螺旋体。这些数据证实阿氏疏螺旋体是从受感染的野生蜱虫传播到它们的小鼠宿主的主要疏螺旋体属种类。

[0682] 用rOspA 1/2进行免疫的少数小鼠(总计3/32,9%)受到感染。在这三只小鼠中,一只小鼠经由所有三种诊断标准(血清学、PCR和培养物)确定受到感染并且序列分析透露出感染性有机体是伽氏疏螺旋体血清型6(>99%OspA序列同一性)。认为受到感染的剩余两只动物仅就三个标准中的两个来说呈阳性。一只小鼠通过血清学和PCR呈现出阳性。然而,感染性有机体无法在培养物中获取。不过,使用对于血清型7OspA基因来说具有特异性的PCR,这一有机体通过从心脏提取的DNA的PCR分析可以被分类成伽氏疏螺旋体血清型7。第三只小鼠是PCR和培养物呈阳性,但血清学呈阴性。从这个小鼠培养的分离物是雷斯疏螺旋体,如由序列测定(与法雷斯疏螺旋体菌株VS116的OspA序列同一性)所确定。重要的是,接受免疫的小鼠未(0/32)感染上阿氏疏螺旋体。少至0.03μg的rOspA 1/2抗原在与作为佐剂的氢氧化铝一起配制并且以双剂量免疫方案施用时赋予了针对由野生蜱虫传播的阿氏疏螺旋体的全面保护。

[0683] 结论-设计成含有来自两种不同OspA血清型(1和2)的保护元件的单个重组外膜蛋白A(OspA)抗原能够诱导保护小鼠对抗狭义伯氏疏螺旋体(OspA血清型1)或阿氏疏螺旋体(OspA血清型2)的感染的抗体反应。在针攻击模型中证明了针对狭义伯氏疏螺旋体菌株ZS7的感染的保护作用。在使用野生蜱虫的蜱虫攻击模型中显示出针对阿氏疏螺旋体种类的保护作用。在两个模型中,少至0.03μg的抗原在以氢氧化铝作为佐剂,以双剂量免疫时程表施用时足以提供针对所靶向的种类的完全保护。正如预期的那样,由这一新型抗原提供的保护无法扩展到其它疏螺旋体属种类,如通过抗原无法提供针对伽氏疏螺旋体和法雷斯疏螺旋体菌株的感染的保护作用来证明。原理研究的这一证据证明保护性表位的知识可以用来合理设计有效且经过基因修饰的需要较少OspA抗原的疫苗,并且表明这种方法可以促进可全球使用的OspA疫苗的发展。

[0684] 实施例10

[0685] 小鼠抗OSPA抗体结合至活疏螺旋体属的表面或抑制所述疏螺旋体属生长的效率与针对使用狭义伯氏疏螺旋体类型1菌株进行的针攻击的保护作用相关

[0686] 本研究的目的是在使用狭义伯氏疏螺旋体OspA类型1菌株进行的针攻击模型中建立对用rOspA 1/2抗原免疫的小鼠的保护作用的相关物。分析的参数是抗OspA抗体结合至活疏螺旋体属的表面或抑制疏螺旋体属的生长的效力。

[0687] 在激发-加强方案中慎重地用佐剂为0.2%的AI(OH)₃的次佳的3ng剂量(比在实施例9中所使用的较低剂量低10倍)的rOspA 1/2抗原对98只小鼠进行免疫,以便在攻击后,观察受保护和受感染的动物。使用100μl的剂量体积在第0、14以及28天进行皮下疫苗接种。在第38天,从96只小鼠中取得预攻击血清样品,并且在10天之后用狭义伯氏疏螺旋体ZS7生长的19.4×ID₅₀的培养物的攻击动物,并且在四周之后确定感染状态。在用所述低剂量抗原进行免疫之后,发现96只小鼠中有71只(72%)是受到保护的。

[0688] 取得攻击后四周的血液以便通过针对狭义伯氏疏螺旋体菌株ZS7的膜部分对它们的血清进行蛋白质印迹法,从而鉴定受感染的小鼠。在使用攻击剂量时,只有受感染的小鼠对菌株ZS7的膜抗原而非OspA(疫苗诱导的针对OspA的反应没有计分)具有抗体反应。

[0689] 量化结合至活疏螺旋体属的表面的OspA抗体-在这一测定中,在室温下在存在EDTA下,在固定稀释倍数(1:100)下用预攻击小鼠血清培育表达OspA类型1的狭义伯氏疏螺旋体菌株B31,以便防止补体活化。在进行洗涤以去除未结合的抗体之后,通过用r-藻红蛋

白偶联的抗小鼠Ig多克隆抗体培育经过处理的细胞来标记特异地结合至细胞表面的抗体。随后,使用发出红色荧光的DNA染色剂(LDS-751),借此来增强检测,并且然后通过流式细胞术(FACSCalibur, Beckton-Dickinson)来分析细菌。针对至少2000种单个疏螺旋体属记录与附接至细胞表面的抗体分子数目相关联的荧光强度,并且计算平均荧光强度(MFI)。正常的小鼠血清充当阴性对照以便评估抗体的非特异性表面结合的程度,而OspA血清型1-特异性mAb充当阳性对照以便确认OspA类型的的身份并且验证细胞在细菌培养物中的OspA表达水平。

[0690] 细菌生长抑制测定-为了测量预攻击血清抑制疏螺旋体属生长的效力,将表达OspA类型1的狭义伯氏疏螺旋体菌株B31在存在补体(正常的豚鼠血清)下,在存在连续稀释的热灭活预攻击或非免疫小鼠血清(阴性对照)下,在33℃下进行培养。在用非免疫血清培育的对照培养物中的细菌充分地生长时(如从微观上确定),通过流式细胞术分析进行准确的细胞计数。将细胞培养物与含有规定数目的经过荧光标记的珠粒的溶液混合并且将DNA染料添加至荧光标记的疏螺旋体属细胞。使用FACSCalibur流式细胞仪来处理样品直到100个珠粒被计数,并且通过比较限定珠粒的门内的事件数目和限定疏螺旋体属的门内的事件数目来计算绝对细胞浓度(细胞/ml)。计算与NMS对照相比,抑制50%的细菌生长的血清稀释倍数并且报告为GI-50效价。使用标准的血清制剂来归一化在不同测定之间的效价。通过非参数曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U test) (Graphpad Prism 5.0版)比较受感染和受保护动物之中的经过测量的血清参数的分布。

[0691] 本研究的结果(参见图19)明确证明了在攻击时的免疫血清的功能性抗体含量与针对狭义伯氏疏螺旋体(ZS7)的高剂量($19.4 \times ID_{50}$)针攻击的感染的保护作用之间存在高度显著的相关性。在用预攻击血清以固定稀释倍数培育细菌之后进行的表达OspA类型1的活疏螺旋体属的基于FACS的荧光强度测量与保护作用最相关($p < 0.0001$ 曼-惠特尼U检验),所述荧光强度测量反映了附接至细胞表面的抗OspA抗体分子的数目。然而,生长抑制效价还与保护作用高度显著地相关($p = 0.0002$ 曼-惠特尼U检验,图19)。

[0692] 实施例11

[0693] 小鼠抗OSPA抗体结合至活疏螺旋体属表面或抑制生长的效率与针对使用阿氏疏螺旋体类型2菌株进行的蜱虫攻击的保护作用相关

[0694] 本研究的目的是在蜱虫攻击模型中建立对用嵌合OspA 1/2抗原进行免疫的小鼠的保护作用的相关物,所述模型利用天然感染途径:通过使用从捷克共和国布德斯韦收集的野生蜱虫来感染小鼠。由于来自这一地方性区域的幼蜱虫主要感染上阿氏疏螺旋体,所以认为所述幼蜱虫可提供阿氏疏螺旋体OspA类型2菌株攻击。如在实施例10中所陈述,分析的参数是抗OspA抗体结合至活疏螺旋体属的表面或抑制疏螺旋体属的生长的效力,两个参数显示出针对狭义伯氏疏螺旋体的针攻击的良好的相关性。因此,本研究用于扩展使用这两个参数作为针对阿氏疏螺旋体(即欧洲最主要的人类疾病相关同基因型种)的天然感染的保护作用的相关物的适用性。

[0695] 在激发-加强免疫方案中用佐剂为0.2%的Al(OH)₃的次佳的3ng剂量(比在实施例9中所使用的较低剂量低10倍)的rOspA 1/2抗原对40只小鼠进行免疫。如在实施例10中,选择这一次佳剂量以便于确保在攻击之后观察受保护和受感染的动物。使用100μl的注射体积在第0、14以及28天进行皮下疫苗接种。在第40天,从小鼠中取得单个血样样品以便产生

预攻击血清。由于可获得的有限数目的蜱虫不允许攻击所有40只小鼠，所以基于表面结合和抗类型2IgG浓度选择20只小鼠以便覆盖宽范围的反应。将8只蜱虫应用于每只小鼠并且允许所述蜱虫依靠小鼠进食5天。在攻击四周之后，处死小鼠，并且通过针对来自狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体以及伽氏疏螺旋体的膜抗原，对血清进行的蛋白质印迹法，来自膀胱的疏螺旋体属有机体的培养物以及来自从膀胱提取的DNA的疏螺旋体属的实时PCR检测来确定接受免疫的小鼠和对照小鼠的感染状态。

[0696] 量化结合至活疏螺旋体属的表面的OspA抗体-在这一测定中，在室温下，在存在EDTA下，在固定稀释倍数(1:100)下用预攻击小鼠血清培育表达OspA类型2的阿氏疏螺旋体菌株Arcon，以便防止补体活化。在进行洗涤以去除未结合的抗体之后，通过用r-藻红蛋白偶联的抗小鼠Ig多克隆抗体培育经过处理的细胞来标记特异地结合至细胞表面的抗体。在测定中的所有后续步骤均是和在实施例10中所描述的那些步骤相似。正常的小鼠血清充当非特异性抗体结合的阴性对照。针对三组分rOspA疫苗制剂培养的高效价小鼠血清连同OspA血清型2特异性mAbs一起充当阳性对照，以便确认OspA血清型的特异性和细胞在细菌培养物中的OspA表达水平。

[0697] 细菌生长抑制测定-为了测量预攻击血清抑制疏螺旋体属生长的效力，将表达OspA类型2的阿氏疏螺旋体菌株Arcon在不存在补体情况下，在存在连续稀释的热灭活预攻击或非免疫小鼠血清(阴性对照)下，在33℃下进行培养。在用非免疫血清培育的对照培养物中的细菌充分地生长时(如从微观上确定)，通过流式细胞术分析进行准确的细胞计数。用于计数细菌的程序与前文描述的用于实施例10中的生长抑制测定的程序相似。计算与NMS对照相比，抑制50%的细菌生长的血清稀释倍数并且报告为GI-50效价。使用标准的血清制剂来归一化在不同测定之间的效价。

[0698] 统计分析-通过非参数曼-惠特尼U检验(Graphpad Prism 5.0版)比较受感染和保护动物之中的经过测量的血清参数的分布。

[0699] 结果-在用0.003pg的rOspA 1/2进行三次免疫且受到8只野生蜱虫攻击的20只动物中，发现有7/20(35%)受到感染。由于有限的蜱虫可用性，所以不可能通过攻击未接受免疫的小鼠的对照组来确定攻击的精确的感染率。然而，这一攻击并不是本研究的目的所需要的，并且在用来自布德斯韦的野生蜱虫的攻击实验中典型地达成了70%至80%的感染率。

[0700] 对于表面结合($p=0.007$)和生长抑制($p=0.03$)测定的结果来说，在受保护和受感染组之间检测出显著差异(图20)。

[0701] 结论-在本研究中，已显示出在攻击时的小鼠血清中的功能性抗体含量与针对野生蜱虫攻击(向每只小鼠应用8只蜱虫)的感染的保护作用之间存在统计学上显著的相关性。在用预攻击血清以固定稀释倍数培育细菌之后进行的表达OspA类型2的活疏螺旋体属的基于FACS的荧光强度测量与保护作用最相关，所述荧光强度测量反映了附接至细胞表面的抗OspA抗体分子的数目。生长抑制效价与保护作用也充分相关。与要求补体用于有效杀伤的狭义伯氏疏螺旋体菌株相比之下，rOspA1/2抗原诱导甚至在不存在补体下也有效抑制疏螺旋体属生长的抗体。

[0702] 实施例10和11中呈现的研究结果合起来可建立在两个实施例中作为“保护作用的相关物”的活疏螺旋体属的表面结合抗体的平均荧光强度(MFI)和免疫小鼠血清GI-50效价的体外参数，在所述两个实施例中，主动小鼠保护模型当前是可获得的(例如，即，狭义伯氏

疏螺旋体OspA类型1菌株的针攻击模型和阿氏疏螺旋体OspA类型2菌株的蜱虫攻击模型。此外,在不存在用于评估针对表达OspA类型3至6的同源伽氏疏螺旋体菌株的保护作用的可靠的主动保护模型下,通过推断,上文提及的模型可以用作体外“保护作用的替代标记”,以便评估表达所有疫苗同源OspA类型的菌株和甚至是表达异源OspA类型的那些菌株的各种疫苗制剂的保护潜力和交叉菌株覆盖度。事实上,在对来自用三组分嵌合rOspA疫苗制剂进行免疫的小鼠的免疫血清进行使用这些功能性免疫反应测定的研究时,则针对伽氏疏螺旋体(OspA类型3、4、5、6)获得具有可比性的MFI和GI-50效价(参见实施例13),因此通过保护作用的这些替代标记指示还实现了针对菌株的保护性反应,对于所述菌株来说,当前不存在主动小鼠保护模型。此外,通过比较用以下内容进行免疫的小鼠的免疫反应:(a)单个嵌合rOspA抗原,(b)或可能的二组分嵌合rOspA抗原疫苗制剂组合中的任何一种,或(c)三组分嵌合rOspA抗原制剂,可能显示出需要后面的三组分疫苗来最佳覆盖表达OspA类型1至6的菌株(实施例14)。而且,通过使用这些体外替代标记测定,可能显示出在用三组分嵌合rOspA疫苗制剂(rOspA 1/2、rOspA 6/4以及rOspA 5/3)对小鼠进行免疫之后产生的免疫反应确实诱导针对迄今为止测试的类型1、2、3、5以及6的所有型内变体(或亚型)(参见实施例15),和甚至针对除了疫苗内存在的同源OspA类型1至6以外的异源OspA类型(参见实施例16)的功能性免疫反应。

[0703] 实施例12

[0704] 包含3种抗原(1/2、6/4以及5/3)的多价重组OSPA制剂在小鼠中具有较高的免疫原性

[0705] 在蜱虫攻击模型中评估了多价OspA疫苗(rOspA 1/2、rOspA 5/3以及rOspA 6/4)。含有来自OspA血清型1和2(SEQ ID NO:2)、OspA血清型6和4(SEQ ID NO:4)以及OspA血清型5和3(SEQ ID NO:6)的保护性表位的三种重组OspA抗原被组合在疫苗中。

[0706] 用固定剂量0.3μg多价疫苗(rOspA 1/2、rOspA 5/3以及rOspA 6/4各0.1μg)在第0天和第28天对十只雌性C3H/HeJ小鼠组(免疫时的年龄:11周)进行皮下免疫。用来自捷克共和国布德斯韦的蜱虫如本文以上所描述的进行蜱虫攻击。野生蜱虫将广义伯氏疏螺旋体传播到小鼠的能力是通过攻击未接受免疫的对照动物来确认。受到攻击的小鼠的感染状态是通过蛋白质印迹法、实时PCR和通过培养物来确定。

[0707] 在第41天通过眼窝穿刺取得中期血液样品。最终血液样品(第70/71天)是通过心脏穿刺收集。单个血清是通过离心作用(10分钟;1000-2000xG;RT)从全血制备。血清是在≤-20℃下进行储存直到使用。

[0708] 在这个实验中,从用于攻击小鼠的相同批次中取得的未进食的蜱虫被表征以便确定总感染率并且确认感染有机体的种类。在通过16SrRNA实时PCR针对是否存在广义伯氏疏螺旋体DNA对80只幼蜱虫进行测试时,发现32.5%(26/80)的幼蜱虫受到感染。OspA血清型可以通过PCR-ELISA针对26只受感染幼虫中的22只来确定;86%(19/22)幼虫被分类成伽氏疏螺旋体并且14%(3/22)幼虫被分类成狭义伯氏疏螺旋体。

[0709] 所有未接受免疫的对照小鼠(100%;10/10)都受到感染,而用多价rOspA疫苗进行免疫的小鼠中只有一只(10%;1/10)受到感染。用于鉴定受感染小鼠的不同方法之间存在100%的一致性。在与对照组相比时,多价rOspA疫苗产生统计学上高度显著的保护作用(p=0.00012;Fisher精确双边检验)。

[0710] 这些数据显示用含有rOspA 1/2抗原的多价rOspA疫苗进行的免疫能够预防阿氏疏螺旋体(表达血清型2OspA的疏螺旋体属种类)的感染。此外,不存在其它rOspA抗原的含入对rOspA 1/2抗原提供的保护性免疫性具有拮抗作用的证据。

[0711] 这种疫苗提供针对阿氏疏螺旋体的蜱虫传播的感染的保护作用,所述保护作用与对于OspA 1/2抗原所观察到的保护作用等效;与0.2%A1(OH)3一起配制并以双剂量时程表施用的0.3 μ g疫苗(每种抗原0.1 μ g)提供90%的保护作用,如通过蛋白质印迹法、疏螺旋体属的培养物以及通过PCR的疏螺旋体属DNA的检测所确定。

[0712] 实施例13

[0713] 包含三组分疫苗(OspA 1/2、OspA 6/4以及OspA 5/3)的疫苗诱导高水平的结合至表达OspA类型1至6的疏螺旋体属菌株并抑制所述菌株生长的功能性抗OspA抗体

[0714] 由于在针攻击(狭义伯氏疏螺旋体)模型(实施例10)和蜱虫攻击(阿氏疏螺旋体)小鼠模型(实施例11)中均显示表面结合(MFI)与生长抑制(GI-50效价)是保护作用的良好相关物,所以进行本研究来确定三组分嵌合rOspA抗原疫苗制剂是否针对伽氏疏螺旋体OspA血清型3至6诱导等效功能性免疫反应,对于伽氏疏螺旋体OspA血清型3至6,无体内保护作用模型可用来研究疫苗的效力。

[0715] 小鼠免疫-用组合有0.2%A1(OH)3作为佐剂的rOspA-1/2、rOspA-6/4以及rOspA-5/3的1:1:1混合物以三种不同剂量(每个剂量1 μ g、0.1 μ g、0.03 μ g蛋白)对10只雌性C3H/HeJ小鼠组进行三次(第0天、第14天、第28天)皮下免疫。血清从在第40天取得的血液样品产生。

[0716] 量化结合至活疏螺旋体属的表面的OspA抗体。在这一测定中,在室温下在存在EDTA下,在固定稀释倍数(1:100)下用峰值效价小鼠血清的池培育表达OspA类型1至6的六种代表性疏螺旋体属菌株(狭义伯氏疏螺旋体B31/OspA-1;阿氏疏螺旋体Arcon/OspA-2;伽氏疏螺旋体PBr/OspA-3;伽氏疏螺旋体DK6/OspA-4;伽氏疏螺旋体W/OspA-5;以及伽氏疏螺旋体KL11/OspA-6)的体外生长培养物,以便预防补体活化。随后的洗涤、标记、检测以及分析程序与在实施例10中所描述的那些程序相似。正常的小鼠血清充当抗体的非特异性结合的阴性对照。

[0717] 细菌生长抑制测定。为了测量预攻击血清抑制疏螺旋体属生长的效力,将表达OspA类型1至6的六种代表性菌株(B31、Arcon、PBr、DK6、W以及KL11)在存在连续稀释的热灭活峰值效价血清池或非免疫小鼠血清(阴性对照)下在33 $^{\circ}$ C下进行培养。B31是在存在补体(豚鼠血清)下进行培养,而其它五种菌株是在不存在补体下进行测试。生长抑制测定是再次如在实施例10中所描述的进行。使用标准的血清制剂来将不同测定之间的效价归一化。

[0718] 抗OspA抗体反应的表面结合和生长抑制效率。在用源自于三组分疫苗的不同免疫剂量组(每剂量1.0 μ g、0.1 μ g以及0.03 μ g蛋白)的三种血清池在1:100的稀释倍数下进行测试时,观察所有六种疏螺旋体属菌株的MFI值在50至200范围内的强荧光染色(图21)。在针对抑制细菌生长的能力测试来自3个剂量组的血清池时,还发现三组分疫苗诱导了针对所有六种OspA类型菌株的强大的GI-50效价,所述效价在1000(类型4菌株,0.03 μ g剂量)至20000(类型6菌株)范围内。

[0719] 结论。这些结果合起来证明rOspA抗原具有较高的免疫原性并且诱导大量的可以结合至活疏螺旋体属的表面且抑制疏螺旋体属生长的功能性抗体。由于检测到高荧光强度和高生长抑制效价(与观察到的OspA类型1和2的水平可比),所以在经过测试的六种菌株之

间的覆盖是完全的。总的来说,本研究中呈现的结果指示在与A1 (OH) 3一起配制时由三组分rOspA疫苗(1/2+5/3+6/4)诱导的抗体反应可预防表达OspA类型1至6的菌株的感染,如流行病学研究所示,所述三组分rOspA疫苗理论上覆盖了引起欧洲和北美洲人类疾病的超过99%的分离物并且因此在预防莱姆疏螺旋体病中是高度有效的。

[0720] 实施例14

[0721] 需要包含三组分疫苗(OspA 1/2、OspA 6/4以及OspA 5/3)的疫苗来最佳覆盖表达OspA类型1至6的疏螺旋体属

[0722] 本研究的目的是研究和比较由rOspA莱姆疏螺旋体病疫苗的单组分和多组分制剂诱导的功能性表面结合和/或生长抑制抗体的免疫原性和交叉菌株覆盖度,本研究再次将抗OspA抗体结合至活疏螺旋体属的表面和体外抑制疏螺旋体属的生长的效率用作保护作用的相关物。

[0723] 免疫小鼠。在激发-加强免疫方案中,用以下各物对每组的十只雌性小鼠(C3H)进行免疫:包含rOspA 1/2抗原、rOspA 6/4抗原或rOspA 5/3抗原的0.1 μ g单组分疫苗;包含0.1 μ g 1/2+5/3抗原、0.1 μ g 1/2+6/4抗原或0.1 μ g 5/3+6/4抗原的二组分疫苗;或包含佐剂为0.2%AI (OH) 3的所有三种1/2+5/3+6/4抗原的0.1 μ g组合的三组分疫苗。使用200 μ l的剂量体积在第0、14以及28天进行皮下疫苗接种。在第42天,从小鼠取得单个血液样品以便产生血清。

[0724] 抗体表面结合和生长抑制测定。略加修改形式的表面结合测定被用于确定抗OspA IgG结合至活疏螺旋体属的表面的效率。分析中包括血清池的具有规定的MFI效价的连续稀释液,以便在用非线性回归曲线进行插值之后产生可读出测试血清的相对效价的标准曲线。表达OspA类型1至6的单个菌株的标准血清的MFI效价被定义为最高稀释倍数,在所述最高稀释倍数下疏螺旋体属的荧光强度被确定为大于正常的小鼠血清所观察到的荧光强度的至少3倍。所有的测定都是以一式两份来进行。

[0725] 图22中呈现的散点图比较了对于在用单一个rOspA抗原或rOspA抗原组合进行免疫之后的单个C3H小鼠的免疫血清所观察到的,针对表达同源OspA类型的六种菌株的MFI效价。结果显示出含有所有三种rOspA抗原(1/2、5/3以及6/4)的制剂对于诱导针对表达OspA类型1至6的所有六种疏螺旋体属菌株的高MFI效价来说是必要的,并且主要由两种rOspA抗原(即,覆盖四种菌株)组成的制剂并未完全覆盖表达制剂中不存在的两种OspA类型的菌株。

[0726] 为了确定各种疫苗组合诱导生长抑制抗体的效力,将分别表达OspA类型1至6的六种代表性疏螺旋体属菌株(B31、Arcon、PBr、DK6、W、KL11)在存在热灭活免疫或非免疫小鼠血清池下在33 $^{\circ}$ C下进行培养。所有的血清都是在单一的稀释倍数下进行测试。使用了以下稀释倍数:B31、PBr和KL11为1:200,Arcon、DK6和W为1:100。PBr是在不存在20%补体下进行培养,而其它5种菌株是在存在补体下进行测试。幼兔补体是用于DK6、W以及KL11,而豚鼠血清是用于B31和Arcon。在用非免疫血清培育的对照培养物中的细菌充分地生长时(如从微观上确定),如以上所述进行准确的细胞计数(参见实施例10)。细菌生长抑制的百分比是由用测试血清观察到的细胞计数相对于正常小鼠血清对照的细胞计数来计算。然后,对于被测试的不同制剂观察到的总生长抑制被呈现为显示超过50%生长抑制的十只C3H小鼠的不同组之中的动物数目(图23)。结果证明三组分制剂是能够诱导针对表达OspA类型1至6的所

有六种代表性菌株的高效价生长抑制抗体的唯一制剂(图23)。在所有情况下,三组分疫苗制剂在>90%的接受免疫的动物中提供>50%的生长抑制。二组分疫苗制剂无法完全覆盖表达疫苗中不存在的OspA类型的两种菌株。包含rOspA 1/2+6/4的制剂不覆盖类型3菌株;包含rOspA 1/2+5/3制剂的制剂不覆盖类型4或6;并且包含rOspA 5/3+6/4的制剂不覆盖类型1。

[0727] 实施例15

[0728] 多价OSPA疫苗制剂覆盖表达OSPA类型1至6的型内变体或亚型的疏螺旋体属

[0729] 虽然疏螺旋体属OspA类型1至6被选作设计和构建多价rOspA疫苗的基础,但也分离出表达类型1、2、3、5以及6的OspA蛋白变体的疏螺旋体属。这些变体尽管被分类成在相同类型中,但它们具有轻微改变的核苷酸基因序列和氨基酸蛋白序列。因此,型内变体或亚型存在于OspA类型1、2、3、5以及6之中(参见图24)。还未观察到OspA类型4的型内变体或亚型。

[0730] 本研究的目的是确认通过用三组分多价rOspA疫苗对小鼠进行免疫而产生的免疫血清含有可结合至表达这些型内变体或亚型的活疏螺旋体属的表面的功能性抗体。

[0731] 对于本研究来说,池集的小鼠免疫血清是通过在第0、14和28天用0.3μg的三组分多价rOspA疫苗对70只雌性C3H小鼠进行三次免疫而产生。在第42天,小鼠被放血并且获得并池集血清。然后使用池集的免疫血清来测试抗体与活疏螺旋体属的表面的结合。用免疫血清池或对照正常小鼠血清在1:100下一式二份培育疏螺旋体属培养物,并且通过如本文以上所述的FACS分析来监控测量抗OspA抗体与细菌的结合的疏螺旋体属的荧光强度。

[0732] 针对表达OspA亚型1至6的大多数菌株,在1:100的血清稀释倍数下检测高水平的表面结合抗体(定义荧光强度比对于未接受免疫的小鼠对照血清所观察到的荧光强度大10倍)。具体来说,表达OspA亚型1a、1b、1c、1d、1f、1h、1j、1k以及1l,2a、2b、2e、2g、2k、2l以及2n,3a、3c、3d以及3e,5a和5c,以及6a、6e、6f、6g以及6k的疏螺旋体属菌株检测到了高水平的抗体结合(图24)。表达OspA亚型1g、2j、2m、3b、5d以及6l的疏螺旋体属菌株观察到弱结合(定义为荧光强度在对于未接受免疫的小鼠对照血清所观察到的荧光强度的2倍至10倍之间)(图24),但这种弱结合主要是因为OspA蛋白在使用的生长条件下的低表达。

[0733] 结论。三组分嵌合rOspA疫苗诱导针对C3H小鼠中OspA类型1、2、3、5以及6的所有型内变体或亚型的功能性表面结合抗体。

[0734] 实施例16

[0735] 多价OSPA疫苗制剂提供针对除了表达OSPA类型1至6的那些疏螺旋体属之外的其它类型的疏螺旋体属的保护

[0736] 本研究的目的是确定三组分嵌合rOspA抗原疫苗制剂(包含所有三种嵌合抗原-1/2、6/4以及3/5)是否也能够提供针对表达除了非同源OspA类型1至6以外的OspA类型的疏螺旋体属的保护作用。在第0、14和28天用0.3μg三组分疫苗对40只C3H小鼠进行三次免疫。在第42天,小鼠被放血,并且制作血清池并且使用所述血清池来评估表面结合和生长抑制(针对表达异源OspA类型的菌株)效率。

[0737] 本研究的结果显示出三组分嵌合rOspA疫苗确实可诱导结合至疏螺旋体属的表面且抑制其它类型的疏螺旋体属的生长的抗体,所述其它类型的疏螺旋体属包括斯柏曼疏螺旋体、法雷斯疏螺旋体、卢西塔尼疏螺旋体以及日本疏螺旋体的菌株(参见表9)。就表达OspA类型7的伽氏疏螺旋体而论,仅观察到弱表面结合并且观察到很少或未观察到生长抑制;然而,这种弱结合和少量的生长抑制可能归因于OspA在所使用的体外培养条件下的低

表达水平,而不是归因于缺少免疫血清抗体的结合。

[0738] 表9.表面结合和针对其它类型的疏螺旋体属的生长抑制

[0739]	基因型	伽氏疏螺旋体	斯柏曼疏螺旋体	法雷斯疏螺旋体	卢西塔尼疏螺旋体	日本疏螺旋体
		OspA-7	体	螺旋体	螺旋体	螺旋体
	表面结合	(+)	+	+	+	+
	生长抑制	-	+	+	+	+

[0740] +:显著的表面结合和/或生长抑制

[0741] -:没有显著的结合/生长抑制

[0742] (+-):低强度表面结合

[0743] 实施例17

[0744] 多价OSPA疫苗制剂将抗体诱导至OSPA分子N末端处的可以促进针对表达疏螺旋体属菌株的任何OSPA的保护作用共同表位

[0745] 在研究多价嵌合rOspA制剂的保护效力的过程期间,针对包含rOspA-1/2和rOspA-6/4的二组分rOspA疫苗产生了单克隆抗体(F237/BK2)。通过抗OspA ELISA显示F237/BK2结合至目前为止研究的所有OspA类型(OspA类型1-7),以及结合至三种嵌合rOspA抗原(rOspA-1/2、rOspA-5/3以及rOspA-6/4)。所述结果指示F237/BK2识别在所有OspA分子上发现的共有表位。此外,初步表位定位研究指示这种共有表位是位于分子的较少变化的N末端半上(即,在氨基酸130的N末端处),其中最常观察到OspA序列同源性。

[0746] 有趣的是,还显示F237/BK2结合至表达同源OspA类型1至6和异源OspA类型的疏螺旋体属的表面,所述异源OspA类型包括由斯柏曼疏螺旋体、法雷斯疏螺旋体以及日本疏螺旋体表达的那些类型,尽管所述结合的效率要低于针对C末端类型特异性表位的单克隆抗体。使用与以上实施例中描述的那些方法相似的方法,还发现F237/BK2抑制表达OspA类型1、2、4、5以及6的代表性菌株的生长。

[0747] 在小鼠中在体内被动保护模型中测试F237/BK2时,观察到F237/BK2赋予针对野生蜱虫攻击(对应于阿氏疏螺旋体类型2攻击)的保护作用。蜱虫是在Wundschuh(施蒂利亚(Styria),奥地利)收集的,已知所述地区主要受阿氏疏螺旋体感染。用500 μ g亲和纯化的mAbF237/BK2对十只雌性C3H小鼠进行腹膜内注射。两小时之后,以每只动物8只蜱虫,将蜱虫应用于10只被动免疫的小鼠和10只假免疫的动物。四天之后,将进过食的蜱虫去除。在第90天,处死小鼠并且如本文以上所述通过血清学测试、PCR分析和疏螺旋体属培养物来针对感染进行分析。在用F237/BK2处理的组中没有动物受到感染,而在对照组中有5只动物(50%)感染上阿氏疏螺旋体。因此,在与假免疫对照小鼠相比时,单克隆抗体F237/BK2提供针对蜱虫攻击的统计学上显著的被动保护作用($p=0.0325$)。这是结合至分子的N末端半上的共同表位的单克隆抗体第一次被报道涉及在保护作用中。此外,如果疫苗能够诱导识别这一共同表位的抗体,那么所述抗体当然会促进疫苗的交叉保护效力。

[0748] 为了测试所述抗体是否确实是由三组分嵌合rOspA疫苗制剂诱导,采用过氧化物酶标记的F237/BK2进行单克隆抗体抑制ELISA。在这些实验中,GST-OspA类型3蛋白被用作

涂布抗原,并且将正常的小鼠血清或来自用三组分嵌合rOspA疫苗进行三次免疫的C3H小鼠的血清池以1:100的稀释倍数添加至孔中。六十分钟之后,将过氧化物酶标记的F237/BK2以预优化的浓度进行添加以便最终给出对于非抑制正常小鼠血清对照来说接近1的光密度(OD)值,并且另外继续培育60分钟。最终,对ELISA盘进行洗涤并且用TMB底物使所述ELISA盘显影。

[0749] 使用这种单克隆抗体抑制ELISA测定,可以证明三组分嵌合rOspA制剂确实诱导结合至与由mAb F237/BK2识别的表位一致或密切接近的表位的抗体。与非抑制正常小鼠血清对照相比,抗OspA免疫血清显著降低了OD值(例如,典型降低了20-30%)。

[0750] 结论。本研究显示出三组分嵌合rOspA疫苗能够诱导类型特异性免疫反应和广泛的交叉保护性免疫反应。

[0751] 实施例18

[0752] 其它合成OSPα核酸和多肽分子

[0753] 本研究的目标是设计分别包含血清型1和2、6和4以及5和3的其它新型OspA抗原。三种合成OspA基因(SEQ ID NO:168(orig sOspA1/2)、170(orig sOspA 6/4)以及172(orig sOspA 5/3))被设计成编码具有来自疏螺旋体属的OspA血清型1和2(orig sOspA 1/2)、OspA血清型6和4(orig sOspA 6/4)以及OspA血清型5和3(orig sOspA 5/3)的保护性表位的OspA多肽分子。表1中提供了这些分子(分别是SEQ ID NO:169、171以及173)的一级氨基酸序列。这些序列包含原始嵌合构建体,即,不具有突变和不具有密码子优化的嵌合构建体。

[0754] 实施例19

[0755] 包含3种抗原(1/2、6/4以及5/3)的多价重组oSPα制剂在小鼠中具有免疫原性

[0756] 在蜱虫攻击模型中评估了包含原始构建体制剂(orig OspA 1/2、orig OspA 5/3以及orig OspA 6/4)的多价OspA疫苗,所述原始构建体制剂不具有密码子优化并且不具有突变。在疫苗中组合含有来自OspA血清型1和2(SEQ ID NO:169)、OspA血清型6和4(SEQ ID NO:171)以及OspA血清型5和3(SEQ ID NO:173)的保护性表位的三种重组OspA抗原。

[0757] 用固定剂量0.3μg多价疫苗(orig OspA 1/2、orig OspA 5/3以及origOspA 6/4各0.1μg)在第0天和第28天对十只雌性C3H/HeJ小鼠组(免疫时的年龄:11周)进行皮下免疫。用来自捷克共和国布德斯韦的蜱虫如本文以上所述进行蜱虫攻击。野生蜱虫将广义伯氏疏螺旋体传播到小鼠的能力是通过攻击未接受免疫的对照动物来确认。受到攻击的小鼠的感染状态是通过蛋白质印迹法、实时PCR和通过培养物来确定。

[0758] 在第41天通过眼窝穿刺取得中期血液样品。最终血液样品(第70/71天)是通过心脏穿刺收集。单个血清是通过离心作用(10分钟;1000-2000xG;RT)从全血制备。血清是在≤-20℃下进行储存直到使用。

[0759] 在这个实验中,从用于攻击小鼠的相同批次中取得的未进食的蜱虫被表征以便确定总感染率并且确认感染性有机体的种类。

[0760] 实施例20

[0761] 包含三组分疫苗(oRIG oSPα 1/2、oRIG oSPα 6/4以及oRIG oSPα 5/3)的疫苗诱导结合至表达OSPα类型1至6的疏螺旋体属菌株并抑制所述菌株生长的高水平的功能性抗OSPα抗体

[0762] 实施例13中呈现的结果指示与Al(OH)₃一起配制的三组分rOspA疫苗(lipB sOspA1/2+lipB sOspA 5/3+lipB sOspA 6/4)诱导的抗体反应可预防表达OspA类型1至6的菌株的感染,并且因此在预防莱姆疏螺旋体病中是有效的。因此,进行本研究来确定等效功能性免疫反应是否是由包含嵌合原始(orig)OspA抗原(Orig sOspA1/2+Orig sOspA 5/3+Orig sOspA 6/4)的三组分OspA疫苗诱导。

[0763] 小鼠免疫。用组合有0.2%Al(OH)₃作为佐剂的Orig sOspA1/2+Orig sOspA 5/3+Orig sOspA 6/4的1:1:1混合物以三种不同剂量(每个剂量1μg、0.1μg、0.03μg蛋白)对10只雌性C3H/HeJ小鼠组进行三次(第0天、第14天、第28天)皮下免疫。血清从在第40天取得的血液样品产生。

[0764] 量化结合至活疏螺旋体属的表面的OspA抗体。在这一测定中,在室温下在存在EDTA下,在固定稀释倍数(1:100)下用峰值效价小鼠血清的池培育表达OspA类型1至6的六种代表性疏螺旋体属菌株(狭义伯氏疏螺旋体B31/OspA-1;阿氏疏螺旋体Arcon/OspA-2;伽氏疏螺旋体PBr/OspA-3;伽氏疏螺旋体DK6/OspA-4;伽氏疏螺旋体W/OspA-5;以及伽氏疏螺旋体KL11/OspA-6)的体外生长培养物,以便预防补体活化。随后的洗涤、标记、检测以及分析程序与在实施例10和13中所描述的那些程序相似。正常的小鼠血清充当抗体的非特异性结合的阴性对照。

[0765] 细菌生长抑制测定。为了测量预攻击血清抑制疏螺旋体属生长的效力,将表达OspA类型1至6的六种代表性菌株(B31、Arcon、PBr、DK6、W以及KL11)在存在连续稀释的热灭活峰值效价血清池或非免疫小鼠血清(阴性对照)下在33℃下进行培养。B31是在存在补体(豚鼠血清)下进行培养,而其它五种菌株是在不存在补体下进行测试。生长抑制测定如在实施例10和13中描述的进行。使用标准的血清制剂来将在不同测定之间的效价归一化。

[0766] 抗OspA抗体反应的表面结合和生长抑制效率。在用源自于三组分疫苗的不同免疫剂量组(每剂量1.0μg、0.1μg以及0.03μg蛋白)的三种血清池在1:100的稀释倍数下进行测试时,测量所有六种疏螺旋体属菌株的荧光染色。

[0767] 实施例21

[0768] 需要包含三组分疫苗(ospa 1/2、ospa 6/4以及ospa 5/3)的疫苗来最佳覆盖表达OspA类型1至6的疏螺旋体属

[0769] 本研究的目的是研究和比较由Orig sOspA莱姆疏螺旋体病疫苗的单组分和多组分制剂诱导的功能性表面结合和/或生长抑制抗体的免疫原性和交叉菌株覆盖度,本研究将抗OspA抗体结合至活疏螺旋体属的表面和体外抑制疏螺旋体属的生长的效率用作保护作用的相关物。

[0770] 免疫小鼠。在激发-加强免疫方案中,用以下各物对每组的十只雌性小鼠(C3H)进行免疫:包含Orig sOspA1/2抗原、Orig sOspA 5/3抗原或Orig sOspA 6/4抗原的0.1μg单组分疫苗;包含1/2+5/3抗原0.1μg、1/2+6/4抗原0.1μg或5/3+6/4抗原0.1μg的二组分疫苗;或包含佐剂为0.2%Al(OH)₃的所有三种1/2+5/3+6/4抗原的0.1μg组合的三组分疫苗。使用200μl的剂量体积在第0、14以及28天进行皮下疫苗接种。在第42天,从小鼠中取得单个血液样品以便产生血清。

[0771] 抗体表面结合和生长抑制测定。略加修改形式的上文描述的表面结合测定被用于确定抗OspA IgG结合至活疏螺旋体属的表面的效率。分析中包括血清池的具有规定的MFI

效价的连续稀释液,以便在用非线性回归曲线进行插值之后产生可读出测试血清的相对效价的标准曲线。表达OspA类型1至6的单个菌株的标准血清的MFI效价被定义为最高稀释倍数,在所述最高稀释倍数下疏螺旋体属的荧光强度被确定为大于正常的小鼠血清所观察到的荧光强度的至少3倍。所有的测定都是以一式两份来进行。

[0772] 为了确定各种疫苗组合诱导生长抑制抗体的效力,将分别表达OspA类型1至6的六种代表性疏螺旋体属菌株(B31、Arcon、PBr、DK6、W、KL11)在存在热灭活免疫或非免疫小鼠血清池下在33℃下进行培养。所有的血清都是在单一的稀释倍数下进行测试。使用了以下稀释倍数:B31、PBr和KL11为1:200,Arcon、DK6和W为1:100。PBr是在不存在20%补体下进行培养,而其它5种菌株是在存在补体下进行测试。幼兔补体是用于DK6、W以及KL11,而豚鼠血清是用于B31和Arcon。在用非免疫血清培育的对照培养物中的细菌充分地生长时(如从微观上确定),如以上所述进行准确的细胞计数(参见实施例10)。细菌生长抑制的百分比是由用测试血清观察到的细胞计数相对于正常小鼠血清对照的细胞计数来计算。然后,对于被测试的不同制剂观察到的总生长抑制被呈现为显示超过50%生长抑制的十只C3H小鼠的不同组之中的动物数目。

[0773] 实施例22

[0774] 多价OspA疫苗制剂覆盖表达OspA类型1至6的型内变体或亚型的疏螺旋体属

[0775] 本研究的目的是确认通过用三组分多价orig OspA疫苗(orig sOspA 1/2、orig sOspA 6/4以及orig sOspA 5/3)对小鼠进行免疫而产生的免疫血清含有可结合至表达这些型内变体或亚型的活疏螺旋体属的表面的功能性抗体。

[0776] 对于本研究来说,池集的小鼠免疫血清是通过在第0、14和28天用0.3μg三组分多价orig OspA疫苗对70只雌性C3H小鼠进行三次免疫而产生。在第42天,小鼠被放血并且获得并池集血清。然后使用池集的免疫血清来测试抗体与活疏螺旋体属的表面的结合。用免疫血清池或对照正常小鼠血清在1:100下一式二份培育疏螺旋体属培养物,并且通过如本文以上所述的FACS分析来监控测量抗OspA抗体与细菌的结合的疏螺旋体属的荧光强度。

[0777] 已经按照被发现或者提出包含用于实践本发明的特定模式的实施方案对本发明进行了描述。在不背离本发明的范围和精神下,所描述的发明的各种修改和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。虽然已结合特定实施方案描述了本发明,但应理解的是,所要求的发明不应不适当地局限于所述特定实施方案。事实上,对相关领域技术人员来说显而易见的用于进行本发明的所描述模式的各种修改意图在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 巴克斯特国际公司
巴克斯特医疗保健股份有限公司
纽约州立大学研究基金会
布鲁克海文科学联合有限责任公司

<120> 嵌合 OSPA 基因和其使用方法

<130> 31315/44557A2

<150> 61/354,901

<151> 2010-05-14

<160> 173

<170> PatentIn 第 3.5 版

<210> 1

<211> 829

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0001]

<223> 合成核苷酸

<400> 1

catatgcgtc tgitgategg ctttgcctcg gcgtggcgc tgcggtgctg cgcacagaaa	60
ggcgctgagt ctattggctc cgtttcigta gatctgcccg gtgaaatgaa ggttctggcg	120
agcaagaaaa aagacaagaa cggcaagtac gatctcatcg caaccgtcga caagctggag	180
ctgaagagta cttctgataa aaacaacggc tcgggtgtgc tggagggcgt caaaactaac	240
aagagcaaaag taaagcttac gatctctgac gatctcggc agaccacgt ggaagtcttc	300
aaagaggatg gcaagacct cgtgtccaaa aaagtaactt ccaagacaa gtcctctacg	360
gaagaaaaat tcaacgaaaa aggtgaggcg tcgaaaaaga tcatcaccat ggcagacggc	420
accgctcttg aatacacggc tattaaaagc gatggtaccg gtaaagegaa atatgtctcg	480
aaaaacttca ctctggaagg caaagtggt aatgataaaa ccaccttgga agtcaaggaa	540
ggcaccttta ctctgagcat gaatatctcc aaatctggcg aagtttccgt tgaactgaac	600

gacactgaca gcagcgtgc gactaaaaaa actgcagcgt ggaattccaa aaattctact 660
 itaaccattt gegttaacag caaaaaaact acccagctgg tgttactaa acaagacacg 720
 atcactgtgc agaaatacga ctccgcaggc accaacttag aaggcacggc agtcgaaatt 780
 aaaacccttg atgaactgaa aaacgcgctg aaataagctg agcggaicc 829

<210> 2
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 2

Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly Cys
 1 5 10 15

[0002]

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

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

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

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

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

Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val Thr

100	105	110
Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly Glu		
115	120	125
Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Met Ala Asp Gly Thr Arg Leu Glu Tyr		
130	135	140
Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu Lys		
145	150	155 160
Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp Lys Thr Thr Leu Glu		
165	170	175
Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Met Asn Ile Ser Lys Ser Gly		
180	185	190
[0003]		
Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala Ala Thr Lys		
195	200	205
Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val		
210	215	220
Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln Asp Thr Ile		
225	230	235 240
Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Thr Ala		
245	250	255
Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu Lys		
260	265	270

<210> 3

<211> 832
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

<400> 3

```

cataatgcgtc igttagatcgg ctttgcctcg gcgctggctc tgatcggtcg cgcacagaaa      60
gggtgctgagt ctattggttc cgtttctgta gatctgcccg gtggcatgac cgttctggtc      120
agcaaagaaa aagacaaaaa cggtaaatac agcctcgagg cgaccgtga caagcttgag      180
ctgaaaggca cctctgataa aaacaacggt tccggcaccg tggagggtga aaaaactaac      240
aaaagcaaag tgaaactgac caatgctgat gacctcagcc agaccaaatt cgaaattttc      300
aaagaagatg ccaaaacctt agtatccaaa aaagtgaccc tgaaagacaa gtcctctacc      360
gaagaasaat tcaacgaaaa gggtgaaacc tctgaaaaaa ccatcgtaat ggcaaatggt      420
[0004] accegtctgg aatacaccca catcaaaagc gatggctccg gcaaagccaa atacgttcig      480
aaagaattca ccttggaagg caccctcgct gccgacggca aaaccaacctt gaaagttacc      540
gaaggcaactg tigtitttaag catgaacatc ttaaaatccg gtgaaatcac cgttgcgtcg      600
gatgaactcg acaccactca ggccaactaa aaaaccggca aatgggattc taacaattcc      660
actctgacca tcagcgtgaa ttccaaaaaa actaaaaaca tegtgttcc caaagaagac      720
accatcaccc tccagaaata cgactctgcg ggcaccaacc tcgaaggcaa cgcagtcgaa      780
atcaaaaccc tggatgaact gaaaaacgct ctgaaataag ctgagcggat cc      832

```

<210> 4
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 4

Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

[0005]

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

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

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

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

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

Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr Thr Leu

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

[0006]

<210>	5	
<211>	829	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成核苷酸	
<400>	5	
catatgcgtc tgttgatcgg ctttgetttg gccttggett taatcggtg tgcacagaaa		60
ggtgctgagt ctattggttc cgtttctgta gatctgccg ggggtatgaa agttctggta		120
agcaaaagaaa aagacaaaaa egglaaatac agcctgatgg caaccgtaga aaagciggag		180
cttaaaggca ctctgataa aaacaacggt tctggcaccc tggaaggta aaaaactaac		240

```

aaaagcaaag taaagcttac tattgctgag gatctgagca aaaccacett tgaaatcttc      300
aaagaagatg gcaaaactct ggatctctaa aaagtaaccc tgaaagacaa gtcttctacc      360
gaagaaaaat tcaacgaaaa gggtgaaatc tctgaaaaaa ctatcgtaat ggcaaatggt      420
acccgtcttg aatacaccca catcaaaagc gataaaaccg gcaaagctaa atacgttctg      480
aaagacitta ctctggaagg cactctggct gctgacggca aaaccacict gaaagttacc      540
gaaggcactg ttactctgag catgaacatt tctaaatccg gcgaaatcac cgttgcactg      600
gatgacactg actctagcgg caataaaaaa tccggcacct gggattctga tacttctact      660
ttaaccatta gcaaaaacag ccagaaaact aaacagctgg tattcaccaa agaaaacact      720
atcaccttac agaactataa ccgtgcaggc aatgcgctgg aaggcagccc ggetgaaatt      780
aaagatctgg cagagctgaa agccgetttg aaataagctg agcggatcc      829

```

[0007]

<210> 6
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 6

Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly Cys
 1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys Gly Thr Ser

50	55	60
Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys Thr Asn Lys		
65	70	75 80
Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Glu Asp Leu Ser Lys Thr Thr Phe		
85	90	95
Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val Thr		
100	105	110
Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly Glu		
115	120	125
Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val Met Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu Tyr		
130	135	140
[0008]		
Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu Lys		
145	150	155 160
Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr Thr Leu		
165	170	175
Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Met Asn Ile Ser Lys Ser		
180	185	190
Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp Ser Ser Gly Asn Lys		
195	200	205
Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Asp Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys		
210	215	220
Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile		

225	230	235	240
Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu Glu Gly Ser Pro			
245	250	255	
Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Lys Ala Ala Leu Lys			
260	265	270	

<210> 7
 <211> 784
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

<400> 7

[0009]

catatggcac agaaaggtgc tgagtctatt ggttccgttt ctgtagatct gcccggtgaa	60
atgaagggttc tggtagagcaa agaaaaagac aagaacggca agtacgatct catcgcaacc	120
gtcgacaagc tggagctgaa aggtacttct gataaaaaca acggetctgg tgtgctggag	180
ggcgtcaaaa ctaacaagag caaagtaaag ctiacgatct ctgaegatct cggtcagacc	240
acgctggaag ttitcaaaga ggatggcaag accctegtgt ccaaaaaagt aacttccaaa	300
gacaagtcct ctacggaaga aaaattcaac gaaaaaggtg aggtgtctga aaagatcate	360
accatggcag acggeaccgc tcttgaatac accggtatta aaagegatgg taccggtaaa	420
gcgaaatatg ttctgaaaaa cticactctg gaaggcaaag tggetaatga taaaaccacc	480
ttggaagtea aggaaggcac cgttactctg agcatgaata tctccaaate tggagaagtt	540
tccgttgaac tgaacgacac tgacagcagc gctgcgacta aaaaaactgc agcgtggaat	600
tccaaaactt ctactttaac catltagctt aacagcaaaa aaactiaccca gctggigtte	660
actaacaag acacgatcac tgtgcagaaa taagactcca acggcaccaa cttagaaggc	720

acggcagtcg aaattaaaac ccttgatgaa ctgaaaaacg cgetgaaata agetgagcgg 780

atcc 784

<210> 8

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 8

Met Ala Gln Lys Gly Ala Glu Ser Ile Gly Ser Val Ser Val Asp Leu
1 5 10 15

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

[0010]

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

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

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

Leu Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val
85 90 95

Thr Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly
100 105 110

Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Met Ala Asp Gly Thr Arg Leu Glu

115	120	125
Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu		
130	135	140
Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp Lys Thr Thr Leu		
145	150	155 160
Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Met Asn Ile Ser Lys Ser		
165	170	175
Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala Ala Thr		
180	185	190
Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser		
195	200	205

[0011]

Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln Asp Thr		
210	215	220
Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Thr		
225	230	235 240
Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu Lys		
245	250	255

<210> 9

<211> 787

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 9

catatggcac agaaagggtgc tgagtctatt ggttcctgtt ctgtagatct gcccggtggc	60
atgaccgttc tggtcagcaa agaaaaagac aaaaacggta aatacagcct cgaggcgacc	120
gtcgacaagc ttgagctgaa aggcacctct gataaaaaca acggttcggg cacccttgaa	180
ggtgaaaaaa ctaacaaaag caaagtgaag ctgaccattg ctgatgacct cagccagacc	240
aaattcgaaa ttttcaaaga agatgccaaa acctagttat ccaaaaaagt gacctgaaa	300
gacaagtect ctaccgaaga aaaattcaac gaaaagggtg aaacctctga aaaaaccatc	360
gtaatggcaa atggtaaccg tciggaatac accgacatca aaagcgatgg ctccggcaaa	420
gccaaataag ttctgaaaga cttcaccctg gaaggcacc ctcgtgccga cggcaaaacc	480
accttgaaag ttaccgaagg cactgttgtt ttaagcatga acatctttaa atccggtgaa	540
atcacctgtg cgtctgata ctctgacacc actcaggcca ctaaaaaaac cggcaaatgg	600
gattctaaca ctccactct gaccatcagc gtgaattcca aaaaaactaa aaacatcgtg	660
ttcaccaaag aagacaccat caccgtccag aaatacgact ctgcgggcac caacctcgaa	720
ggcaacgcag tcgaaatcaa aacctggat gaactgaaaa acgtctgaa ataagctgag	780
cggatcc	787

[0012]

<210> 10

<211> 256

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 10

Met	Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Glu	Ser	Ile	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Asp	Leu
1			5						10					15	

Pro Gly Gly Met Thr Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys Asn Gly

20	25	30
Lys Tyr Ser Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys Gly Thr		
35	40	45
Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys Thr Asn		
50	55	60
Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Gln Thr Lys		
65	70	75 80
Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Ala Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val		
85	90	95
Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly		
100	105	110
[0013]		
Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Met Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu		
115	120	125
Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu		
130	135	140
Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr Thr		
145	150	155 160
Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Met Asn Ile Leu Lys		
165	170	175
Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr Gln Ala		
180	185	190
Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu Thr Ile		

	195	200	205
Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys Glu Asp			
210	215	220	
Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly			
225	230	235	240
Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu Lys			
245	250	255	

<210> 11
 <211> 784
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0014] <220>
 <223> 合成核苷酸

<400> 11
 catatggcac agaaaggtgc tgagtctatt gggtccgttt ctgtagatct gcccgggggt 60
 atgaaagtgc tggttaagcaa agaaaaagac aaaaacggta aatacagcct gatggcaacc 120
 gtagaaaagc tggagcttaa aggcacttct gataaaaaca acggttcctgg caccctggaa 180
 ggtgaaaaaa ctaacaaaag caaagtaaag cttaactattg ctgaggatct gagcaaaacc 240
 acctttgaaa tcttcaaga agatggcaaa actctgggat ctaaaaaagt aaccctgaaa 300
 gacaagtctt ctaccgaaga aaaattcaac gaaaagggtg aaatctctga aaaaactatc 360
 gtaatggcaa atggtaccgc tctggaatac accgacatca aaagcgataa aaccggcaaa 420
 gctaaatacg ttctgaaaga ctttactctg gaaggcactc tggctgctga cggcaaaacc 480
 actctgaaag ttaccgaagg cactgttact ctgagcatga acatttctaa atccggcgaa 540
 atcacggttg cactggatga cactgaactc agcggcaata aaaaatccgg caccctgggat 600

tctgatactt ctactttaac cattagcaaa aacagccaga aaactaaaca gctggatttc 660
 accaaagaaa acactatac acgtacagaac tataaccgtg caggcaatgc gctggaaggc 720
 agccccgctg aaattaaaga tctggcagag ctgaaagccg ctttgaaata agctgagcgg 780
 atcc 784

<210> 12
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 12

Met Ala Gln Lys Gly Ala Glu Ser Ile Gly Ser Val Ser Val Asp Leu
 1 5 10 15

[0015]

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

Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys Gly Thr
 35 40 45

Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys Thr Asn
 50 55 60

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

Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val
 85 90 95

Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly

100	105	110
Glu Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val Met Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu		
115	120	125
Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu		
130	135	140
Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr Thr		
145	150	155 160
Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Met Asn Ile Ser Lys		
165	170	175
Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp Ser Ser Gly Asn		
180	185	190
Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Asp Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser		
195	200	205
Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr		
210	215	220
Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu Glu Gly Ser		
225	230	235 240
Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Lys Ala Ala Leu Lys		
245	250	255

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly
1 5 10 15

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 14

tcggggctgg cttaactatg

20

[0017]

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 15

gcttcgget cgtat

15

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 16

gcttcgget cgtatgttgt

20

	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 17	
	ttatgctagt tattgctcag cg	22
	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 18	
[0018]	ttccctcta gaaataattt tgt	23
	<210> 19	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 19	
	ggaattccat atgcgtctgt tgategget	29
	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	

	<400> 20	
	ttggtgctg cggagtcg	18
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 21	
	aatacgaactc cgcaggcacc	20
	<210> 22	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0019]	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 22	
	ctgggatacgc ctcagcttat ttea	24
	<210> 23	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 23	
	cgtgcgtacc atatggcaca gaaaggtgct gagtct	36
	<210> 24	
	<211> 9	
	<212> PRT	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 24

Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala
1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 25

[0020] Lys Glu Lys Asp Lys Asn
1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 26

Lys Thr Asn Lys Ser Lys
1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 27

Lys Glu Lys Asn Lys Asp

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Lys Glu Lys Asp Lys Asp

1 5

[0021]

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 29

Lys Ala Asp Lys Ser Lys

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 30

Lys Thr Asp Lys Ser Lys
1 5

<210> 31

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 31

catatgcgtc tgttgatcgg ctttgcctcg gcgctggctc tgateggctg cgcacagaaa 60

<210> 32

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 32

catatggcac agaaa 15

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 33

Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly Cys
1 5 10 15

[0022]

Ala Gln Lys

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 34

Met Ala Gln Lys

1

<210> 35

<211> 50

<212> DNA

[0023] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 35

gcacaaacag ccagaaaact aaacagctgg tattcaccaa agaaaacact

50

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 36

gcacaaacag ccagaaaact aaacagctgg g

31

<210> 37

<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 37
aattcaaaca gctggtattc accaaagaaa acact 35

<210> 38
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 38
gatcactgtg cagaaatacg aciccaacgg caccaactta gaaggeacgg cagtc 55

[0024]

<210> 39
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 39
gatcactgtg cagaaatacg aciccgacgg caccaactta gaaggeacgg cagtc 55

<210> 40
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 40

	gatcactgtg cagaaatacg actccggcac caacttagaa ggcaaggcag tc	52
	<210> 41	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 41	
	cgactccgca ggcaccaa	18
	<210> 42	
	<211> 813	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0025]	<223> 合成核苷酸	
	<400> 42	
	atgagattat taataggatt tgccttagcg ttagctttaa taggatgtgc acaaaaaggt	60
	gcigagtcaa tiggatccgt ttcagtagat ttgcctgggtg aaatgaaagt tcttgtaage	120
	aaagaaaaag acaaaaacgg caagtagcat ctaattgcaa cagtagacaa gcttgagctt	180
	aaaggaactt ctgataaaaa caatggatct ggagtacttg aaggcgtaaa aactaacaaa	240
	agtaaagtaa aattaacaat ttctgacgat ctaggtcaaa ccacacttga agtittcaaa	300
	gaagatggca aaacactagt atcaaaaaaa gtaacttcca aagacaagtc atcaacagaa	360
	gaaaaattca atganaaagg tgaagtatct gaaaaataa taacaatggc agacggaacc	420
	agacttgaat acacaggaat taaaagcgat ggaactggaa aagctaaata tgttttaaaa	480
	aatlttactc ttgaaggaaa agtagctaat gataaaacaa catiggaagt aaaagaagga	540
	accgttactt taagtatgaa tatttcaaaa tctggggaag tticagttga acttaatgac	600

	actgacagta gtgetgetac taaaaaaact gcagcttigga attcaaaaac ttctacttta	660
	acaattagtg ttaacagcaa aaaaactaca caacttgigt ttactaaaca agacacaata	720
	actgtacaaa aatacgactc caacggtacc aatttagaag gcacagcagt cgaaattaaa	780
	acacttgatg aacttaaaaa cgcittaaaa taa	813
	<210> 43	
	<211> 826	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 43	
	atggctctgt tgateggett tgctctggcg ctggetctga tggctgcgc acagaaaggt	60
	gttgagtcta tiggttccgt ttctgtagat ctgcccggtg aaatgaaggt tcigtgagc	120
[0026]	aaagaaaaag acaagaacgg caagtacgat ctcatcgcaa ccgtcgacaa gctggagctg	180
	aaaggtaactt ctgataaaaa caacggetct ggigtgctgg agggcgicaa aactaacaag	240
	agcaaagtaa agcttacgat ctctgacgat ctcggtcaga ccacgcigga agttttcaaa	300
	gaggatgcea agacctcgt gtccaaaaaa gtaacttcca aagacaagtc ctctacggaa	360
	gaaaaattca acgaaaaagg tgagggtgct gaaaagatca tcaccatgga agacggcacc	420
	cgtcttgaat acaccggtat taaaagegat ggtaccggtg aagegaaata tgttctgaaa	480
	aacttcactc tggaaggcaa agtggetaat gataaaacca ccttgaagt caaggaagga	540
	accgttactc tgagcatgaa tatctccaaa tctggtgaag ttccggtga actgaacgac	600
	actgacagca gcgtcgac taaaaaaact gcagcgtgga attcaaaaac ttctacttta	660
	accattagcg ttaacagcaa aaaaactacc cagciggigt tcaactaaaca agacacgaic	720
	actgtgcaga aatacgactc cgcaggcacc aacttagaag gcacggcagt cgaaattaaa	780

acccttgatg aactgaaaaa cgcgctgaaa taagctgagc ggatec 826

<210> 44

<211> 818

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 44

atatgagatt attaatagga ttigettttag cgttagcttt aataggatgt gcacaaaaag 60

gtgctgagtc aattggatcc gtttcagtag atttacctgg tggaatgaca gttcttgtaa 120

gtaaagaaaa agacaaagac ggtaaataca gtctagaggc aacagtagac aagcttgage 180

ttaaaggaac ttctgataaa aacaacggtt ctggaacact tgaaggigaa aaaactgaca 240

aaagtaaagt aaaatttaaca attgctgatg acctaaagtc aactaaattt gaaattttca 300

[0027]

aagaagatgc caaaacatta gtatcaaaaa aagtaacctt taaagacaag tcatcaacag 360

aagaaaaatt caacgaaaag ggtagaacat ctgaaaaaac aatagtaaga gcaaatggaa 420

ccagacttga atacacagac ataaaaagcg atggatccgg aaaagctaaa gaagtittaa 480

aagacttiac tcttgaagga acctagctg ctgacggcaa aacaacattg aaagttacag 540

aaggcactgt tgttittaage aagaacattt taaaatecgg agaaataaca gtigcacttg 600

atgactciga cactactcag gctactaaaa aaactggaaa atgggattca aatacttcca 660

ctttaacaat tagtgtgaat agcaaaaaaa ctaaaaacat tgtatttaca aaagaagaca 720

caataacagt acaaaaaaac gactcagcag gcaccaatct agaaggcaac gcagtcgaaa 780

ttaaaacact tgatgaactt aaaaacgctt taaaataa 818

<210> 45

<211> 831

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 45

atatgcgtct gttagtcggc ttgtctctgg cgtcggcctc gatcggctgc gcacagaaag	60
gtgtcgtagtc tattggttcc gtttctgtag atctgcccggtc tggcatgacc gttctgtgta	120
gcaaagaaaa agacaaaaac ggtaaataca gcctcgaggc gaccgtcgac aagcttgagc	180
tgaaaggcac ctctgataaa aacaacgggt cgggcaccct ggaaggigaa aaaactaaca	240
aaagcaaagt gaaactgacc attgctgatg acctcagcca gaccaaattc gaaatttca	300
aagaagatgc caaaaccita gtatccaaaa aagtgaccct gaaagacaag tctctaccg	360
aagaaaaatt caacgaaaag ggtagaacct ctgaaaaaac catcgtaatg gcaaatggta	420
cccgtctgga atacaccgac atcaaaagcg atggtccggc caaagccaaa tacgttctga	480
[0028] aagaattcac cctggaaggc acctcgtctg ccgacggcaa aaccaccttg aaagtaccg	540
aaggcacigt tgttttaagc atgaacatct taaaatccgg tgaaatcacc gtgcgtctgg	600
atgactctga caccactcag gccactaaaa aaaccggcaa atgggattct aacacttcca	660
ctctgaccat cagcgtgaat tccaaaaaaa ctaaaaacat cgtgttcacc aaagaagaca	720
ccatcacctt ccagaaatac gactctgcgg gcaccaacct cgaaggcaac gcagtcgaaa	780
tcaaaaccct ggatgaactg aaaaacgtc tgaaataagc tgagcggatc c	831

<210> 46

<211> 816

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 46

	catatgagat taitaatagg atttgctita gcgtagctt taataggatg tgcacaaaaa	60
	ggigctgagt caatiggatc cgtttcagta gatttacctg gtggaatgaa agttcttgta	120
	agtaaagaaa aagacaaaga tggtaaatac agtetaatgg caacagtaga aaagcttgag	180
	cttaaaggaa ctctgataa aaacaacggt tctggaacac ttgaaggta aaaaactgac	240
	aaaagtaaag taaaattaac aattgctgag gatctaagta aaaccacatt tgaatcttc	300
	aaagaagatg gcaaaacatt agtatcaaaa aaagtaaccc ttaaagacaa gtcataaca	360
	gaagaaaaat tcaacgaaaa ggggtgaaata tctgaaaaaa caatagtaag agcaaatgga	420
	accagacttg aatacacaga cataaaaagc gataaaaacc gaaaagetaa agaagtttta	480
	aaagacttta ctctgaagg aactctagct gctgacggca aaacaacatt gaaagttaca	540
	gaaggcactg ttactttaag caagaacatt tcaaaatccg gagaaataac agttgcactt	600
	gatgacactg actctagcgg caataaaaaa tccggaacat gggattcaga tacttctact	660
[0029]	ttaacaattia gtaaaaacag tcaaaaact aaacaacttg tattcacaaa agaaaacaca	720
	ataacagtac aaaactataa cagagcagge aatgcgcttg aaggcagccc agctgaaatt	780
	aaagaicttg cagagcttaa agccgcttta aaataa	816

<210> 47

<211> 829

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 47

catatgcgtc tgttgatcgg ctttgctttg gcgctggctt taatcgctg tgcacagaaa	60
--	----

ggigctgagi ctatiggtc cgtttctgta gatcgcgccg ggggtatgaa agtctggta	120
---	-----

agcaaagaaa aagacaaaaa cggtaaatac agcctgatgg caaccgtaga aaagctggag	180
---	-----

```

cttaaaggca ctctgataa aaacaacggt tcctggcacc tggaaggatga aaaaactaac 240
aaaagcaaag taaagcttac tattgctgag gatctgagca aaaccacctt tgaatcttc 300
aaagaagatg gcaaaactct ggtatctaaa aaagtaaccc tgaaagacaa gtctctctac 360
gaagaaaaat tcaacgaaaa gggtgaaatc tcctgaaaaa ctatctgaat ggcaaatggt 420
accctcttgg aatacaccga catcaaaage gataaaaccg gcaaagctaa atactttctg 480
aaagaattta ctctggaagg cactctgget gctgacggca aaaccaetct gaaagtacc 540
gaaggaactg ttactctgag catgaacatt tctaaatccg gcgaaatcac cgttgcactg 600
gatgaacttg actctagcgg caataaaaaa tccggcaact gggattctga tacttctact 660
ttaaccatta gcaaaaacag ccagaaaact aaacagctgg tattcaccaa agaaaacact 720
atcaccttac agaactataa ccgtgcaggc aatgccttgg aaggcagccc ggctgaaatt 780
aaagatcttg cagagctgaa agccgctttg aaataagctg agcggatcc 829

```

[0030]

<210> 48
 <211> 829
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

```

<400> 48
ggatcccttc agcttatttc agcgcgtttt tcagttcacc aagggtttta atttgaactg 60
ccgtgccttc taagttggtg cctgcggagt cgtatttctg cacagtgate gtgtcttggt 120
tagtgaacac cagctgggta gtttttttgc tgttaacgtt aatggtttaa gtagaagttt 180
tggaattcca cgtgcagtt tttttagtcg cagcgtgct gtcagtgtcg ttcagttcaa 240
cggaaacttc accagatttg gagatattca tgcctagagt aacggtgcc tccctgactt 300
ccaagtggtt ttatcatta gccacttgc cttccagagt gaagttttc agaacatatt 360

```

tcgctttacc ggtaccatcg cttttaatac cgggtgtattc aagacgggtg cegtetgeca	420
tggtgatgat cttticagac acctcaacctt tttegttga tttttcttc gtagaggact	480
tgtctttgga agttactttt ttggacaaga gggctetigc atctctttg aaaacttcca	540
cggtggctcg accgagatcg tcagagatcg taagetttac ttgtctttg ttagttttga	600
cgccttcag cacaccagag cegttgtttt tctcagaagt acctttcagc tccagettgt	660
cgacggttgc gatgagatcg tacttgccgt tcttgctttt ttctttgctc accagaacct	720
tcatttccac gggcagatct acagaaacgg aaccaataga ctacagacct ttctgtgcgc	780
agccgatcag agccagcgcc agagcaaage cgatcaacag acgcatacg	829

<210> 49

<211> 832

<212> DNA

<213> 人工序列

[0031]

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 49

ggatccgctc agcttatitc agagcgittt tcagttcacc cagggttttg atttcgactg	60
cgttgccttc gaggttggtg cccgcagagt cgtatttctg gacggtgatg gtgtcttctt	120
tggtgaacac gatgttttta gtttttttgg aattcacgct gatggtcaga gtggaagtgt	180
tagaatccca ttigccggtt tttttagttg cctgagtggt gtcagagtea tccagcgeaa	240
cggtgatttc accggatttt aagatgttca tgettataaac aacagtgcct tcggttaactt	300
tcaaggtggg ttigccgtcg gcagcgaggg tgccttcag ggtgaagtc ttcagaacgt	360
atttggtttt gcggagcca tcgtttttga tgcgggtgta ttccagaagg gtaccatttg	420
ccattacgat ggttttttca gaggtttcac ccttttcgtt gaattttctc tcggtagagg	480
acttgctttt cagggtcact tttttggata ctaaggtttt ggcattctct ttgaaaattt	540

cgaatttggt ctggctgagg tcacagcaa tggtcagttt cactttgctt ttgttagttt 600
 ttacaccttc cagggtgccg gaaccgttgt tttatcaga ggtgcccttc agctcaagct 660
 tgtcgacggc cgcctcgagg ctgtatttac cgtttttgtc tttttcttg ctgaccagaa 720
 cggtcatgcc accgggcaga tctacagaaa cggaaccaat agactcagca cttttctgtg 780
 cgcagccgat cagagccagc gccagagcaa agccgatcaa cagaagcata tg 832

<210> 50

<211> 829

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 50

[0032]

ggatccgctc agcttatttc aaageggctt tcagctctgc cagatcttta attcagccg 60
 ggctgcccttc cagcgcattg cctgcacggc tatagttctg tacggtgata gtgttttctt 120
 tggatgaatac cagctgttta gttttctggtc tgtttttget aatggttaaa gtagaagtat 180
 cagaatccca ggtgccggat tttttatgc cgttagagtc agtgcctcc agtgcacgg 240
 tgatttcgac ggatttagaa atgttcaigc tcagagtaac agtgccttcg gtaactttca 300
 gagtggtttt gccgtcagca gccagagtc cttccagagt aaagtcttc agaacgtatt 360
 tagctttgac ggttttatcg cttttgaigt cgtgttatc cagacgggia ccaittgeca 420
 ttaagatagt ttttcagag atttcacct tttcgttgaa tttttcttc gtagaagact 480
 tgtcttcag ggttaatttt ttagatacca gattttgac atcttcttg aagatttcaa 540
 aggtggtttt gctcagatcc tcagcaatag taagctttac tttgttttg ttagtttttt 600
 caccctccag ggtgccagaa ccgttgltt taccagaagt gcccttaage tccagctttt 660
 ctacggctgc catcaggtg tatttaccgt tttgtcttt tcttttgcct accagaactt 720

tcataceccc gggcagatct acagaaacgg aaccaataga etcageacct ttctgtgcac 780

agccgattaa agccagegcc aaagcaaagc cgateaacag acgcataatg 829

<210> 51

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 51

tttctgtgcg cagccgatca gagccagegc cagagcaaag ccgateaaca gacgcataatg 60

<210> 52

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 52

tttctgtgcc ataatg 15

<210> 53

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 53

agtgttttct ttggtgaata ccagctgttt agttttcttg ctgtttttgc 50

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 54	
	aattccacgc tgtttagttt ttggtgtgtt ttgc	35
	<210> 55	
	<211> 784	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 55	
	gtataccgtg tctttccacg actcagataa ccaaggcaaa gacatctaga cgggccactt	60
	lacttccaag accacitggt tcttttctg ttcttgccgt lcaigtctaga gtagegttgg	120
[0034]	cagctgttcg acctcgactt tccatgaaga ctatttttgt tgccgagacc aacagacctc	180
	cgcagtttt gattgttttc gtttcatttc gaatgctaga gactgctaga gccagtctgg	240
	tgcgaccttc aaaagttttt cctaccgttc tgggagcaca ggttttttca ttgaaggttt	300
	ctgttcagga gatgccttct tttaagtig ctttttccac tccacagaact ttctagtag	360
	tggtaaccgc tgccgtgggc agaacttat tgcccataat ttctctacc atggccattt	420
	cgttttatac aagaattttt gaagtgagac cttecgtttc accgattact attttggtgg	480
	aaacttcagt tctttccgtg gcaatgagac tcgtacttat agaggtttag accacttcaa	540
	aggcaacttg acttgcgtg actgtcgtcg cgaecgtgat tttttgaag tcgcacetta	600
	aggttttgaa gatgaaattg gtaatcgcaa ttgtcgtttt ttgatgggt cgaccacaag	660
	tgatttgttc tgtctagtg aacgtcttt atctgaggt tgccgtgggt gaattcttcg	720
	tgcgcacgc ttttaatttg ggaactactt gactttttgc ggaacttat tcgactcgcc	780

tagg	784
<210> 56	
<211> 787	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成核苷酸	
<400> 56	
gtataccgtg tctttccaag acicagataa ccaaggeaaa gacatctaga cgggccaccg	60
tactggcaag accagtcgtt tctttttctg tttttgccat ttatgtcggg getccgctgg	120
cagcigtctg aactcgactt tccgtggaga ctatttttgt tgccaaggcc gtgggacatt	180
ccactttttt gattgttttc gtttcacitt gactggiaac gactacigga gtcggtctgg	240
tttaagcttt aaaagtittt tctacggttt tggaatcata ggttttttca ctgggacttt	300
[0035] ctgttcagga gatggetttt tttaagttg ctttccac ttgggagact ttttggtag	360
cattaccgtt taccatgggc agaccttatg tggeigtagt tttegtacc gaggcgttt	420
cggtttatgc aagaattttt gaagtgggac ctccgtggg agegacggt gccgttttg	480
tggaactttc aatggettec gtagacaaca aattcgtact tgtagaatti taggccatt	540
tagtggcaac ggcacctact gagactgtg tgagtcggg gatttttttg gccgtttacc	600
ctaagattgt gaaggtgaga ctggtagtc cacttaaggt tttttgati ttgtagcac	660
aagtggtttc ttctgtggtg gtgacaggc tttatgtga gacgccgtg gtggagatt	720
cgttgcgtc agcttttagt ttgggacctt ctgacittt tgcgagactt tttcgactc	780
gcttagg	787
<210> 57	
<211> 784	
<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 57

gtataccgtg tctttccacg acicagataa ccaaggcaaa gacatctaga cgggccccca	60
tactttcaag accattcggt tctttttctg tttttgccat ttatgtcgga ctaccgttgg	120
catcttttcg aectcgaatt tccgtgaaga ctatttttgt tgccaagaac gtgggacctt	180
ccactttttt gattgttttc gtttcatttc gaatgataac gactcctaga ctcgtttttg	240
tggaactttt agaagtttct tctaccgttt tgagaccata gattttttca tigggacctt	300
ctgttcagaa gatggtttct ttttaagttg cttttccac tttagagact tttttgatag	360
cattaccgtt tactatgggc agaccittat tggtcttagt ttctctatt ttggccgttt	420
cgatttatgc aagactttct gaaatgagac cttccgtgag accgacgact gccgttttgg	480
tgagactttc aatggcttcc gtgacaatga gactcgtact tgtaaagatt taggccgttt	540
tagtggaac gtgacctact gtgactgaga tcgccgttat tttttaggcc gtggacctta	600
agactatgaa gatgaaatig gtaacgttt ttgtcggctt ttgatttgt cgaccataag	660
tggtttcttt tttgatagtg gcatgtcttg atattggcac gtccgttacg cgaccttcg	720
tcgggccgac ttttaattct agaccgtctc gactttcggc gaaactttat tcgactcgcc	780
tagg	784

[0036]

<210> 58

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 58

	agtgttttct ttggtgaata ccagctgitt g	31
	<210> 59	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 59	
	tatgctcttg ttgateggct ttgctctggc gctgctctg atcgg	45
	<210> 60	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0037]	<223> 合成核苷酸	
	<400> 60	
	cfcgcacag aaaggtctg agtctattgg ttcgtttct gtagatctgc	50
	<210> 61	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 61	
	ccggigaaat gaaggttctg gtgagcaaag aaaaagacaa gaacggcaag	50
	<210> 62	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	62	
	taagatetca tggcaaccgt cgacaagctg gagctgaaag gtaettetga		50
	<210>	63	
	<211>	56	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	63	
	taaaaacaac ggctctggig tgcctggagg cgtcaaaact aacaagagca aagtaa		56
	<210>	64	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
[0038]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	64	
	agctttacct tgcctctgtt agctttgacg cctccagca		40
	<210>	65	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	65	
	caccagagcc gttgitttta tcagaagtac cttcagctc cagcttgctg		50
	<210>	66	

<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 66
acggttgcga igagatcgta ctigccgttc ttgtcttttt ctttgetcac 50

<210> 67
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 67
cagaaccttc atttcaccgg gcagatctac agaaacggaa ccaatagact 50

[0039]

<210> 68
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 68
cagcaccttt ctgigcgcag ccgacagag ccagcgcag agcaaagccg atcaacagac 60

gca 63

<210> 69
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

	<400> 69 agetttaacgat ctctgacgat ctgggtcaga ccac	34
	<210> 70 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 70 gctggaagtt ttcaaagagg atggcaagac cctcgtgtcc aaaaaagtaa	50
	<210> 71 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
[0040]	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 71 cttccaaaga caagtcctct acggaagaaa aattcaacga aaaaggtgag	50
	<210> 72 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 72 gtgtctgaaa agatcatcac catggcagac ggcaeccgtc	40
	<210> 73 <211> 31 <212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	73	
		ttgaatacac cggatattaaa agegatggta c	31
	<210>	74	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	74	
		catcgctttt aataccggtg tattcaagac gggtgccgic tgccatg	47
[0041]	<210>	75	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	75	
		gtgatgatct ttccagacac ctcacctttt tegttgaatt ttcttccgt	50
	<210>	76	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	76	
		agaggacttg tctttggaag ttactttttt ggacacgagg gtcttgccat	50

	<210> 77	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 77	
	ccctcttgaa aacttcacgc gtggtctgac cgagatcgtc agagatcgta	50
	<210> 78	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 78	
[0042]	cggtaaagcg aaatatgttc tgaaaaactt cactctgga	39
	<210> 79	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 79	
	aggcaaagtg gctaatgata aaaccacctt ggaagtcaag gaaggcaccg	50
	<210> 80	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	

	<400> 80 ttactctgag catgaatata tccaaatctg gtgaagtctt cgttgaactg	50
	<210> 81 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 81 aacgacactg acagcagcgc tgcgactaaa aaaactgcag cgtgg	45
	<210> 82 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
[0043]	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 82 aattccacgc tgcagttttt ttagtcgca	29
	<210> 83 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 83 gcgctgetgt cagtgtcgtt cagttcaacg gaaacttcac cagatttgga	50
	<210> 84 <211> 50 <212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 84

gatattcatg ctcagagtaa cggtagcttc cttagacttcc aaggtggttt

50

<210> 85

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 85

tatcattagc cacittgcct tccagagtga agtttttcag aacatatitc gcttiaccgg

60

tac

63

[0044]

<210> 86

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 86

aattccaaaa cttctacttt aaccattagc gttacagca aaaaa

45

<210> 87

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 87

	actacccegc tgggtgttca taaacaagac acgacacatg tgcagaaata	50
	<210> 88	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 88	
	cgactccaac ggcaccaact tagaaggcac ggcagtcgaa attaaaaccc	50
	<210> 89	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
[0045]	<400> 89	
	ttgatgaact gaaaaacgcg ctgaaataag ctgagcg	37
	<210> 90	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 90	
	gatccgctca gcttatttca gcgcgttttt cagtccatca agggttttta ttctgactgc	60
	c	61
	<210> 91	
	<211> 50	
	<212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	91	
		gtgccttcta agttggtgcc gtgggagteg tatttctgca cagtgategt	50
	<210>	92	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	92	
		gtcttgttta gtaacacca gctgggtagt ttttttgcg ttaacgctaa	50
[0046]	<210>	93	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	93	
		tggttaaagt agaagttttg g	21
	<210>	94	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	94	
		tatgcgtcig tigategget ttgetttgge getggettta ateggetg	48

	<210> 95	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 95	
	tgccacagaaa ggtgctgagt ctattgggtc cgtttctgta gatctgcccg	50
	<210> 96	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 96	
[0047]	ggggtatgaa agttctggta agcaaagaaa aagacaaaaa cggtaaatac	50
	<210> 97	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 97	
	agcctgatgg caaccgtaga aaagctggag cttaaaggca cttctgataa	50
	<210> 98	
	<211> 53	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	

	<400> 98 aaacaacggt tctggcaecc tggaagggtga aaaaactaac aaaagcaaag taa	53
	<210> 99 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 99 agctttactt tgcctttgtt agtittttca ccttcca	37
	<210> 100 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
[0048]	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 100 gggtgccaga accgttgitt ttatcagaag tgcctttaag ctccagcttt	50
	<210> 101 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 101 tctacggttg ccattcaggt gttattaccg tttttgtctt tttctttgct	50
	<210> 102 <211> 50 <212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	102	
		taccagaact ttcatacecc cgggcagatc tacagaaaag gaaccaatag	50
	<210>	103	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	103	
		actcagcaac ttctgtgca cagccgatta	30
[0049]	<210>	104	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	104	
		aagccagcgc caaagcaaag ccgatecaaca gacgea	36
	<210>	105	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	105	
		agcttactat tgcagaggat ctgagcaaaa ccaccttga aatcttc	47

	<210> 106	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 106	
	aaagaagatg gcaaaactct ggtatctaaa aaagtaaccc tgaaagacaa	50
	<210> 107	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 107	
[0050]	gtcttctacc gaagaaaaat tcaacgaaaa gggtgaaate	40
	<210> 108	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 108	
	tctgaaaaaa ctatcgtaat ggc aaatggt ac	32
	<210> 109	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	

	<400> 109 aaggtaggttt tgcacagatc ctcagcaata gta	33
	<210> 110 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 110 agagttttgc catcttcttt gaagatttca	30
	<210> 111 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
[0051]	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 111 atttttcttc ggtagaagac ttgtctttca gggttacttt tttagatacc	50
	<210> 112 <211> 48 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 112 catttgcac tacgatagtt ttttcagaga tttcaccctt ttctgtga	48
	<210> 113 <211> 48 <212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	113	
		ccgtcttgaa tacaccgaca tcaaaagcga taaaaccggc aaagctaa	48
	<210>	114	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	114	
		atacgttctg aaagacttta ctctggaagg cactctggct gctgacggca	50
[0052]	<210>	115	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	115	
		aaaccactct gaaagttacc gaaggcactg ttactctgag catgaacatt	50
	<210>	116	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	116	
		tctaaatcgg gcgaaatcac cgttgcactg gatgacactg actctagcgg	50

	<210> 117	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 117	
	caataaaaaa tcgggcacct gggattctga tacttctact ttaaccatta	50
	<210> 118	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 118	
[0053]	gcataaacag ccagaaaact aaacagctgg g	31
	<210> 119	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 119	
	gcctttgatg tcggtgtatt ccagacgggt ac	32
	<210> 120	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	

	<400> 120 cettccagag taaagtcttt cagaacgtat ttagctttgc cggttttatc	50
	<210> 121 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 121 cagtgccttc gtaactttc agagtggttt tgcgcgcagc agccagagtg	50
	<210> 122 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
[0054]	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 122 cagtgcacac gtagtttgc cggatttaga aatgttcacg ctacagagtaa	50
	<210> 123 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成核苷酸	
	<400> 123 tcagaatccc aggtgccgga tttttattg ccgctagagt cagtgtcacc	50
	<210> 124 <211> 55 <212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	124	
		aattccacgc tgttagttt tctggtgtt ttgctaattg gttaaagtag aagta	55
	<210>	125	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	125	
		aattcaaaca gtgtgtattc accaaagaaa acactatcac cgtac	45
[0055]	<210>	126	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	126	
		agaactataa ccgtgcaggc aatgcgttg aaggcagccc	40
	<210>	127	
	<211>	54	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	127	
		ggctgaaatt aaagatctgg cagagctgaa agccgctttg aaataagctg ageg	54

	<210> 128	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 128	
	gatecgcctca gcttatttca aagcgget	28
	<210> 129	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
[0056]	<400> 129	
	ttcagctctg ccagatcttt aatttcagec ggcctgcctt ccagcgcatt	50
	<210> 130	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 130	
	gcctgcacgg ttatagttct gtacgggtgat agtgttttct ttggtgaata ccagctgttt	60
	g	61
	<210> 131	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	131	
	tatgcgtctg ttgatecggt ttgctctggt gctggctctg atcggtctg		48
	<210>	132	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	132	
	cgcacagaaa ggtgctgagt ctattggttc cgtttctgta gatctgcccg		50
	<210>	133	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
[0057]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	133	
	gtggcatgac cgttctggtc agcaaaagaaa aagacaaaaa cg		42
	<210>	134	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	134	
	gtaaatacag cctcgaggcg accgtcgaca		30
	<210>	135	

<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 135
agcttgtcga cggtcgcctc gaggcgtat ttaccgtttt tgtcttttct ttigtct 56

<210> 136
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 136
gaccagaacg gtcatgccac cgggcagatc tacagaaacg 40

[0058]

<210> 137
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 137
gaaccaatag actcagcacc ttctgtgctg cagccgatac gagccagctc 50

<210> 138
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 138

	cagagcaaag cegatcaaca gagca	26
	<210> 139	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 139	
	agcttgagct gaaaggeacc ttgataaaa acaacggttc cggcaccctg	50
	<210> 140	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0059]	<223> 合成核苷酸	
	<400> 140	
	gaaggtgaaa aaactaaca aagcaaagt aaactgacca ttgctgat	48
	<210> 141	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 141	
	gaaccicagec agaccaaatt cgaaattttc aaagaagatg ccaaaacctt	50
	<210> 142	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	142	
		agtatccaaa aaagtgaccc tgaagacaa gtcctctacc gaagaaaaat	50
	<210>	143	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	143	
		tcaacgaaaa ggggtgaaacc tcgaaaaaa ccategtaaf ggcaaatggt ac	52
	<210>	144	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	144	
		catttgcatt tacgatggtt ttttcaga	28
	<210>	145	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	145	
		ggtttcaccc itttcgttga atttttcttc ggtagaggac	40
	<210>	146	

[0060]

<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 146
ttgtctttca gggtcacttt ttggatact aagggttttg catcttcttt 50

<210> 147
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 147
gaaaatttcg aatttggctt ggcctgaggc atcagcaatg gtcagtttca 50

[0061]

<210> 148
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 148
ctttgctttt gttagttttt tcaccttcca gggcgccgga 40

<210> 149
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 149

	accgttggtt ttatcagagg tgcctttcag ctca	34
	<210> 150	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 150	
	ccgtctggaa tacaccgaca tcaaaagcga tggtccggc aaagccaa	48
	<210> 151	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0062]	<223> 合成核苷酸	
	<400> 151	
	atacgttctg aaagacttca ccttgaagg caccctcget gccgacgg	48
	<210> 152	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 152	
	caaaaccacc ttgaaagtta ccgaaggcac tgttggttta ag	42
	<210> 153	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	153	
		catgaacatc itaaaatccg gtgaaatcac cgttgcgctg	40
	<210>	154	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	154	
		gatgactctg acaccactca ggccactaaa aaaaccggca aatgggattc	50
	<210>	155	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	155	
		taacaattcc actctgacca tcagcgtg	28
	<210>	156	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	156	
		aattcacgct gatggtcaga giggaagtgt tagaatccca ttgccc	47
	<210>	157	

[0063]

<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 157
gttttttttag iggcctgagt ggtgtcagag tcateccagcg caacggtgat ttcac 55

<210> 158
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 158
cggatttttaa gatgttcatg cttaaaacaa cagtgccttc ggtaacttcc 50

[0064]

<210> 159
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 159
aaggtgggtt tgcgctcggc agcgagggtg ccttcaggg 40

<210> 160
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸

<400> 160

	tgaagtccttt cagaacgtat ttggctttgc cggagccatc	40
	<210> 161	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 161	
	gcttttgaag tcggtgtatt ccagacgggt ac	32
	<210> 162	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0065]	<223> 合成核苷酸	
	<400> 162	
	aattccaaaa aaactaaaaa catcgtgttc accaaagaag acaccatcac cg	52
	<210> 163	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 163	
	tccagaaata cgactctgcg ggcaccaacc tcgaaggeaa cgcagtcgaa	50
	<210> 164	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	164	
		atcaaaaaccc tggatgaact gaaaaacgct ctgaaataag ctgagcg	47
	<210>	165	
	<211>	71	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	165	
		gatecgctca gcttatttca gacggttttt cagtccatcc agggttttga tttegactgc	60
		gttgccttcg a	71
[0066]	<210>	166	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	166	
		ggttgggtcc cgcagagtcg tattctgga cggatggtt gcttctttg	50
	<210>	167	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成核苷酸	
	<400>	167	
		gtgaacacga tgttttttagt ttttttgg	28

<210> 168
 <211> 822
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

<400> 168
 atgaaaaaat atttattggg aatagggtcta atattagcct taatagcatg taagcaaaat 60
 gtttagcagcc ttgacgagaa aaacagcggt tcagtagatt tgcctgggga aatgaaagtt 120
 cttgtaagca aagaaaaaaa caaagacggc aagtacgac taattgcaac agtagacaag 180
 cttgagctta aaggaacttc tgataaaaac aatggatctg gactacttga aggcgtaaaa 240
 gctgacaaaa gtaaagtaaa attaacaatt tctgacgac taggtcaaac cacacttgaa 300
 gttttcaag aagatggcaa aacactagta tcaaaaaaag taacttccaa agacaagtca 360
 [0067] tcaacagaag aaaaattcaa tgaaaaaggt gaagtatctg aaaaaaiaat aacaagagca 420
 gacggaacca gacttgaata cacaggaatt aaaagcgaig gatctggaaa agctaaagag 480
 gttttaaaaa acttiactct tgaaggaaaa gtagctaag ataaagtaac attggaagta 540
 aaagaaggaa cgttactit aagtaaaaat atttcaaaat ctggggaagt ttcagttgaa 600
 cttatgaca ctgacagtag tgctgctaet aaaaaaactg cagcttgga ttcaaaaact 660
 tctactttaa caattagtgt taacagcaaa aaaactaac aacttggtt tactaaacaa 720
 gacacaataa ctgtacaaaa atacgactcc gcaggtacca atttagaagg cacagcagtc 780
 gaaattaaaa cacttgatga acttaaaaac gcittaaaat ag 822

<210> 169
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 169

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

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

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

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

[0068]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0069]

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

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

Lys

<210> 170

<211> 825

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 170

atgaaaaaat atttattggg aataggtcta atattagect taatagcatg taagcaaat

60

	gttagcacgc ttgatgaaaa aaatagcggt tcagtagatt tacctggtgg aatgacagtt	120
	cttgtaagta aagaaaaaga caaagacggt aaatacagtc tagaggcaac agtagacaag	180
	cttgagctta aaggaacttc tgataaaaaac aacggttctg gaacacttga aggtgaaaaa	240
	actgacaaaa gtaaagtaaa attaacaatt gctgatgacc taagtcaaac taaatttgaa	300
	attttcaaag aagaigccaa aacattagta tcaaaaaaag taacctttaa agacaagtca	360
	tcaacagaag aaaaattcaa cgaaaagggt gaaacatctg aaaaaacaat agtaagagca	420
	aatggaacca gacttgaata cacagacata aaaagcgatg gatccggaaa agctaaagaa	480
	gtttttaaag actttactct tgaaggaaact ctgctgctg acggeaaaac aacattgaaa	540
	gttacagaag gcactgttgt ttttaagcaag aacattttta aatccggaga aataacagtt	600
	gcacttgatg actctgacac tactcaggct actaaaaaaaa ctggaaaatg ggattcaaat	660
	acttccactt taacaattag tgtgaatagc aaaaaaacta aaaacattgt atttcaaaa	720
[0070]	gaagacacaa taacagtaca aaaatacgac tcagcaggca ccaatctaga aggcaacgca	780
	gtcgaaatta aaacacttga tgaacttaaa aacgctttta aataa	825

<210> 171

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 171

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

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

	Asp	Leu	Pro	Gly	Gly	Met	Thr	Val	Leu	Val	Ser	Lys	Glu	Lys	Asp	Lys	
		35						40					45				
	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ser	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Asp	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	
		50					55					60					
	Gly	Thr	Ser	Asp	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Gly	Glu	Lys	
	65					70				75						80	
	Thr	Asp	Lys	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Ile	Ala	Asp	Asp	Leu	Ser	Gln	
					85					90					95		
	Thr	Lys	Phe	Glu	Ile	Phe	Lys	Glu	Asp	Ala	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Lys	
			100						105					110			
[0071]	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Glu	Glu	Lys	Phe	Asn	Glu	
		115						120					125				
	Lys	Gly	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	Thr	Ile	Val	Arg	Ala	Asn	Gly	Thr	Arg	
		130						135					140				
	Leu	Glu	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Gly	Lys	Ala	Lys	Glu	
	145					150					155					160	
	Val	Leu	Lys	Asp	Phe	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	
					165					170					175		
	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Ser	Lys	Asn	Ile	
					180					185					190		
	Leu	Lys	Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Ala	Leu	Asp	Asp	Ser	Asp	Thr	Thr	
		195						200					205				

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

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

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

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

Leu Lys

[0072]

<210> 172

<211> 822

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸

<400> 172

atgaaaaaat atttatiggg aataggtcta atattagcct taatagcatg taagcaaat 60

gttagcagcc ttgatgaaaa aaatagcggt tcagtagatt tacctgggtg aatgaaagtt 120

cttgtaagta aagaaaaaga caaagatggt aaatacagtc taatggcaac agtagaaaag 180

cttgagctta aaggaacttc tgataaaaaac aacggttctg gaacacttga aggtgaaaaa 240

actgacaaaa gtaaagtaaa attaacaatt gctgaggatc taagtaaac cacattigaa 300

atcttcaag aagatggcaa aacattagta tcaaaaaag taaccttaa agacaagtca 360

tcaacagaag aaaaattcaa cgaaaagggt gaaatatctg aaaaaacaat agtaagagca 420

```

aatggaacca gacttgaata cacagacata aaaagegata aaaccggaaa agctaaagaa      480
gtttttaaag actttactct tgaaggaaact ctagctgctg acggcaaaac aacattgaaa      540
gttacagaag gcactgttac ttttaagcaag aacatttcaa aatccggaga aataacagtt      600
gcacttgatg acaetgactc tagcggcaat aaaaaatccg gaacatggga ttcagatact      660
tctactttaa caattagtaa aaacagtcac aaaactaaac aacttgtatt cacaaaagaa      720
aacacaataa cagtacaaaa ctataacaga gcaggcaatg cgcttgaagg cagcccagct      780
gaaattaaag atcttgaga gcttaaagcc gctttaaatt aa                          822

```

<210> 173
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0073] <220>
 <223> 合成肽

<400> 173

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

	Thr	Asp	Lys	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Ile	Ala	Glu	Asp	Leu	Ser	Lys	
					85				90					95			
	Thr	Thr	Phe	Glu	Ile	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Lys	
				100					105					110			
	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Glu	Glu	Lys	Phe	Asn	Glu	
				115					120					125			
	Lys	Gly	Glu	Ile	Ser	Glu	Lys	Thr	Ile	Val	Arg	Ala	Asn	Gly	Thr	Arg	
				130					135					140			
	Leu	Glu	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Ser	Asp	Lys	Thr	Gly	Lys	Ala	Lys	Glu	
	145					150					155					160	
[0074]	Val	Leu	Lys	Asp	Phe	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	
					165					170					175		
	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Lys	Asn	Ile	
					180					185					190		
	Ser	Lys	Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Ala	Leu	Asp	Asp	Thr	Asp	Ser	Ser	
				195					200					205			
	Gly	Asn	Lys	Lys	Ser	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	
				210					215					220			
	Ile	Ser	Lys	Asn	Ser	Gln	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	Phe	Thr	Lys	Glu	
	225					230					235					240	
	Asn	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Asn	Tyr	Asn	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	
					245					250					255		

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

[0075]

Lys

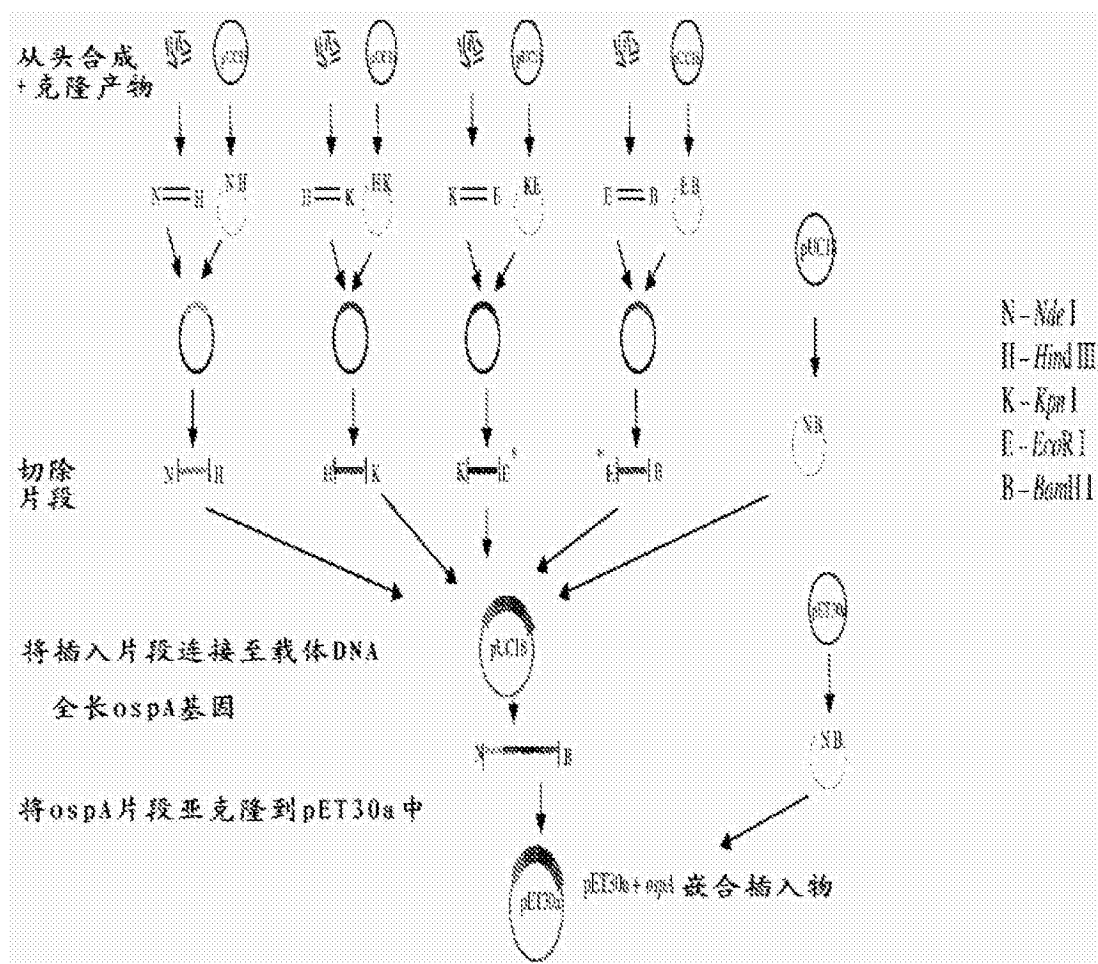


图1

1	MRLIGFALA	LALIGCAQKG	AESIGSVSVD	LPGEMKVLVS	KERDKNGKYD
51	LIATVDKLEL	KGTSCKNNGS	GVLEGVKTNK	SKVKLTISDD	LGQTILEVFK
101	EDGKTLVSCK	VTCKDKSSTE	EKFNEKGEVS	EKIITMADGT	RLEYTGIKSD
151	GTGKAKYVLK	NFTLEGKVAN	DKTTILEVKEG	TVTLSMNISK	SGEVSVELND
201	TDSSAATKKT	AAWNSKTSTL	TISVNSKTT	QLVFTKQDTI	TVQKYDSAGT
251	NLEGTAVEIK	TLDELKNALK			

(SEQ ID NO: 2)

图2

```

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

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

+1   G E M K V L V S K E K D K N G K Y
101  GTGAAATGAA GGTTCCTGGTG AGCAAAGAAA AAGACAAGAA CGGCAAGTAC
      CACTTTACTT CCAAGACCAC TCGTTTCTTT TTCTGTTCCT GCCGTTCTTG

+1   D L I A T V D K L E L K G T S D K
151  GATCTCATCG CAACCGTCGA CAACCTGGAG CTGAAAGSTA CTTCTGATAA
      CTAGAGTAGC GTTGGCAGCT GTTCGACCTC GACTTTCCAT GAAGACTATT

+1   N N G S G V L E G V K T N K S K
201  AAACAACGGC TCTGGTGTGC TGGAGGGCGT CAAAACTAAC AAGAGCAAAG
      TTTGTTGCCG AGACCACACG ACCTCCCGCA GTTTTGATTG TTCTCGTTTC

+1   V K L T I S D D L G Q T T L E V F
      HindIII
      ~~~~~
251  TAAAGCTTAC GATCTCTGAC GATCTCGGTC AGACCACGCT GGAAGTTTTT
      ATTTTGAATG CTAGAGACTG CTAGAGCCAG TCTGGTGCGA CCTTCAAAAG

+1   K E D G K T L V S K K V T S K D K
301  AAAGAGGATG GCAAGACCCT CGTGTCCAAA AAAGTAACTT CCRAAGACAA
      TTTCTCCTAC CGTTCTGGGA GCACAGGTTT TTTCATIGAA GGTTCCTGTT

+1   S S T E E K F N E K G E V S E K
351  GTCCTCTACG GAAGAAAAAT TCAACGAAAA AGGTGAGGTG TCTGAAAAGA
      CAGGAGATGC CTTCTTTTIA AGTTGCTTTT TCCACTCCAC AGACTTTTCT

+1   I I T M A D G T R L E Y T G I K S
401  TCATCACCAT GGCAGACGGC ACCCGTCTTG AATACACCGG TATTAAAAGC
      AGTAGTGGTA CCGTCTGCCG TGGGCAGAAC TTATGTGGCC ATAATTTTCG

+1   D G T G K A K Y V L K N F T L E G
      KpaI
      ~~~~~
451  GATGGTACCG GTAAAGCGAA ATATGTTCTG AAAAAGTTCA CTCTGGAAGG
      CTACCATGGC CATTTCGCTT TATACAAGAC TTTTGAAGT GAGACCTTCC

+1   K V A N D K T T L E V K E G T V
501  CAAAGTGGCT AATGATAAAA CCACCTTGGA AGTCAAGGAA GGCACCGTTA
      GTTTCACCGA TTACTATTTT GGTGGAACCT TCAGTTCCTT CCGTGGCAAT

```

图3A

```

+1 T L S M N I S K S G E V S V E L N
551 CTCTGAGCAT GAATATCTCC AAATCTGGTG AAGTTTCCGT TGAAC TGAAC
   GAGACTCGTA CTTATAGAGG TTTAGACCAC TTCAAAGGCA ACTTGACTTG

+1 D T D S S A A T K N T A A W N S K
                                   EcoRI
                                   ~~~~~
601 GAACTGACA 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 TTAACCATTA 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 TGTTCATAA ACAAGACACG ATCACTGTGC AGAAATACGA CTCCGCAGGC
   ACAAGTGATT TGTCTGTGTC TAGTGACACG TCTTTATGCT GAGGCGTCCG

+1 T N L E G T A V E I K T L D E L K
751 ACCAACTTAG AAGGCACGGC AGTCGAAATT AAAACCCTTG ATGAAC TGAA
   TGGTTGAATC TTCCGTGCGG TCAGCTTTAA TTTTGGGAAC TACTTGACTT

+1 N A L K *
                                   Bpu1102I  BamHI
                                   ~~~~~
801 AAACGCGCTG AAATAAGCTG AGCGGATCC
   TTTGCGCGAC TTTATTCGAC TCGCCTAGG

```

lipB sOspA 1/2²³¹ -核苷酸序列(SEQ ID NO: 1),和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2;
互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 48)

图3B

```

1  MRLIGFALA LALIGCAQKG AESIGSVSVD LPGGMTVLVS KERDKNGKYS
51 LEATVDKLEL KGTSDKNNGS GTLEGERTNK SKVKLTIAAD LSQTKFEIFK
101 EDAKTLVSKK VTLKDKSSTE EKFNEKGETS EKTIVMANGT RLEYTDIKSD
151 GSGKAKYVLK DFTLEGTLAA DGKTTLEKVE GTVVLSMNIL KSGEITVALD
201 DSDTTQATKK TGNWDSNTST LTISVNSKKT KNIVFTKEDT ITVQKYDSAG
251 TNLEGNAVEI KTLDELKNAL

```

(SEQ ID NO: 4)

图4

```

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

+1   A Q K G A E S I G S V S V D L F
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 CGTTCTGGTC AGCAAAGAAA AAGACAAAAA CGGTAAATAC
      CACCGTACTG GCAAGACCAG TCGTTTCTTT TTCTGTTTTT GCCATTTATG

+1   S L E A T V D K L E L K G T S D K
      HindIII
      ~~~~~
151  AGCCTCGAGG CGACCGTCGA CAAGCTTGAG CTGAAAGGCA CCTCTGATAA
      TCGSAGCTCC GCTGGCAGCT GTTCGAACTC GACTTTCGGT GGAGACTATT

+1   N N G S G T L E G E K T N K S K
201  AAACAACGGT TCCGGCACCC TGAAGGTGA AAAAATAAAC AAAAGCAAAG
      TTTGTIGCCA AGGCCGTGGG ACCTTCCACT TTTTGTATTG TTTTCGTTTC

+1   V K L T I A D D L S Q T K F E I F
251  TGAAACTGAC CATTGCTGAT GACCTCAGCC AGACCAAATT CGAAATTTTC
      ACTTTGACTG GTAACGACTA CTGGAGTCGG TCTGGTTTAA GCTTTAAAAG

+1   K E D A K T L V S K K V T L K D K
301  AAAGAAGATG CCAAAACCTT AGTATCCAAA AAAGTGACCC TGAAAGACAA
      TTTCTTCTAC GGTTTTGGAA TCATAGGTTT TTTCAGTGGG ACTTCTGTIT

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

+1   T I V M A N G T R L E Y T D I K S
      KpnI
      ~~~~~
401  CCATCGTAAT GGCAAATGGT ACCCGTCTGG AATACACCGA CATCAAAAGC
      GGTAGCATTG CCGTTTACCA TGGGCAGACC TTATGTGGCT GTAGTTTTCG

+1   D G S G K A K Y V L K D F T L E G
451  GATGGCTCCG GCAAAGCCAA ATACGTTCTG AAAGACTTCA CCCTGGAAGG
      CTACCGAGGC CGTTTCGGTT TATGCAAGAC TTTCTGAAGT GGGACCTTCC

+1   T L A A D G K T T L K V T E G T
501  CACCCTCGCT GCCGACGGCA AAACCACCTT GAAAGTTACC GAAGGCACTG
      GTGGGAGCGA CGGCTGCCGT TTTGGTGGAA CTTTCAATGG CTTCCGTGAC

```

图5A

```

+1 V V L S M N I L K S G E I T V A L
551 TTGTTTAAAG CATGAACATC TTAAAATCCG GTGAAATCAC CGTTGCGCTG
AACAAAATTC GTACTTGTAG AATTTTAGGC CACTTTAGTG GCAACGCGAC

+1 D D S D T T Q A T K K T G K W D S
601 GATGACTCTG ACACCACTCA GGCCACTAAA AAAACCGGCAC AATGGGATTC
CTACTGAGAC TGTGGTGAGT CCGGTGATTT TTTTGGCCGT TTACCCCTAAG

+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 AGTCGCACCT AAGGTTTTTT TGATTTTTGT

+1 I V F T K E D T I T V Q K Y D S A
701 TCGTGTTTAC CAAAGAAGAC ACCATCACCG TCCAGAAATA CGACTCTGCG
AGCACAAAGT GTTCTTCTG TGGTAGTGCC AGGTCTTTAT GCTGAGACGC

+1 G T N L E G N A V E I K T L D E L
751 GGCACCAACC TCGAAGGCAA CGCAGTCGAA ATCAAACCC TGGATGAAC
CCGTGGTTGG AGCTTCCGTT GCGTCAGCTT TAGTTTTGGG ACCTACTTGA

+1 K N A L K *
EpuII02I BamHI
~~~~~
801 GAAAAACGCT CTGAAATAAG CTGAGCGGAT CC
CTTTTTGCGA GACTTTATTC GACTCGCCTA GG

```

lipB sOspA 6/4-核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4);
互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 49)

图5B

```

1 MRLIGFALA LALIGCAQNG AESIGSVSVD LFGGMKVLVS KEKDKNGKYS
51 LMATVEKLEL KGTSDKNNGS GTLEGERTNK SKVKLTIAED LSKTTFEIFK
101 EDGKTLVSKK VTLKDKSSTE EKFNERGEIS EKTIVMANGT RLEYTDIKSD
151 KTGKAKYVLK DFTLEGTLLA DGKTTLVKTE GTVTLSMNIS KSGEITVALD
201 DTDSSGNKKS GTWSDTSTL TISKNSQRTK QLVFTKENTI TVQNYNRRAGN
251 ALEGSFAEIK DLAEILKAALK

```

(SEQ ID NO: 6)

图6

```

+1   M R L L I G F A L A L A L I G C
      NdeI
      ~~~~~
1    CATATGCGTC TGTTCATCGG CTTTGCTTTG GCGCTGGCTT TAATCGGCTG
      GTATACGCAG ACAACTAGCC GAAACGAAAC 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 AGTTCTGGTA AGCAAAGAAA AAGACAAAAA CGGTAAATAC
      CCCCATACTT TCAAGACCAT TCGTTTCTTT TTCTGTTTTT GCCATTTATG

+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 GTTGGCAICT TTTGACCTC GAATTTCCGT GAAGACTATT

+1   N N G S G T L E G E K T N K S X
201  AAACAACGGT TCTGGCACCC TGGAGGTGA AAAAATAAC AAAAGCAAAG
      TTGTGTGCCA AGACCGTGGG ACCTTCCACT TTTTGTATTG TTTTCGTTTC

+1   V K L T I A E D L S K T T F E I F
      HindIII
      ~~~~~
251  TAAAGCTTAC TATTGCTGAG GATCTGAGCA AAACCACCTT TGAAATCTTC
      ATTTCGAATG ATAACGACTC CTAGACTCGT TTTGGTGGAA ACTTTAGAAG

+1   K E D G K T L V S X K V T L K D K
301  AAAGAAGATG GCAAAACTCT GGTATCTAAA AAAGTAACCC TGAAAGACAA
      TTTCTTCTAC CGTTTTGAGA CCATAGATTT TTTTATTGGG ACTTCTGTTC

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

+1   T I V M A N G T R L E Y T D I K S
      KpnI
      ~~~~~
401  CTATCGTAAT GGCAAATGGT ACCCGTCTGG AATACACCGA CATCAAAAGC
      GATAGCATTG CCGTTTACCA TGGGCAGACC TTATGTGGCT GTAGTTTTCG

+1   D K T G K A K Y V L K D F T L E G
451  GATAAAACCG GCAAAGCTAA ATACGTTCTG AAAGACTTTA CTCTGGAAGG
      CTATTTTGGC CGTTTCGATT TATGCAAGAC TTTCTGAAAT GAGACCTTCC

+1   T L A A D G K T T L K V T E G T
501  CACTCTGGCT GCTGACGGCA AAACCACTCT GAAAGTTACC GAAGGCACTG
      GTGAGACCGA CCACTGCCGT TTTGGTGAGA CTTTCAATGG CTTCCGTGAC

```

图7A

```

+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 GTACTTGTAAGATTAGGC CGCTTTAGTG GCAACGTGAC

+1 D D T D S S G N K K S G T W D S D
601 GATGACACTG ACTCTAGCGG CAATAAAAAA TCCGGCACCT GGGATTCTGA
    CTACTGTGAC TGAGATCGCC GTTATTTTIT AGGCCGTGGA CCCTAAGACT

+1 T S T L T I S K N S Q K T K Q L
                                PvuII
                                ~~~~~
651 TACTTCTACT TTAACCATTA GCAAAAACAG CCAGAAACT AAACAGCTGG
    ATGAAGATGA AATTGGTAAT CGTTTTTIGT GGTCTTTTGA TTTGTGACAC

+1 V F T K E N T I T V Q N Y N R A G
701 TATTCACCAA AGAAAACACT ATCAACGTAC AGAACTATAA CCGTGCAGGC
    ATAAGTGGTT TCTTTTGTGA TAGTGCAATG 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 TTCCGTGGG CCGACTTTAA TTTCTAGACC GTCTCGACTT

+1 A A L K *
                                Bpu1102I BamHI
801 AGCCGCTTTG AAATAAGCTG AGCGGATCC
    TCGGCGAAAC TTTATTCGAC TCGCCTAGG

```

lipB sOspA 5/3 - 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5), 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6);
互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 50)

图7B

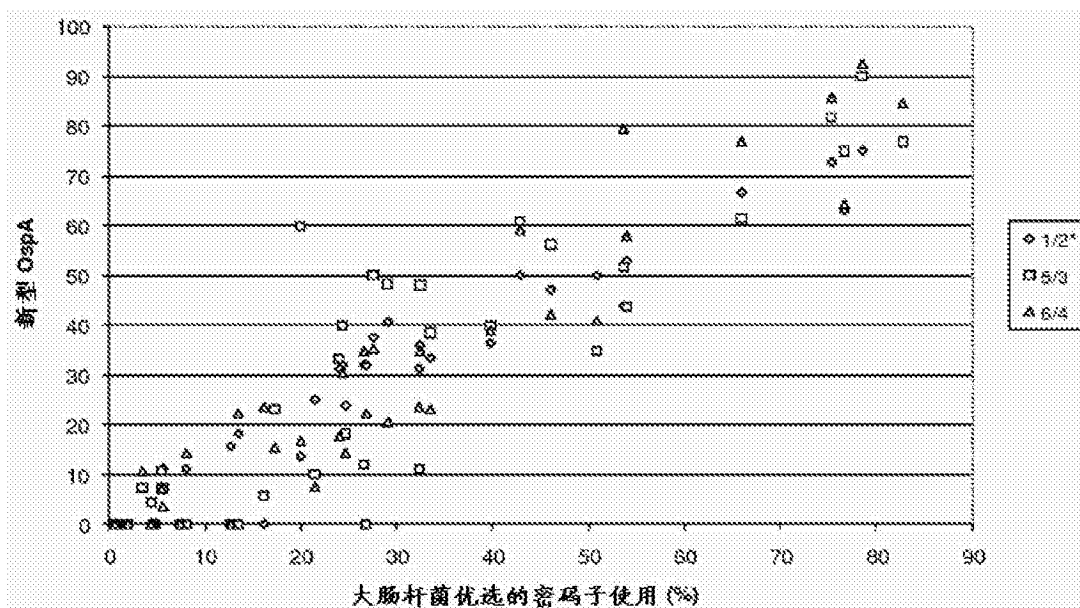


图8

脂质化构建体的5'序列 (SEQ ID NO: 31)

氨基酸序列 (SEQ ID NO: 33)

互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 51)

```

+1      M B L L I S F A L A L A L I S C A Q K
      NdeI
~~~~~
1  CATATGCGTC TGTTGATCGG CTTTGCTCTG GCGCTGGCTC TGATCGGCTG CGCACAGAAA
   GTATACGCAG ACAACTAGCC GAAACGAGAC CGGACCGGAG ACTAGCCGAC GCGTGTCTTT
  
```

非脂质化构建体的5'序列 (SEQ ID NO: 32)

氨基酸序列 (SEQ ID NO: 34)

互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 52)

```

+1      M                                          A Q K
      NdeI
~~~~~
1  CATATG*****                               *GCAC AGAAA
   GTATAC*****                               *CGTG TCTTT
  
```

图9

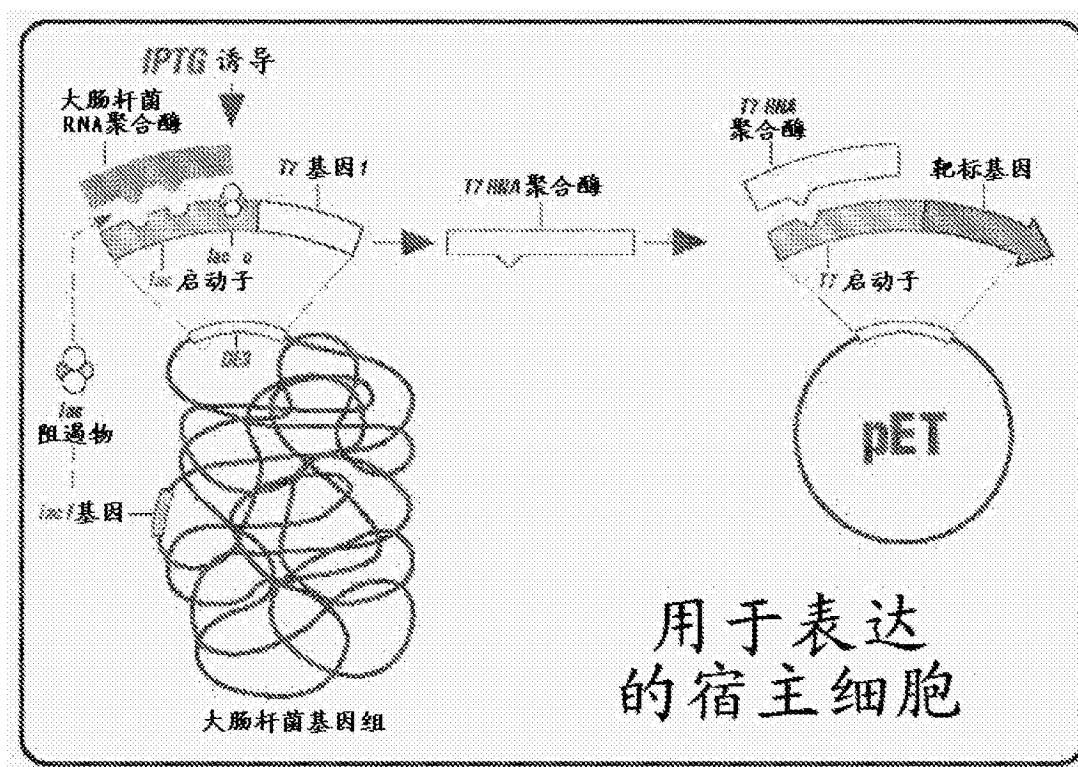
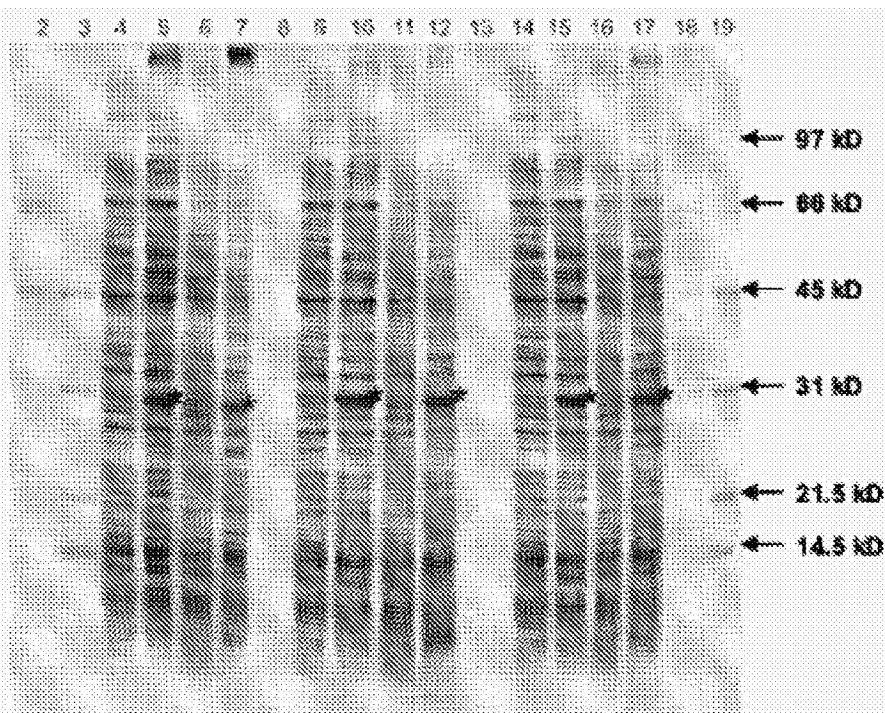


图10



泳道	构建体/样品	诱导 ¹
2	高标记	-
3	低标记	-
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	高标记	-
19	低标记	-

¹用1mM IPTG 诱导3小时,- 暗示未诱导

²WCB: 工作细胞库

³PC: 原代细胞

* OspA

图11

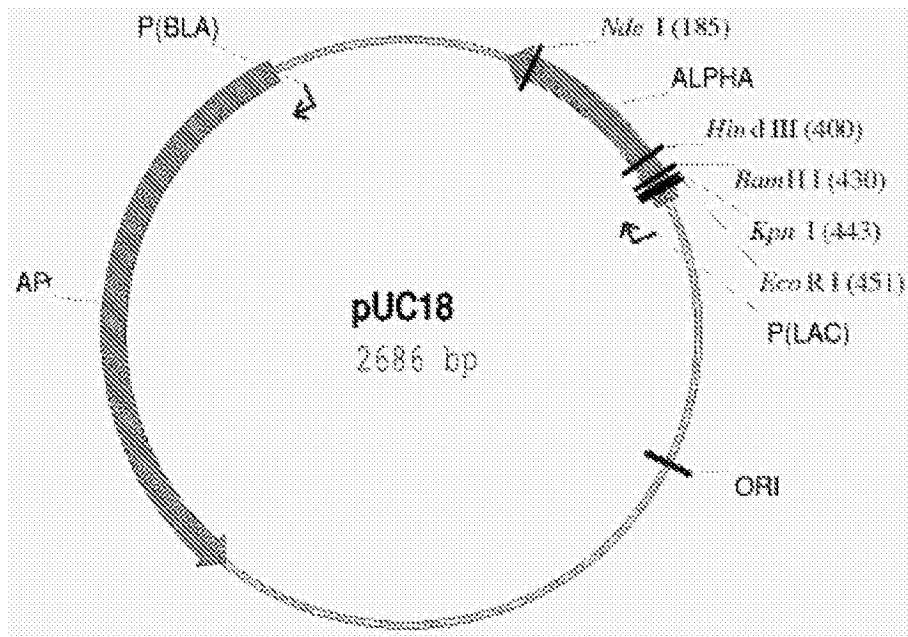


图12

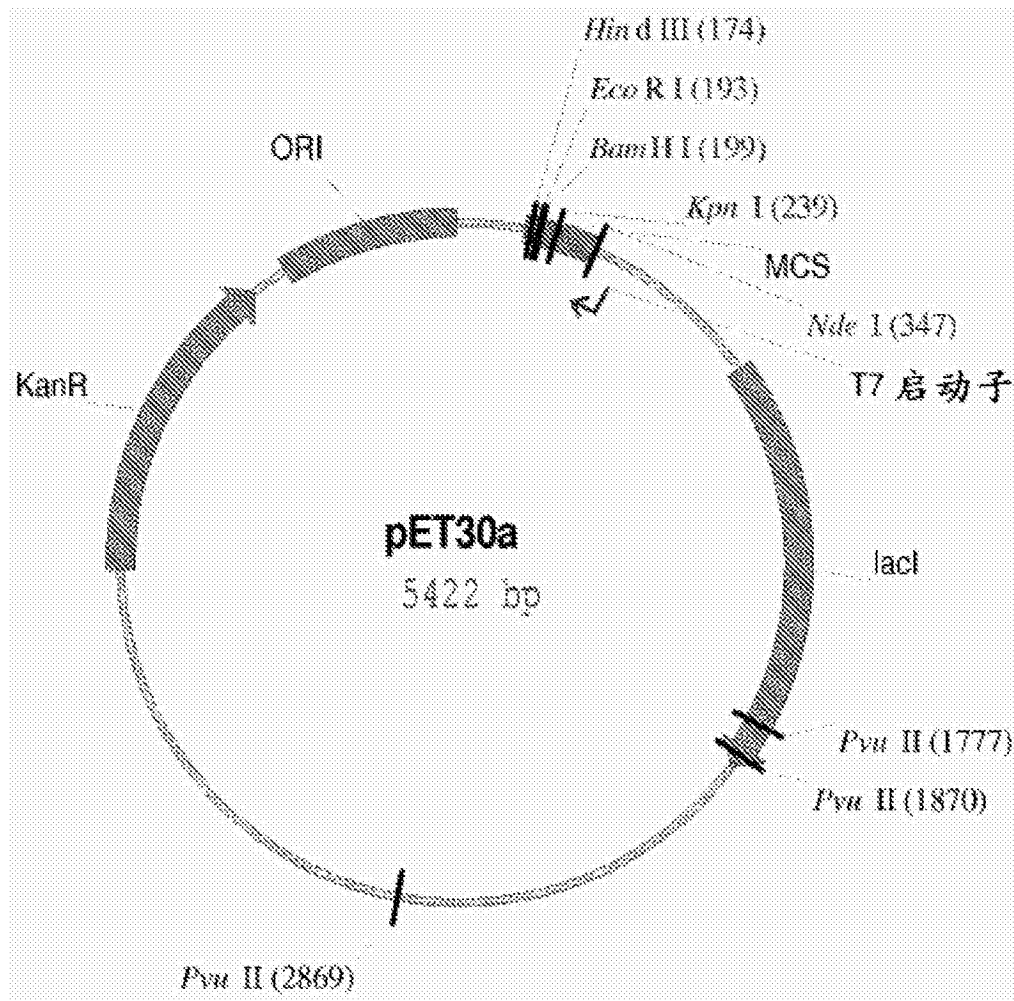
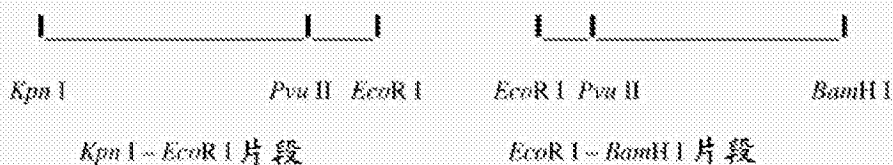
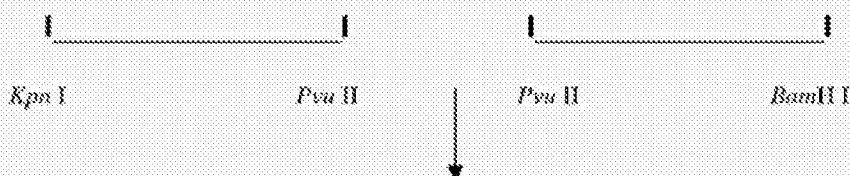


图13

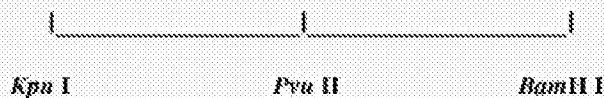
克隆从头合成的产物



用 *Pvu* II 消化



连接至 *Kpn* I / *Bam*H I 消化的载体



在最终 lipB sOspA 5/3 构建体中所需的序列 (SEQ ID NO: 35);
互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 53)

```

                                PvuII
                                ~~~~~
671      GCAAAAACAG CCAGAAACT AAACAGCTGG TATTCACCAA AGAAAACACT      720
      CGTTTTTGTC GGTCTTTTGA TTTGTCGACC ATAAGTGCTT TCTTTGTGA
  
```

用于 *Kpn* I - *Eco*R I 片段的 3' 末端的寡核苷酸 (并入外部 *Eco*R I 位点) (SEQ ID NO: 36); 互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 54)

```

GCAAAAACAG CCAGAAACT AAACAGCTGGG
CGTTTTTGTC GGTCTTTTGA TTTGTCGACCCTTAA
  
```

用于 *Eco*R I - *Bam*H I 片段的 5' 末端的寡核苷酸 (并入外部 *Eco*R I 位点) (SEQ ID NO: 37); 互补核苷酸序列 (SEQ ID NO: 55)

```

AATTC AAACAGCTGG TATTCACCAA AGAAAACACT
      G TTTGTCGACC ATAAGTGCTT TCTTTGTGA
  
```

图14

凸显 lipB sOspA 1/2²⁵¹ 中的氨基酸变化 (SEQ ID NO: 39) 的比对和用于引入所述变化的PCR引物序列 (SEQ ID NO: 21 和 41)

lipB OspA 1/2 mod (SEQ ID NO: 38); 共有序列 (SEQ ID NO: 40)

```

              719                               774
              I T V Q N Y D S A G T W L E G T A V
lipB OspA 1/2 mod (761) GATCACTGTGCAAAATACGACTCCAGCCAGGCACTTACAGGCACGAGTTC
lipB sOspA 1/2 251 (760) GATCACTGTGCAAAATACGACTCCAGCCAGGCACTTACAGGCACGAGTTC
共有 (761) GATCACTGTGCAAAATACGACTCC GGCACCAACTTAGAAGGCACGCGAGTC

```

```

内部正向引物 → AATACGACTCCGCGAGGCACC (SEQ ID NO: 21)
内部反向引物 → CGGCTCTGCGAGGCACCAA (SEQ ID NO: 41)
外部正向引物 → bp 1 至 21 + NdeI 位点
外部反向引物 → bp 808 至 828 - BamH I 位点

```

图15

Blip OspA BPBP/A1与被修饰的分子lipB sOspA 1/2²⁵¹的OspA序列的比对

```

      M R L L I G F A L A L A L I G C A
1  ATGAGATTAT TAATAGGATT TGCTTTAGCG TTAGCTTTAA TAGGATGTGC
1  ATGCGTCTGT TGATCGGCTT TGCTCTGGCG CTGGCTCTGA TCGGCTGGCG

      Q K G A E S I G S V S V D L F G
51 ACAAAAAGGT GCTGAGTCAA TTGGATCCGT TTCAGTAGAT TTGGCTGGTG
51 ACAGAAAGGT GCTGAGTCTA TTGGTTCCGT TTCGTAGAT CTGCCCCGGT

      E M K V L V S K E K D K N G K Y D
101 AAATGAAAGT TCTTGTAAGC AAAGAAAAAG ACAAAAACGG CAAGTACGAT
101 AAATGAAGGT TCTGGTGAGC AAAGAAAAAG ACAAGAACGG CAAGTACGAT

      L I A T V D K L E L K G T S D K N
151 CTAATTGCAA CAGTAGACAA GCTTGAGCTT AAAGGAACCT CTGATAAAAA
151 CTCATCGCAA CCGTCGACAA GCTGGAGCTG AAAGGTACTT CTGATAAAAA

      N G S G V L E G V K T N K S K V
                                HindIII
201 CAATGGATCT GGAGTACTTG AAGGCGTAAA AACTAACAAA AGTAAAGTAA
201 CAACGGCTCT GGTGTGCTGG AGGCGCTCAA AACTAACAAG AGCAAAGTAA

      K L T I S D D L G Q T T L E V F K
HindIII
~~~~~
251 AATTAACAAT TTCTGACGAT CTAGGTCAAA CCACACTTGA AGTTTTCAAA
251 AGCTTACGAT CTCTGACGAT CTCGGTCAGA CCACGCTGGA AGTTTTCAAA

      E D G K T L V S K K V T S K D K S
301 GAAGATGGCA AAACACTAGT ATCAAAAAAA GTAACCTCCA AAGACAAGTC
301 GAGGATGGCA AGACCCTCGT GTCCAAAAAA GTAACCTCCA AAGACAAGTC

      S T E E K F N E K G E V S E K I
351 ATCAACAGAA GAAAAATTCA ATGAAAAAAG TGAAGTATCT GAAAAAATAA
351 CTCTACGGAA GAAAAATTCA ACGAAAAAAG TGAGGTGTCT GAAAAGATCA

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

      G T G K A K Y V L K N F T L E G K
KpnI
~~~~~
451 GGAACGGAA AAGCTAAATA TGTTTTAAAA AATTTTACTC TTGAAGGAAA
451 GGTACCGTA AAGCSAAATA TGTTCTGAAA AACTTCACCTC TGAAGGCAA

      V A N D K T T L E V K E G T V T
501 AGTAGCTAAT GATAAAACAA CATTGGAAGT AAAAGAAGGA ACCGTTACTT
501 AGTGGCTAAT GATAAAACCA CCTTGAAGT CAAGGAAGGC ACCGTTACTC

```

图16A

```

      L S M N I S K S G E V S V E L N D
551 TAAGTATGAA TATTTCAAAA TCTGGGGGAAG TTTCAGTTGA ACTTAATGAC
551 TGAGCATGAA TATCTCCAAA TCTGGTGAAG TTTCAGTTGA ACTGAACGAC

      T D S S A A T K K T A A W N S K T
                                EcoRI
                                ~~~~~
601 ACTGACASTA GTGCTGCTAC TAAAAAAACT GCAGCTTGGG ATTCAAAAAC
601 ACTGACASCA GCGCTGCGAC TAAAAAAACT GCAGCGTGGG ATTCCAAAAC

      S T 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 CAGCTGGTGT

      F T K Q D T I T V Q K Y D S A G T
701 TTAATAAACA AGACACAATA ACTGTACAAA AATACGACTC CAACGGTACC
701 TCAATAAACA AGACACGATC ACTGTGCAGA AATACGACTC CGCAGGCACC

      N L E G T A V E I K T L D E L K N
751 AATTTAGAAG GCACAGCAGT CGAAATTAAA ACACTTGATG AACTTAAAAA
751 AACTTAGAAG GCACGGCAGT CGAAATTAAA ACCCTTGATG AACTGAAAAA

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

```

上部链是原始序列(SEQ ID NO: 42)并且下部链是优化序列(SEQ ID NO: 43)。氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。

注意:未示出序列起始处的三个碱基(CAT);这些碱基形成 *Nde* I 位点 CATATG 的一部分。

图16B

Blip OspA KT与被修饰的分子 lipB sOspA 6/4 的 OspA 序列的比对。

```

      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 F G
51 GCACAAAAG GTGCTGAGTC AATTGGATCC GTTTCAGTAG ATTTACCTGG
51 GCACAGAAAG GTGCTGAGTC TATTGGTTCC GTTTCGTGAG ATCTGCCCGG

      G M T V L V S K E K D K N G K Y
101 TGGAATGACA GTTCTTGTAAGTAAAGAAAA AGACAAAGAC GGTAATAACA
101 TGGCATGACC GTTCTGGTCA GCAAAGAAAA AGACAAAAC GGTAATAACA

      S L E A T V D K L E L K G T S D K
      HindIII
      ~~~~~
151 GTCTAGAGGC AACAGTAGAC AAGCTTGAGC TTAAAGGAAC TTCTGATAAA
151 GCCTCGAGGC GACCGTCGAC AAGCTTGAGC TGAAAGGCAC CTCTGATAAA

      N N G S G T L E G E K T N K S K V
201 AACAAACGGTT CTGGAACACT TGAAGGTGAA AAAACTGACA AAAGTAAAGT
201 AACAAACGGTT CCGGCACCCT GGAAGGTGAA AAAACTAACA AAAGCAAAGT

      K L T I A D D L S Q T K F E I F
251 AAAATTAACA ATTGCTGATG ACCTAAGTCA AACTAAATTT GAAATTTTC
251 GAAACTGACC ATTGCTGATG ACCTCAGCCA GACCAAATTC GAAATTTTCA

      K E D A K T L V S K K V T L K D K
301 AAGAAGATGC CAAAACATTA GTATCAAAAA AAGTAACCCT TAAAGACAAG
301 AAGAAGATGC CAAAACCTTA GTATCCAAAA AAGTGACCCT GAAAGACAAG

      S S T E E K F N E K G E T S E K T
351 TCATCAACAG AAGAAAAATT CAACGAAAAG GGTGAAACAT CTGAAAAAAC
351 TCCTCTACCG AAGAAAAATT CAACGAAAAG GGTGAAACCT CTGAAAAAAC

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

+3 D G S G K A K Y V L K D F T L E G
451 ATGGATCCGG AAAAGCTAAA GAAGTTTAA AAGACTTTAC TCTTGAAGGA
451 ATGGCTCCGG CAAAGCCAAA TACGTTCTGA AAGACTTCAC CCTGGAAGGC

+3 T L A A D G K T T L K V T E G T V
501 ACTCTAGCTG CTGACGGCAA AACAACATTG AAAGTTACAG AAGGCACTGT
501 ACCCTCGCTG CCGACGGCAA AACCACCTTG AAAGTTACCG AAGGCACTGT

```

图17A

```

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

      D D S D T T Q A T K K T G K W D S
601 ATGACTCTGA CACTACTCAG GCTACTAAAA AAAC TGGAAT ATGGGATTCA
601 ATGACTCTGA CACTACTCAG GCTACTAAAA AAAC TGGAAT ATGGGATTCT

      N T S T L T I S V N S K K T K N I
      EcoRI
      ~~~~~
651 AATACTTCCA CTTTAACAAT TAGTGTGAAT AGCAAAAAAA CTAAAAACAT
651 AACACTTCCA CTCTGAACAT CAGCGTGAAT TCACAAAAAA CTAAAAACAT

      V F T K E D T I T V Q K Y D S A
701 TGTATTTACA AAAGAAGACA CAATACAGT ACACAAATAC GACTCAGCAG
701 CGTGTTTACC AAAGAAGACA CCATCACCGT CCAGAAATAC GACTCTGCGG

      G T N L E G N A V E I K T L D E L
751 GCACCAATCT AGAAGGCAAC GCAGTCGAAA TTAAAAACAT TGATGAACTT
751 GCACCAACCT CGAAGGCAAC GCAGTCGAAA TCAAAAACCT GGATGAACTG

      K N A L K *
      BamHI
      ~~~~~
801 AAAAACGCTT TAAAATAA
801 AAAAACGCTC TGAAATAAGC TGAGCGGATC C

```

上部链是原始序列(SEQ ID NO: 44)并且下部链是优化序列(SEQ ID NO: 45)。
氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)。

注意: 未示出序列起始处的单一个碱基(C); 所述碱基形成 *Nde* I 位点 CATATG 的一部分。

图17B

Blip OspA 5/3 与被经修饰的分子 lipB sOspA 5/3 的 OspA 序列的比对。

```

      M R L L I G F A L A L A L I G C
NdeI
-----
1  CATATGAGAT TATTAATAGG ATTIGCTTTA GCGTAGCTT TAATAGGATG
1  CATATGCGTC TGTTGATCGG CTTTGCTTTG GCGCTGGCTT TAATCGGCTG

      A Q K G A E S I G S V S V D L P
51  TGCACAAAAA GGTGCTGAGT CAATTGGATC CGTTTCAGTA GATTTACCTG
51  TGCACAGAAA GGTGCTGAGT CTATTGGTTC CGTTTCTGTA GATCTGCCCG

      G G M K V L V S K E K D K N G K Y
101 GTGGAATGAA AGTTCCTGTA AGTAAAGAAA AAGACAAAGA TGCTAAATAC
101 GGGGTATGAA AGTTCCTGTA AGCAAAGAAA AAGACAAAAA CGGTAAATAC

      S L M A T V E K L E L K G T S D K
151 AGTCTAATGG CAACAGTAGA AAAGCTTGAG CTTAAAGGAA CTTCTGATAA
151 AGCCTGATGG CAACCGTAGA AAAGCTGGAG CTTAAAGGCA CTTCTGATAA

      N N G S G T L E G E K T N K S K
201 AAACAACGGT TCTGGAACAC TTGAAGGTGA AAAAAGTGAC AAAAGTAAAG
201 AAACAACGGT TCTGGCACCC TGGAAGGTGA AAAAAGTAAAC AAAAGCAAAAG

      V K L T I A E D L S K T T F E I F
HindIII
-----
251 TAAATTTAAC AATTGCTGAG GATCTAAGTA AAACCAACATT TGAAATCTTC
251 TAAAGCTTAC TATTGCTGAG GATCTGAGCA AAACCAACCTT TGAAATCTTC

      K E D G K T L V S K K V T L K D K
301 AAAGAAGATG GCAAAACATT AGTATCAAAA AAAGTAACCC TTAAAGACAA
301 AAAGAAGATG GCAAAACTCT GGTATCTAAA AAAGTAACCC TGAAAGACAA

      S S T E E K F N E K G E I S E K
351 GTCATCAACA GAAGAAAAAT TCAACGAAAA GGCTGAAATA TCTGAAAAAA
351 GTCTTCTACC GAAGAAAAAT TCAACGAAAA GGCTGAAATC TCTGAAAAAA

      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 GGCAAATGCT ACCCGTCTGG AATACACCGA CATCAAAAAGC

      D K T G K A K Y V L K D F T L E G
451 GATAAAACCG GAAAAGCTAA AGAAGTTTAA AAAGACTTTA CTCTTGAAGG
451 GATAAAACCG GCAAAGCTAA ATACGTTCTG AAAGACTTTA CTCTGGAAGG

      T L A A D G K T T L K V T E G T
501 AACTCTAGCT GCTGACGGCA AAACAACATT GAAAGTTACA GAAGGCACTG
501 CACTCTGGCT GCTGACGGCA AAACCACTCT GAAAGTTACC GAAGGCACTG

```

图18A

```

      V T L S M N I S K S G E I T V A L
551 TTACTTTAAG CAAGAACATT TCAAAATCCG GACAAATAAC 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 TCCGGAACAT GGGATTTCAGA
601 GATGACACTG ACTCTAGCGG CAATAAAAAA TCCGGCACCT GGGATTCTGA

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

      V F T K E N T I T V Q N Y N R A G
701 TATTACAAA AGAAAACACA ATAACAGTAC AAAACTATAA CAGAGCAGGC
701 TATTACCAA AGAAAACACT ATCACCCTAC AGAACTATAA CCGTGCAGGC

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

      A A L K *
                                     BamHI
                                     ~~~~~
801 AGCCGCTTTA AAATAA
801 AGCCGCTTTG AAATAAGCTG AGCGGATCC

```

上部链是原始序列(SEQ ID NO: 46)并且下部链是优化序列(SEQ ID NO: 47)。
氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)。

图18B

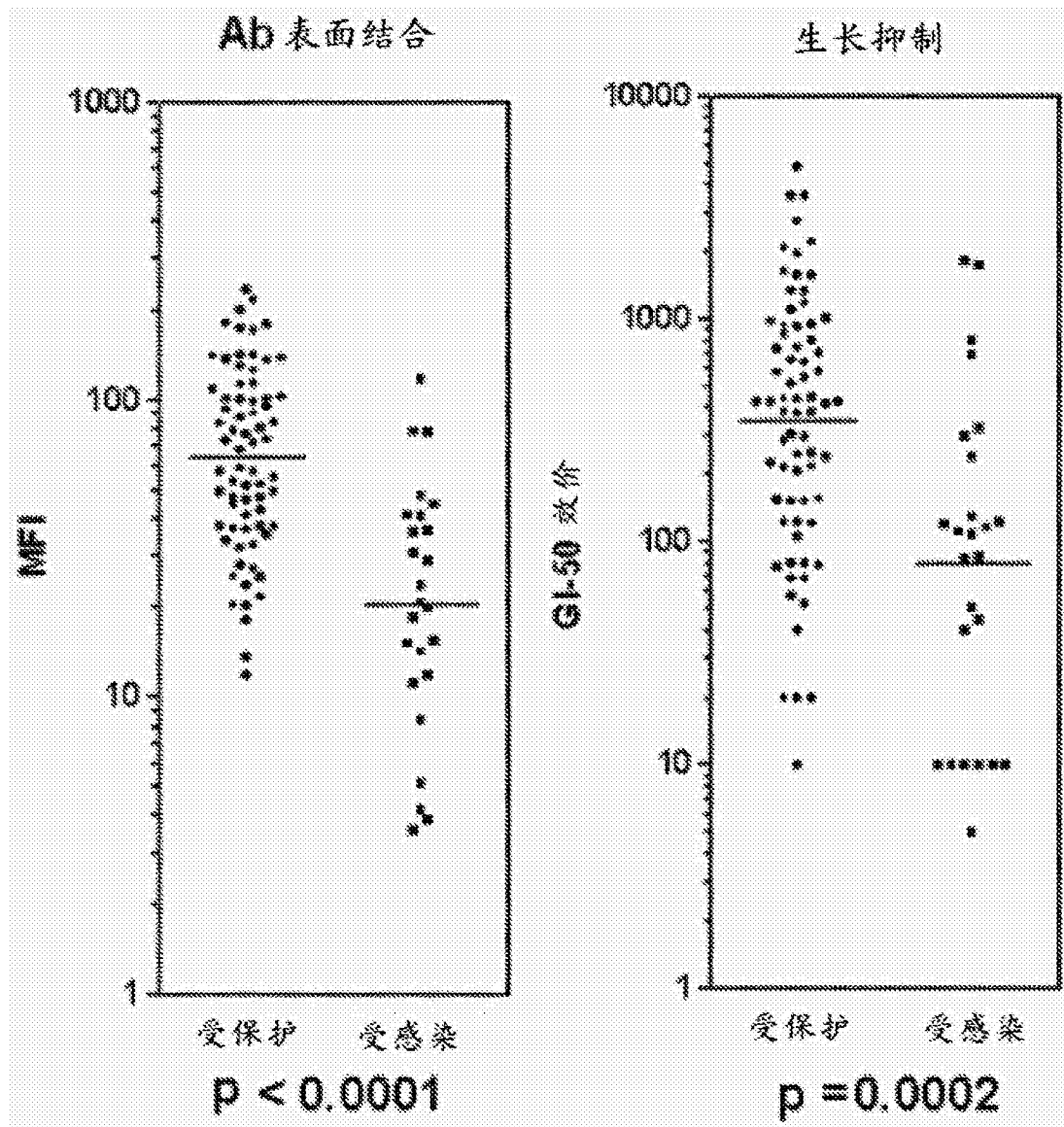


图19

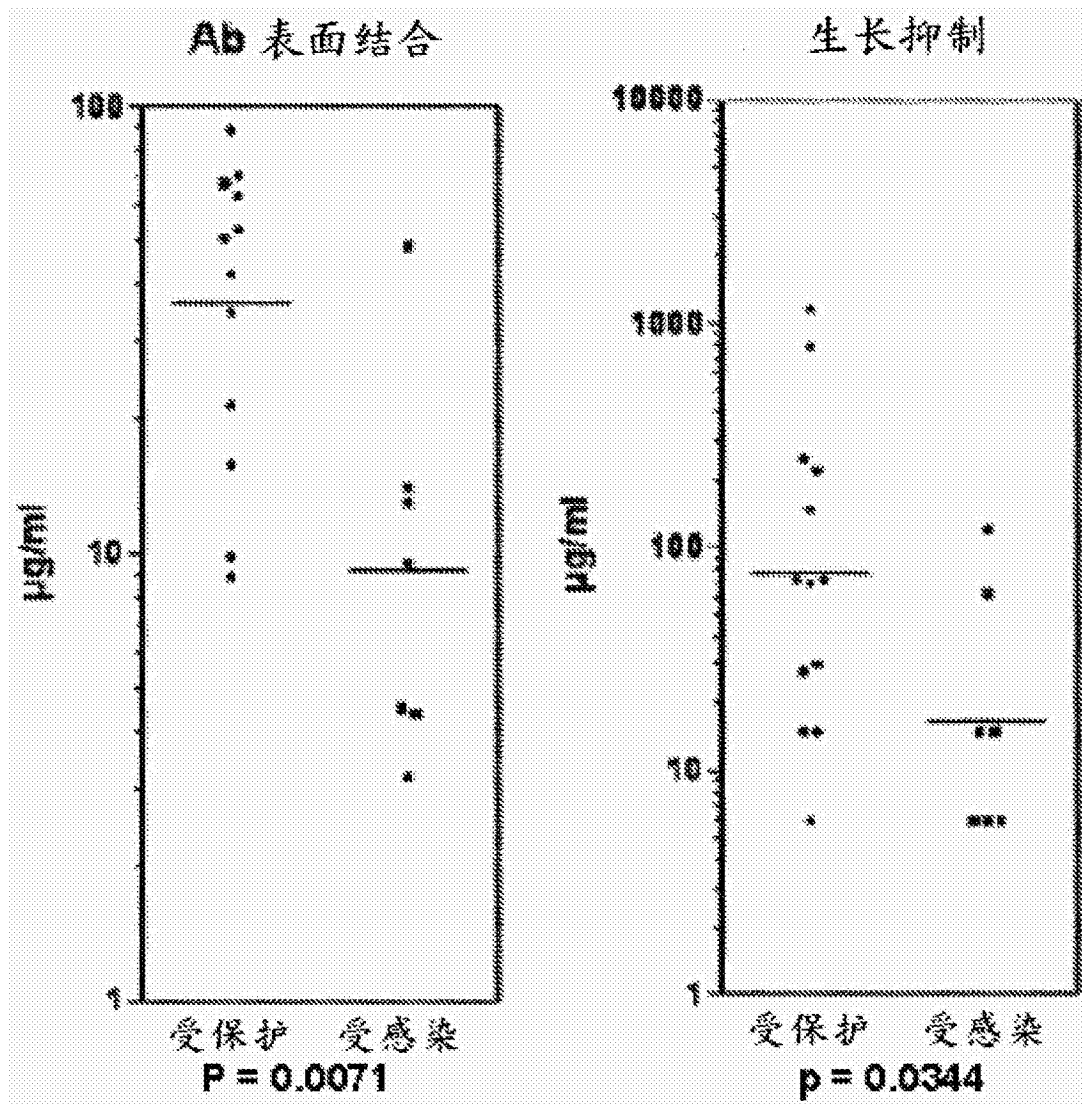


图20

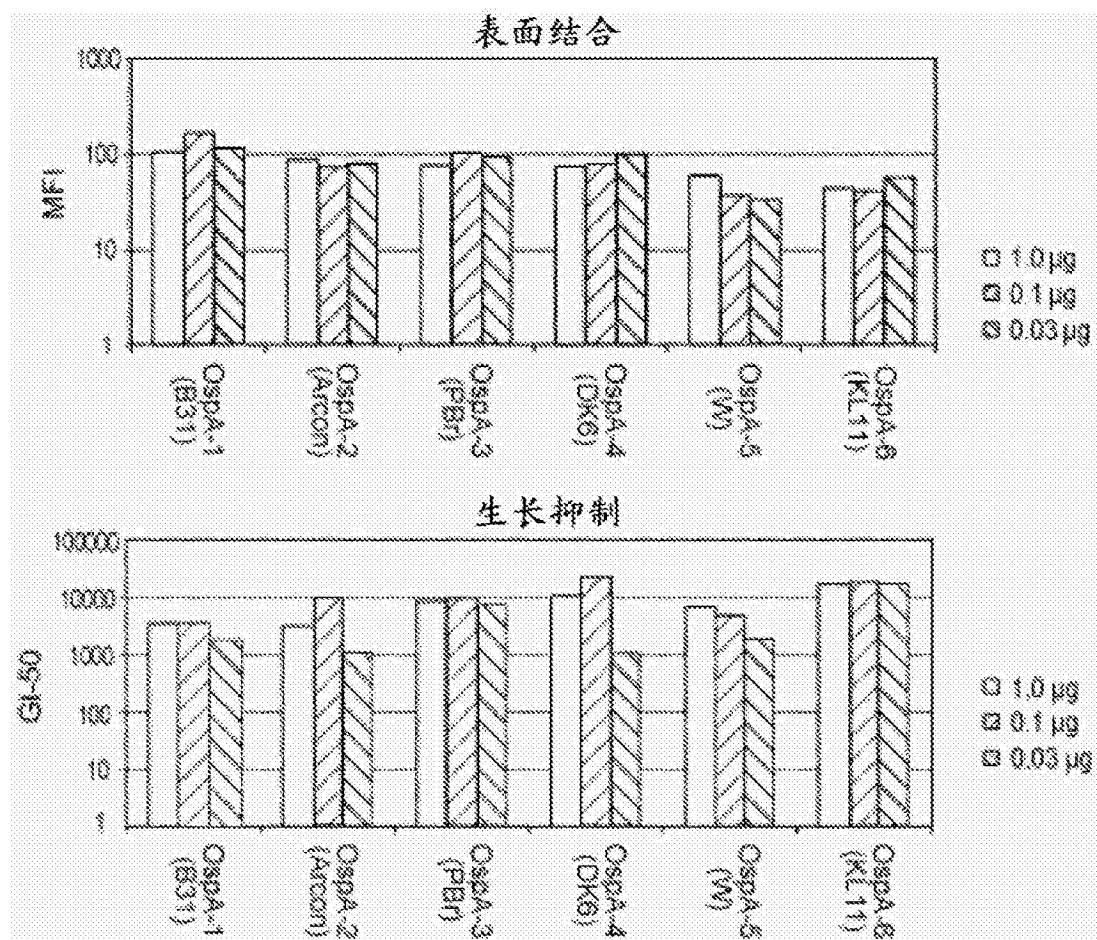


图21

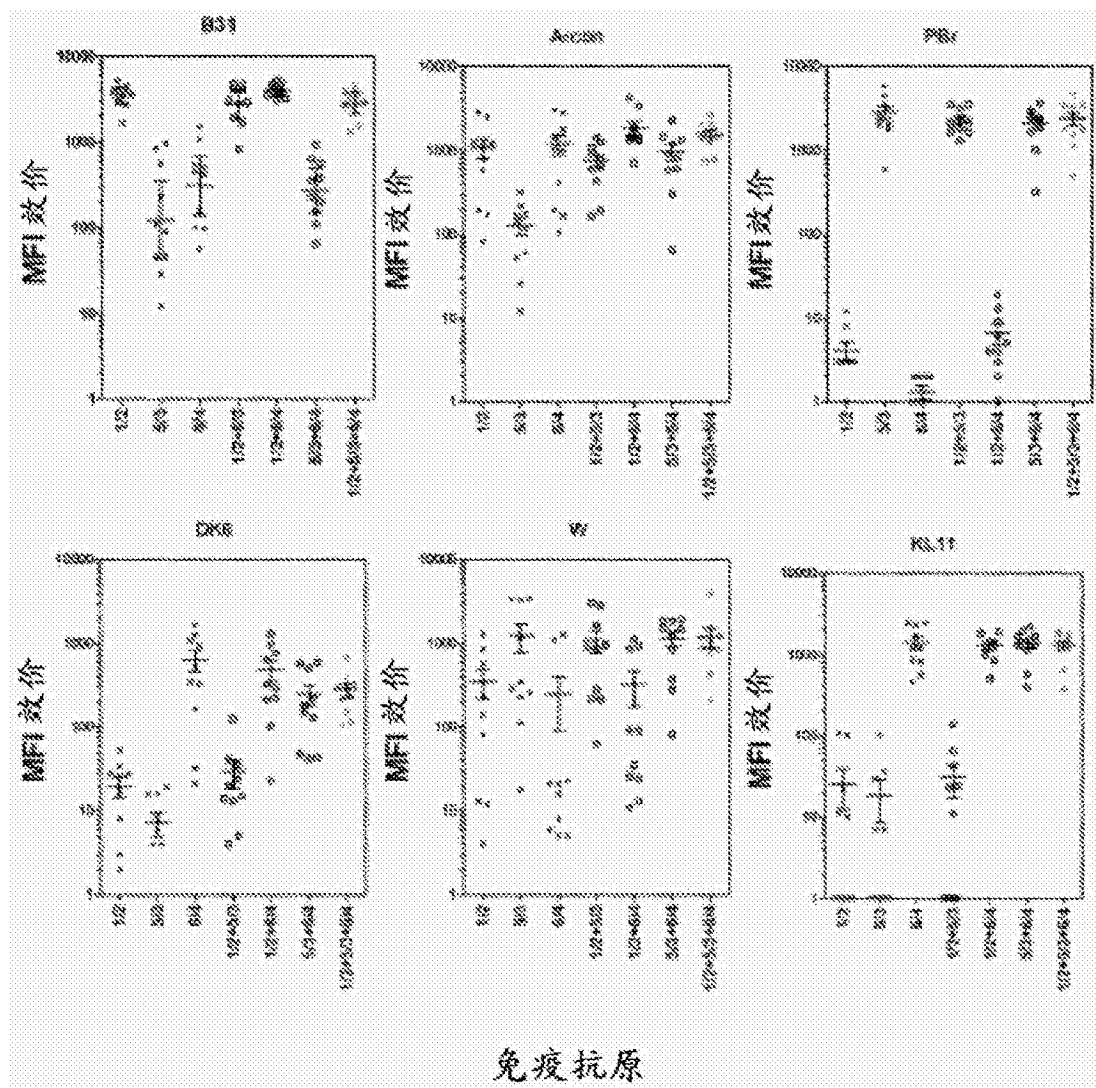


图22

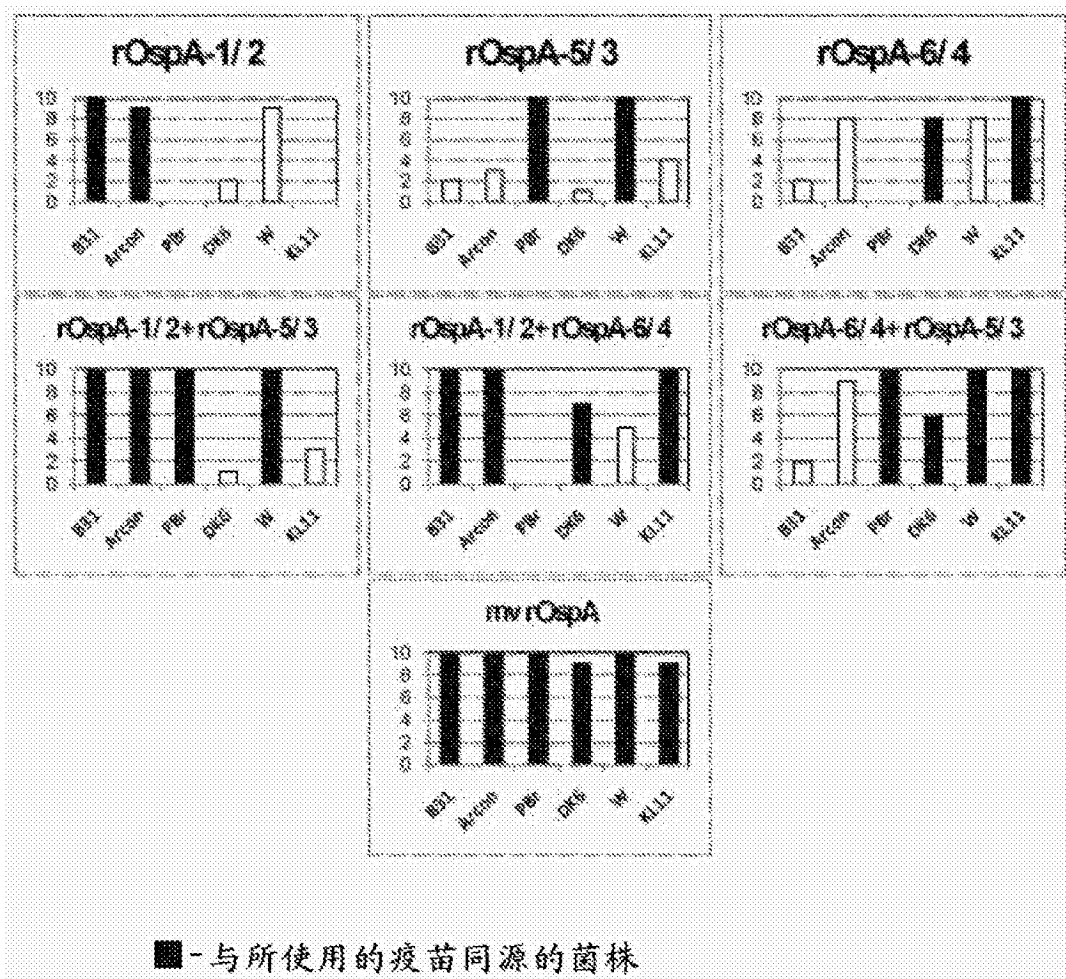


图23

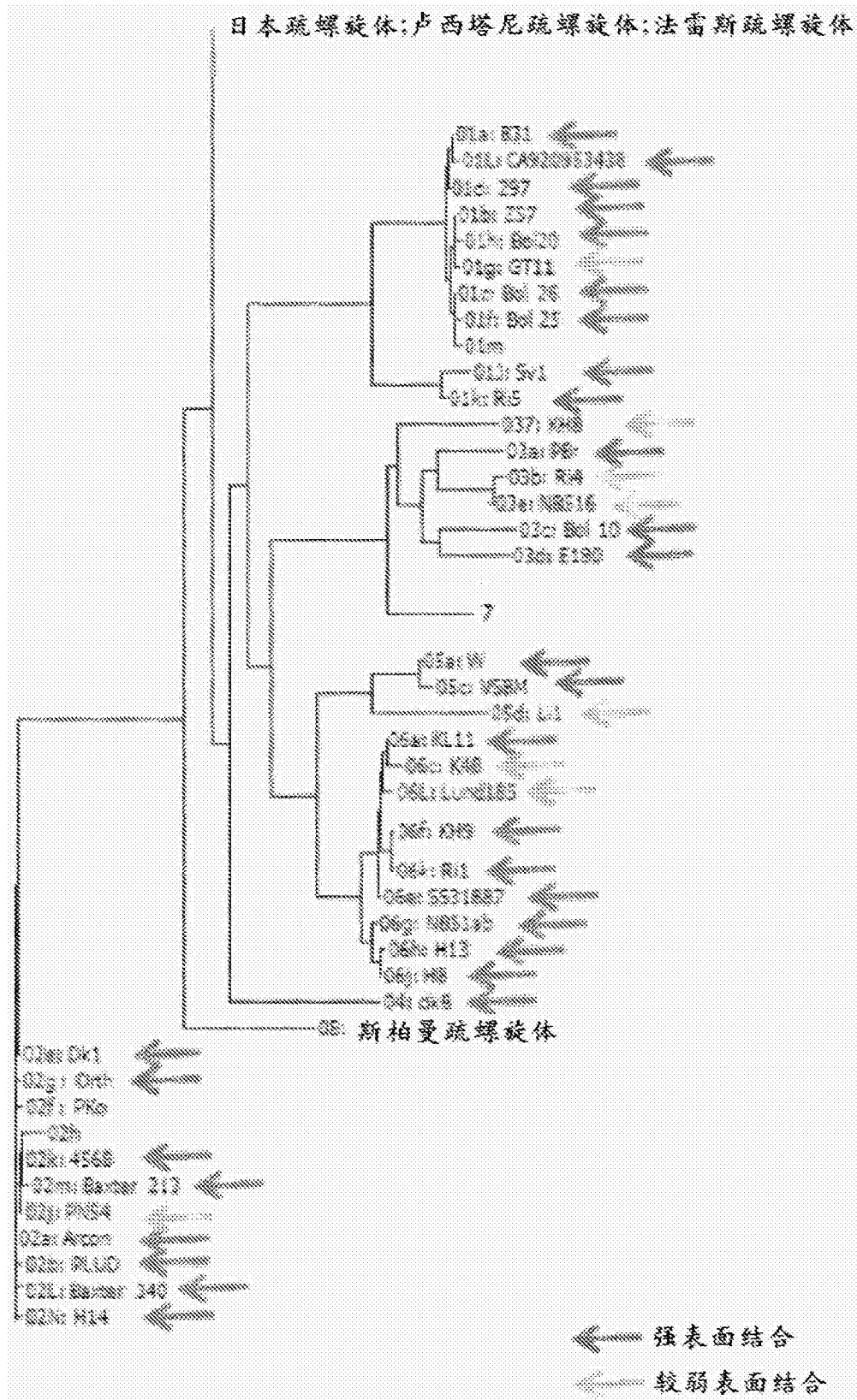


图24