

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

424-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11. 08. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.08.94, 25.02.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/9416667, 95/9503867**

(33) Země priority: **GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 10. 97**
(Věstník č. 10/97)

(86) PCT číslo: **PCT/EP95/03213**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/05313**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/31
C 07 K 14/20
A 61 K 39/02
G 01 N 33/569

(71) Přihlášovatel:

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.
V., Munich, DE;
DEUTSCHES
KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG
DES ÖFFENTLICHEN RECHTS, Heidelberg,
DE;

(72) Původce:

Wallich Reinhard, Heidelberg, DE;
Simon Markus M., Freiburg, DE;
Kramer Michael D., Heidelberg, DE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vakcína obsahující Borrelia burgdorferi
OspG**

(57) Anotace:

Předkládaný vynález poskytuje nový antigen
OspG z B. burgdorferi, který je použitelný v
prevenci a diagnostice Lymeské choroby. Je
popsáno klonování a sekvencování a exprese
antigenu.

(61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113) (114) (115) (116) (117) (118) (119) (120) (121) (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128) (129) (130) (131) (132) (133) (134) (135) (136) (137) (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152) (153) (154) (155) (156) (157) (158) (159) (160) (161) (162) (163) (164) (165) (166) (167) (168) (169) (170) (171) (172) (173) (174) (175) (176) (177) (178) (179) (180) (181) (182) (183) (184) (185) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (195) (196) (197) (198) (199) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (218) (219) (220) (221) (222) (223) (224) (225) (226) (227) (228) (229) (230) (231) (232) (233) (234) (235) (236) (237) (238) (239) (240) (241) (242) (243) (244) (245) (246) (247) (248) (249) (250) (251) (252) (253) (254) (255) (256) (257) (258) (259) (260) (261) (262) (263) (264) (265) (266) (267) (268) (269) (270) (271) (272) (273) (274) (275) (276) (277) (278) (279) (280) (281) (282) (283) (284) (285) (286) (287) (288) (289) (290) (291) (292) (293) (294) (295) (296) (297) (298) (299) (300) (301) (302) (303) (304) (305) (306) (307) (308) (309) (310) (311) (312) (313) (314) (315) (316) (317) (318) (319) (320) (321) (322) (323) (324) (325) (326) (327) (328) (329) (330) (331) (332) (333) (334) (335) (336) (337) (338) (339) (340) (341) (342) (343) (344) (345) (346) (347) (348) (349) (350) (351) (352) (353) (354) (355) (356) (357) (358) (359) (360) (361) (362) (363) (364) (365) (366) (367) (368) (369) (370) (371) (372) (373) (374) (375) (376) (377) (378) (379) (380) (381) (382) (383) (384) (385) (386) (387) (388) (389) (390) (391) (392) (393) (394) (395) (396) (397) (398) (399) (400) (401) (402) (403) (404) (405) (406) (407) (408) (409) (410) (411) (412) (413) (414) (415) (416) (417) (418) (419) (420) (421) (422) (423) (424) (425) (426) (427) (428) (429) (430) (431) (432) (433) (434) (435) (436) (437) (438) (439) (440) (441) (442) (443) (444) (445) (446) (447) (448) (449) (450) (451) (452) (453) (454) (455) (456) (457) (458) (459) (460) (461) (462) (463) (464) (465) (466) (467) (468) (469) (470) (471) (472) (473) (474) (475) (476) (477) (478) (479) (480) (481) (482) (483) (484) (485) (486) (487) (488) (489) (490) (491) (492) (493) (494) (495) (496) (497) (498) (499) (500) (501) (502) (503) (504) (505) (506) (507) (508) (509) (510) (511) (512) (513) (514) (515) (516) (517) (518) (519) (520) (521) (522) (523) (524) (525) (526) (527) (528) (529) (530) (531) (532) (533) (534) (535) (536) (537) (538) (539) (540) (541) (542) (543) (544) (545) (546) (547) (548) (549) (550) (551) (552) (553) (554) (555) (556) (557) (558) (559) (560) (561) (562) (563) (564) (565) (566) (567) (568) (569) (570) (571) (572) (573) (574) (575) (576) (577) (578) (579) (580) (581) (582) (583) (584) (585) (586) (587) (588) (589) (590) (591) (592) (593) (594) (595) (596) (597) (598) (599) (600) (601) (602) (603) (604) (605) (606) (607) (608) (609) (610) (611) (612) (613) (614) (615) (616) (617) (618) (619) (620) (621) (622) (623) (624) (625) (626) (627) (628) (629) (630) (631) (632) (633) (634) (635) (636) (637) (638) (639) (640) (641) (642) (643) (644) (645) (646) (647) (648) (649) (650) (651) (652) (653) (654) (655) (656) (657) (658) (659) (660) (661) (662) (663) (664) (665) (666) (667) (668) (669) (670) (671) (672) (673) (674) (675) (676) (677) (678) (679) (680) (681) (682) (683) (684) (685) (686) (687) (688) (689) (690) (691) (692) (693) (694) (695) (696) (697) (698) (699) (700) (701) (702) (703) (704) (705) (706) (707) (708) (709) (710) (711) (712) (713) (714) (715) (716) (717) (718) (719) (720) (721) (722) (723) (724) (725) (726) (727) (728) (729) (730) (731) (732) (733) (734) (735) (736) (737) (738) (739) (740) (741) (742) (743) (744) (745) (746) (747) (748) (749) (750) (751) (752) (753) (754) (755) (756) (757) (758) (759) (760) (761) (762) (763) (764) (765) (766) (767) (768) (769) (770) (771) (772) (773) (774) (775) (776) (777) (778) (779) (780) (781) (782) (783) (784) (785) (786) (787) (788) (789) (790) (791) (792) (793) (794) (795) (796) (797) (798) (799) (800) (801) (802) (803) (804) (805) (806) (807) (808) (809) (810) (811) (812) (813) (814) (815) (816) (817) (818) (819) (820) (821) (822) (823) (824) (825) (826) (827) (828) (829) (830) (831) (832) (833) (834) (835) (836) (837) (838) (839) (840) (841) (842) (843) (844) (845) (846) (847) (848) (849) (850) (851) (852) (853) (854) (855) (856) (857) (858) (859) (860) (861) (862) (863) (864) (865) (866) (867) (868) (869) (870) (871) (872) (873) (874) (875) (876) (877) (878) (879) (880) (881) (882) (883) (884) (885) (886) (887) (888) (889) (890) (891) (892) (893) (894) (895) (896) (897) (898) (899) (900) (901) (902) (903) (904) (905) (906) (907) (908) (909) (910) (911) (912) (913) (914) (915) (916) (917) (918) (919) (920) (921) (922) (923) (924) (925) (926) (927) (928) (929) (930) (931) (932) (933) (934) (935) (936) (937) (938) (939) (940) (941) (942) (943) (944) (945) (946) (947) (948) (949) (950) (951) (952) (953) (954) (955) (956) (957) (958) (959) (960) (961) (962) (963) (964) (965) (966) (967) (968) (969) (970) (971) (972) (973) (974) (975) (976) (977) (978) (979) (980) (981) (982) (983) (984) (985) (986) (987) (988) (989) (990) (991) (992) (993) (994) (995) (996) (997) (998) (999) (1000) (1001) (1002) (1003) (1004) (1005) (1006) (1007) (1008) (1009) (1010) (1011) (1012) (1013) (1014) (1015) (1016) (1017) (1018) (1019) (1020) (1021) (1022) (1023) (1024) (1025) (1026) (1027) (1028) (1029) (1030) (1031) (1032) (1033) (1034) (1035) (1036) (1037) (1038) (1039) (1040) (1041) (1042) (1043) (1044) (1045) (1046) (1047) (1048) (1049) (1050) (1051) (1052) (1053) (1054) (1055) (1056) (1057) (1058) (1059) (1060) (1061) (1062) (1063) (1064) (1065) (1066) (1067) (1068) (1069) (1070) (1071) (1072) (1073) (1074) (1075) (1076) (1077) (1078) (1079) (1080) (1081) (1082) (1083) (1084) (1085) (1086) (1087) (1088) (1089) (1090) (1091) (1092) (1093) (1094) (1095) (1096) (1097) (1098) (1099) (1100) (1101) (1102) (1103) (1104) (1105) (1106) (1107) (1108) (1109) (1110) (1111) (1112) (1113) (1114) (1115) (1116) (1117) (1118) (1119) (1120) (1121) (1122) (1123) (1124) (1125) (1126) (1127) (1128) (1129) (1130) (1131) (1132) (1133) (1134) (1135) (1136) (1137) (1138) (1139) (1140) (1141) (1142) (1143) (1144) (1145) (1146) (1147) (1148) (1149) (1150) (1151) (1152) (1153) (1154) (1155) (1156) (1157) (1158) (1159) (1160) (1161) (1162) (1163) (1164) (1165) (1166) (1167) (1168) (1169) (1170) (1171) (1172) (1173) (1174) (1175) (1176) (1177) (1178) (1179) (1180) (1181) (1182) (1183) (1184) (1185) (1186) (1187) (1188) (1189) (1190) (1191) (1192) (1193) (1194) (1195) (1196) (1197) (1198) (1199) (1200) (1201) (1202) (1203) (1204) (1205) (1206) (1207) (1208) (1209) (1210) (1211) (1212) (1213) (1214) (1215) (1216) (1217) (1218) (1219) (1220) (1221) (1222) (1223) (1224) (1225) (1226) (1227) (1228) (1229) (1230) (1231) (1232) (1233) (1234) (1235) (1236) (1237) (1238) (1239) (1240) (1241) (1242) (1243) (1244) (1245) (1246) (1247) (1248) (1249) (1250) (1251) (1252) (1253) (1254) (1255) (1256) (1257) (1258) (1259) (1260) (1261) (1262) (1263) (1264) (1265) (1266) (1267) (1268) (1269) (1270) (1271) (1272) (1273) (1274) (1275) (1276) (1277) (1278) (1279) (1280) (1281) (1282) (1283) (1284) (1285) (1286) (1287) (1288) (1289) (1290) (1291) (1292) (1293) (1294) (1295) (1296) (1297) (1298) (1299) (1300) (1301) (1302) (1303) (1304) (1305) (1306) (1307) (1308) (1309) (1310) (1311) (1312) (1313) (1314) (1315) (1316) (1317) (1318) (1319) (1320) (1321) (1322) (1323) (1324) (1325) (1326) (1327) (1328) (1329) (1330) (1331) (1332) (1333) (1334) (1335) (1336) (1337) (1338) (1339) (1340) (1341) (1342) (1343) (1344) (1345) (1346) (1347) (1348) (1349) (1350) (1351) (1352) (1353) (1354) (1355) (1356) (1357) (1358) (1359) (1360) (1361) (1362) (1363) (1364) (1365) (1366) (1367) (1368) (1369) (1370) (1371) (1372) (1373) (1374) (1375) (1376) (1377) (1378) (1379) (1380) (1381) (1382) (1383) (1384) (1385) (1386) (1387) (1388) (1389) (1390) (1391) (1392) (1393) (1394) (1395) (1396) (1397) (1398) (1399) (1400) (1401) (1402) (1403) (1404) (1405) (1406) (1407) (1408) (1409) (1410) (1411) (1412) (1413) (1414) (1415) (1416) (1417) (1418) (1419) (1420) (1421) (1422) (1423) (1424) (1425) (1426) (1427) (1428) (1429) (1430) (1431) (1432) (1433) (1434) (1435) (1436) (1437) (1438) (1439) (1440) (1441) (1442) (1443) (1444) (1445) (1446) (1447) (1448) (1449) (1450) (1451) (1452) (1453) (1454) (1455) (1456) (1457) (1458) (1459) (1460) (1461) (1462) (1463) (1464) (1465) (1466) (1467) (1468) (1469) (1470) (1471) (1472) (1473) (1474) (1475) (1476) (1477) (1478) (1479) (1480) (1481) (1482) (1483) (1484) (1485) (1486) (1487) (1488) (1489) (1490) (1491) (1492) (1493) (1494) (1495) (1496) (1497) (1498) (1499) (1500) (1501) (1502) (1503) (1504) (1505) (1506) (1507) (1508) (1509) (1510) (1511) (1512) (1513) (1514) (1515) (1516) (1517) (1518) (1519) (1520) (1521) (1522) (1523) (1524) (1525) (1526) (1527) (1528) (1529) (1530) (1531) (1532) (1533) (1534) (1535) (1536) (1537) (1538) (1539) (1540) (1541) (1542) (1543) (1544) (1545) (1546) (1547) (1548) (1549) (1550) (1551) (1552) (1553) (1554) (1555) (1556) (1557) (1558) (1559) (1560) (1561) (1562) (1563) (1564) (1565) (1566) (1567) (1568) (1569) (1570) (1571) (1572) (1573) (1574) (1575) (1576) (1577) (1578) (1579) (1580) (1581) (1582) (1583) (1584) (1585) (1586) (1587) (1588) (1589) (1590) (1591) (1592) (1593) (1594) (1595) (1596) (1597) (1598) (1599) (1600) (1601) (1602) (1603) (1604) (1605) (1606) (1607) (1608) (1609) (1610) (1611) (1612) (1613) (1614) (1615) (1616) (1617) (1618) (1619) (1620) (1621) (1622) (1623) (1624) (1625) (1626) (1627) (1628) (1629) (1630) (1631) (1632) (1633) (1634) (1635) (1636) (1637) (1638) (1639) (1640) (1641) (1642) (1643) (1644) (1645) (1646) (1647) (1648) (1649) (1650) (1651) (1652) (1653) (1654) (1655) (1656) (1657) (1658) (1659) (1660) (1661) (1662) (1663) (1664) (1665) (1666) (1667) (1668) (1669) (1670) (1671) (1672) (1673) (1674) (1675) (1676) (1677) (1678) (1679) (1680) (1681) (1682) (1683) (1684) (1685) (1686) (1687) (1688) (1689) (1690) (1691) (1692) (1693) (1694) (1695) (1696) (1697) (1698) (1699) (1700) (1701) (1702) (1703) (1704) (1705) (1706) (1707) (1708) (1709) (1710) (1711) (1712) (1713) (1714) (1715) (1716) (1717) (1718) (1719) (1720) (1721) (1722) (1723) (1724) (1725) (1726) (1727) (1728) (1729) (1730) (1731) (1732) (1733) (1734) (1735) (1736) (1737) (1738) (1739) (1740) (1741) (1742) (1743) (1744) (1745) (1746) (1747) (1748) (1749) (1750) (1751) (1752) (1753) (1754) (1755) (1756) (1757) (1758) (1759) (1760) (1761) (1762) (1763) (1764) (1765) (1766) (1767) (1768) (1769) (1770) (1771) (1772) (1773) (1774) (1775) (1776) (1777) (1778) (1779) (1780) (1781) (1782) (1783) (1784) (1785) (1786) (1787) (1788) (1789) (1790) (1791) (1792) (1793) (1794) (1795) (1796) (1797) (1798) (1799) (1800) (1801) (1802) (1803) (1804) (1805) (1806) (1807) (1808) (1809) (1810) (1811) (1812) (1813) (1814) (1815) (1816) (1817) (1818) (1819) (1820) (1821) (1822) (1823) (1824) (1825) (1826) (1827) (1828) (1829) (1830) (1831) (1832) (1833) (1834) (1835) (1836) (1837) (1838) (1839) (1840) (1841) (1842) (1843) (1844) (1845) (1846) (1847) (1848) (1849) (1850) (1851) (1852) (1853) (1854) (1855) (1856) (1857) (1858) (1859) (1860) (1861) (1862) (1863) (1864) (1865) (1866) (1867) (1868) (1869) (1870) (1871) (1872) (1873) (1874) (1875) (1876) (1877) (1878) (1879) (1880) (1881) (1882) (1883) (1884) (1885) (1886) (1887) (1888) (1889) (1890) (1891) (1892) (1893) (1894) (1895) (1896) (1897) (1898) (1899) (1900) (1901) (1902) (1903) (1904) (1905) (1906) (1907) (1908) (1909) (1910) (1911) (1912) (1913) (1914) (1915) (1916) (1917) (1918) (1919) (1920) (1921) (1922) (1923) (1924) (1925) (1926) (1927) (1928) (1929) (1930) (1931) (1932) (1933) (1934) (1935) (1936) (1937) (1938) (1939) (1940) (1941) (1942) (1943) (1944) (1945) (1946) (1947) (1948) (1949) (1950) (1951) (1952) (1953) (1954) (1955) (1956) (1957) (1958) (1959) (1960) (1961) (1962) (1963) (1964) (1965) (1966) (1967) (1968) (1969) (1970) (1971) (1972) (1973) (1974) (1975) (1976) (1977) (1978) (1979) (1980) (1981) (1982) (1983) (1984) (1985) (1986) (1987) (1988) (1989) (1990) (1991) (1992) (1993) (1994) (1995) (1996) (1997) (1998) (1999) (2000) (2001) (2002) (2003) (2004) (2005) (2006) (2007) (2008) (2009) (2010) (2011) (2012) (2013) (2014) (2015) (2016) (2017) (2018) (2019) (2

Vakciny obsahující *Borrelia burgdorferi* OspG

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových antigenů a jejich derivátů odvozených od *Borrelia burgdorferi*, metod jejich produkce, jejich použití v lidské a zvířecí medicíně a diagnostice a farmaceutických kompozic, které je obsahují.

Přesněji, předkládaný vynález poskytuje klonující expresi nového polymorfního *B. burgdorferi* lipoproteinu OspG. Tento byl dříve znám jako lp77. Určená aminokyselinová sekvence tohoto proteinu nevykazuje žádnou homologii k jiným známým antigenům *Borrelia* jako je OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF a P27. Tyto proteiny zevního povrchu vykazují mezi 41% a 65% podobnosti s OspG (Tabulka 1).

Dosavadní stav techniky

Lymská choroba je nejčastější vektorem přenášenou infekční chorobou mírného klimatu. Etiologické agens, spirocheta *Borrelia burgdorferi*, způsobuje u lidí multisystemové onemocnění, které může napadat kůži, nervový system, klouby a srdce (8,44). Kmeny *B. burgdorferi* izolované z různých biologických zdrojů a geografických oblastí jsou heterogenní (2, 19, 38, 45, 50) a je předpokládáno, že charakter manifestace onemocnění je ovlivněn antigenními rozdíly mezi kmeny spirochet. Ačkoliv byly popsány mnohé pokusy klasifikovat *B. burgdorferi* podle imunologických nebo molekulárních kritérií, je taxonomie *B. burgdorferi* stále kontraverzní a věcí aktivního výzkumu.

Nyní je využíváno množství antigenů *B.burgdorferi* jako je zevní povrchový protein A (OspA), OspB, pC a p100 pro serologickou diagnostiku a jako možných kandidátů pro vývoj vakciny (13, 14, 36, 38, 40, 41). Nicméně, díky jejich zřejmé heterogenitě, stále chybí jasná kritéria pro vývoj druhově specifických diagnostických standardů a pro vývoj polypeptidové vakciny, která zaručí ochranu před jakýmkoliv poddruhem.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález objevuje další lipoprotein *B.burgdorferi*, který je označen OspG. Tato molekula je charakterizována molekulární hmotností přibližně 22 kDa, izoelektrickým bodem PI=5.2 a obsahuje 196 aminokyselin. Zralý protein je dále charakterizován jednou rozsáhlou hydrofobní doménou o přibližně 20 aminokyselinách na amino terminální části OspG. N-terminální peptid koresponduje k "leader" signálnímu peptidu, který je nacházen v typických prokaryotních lipoproteinových prekursorech. Na karboxy konci hydrofobního jádra je štěpící místo předpokládaně rozpoznávané *B.burgdorferi* signální peptidasou. Potenciální štěpící místo v OspG se nachází mezi serinem v poloze 19 a cysteinem v poloze 20. Sekvence okolo štěpícího místa OspG je L-1-1-S-C.

Oproti OspA, B, C, D, E, F a P27 e OspG gen přirozeně umístěn na 55 kb plasmidu u *B.burgdorferi* ZS7. Byla zaznamenána slabá zkřížená reaktivita mezi OspG probou a 45 kb plasmidem. OspG má aminokyselinovou sekvenci jak je dána na Obrázku 1. Je dále charakterizován tím, že je exprimován pouze během infekce a není detekovatelný v *B.burgdorferi* kultivované in vitro.

V souladu s tím předkládaný vynález poskytuje izolovaný protein odvozený od *B.burgdorferi* charakterizovaný tím, že má molekulární hmotnost okolo 20 - 22 kDa, jak je určeno dvourozměrnou SDS gelovou elektroforesou, a izoelektrický bod mezi 4,9 a 5,4.

Předkládaný vynález dále poskytuje protein nebo imunologicky nebo antigenně rovnocenný fragment nebo jeho derivát alespoň 80% homologie k aminokyselinové sekvenci znázorněné na Obrázku 1.

Protein a jeho korespondující DNA a RNA sekvence nacházejí využití jak ve vakcině, tak na poli diagnostiky.

Preferovaně předkládaný vynález poskytuje protein mající alespoň 85% homologii, lépe 90% homologii a nejlépe 95% homologii k proteinu znázorněnému na Obrázku 1.

Protein předkládaného vynálezu může být fuzní protein, a v tomto případě je fuzní protein charakterizován tím, že má část jeho aminokyselinové sekvence nebo její fragment. Preferovanou částí je alespoň 80%, lépe 85% , ještě lépe 90%, a nejlépe 95% homologie k proteinové sekvenci Obrázku 1.

Preferovaně je protein alespoň 70% čistoty jak je určeno SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforesou, lépe 80% čistoty a nejlépe alespoň 90% čistoty.

Protein předkládaného vynálezu může být lipoprotein, nebo může být produkován jako protein bez jakýchkoliv asocioaných lipidů. Je-li produkován rekombinantními technikami bude lipoprotein exprivován se signální sekencí. Stěpení signální

sekvence kvůli odstranění N-koncových 19 aminokyselin povede k produkci molekuly bez lipidů.

Imunoblottová analýza ukazuje, že OspG je rozpoznán sérem od myši dříve infikovaných intaktními spirochetami což napovídá, že nativní protein je u tohoto druhu imunogenní.

Předkládaný vynález dále identifikuje a sekvenuje gen pro OspG. V souladu s tím vynález poskytuje DNA sekvenci kódující protein OspG nebo jeho fragment nebo jeho derivát. Preferovaná DNA sekvence je v podstatě dána na Obrázku 1.

Termín "v podstatě" jak je zde použit znamená alespoň 70% identitu k sekvenci dané na Obrázku 1, lépe 80% identitu, ještě lépe alespoň 85% identitu a nejlépe alespoň 95% identitu. Předkládaný vynález poskytuje DNA sekvenci mající v podstatě sekvenci znázorněnou na Obrázku 1, nebo její fragment, nebo DNA sekvenci, která hybridizuje zmíněnou sekvenci a která koduje protein, který vykazuje OspG antigenicitu.

DNA předkládaného vynálezu může být připravena enzymatickou polymerací DNA, která může být provedena in vitro užitím DNA polymerasy jako je DNA polymerasa I (Klenow fragment) ve vhodném pufru obsahujícím nukleosid trifosfáty dATP, dCTP, dGTP, a dTTP podle potřeby při teplotě 10 - 37 °C, obecně v objemu 50 µl nebo menším. Enzymatická ligace DNA fragmentů může být provedena užitím DNA ligasy jako je T4 DNA ligáza ve vhodném pufru jako je 0,05 M Tris (pH 7.4), 0,01 M MgCl₂, 0,01 M dithiotreitol, 1 mM spermidin, 1 mM ATP a 0,1 mg/ml hovězí sérový albumin, při okolní teplotě 4 °C, obecně v objemu 50 µl nebo menším. Chemická syntéza DNA polymeru nebo jeho fragmentů může být provedena konvenčními

fosphotriesterovou, fosphitovou nebo fosphoramiditovou chemií, užitím techniky pevné fáze jako je ta, která je popsána v "Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual" (vyd. H.G. Gassen and A.Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982)), nebo v jiné odborné publikaci, například M.J.Gait, H.W.D. Matthes, M.Singh, B.S. Sproat, a R.C. Titmas, Nucleic Acids Research, 1982, 10, 6234; B.S. Sproat a W. Bannwarth, Tetrahedron Letters, 1983, 24, 5771; M.D. Matteucci a M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters, 1980, 21, 719; M.D. Matteucci a M.H. Caruthers, Journal of the American Chemical Society, 1981, 103, 3185, S.P. Adams et al., Journal of the American Chemical Society, 1983, 105, 661; N.D.Sinha, J.Biernat, J.McMannus, a H.Koester, Nucleic Acids Research, 1984, 12, 4539; a H.W.D.Matthes et al., EMBO Journal, 1984, 3, 801.

Alternativně může být kodující sekvence odvozena od B.burgdorferi mRNA užitím známých technik (t.j. reverzní transkripce mRNA pro generování komplementárního cDNA řetězce), a komerčně dostupných cDNA kitů.

Vynález není omezen na specificky popsané sekvence, ale zahrnuje všechny molekuly kodující protein nebo jeho imunogenní derivát, jak je popsáno výše.

DNA polymery, které kodují mutanty proteinu vynálezu mohou být připraveny místně řízenou mutagenesí cDNA kodující protein pomocí konvenčních metod jako jsou ty, které popisuje G. Winter et al., v Nature 1982, 299, 756 - 758 nebo Zoller a Smith 1982, Nucl. Acids Res., 10 6487 - 6500, nebo pomocí deleční mutagenese jak ji popisuje Chan a Smith v Nucl. Acids Res., 1984, 12, 2407 - 2419 nebo G.Winter et al., v Biochem. Soc. Trans., 1984, 12, 224 - 225.

V jednom aspektu předkládaný vynález poskytuje postup, který zahrnuje tyto kroky:

i) přípravu replikovatelného nebo integrujícího expresního vektoru schopného v hostitelské buňce exprese DNA polymeru obsahujícího nukleotidovou sekvenci, která koduje zmíněný OspG protein nebo jeho imunogenní derivát;

ii) transformování hostitelské buňky zmíněným vektorem;

iii) kultivování zmíněných transformovaných hostitelských buněk za podmínek dovolujících expresi zmíněného DNA polymeru za produkce zmíněného proteinu; a

iv) odběr uvedeného proteinu.

Termín "transformování" jak je zde použit znamená zavedení cizorodé DNA do hostitelské buňky transformací, transfekcí nebo infekcí vhodným plasmidem nebo virovým vektorem za použití konvenčních technik jak je popsáno v Genetics Engineering; Eds. S.M. Kingsman and A.J. Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, England, 1988. Termín "transformovaný" nebo "transformant" je zde použit na výslednou hostitelskou buňku obsahující a exprimující požadovaný cizorodý gen.

Expresní vektor je nový a také tvoří část vynálezu.

Replikovatelný expresní vektor může být připraven podle vynálezu štěpením vektoru kompatibilního s hostitelskou buňkou za vytvoření lineárního DNA segmentu majícího intaktní replikon, a kombinováním uvedeného lineárního segmentu za ligačních podmínek s jednou nebo více DNA

molekulami které, spolu s uvedeným lineárním segmentem kodují požadovaný produkt jako je DNA polymer kodující OspG protein, nebo jeho fragmenty.

Tak může být DNA polymer vytvořen předem nebo vytvořen během konstrukce vektoru, jak je žádoucí.

Volba vektoru bude částečně určena hostitelskou buňkou, která může být prokaryotní nebo eukaryotní. Vhodné vektory zahrnují plasmidy, bakteriofágy, kosmidy a rekombinantní viry.

Příprava replikovatelného expresního vektoru může být provedena konvenčně vhodnými enzymy pro restrikci polymerizaci a ligaci DNA postupy popsány, například, Maniatisem et al., který byl citován výše.

Rekombinantní hostitelská buňka je připravena podle vynálezu transformováním hostitelské buňky replikovatelným expresním vektorem podle vynálezu za transformujících podmínek. Vhodné transformující podmínky jsou konvenční a jsou popsány například v Maniatis et al. citovaném výše, nebo "DNA cloning" Vol. II. D.M. Glover ed., IRL Press LTD, 1985.

Výběr transformujících podmínek je určen hostitelskou buňkou. Tak bakteriální hostitel jako je E.coli může být ošetřen roztokem CaCl_2 (Cohen et al., Proc. Nat. Acad.Sci., 1973, 69, 2110) nebo roztokem obsahujícím směs RbCl , MnCl_2 , octan draselný a glycerol, a pak 3-(N-morpholino)-propansulfonovou kyselinou, RbCl a glycerolem. Savčí buňky v kultuře mohou být transformovány vápníkovou koprecipitací DNA vektoru do buněk. Vynález také

zahrnuje hostitelské buňky transformované replikovatelným expresním vektorem podle vynálezu.

Kultivování transformovaných hostitelských buněk za podmínek dovolujících expresi DNA polymeru je provedeno konvenčně, jak je popsáno například v Maniatis et al. a "DNA cloning" citovaných výše. Preferovaně jsou buňce doplňovány živiny a je kultivována při teplotě nižší než 45 °C.

Produkt je shromážděn konvenčními metodami podle hostitele. Tam, kde je hostitel bakteriální, jako je *E.coli*, může být lyzován chemicky nebo enzymaticky a proteinový produkt může být izolován z výsledného lyzátu nebo super variant. Tam kde je hostitel savčí může být produkt obecně izolován z živného media nebo z buněk prostého extraktu. Konvenční techniky izolace proteinu zahrnují selektivní precipitaci, absorpční chromatografii, a afinitní chromatografii včetně monoklonální protilátka afinitní kolony.

Alternativně může být exprese provedena na hmyzích buňkách za použití vhodného vektoru jako je Baculovirus. V jednotlivém aspektu tohoto vynálezu je protein exprivován v Lepidoptera buňkách za produkce imunogenních polypeptidů. pro expresi proteinu v Lepidoptera buňkách je preferováno použití baculovirus expresního systému. V takovém systému je expresní kazeta obsahující sekvenci kodující protein, která je operativně navázána na baculovirový promotor, typicky umístěna do "shuttle" vektoru. Takový vektor obsahuje dostatečné množství bakteriální DNA k šíření "shuttle" vektoru v *E.coli* nebo jiném vhodném prokaryotním hostiteli. Takový "shuttle" vektor také obsahuje dostatečné množství baculovirové DNA připojené k požadované kodující sekvenci

proteinu, takže dovoluje rekombinaci mezi divokým typem baculoviru a heterologním genem. Rekombinantní vektor je pak kotransfektován do Lepidoptera buněk s DNA divokého typu baculoviru. Rekombinantní baculoviry vzniklé z homologní rekombinace jsou pak selektovány a plaky jsou purifikovány standardními technikami. Viz Summers et al., TAES Bull (Texas Agricultural Experimental Station Bulletin) NR 1555, Květen, 1987.

Postup exprese CS proteinu ve hmyzích buňkách je popsán detailně v USSN 287,934 SmithKline RIT (WO/US 89/05550).

Produkce v hmyzích buňkách může také být provedena infikováním hmyzích larev. Například, protein může být produkován v *Heliothis virescens* housenkách krmením rekombinantním baculovirem podle vynálezu spolu se stopovým množstvím divokého typu baculoviru a pak extrakcí proteinu z hemolymfy po asi dvou dnech. Viz, například, Miller et al., PCT/WO88/02030.

Nový protein podle vynálezu může být také exprimován ve kvasinkách jak je popsáno pro CS protein v EP-A-0 278 941.

Předkládaný vynález se také týká kompozice vakciny obsahující OspG nebo jeho fragment nebo derivát.

Ve vakcině podle vynálezu může být vodný roztok proteinu(ů) použit přímo. Alternativně může být protein, s nebo bez předcházející lyofilizace, smíchán nebo absorbován s jakýmkoliv z mnoha známých adjuvans. Taková adjuvans zahrnují, ale nejsou na ně omezena, hydroxid hlinitý, muramyl dipeptid a saponiny jako je Quil A. Zejména preferovaná adjuvans jsou MPL (monofosforyl lipid A)

a 3D-MPL (3 De-O-acetylovaný monofosforyl lipid A). Další preferovaná adjuvans jsou známá jako QS21. 3 D-MPL může být získán od Ribi Immunochem nebo metodami popsány v UK patentu č.2220211, zatímco QS21 může být získán od Cambridge Biotech nebo metodami popsány v US patentu č. 5,057,540. Jako další alternativa může být protein enkapsulován v mikročásticích jako jsou liposomy nebo asociován s olejem ve vodné emulzi. V ještě další alternativě může být protein konjugován na imunostimulující makromolekulu jako je usmrcená Bordetella nebo tetanický toxoid. V preferovaném provedení vynálezu bude antigen předkládaného vynálezu obsahovat jiné Borreliové antigeny, zejména OspA.

Proteiny předkládaného vynálezu mohou být exprimovány živými vektory jako je BCG, Listeria nebo Salmonella a při použití takových vektorů mohou být vytvářeny živé vakcíny.

Příprava vakcín je obecně popsána v New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al., (eds.), University Park Press, Baltimore, Maryland, 1978. Enkapsulace v liposomech je popsána Fullertonem, US patent 4,235,877. Konjugaci proteinů na makromolekuly objasňuje, například, Likhite, US patent 4,372,945 a Armor et al., US patent 4,474,757.

Užití Quil A popisuje Dalsgaard et al., Acta Vet Scand, 18:349 (1977).

Množství proteinu podle předkládaného vynálezu přítomného v každé dávce vakcíny je vybráno jako množství, které indukuje imunoprotektivní odpověď bez signifikantních nepříznivých vedlejších účinků v typické vakcíně. Takové množství bude velmi záviset na tom, který specifický

imunogen je využit a na tom, jestliže vakcína obsahuje adjuvans. Obecně je očekáváno, že každá dávka bude obsahovat 1 – 1000 µg proteinu, výhodně 1 – 200 µg. Optimální množství pro jednotlivou vakcínu může být upřesněno standartními studiemi zahrnujícími pozorování titru protilátek a jiných odpovědí subjektů. Po počáteční vakcinaci mohou subjekty dostat další dávku pro zvýšení jejich imunitní odpovědi.

Předkládaný vynález se také týká protilátek, preferovaně monoklonálních protilátek, které jsou specifické pro OspG. Takové protilátky nacházejí uplatnění v diagnostice a také v prevenci Lymské choroby.

V alternativním provedení vynález poskytuje diagnostický kit obsahující OspG antigen.

Příklady provedení vynálezu

I. Materiál a metody

I.1. Kmeny *Borrelia*

Kmeny *B.burgdorferi* použité v této studii byly popsány jinde (45). *Borrelie* byly kultivovány v modifikovaném Barbour – Stoenner – Kelly II (BSK II) mediu (2) při 33 °C. Spirochety byly získány centrifugací při 10000 x g při 4 °C po 20 minut, dvakrát promyty v PBS a počítány mikroskopií v temném poli.

Příprava a screening *B.burgdorferi* expresní knihovny

Genomová DNA byla připravena z *B.burgdorferi* kmenu ZS7 lysozym/SDS metodou a DNA fragmenty byly generovány sonikací. Tupě zakončená DNA byla insertována do pUEX1

vektoru použitím adaptorové klonovací strategie (7,31).
 Ligovaná DNA byla transformována do *E.coli* MC1061 po čemž
 následoval expresní screening užitím imunitního séra
 získaného od DBA/2 myši inokulovaných 104 (a méně)
B.burgdorferi (ZS7) organismy.

I.2. Southern Blot hybridizace

Celková genomová DNA byla extrahována z *Borrelia*
 organismů jak bylo popsáno dříve (32). Přibližně 5 µg DNA
 bylo tráveno 100 U restriční nukleázy (HindIII) podle
 doporučení výrobce (Boehringer, Mannheim). Vzorky byly
 podrobeny elektroforese užitím 0.7% agarosového gelu. DNA
 fragmenty byly transferovány do Hybon TM-N nylonové membrány
 (Amersham) po čemž následovala UV - zkřížená vazba a
 hybridizace. Krátce, při použití ³²P-značených prob byla
 hybridizace provedena přes noc při 65 °C v 0,5 M
 NaHPO₄/7%NaDodSO₄, pH 7,2. Po promytí v 40 nM NaHPO/1%
 NaDodSO₄, pH 7,2 při pokojové teplotě po 30 minut byla suchá
 membrána autoradiografována na Kodak XAR-5 filmu s
 intenzifikovaným prohlížením při -80 °C po 1 až 12 hodin.
 Jako hybridizační proba byl použit 500 bp DNA fragment
 zahrnující LA7 kodující region. Žádoucí genový fragment byl
 získán z agarosového gelu s nízkou teplotou tání,
 precipitován ethanolem a radioznačen náhodně nastartovanou
 reakcí jak je popsáno.

I.5. Gelová elektroforesa

Pro elektroforesu na jednorozměrových SDS/PAGE gelových
 deskách podle Laemliho (21) bylo 40 µl každého lyzátu
 (ekvivalentní k $\approx 10^8$ organismů) smícháno s 10 µl 5 x
 redukujícím vzorkem pufru.

Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforeza byla provedena jak popisuje O'Farrel (29) za použití IEF (Pharmacia/LKB amfolyty: 1,45% pH 3,5 - 10, 0,1% pH 2,5 - 4,0, 0,2% pH 9 - 11) v prvním rozměru. Bylo použito stejné množství lyzátu jako v případě jednorozměrové gelové elektroforezy. Gely byly buď barveny stříbrem nebo zpracovány pro Western blotting (15).

Proteolýza povrchu použitím proteiny K (Boehringer - Mannheim, Germany) byla provedena podle metody Barboura et al., (20). Proteiny byly pak separovány SDS-PAGE a jednotlivé antigeny byly identifikovány imunoblottingem.

I.6. Western blotting

Po dvourozměrové SDS-PAGE byly proteiny elektroblotovány po 1 hodinu při konstantním proudu (60 mA) do Hybond C nitrocelulosové vrstvy (Amersham) za využití semisuché elektroblottingové komůrky (BIO-RAD, Munich, Germany) podle doporučení výrobce. Po inkubaci přes noc ve blokujícím pufru (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% netučného sušeného mléka) byly imunoblotty inkubovány po 2 hodiny při pokojové teplotě s 1:100 (obj./obj.) ředěním myšího a lidského antiséra v 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% sušeného mléka, 0,2 % Tween 20 nebo se supernatantem kultury myší mAbs (LA7). Nitrocelulosové filtry byly promyty pětkrát v ředícím pufru a inkubovány další hodinu s alkalická fosfatasa - konjugovaným kozím anti - králičím antiserem (Dianova, Hamburg, Germany, 1:400 obj./obj.). Bloty byly promyty čtyřikrát ve výše zmíněném pufru a dvakrát v TBS a imunoreaktivní proužky pak byly vizualizovány přidáním 20 ml DEA-pufu (0,1 M diethanolamin (Sigma), 0,02% NaN₃, 5mM MgCl₂, pH 9,0) doplněném 5-bromo-4-chloro-3-indolfosfátem

(BCIP, Sigma; 165 µg/ml) a nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma, 330 µg/ml) jako substrátem. Reakce byla ukončena promytím membrány v 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA.

I.7. DNA sekvence

B.burdorferi genomové DNA fragmenty klonované do pUEX1 plasmidů (Amersham) byly sekvenovány užitím T⁷Sequencing kit (Pharmacia) podle doporučení výrobce.

I.8. Aminokyselinová sekvenční analýza

Simultání seřazení proteinových sekvencí a konstrukcí fylogenetického stromu bylo provedeno použitím HUSAR software.

I.9. Imunofluorescence

Organismy *B.burgdorferi* byly dvakrát promyty v PBS, transferovány do adhezních sklíček (Superior, Bad Mergentheim, FRG) (1×10^5 spirochet/reakční pole), fixovány v absolutním ethanolu (2 minuty, -20 °C) a sušeny vzduchem. Fixované spirochety byly inkubovány s příslušnou mAb, ředěné spirochety byly inkubovány s fluorescein isothiokyanatem ve vlhké komůrce po 30 minut. Po třech promytích v PBS byly preparáty vyšetřovány použitím fluorescentního mikroskopu a dokumentovány užitím 400 ASA černobílého filmu (HP5; Ilford, UK).

I.10. Imunofluorescence

Organismy *B.burgdorferi* byly dvakrát promyty v PBS, transferovány do adhezních sklíček (Superior, Bad Mergentheim, FRG) 10^5 spirochet na reakční pole, fixovány v absolutním ethanolu (2 minuty, -20 °C) a sušeny vzduchem. Fixované

spirochety byly inkubovány s jednotlivou MAb ředěnou v PBS ve vlhké komůrce po 30 minut. Po třech promytích v PBS byly spirochety inkubovány s fluorescein isothiokyanat - značeným anti - myším imunoglobulinovým antiserem (Medac, Hamburg, Germany) v temné vlhké komůrce po 30 minut. Po třech promytích v PBS byly preparáty vyšetřovány požitím fluorescentního mikroskopu a dokumentovány užitím 400 ASA černobílého filmu (HP5; . . . Illford, UK).

ELISA B.burgdorferi specifické protilátky byly měřeny v pevné fázi ELISA systému s B.burgdorferi B31 antigeny jak je popsáno dříve (15).

2.1. PCR amplifikace části ospG genu

OspG gen postrádající sekvenci kodující hydrofobní "leader" peptid byl PCR amplifikován s oligonukleotidovými primery 5' - GTGGATCCAAGATTGATGCGAGTAGTG - 3' (korespondující nukleotidům 61 až 79) a 5' - GTGAATTCTATTTTTATCTTCTATATTTTGAGGCTCTG - 3' (korespondující nukleotidům 560 až 590). Plasmidová pZS7 DNA byla podrobena 30 cyklům PCR na DNA Thermal Cyclor (Bio-Med60). Denaturace byla provedena při 94 °C po 60 s, tepelné zpracování při 48 °C po 90 s a extenze při 72 °C po 90 s. Amplifikovaný fragment byl ligován v rámečku s genem gluthathion S-transferasy do pGEX-2T vektoru po digesci BamHI a EcoRI a byl použit pro transformaci DH5α hostitelských buněk.

2.2. Exprese a purifikace rekombinantního OspG

Expresa gluthathion-S-transferasa-OspG fuzního proteinu v E.coli DH5α, afinitní purifikace a štěpení fuzního proteinu endoproteinasou trombinem bylo provedeno podle doporučení výrobce (Pharmacia).

2.3. (^3H) palmitat značení a Triton X-100 fázové rozdělování

E.coli organismy s plasmidy nesoucími kompletní (pZSX77) zkrácené (pOspG) verze ospG genu byly kultivovány za přítomnosti (9,10-(n)- ^3H) palmitové kyseliny (specifická aktivita ≈ 50 Ci/mmol, Amersham) a radioznačené lipoproteiny byly extrahovány Triton X-100 rozdělením do fází jak bylo popsáno dříve (46).

2.4. Vývoj imunitního séra a serologie

Imunitní séra byla získána od myši dříve inokulovaných na ocase buď 10^8 (C.B-17; IS anti- 10^8) nebo 10^3 (DBA/2; IS anti- 10^3) živými *B.burgdorferi* spirochetami kmenu ZS7 nebo "primed" 5 - 10 μg lipidovaného (lip) lipOspA (BALB/c; IS anti-lipOspA) nebo rekombinantním (rec) recOspG (BALB/c; IS anti-recOspA) s.c. s adjuvans (ABM2; Sebac, Aidenbach, Germany) a posílených po 10 a 20 dnech. Všechna séra byla analyzována ELISA na množství spirochety-specifických imunoglobulinů (Ig) v buď kompletním lysátu spirochet (B.b.Ig) nebo v recOspA (OspA Ig) nebo recOspG (OspG Ig) jak bylo popsáno dříve (39).

2.5. Pokusy ochrany

SCID myši byly buď ponechány bez ošetření nebo rekonstituovány buď normálním myším sérem (NMS) nebo poolovaným imunitním sérem (IS). Množství spirochet-specifických IG (ELISA nebo kompletní *B.burgdorferi* buněčné lysáty) transferované s jednotlivým IS bylo následující: IS anti- 10^8 , 4,4 μg Ig/myš; IS anti- 10^3 , 4,5 μg /myš; IS anti-lipOspA, 5 μg /myš; IS anti-recOspG, 72 ng/myš. Při testování na recOspG bylo množství specifických Ig asi 10 - 20 krát vyšší v IS anti-recOspG ve srovnání s IS anti- 10^3 . IS byly podány i.p. a o hodinu později byly příjemci vystaveni 10^5 spirochetám (*B.burgdorferi* ZS7) s.c. Myši byly zkoumány na vývoj klinické artritidy za podmínek slepého pokusu na přítomnost

spirochet kultivací biopsií ucha v BSK mediu jak bylo popsáno dříve (37,40).

2.6. Patologie

Vývoj klinické artritidy v tibiotalárním skloubení byl monitorován za podmínek slepého pokusu jak bylo popsáno dříve (37,40). Použité hodnocení bylo následující: ++, těžká; + méně těžká; (+) střední; +/- mírný otok; (+/-) hraniční otok, zarudnutí; a -, žádné známky artritidy.

Výsledky

Klonování OspG a analýza rekombinantních konstruktů

B. burgdorferi ZS7 genomová DNA expresní knihovna byla vyšetřována imunitním sérem od myši dříve infikovaných 10^3 spirochetami (IS anti- 10^3). U tohoto IS bylo ukázáno dříve, že postrádá protilátky proti OspA a OspB, ale uděluje ochranu SCDI myším proti následné infekci (35). Navíc, toto IS rozpoznává dva individuální proteiny s relativní molekulární hmotností 19 - 20 kDa a dva proteiny $\approx$ 40 kDa, je-li testováno na imunoblotech z lyzátů celých buněk kmenu ZS7 separovaných dvourozměrovou gelovou elektroforesou. Bylo identifikováno přibližně 20 klonů s jedním klonem částečně reaktivním, který byl označen pZS77. Rekombinantní plasmid pZS77 byl podroben restrikční analýze, subklonování a sekvencování. Nukleotidová sekvence OspG spolu s aminokyselinovou sekvencí OspG jsou ukázány na Obrázku 1. Konsenzuální vazebné místo pro ribosom (GGAG) je umístěno 10 bp "upstream" ATG start kodonu OspG genu. Dále "upstream" této translační iniciační sekvence jsou -10 region (TATATT), v poloze -70 až -64, a -35 region (TTGTTA) v poloze -105 až -100. Dvě krátké invertované opakující se sekvence ATATTT a TTACATTT byly obsaženy v tomto "upstream" regionu mezi polohou -118 až -49. ATG

start kodon OspG genu v poloze +1 je následován otevřeným čtecím rámečkem o 588 nukleotidech, korespondujícím s 196 aminokyselinovým proteinem s počítanou molekulární hmotností 22049 kDa. Možný rho-nezávislý terminátor byl identifikován mezi pozicí 620 a 656. Připojení DNA sekvence "upstream" ATG start kodonu OspG genu s nedávno popsáním promotorovým regionem ospE-ospF operonu jeví 94% identitu jak je určeno GAP algoritmem. Všimněme si, že ospG promotor obsahuje dva vysoce konzervované oktamerové DNA motivy, ATGTATTT (v poloze -187 až -180) a AATTACAT (v poloze -120 až -113), které - jak bylo ukázáno dříve - asociují s protein vazebným místem pro negativní regulátorovou molekulu, pojmenovanou MATa2 a regulují genovou expresi v průběhu diferenciaci kvasinky (5,25). Tyto DNA motivy byly identifikovány na dvou genech MFa2 a BAR1 od *Saccharomyces cerevisiae* a obsahují nedokonalé opakující se sekvence motivu, který se podobá imunoglobulinovému oktamerovému motivu ATTTGCAT. Ještě zajímavější je, že další imunoglobulinová (Ig) oktameru podobná sekvence ATTTGCAA (v poloze -154 až -147) je umístěna mezi dvěma *S.cerevisiae* podobnými motivy, které se liší od Ig-oktamerového motivu pouze jednou přechodnou substitucí.

Aminokyselinová sekvenční analýza OspG

Hydropatický profil OspG napovídá, že protein je z velké části hydrofilní s jednou hydrofobní doménou okolo 20 aminokyselin v amino koncové části. Tento N-koncový region jeví podobnost s "leader" signálním peptidem přítomným v typických prokaryotních lipoproteinech (51,52). Na COOH-konci signální sekvence je putativní signální peptidasu II rozpoznávající motiv Leu-X-Y-Z-Cys (Obrázek 3a). Potenciální štěpící místo v OspG je umístěno mezi serinem v poloze 19 a cysteinem v poloze 20. Spočítaný izoelektrický bod je pI 5.2. Srovnání aminokyselinové sekvence OspG se sekvencemi všech známých proteinů zevního povrchu *B.burgdorferi*, OspA - OspF a P27, ukazuje, že OspG

vykazuje vysokou homologii s OspF (65%) (Tabulka 1). Navíc, bazický N - koncový peptidový motiv M-N-K-K-M OspG je identický s tím, který je pozorován u OspE a OspF.

Mapování OspG

Plasmidová a chromozomální DNA několika *B.burgdorferi* kmenů byla separována gelovou elektroforezou v pulzním poli a hybridizována ospA a ospG specifickými probami. Vyhodnotili jsme velikost plasmidu obsahujícího ospA jako 53 kb pro německý *B.burgdorferi* izolát ZS7. OspA obsahující plasmid kmene ACA-1 byl stěží viditelný díky malému množství DNA zavedenému do gelu, ale byl pozorován při prodloužené expozici (data nejsou ukázána). Při použití ospG probe byl pozorován prominentní proužek s lineárním plasmidem okolo 48 kb a jeden slabší s 45 kb plasmidem kmene ZS7. Oproti tomu u amerického kmene B31 dva plasmidy velikosti 45 kb a asi 35 kb hybridizovaly s ospG genovou probou. Povšimněme si, že nebyla pozorována hybridizace, pokud byla použita genomová DNA z *B.garinii* kmenů ZQ1 a 20047 stejně jako z kmene *B.japonica* HO14. V kontrolním pokusu byla použita ospE-ospF proba odvozená od kmene ZS7 k určení toho, jestli mohou být pozorovány odlišné proužky u těchto genomových DNA. Tento pokus ukázal dva plasmidy 45 kb a 35 kb pro kmeny ZS7, B31, 20047 a 21038. DNA izolované z jiných druhů *Borelií*, jako je *B.coriaceae* Co53, *B.hermsii*, a *B.turicatae*, a z *Treponema pallidum* nehybridizovaly s ospG probou, což ukazuje specifitu pro druh *B.burgdorferi*.

RFLP ospG genu

Analýza polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) ospG endonukleasou HindIII ukázala alespoň sedm různých hybridizačních vzorků mezi 20 testovanými *B.burgdorferi* izoláty: většina *B.burgdorferi* "sensu stricto" izolátů je charakterizována dvěma hybridizačními fragmenty 1,8 a 3,8 kb (Obrázek 6, linie 1); 3 z 6

izolátů *B.garinii* nehybridizovalo s *ospG* probou a *B.garinii* kmeny 20047 a S90 vykazovaly fragmenty 1,8 kb a 1,7 a 3 kb, v příslušném pořadí (data nejsou ukázána); mezi kmeny druhu *B. afzelii* byly pozorovány alespoň tři různé hybridizační vzorky: jeden proužek 2.4 kb pro kmen ACA-1 (linie 3) a dva proužky buď 1.9 a 2 kb pro kmen MMS (linie 4) nebo 2 a 5 kb pro kmen NE40 (linie 5).

Exprese *OspG* rekombinantního proteinu v *E.coli*

Při amplifikaci *OspG* PCR byly primery vybrány takovým způsobem, aby konečný rekombinantní produkt postrádal 20 aminokyselinových zbytků tvořících "leader" peptid (46). Amplifikovaný *OspG* kodující produkt byl insertován v rámečku s proteinovým nosičem expresního vektoru pGEX-2T (Pharmacia, Freiburg, Germany) a po indukci IPTG byl získán GST-*OspG* fúzní protein o přibližně 44 kDa. GST-*OspG* fúzní protein byl obohacen z *E.coli* lyzátu použitím glutathion-agarosových korálek a následnou digescí vazby GST-*OspG* fúzních proteinů místně specifickou proteasou.

Značení (^3H) palmitátem

K určení toho, je-li *OspG* exprivován jako lipoprotein v *E.coli* byly DH5 α buňky transformovány buď plasmidem pZS77 nebo p*OspG* a značeny s (^3H) palmitátem (Obrázek 8). Plasmid pZS77 koduje kompletní *OspG* prekursorový protein s jeho normální N-koncovou signální sekvencí, zatímco p*OspG* specifikuje protein, který má prvních 21 zbytků *OspG* prekursoru nahrazeno sekvencí Met-Lys. Po extrakci dělením do detergentní fáze a separací SDS-PAGE byly radioaktivní produkty vizualizovány fluorografií. *E.coli* buňky obsahující kompletní *OspG* gen (plasmid pZS77) exprivovaly 20 kDa lipoprotein, který se dělí do detergentní fáze, zatímco lipoprotein nemohl být pozorován u DH5 α buněk obsahujících

zkrácený ospG gen.

Subcelulární lokalizace OspG

K určení subcelulární lokalizace OspG v intaktním organismu byly spirochety ošetřeny proteinasou K a následně analyzovány užitím imuno-blotingu za použití anti-10³ séra využitého k izolaci ospG z expresní knihovny. Anti-10³ imunoserum detekovalo čtyři proteiny nízké molekulární hmotnosti, které částečně vymizely po proteolýze, zatímco dvě struktury molekulární hmotnosti v rozmezí $\approx$ 40 kDa nebyly narušeny ošetřením proteasou (17). K určení toho, je-li rOspG rozpoznán anti-10³ sérem bylo provedeno Western blotting. Po absorpci anti-10³ séra rOspG rozpoznávalo absorbované anti-10³ sérum stejné velké proteiny identické velikosti (Obr.7A) což napovídá, že OspG nemusí být přítomen mezi proteiny nízké molekulární hmotnosti obsaženými v lyzátech in vitro kultivovaných ZS7 nebo alternativně, proteolýza OspG se může vyskytnout. Aby se potvrdila identita OspG a aby bylo zřejmé, je-li OspG schopen být exprimován v in vitro kultivované B.burgdorferi ZS7, hyperimunní myší anti-rOspG sérum selhalo v detekci OspG z 10⁹ in vitro kultivovaných ZS7 organismů. V některých experimentech mohla být pozorována slabá neočekávaná reaktivita s 40 kDa polypeptidem, který může být buď variantou OspG nebo reprezentuje B.burgdorferi protein, který sdílí některé epitopy s OspG. Aby se zhodnotila exprese ospG genu v in vitro kultivovaných B.burgdorferi ZS7 byla celková RNA izolována a analyzována na přítomnost ospG transkriptu Northern blot hybridizací. Jako kontrola pro in vitro expresi a RNA degradaci byl NC filtr probován ospA genovou probou. Oproti ospA probě, která se vážala na jeden 2 kb transkript, ospG proba selhala v detekci ospG transkriptu. Tyto výsledky napovídají, že deficit v OspG expresi během in vitro kultivace se jeví být na úrovni ospG transkripce mRNA stability. Zatímco OspG nebyl detekovatelný v lyzátech z in

vitro kultivovaných *B.burgdorferi* ZS7 může být exprese OspG odlišná během kultivace v savčím hostiteli. Imunoblotová analýza za použití reprezentativních vzorků séra od jak lidských pacientů s Lymskou chorobou, tak od experimentálně infikovaných myší ukázala, že protilátky se specificitou pro OspG byly přítomny. 6 ze 13 vzorků séra od pacientů s dokumentovanou lymskou borelií obsahovalo anti-OspG protilátky. Oproti tomu, všechna séra od zdravých dárců (n=8) neobsahovala protilátky rozpoznávající rOspG (data nejsou ukázána). Tato zjištění napovídají, že OspG je exprimován pouze v průběhu infekce.

Částečná ochrana SCID myší anti-OspG imunitním sérem

Aby se testovala ochranná kapacita anti-OspG imunitního séra byly SCID myši ošetřeny následujícím množstvím *B.burgdorferi* specifických Ig z poolovaných (Immune Sera) IS přípravků: C.B-17 IS anti-10⁸ (4,4 µg B.b. Ig/myši), DBA/2 IS anti-10³ (4,5 µg B.b. Ig/myši), BALB/c IS anti-lipOspA (5 µg B.b. Ig/myši), a BALB/c IS anti-recOspG (72 ng B.b. Ig/myši). Nicméně, IS anti-recOspG obsahoval > 10 krát více protilátek k recOspG ve srovnání s IS anti-10³. SCID myši byly injikovány intraperitoneálně s indikovaným IS a následně vystaveny 10⁵ *B.burgdorferi* organismům. Byl monitorován vývoj klinické artritidy a přítomnost spirochet v biopsiích z ucha. U inokulovaných, ale jinak neošetřených nebo (normální myši sérum) MNS ošetřených myší se vyvinula klinická artritida od dne 6 p.i. s těžkými otoky tibiotarsálního kloubu, které se vyvinuly mezi dnem 13 a 24 (konečný bod). Jak bylo popsáno výše, SCID myši pasivně imunizované IS anti-10⁸ nebo IS anti-10³ a IS anti lipOspA nevykazovaly žádné nebo pouze marginální příznaky klinické artritidy. Oproti tomu, u SCID myší pasivně imunizovaných IS anti-recOspG se vývoj artritidy pouze opozdil jak ukazuje lehký otok mezi dny 6 a 18. Později se u těchto myší vyvinuly těžší formy artritidy což ukazuje, že toto IS je méně

účinné než jiná IS v kontrole infekce. Fakt, že IS anti-recOspG obsahoval > 10 krát více protilátek k recOspG než IS anti-10³, ale byl méně účinný v ochraně napovídá, že u IS anti-10³ další specifity přispívají ke kontrole infekce.

Odkazy

1. Aron, L., M. Alekshun, L. Perlee, I. Schwartz, H.P. Godfrey and F.C. Cabello. 1994. Cloning and DNA sequence analysis of *bmpC*, a gene encoding a potential membrane lipoprotein of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 123: 75-82.
2. Barbour, A.G., S.L. Tessier, and S.F. Hayes. 1984. Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 45:94-100.
3. Barbour, A.G., and H.G. Stoenner. 1985. Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *UCLA Symp. Mol Cell Biol. New Ser.* 20:123-125.
4. Bergström, S., V.G. Bundoc, and A.G. Barbour. 1989. Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, *OspA* and *OspB*, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 3:479-486.
5. Borst, P. and D.R. Greaves. 1987. Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science* 235:658-667.
6. Brandt, M.E., B.S. Riley, J.D. Radolf, and M.V. Norgard. 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect. Immun* 58:983-991.
7. Bressan, G.M. and K.K. Stanley. 1987. *pUEX*, a bacterial expression vector related to *pEX* with universal host specificity. *Nucl. Acids Res.* 15:10056.
8. Burgdorfer, W., A.G. Barbour, S.F. Hayes, J.L. Benach, E. Grunwaldt, and J.P. Davis. 1982. Lyme disease - a tick-borne spirochestosis? *Science* 216: 1317-1319.
9. Champion, C.I., D.R. Blanco, J.T. Skare, D.A. Haake, M. Giladi, D. Foley, J.N. Miller, and M.A. Lovett. 1994. A 9.0-kilobase-pair circular plasmid of *Borrelia burgdorferi* encodes an exported protein: Evidence for expression only during infection. *Infect. Immun.* 62:2653-2661.
10. Church, G.M. and W. Gilbert. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.

11. Craft, J.E., D.K. Fischer, G.T. Shimamoto, and A.C. Steere. 1986. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognised during Lyme disease. *J Clin. Invest.* 78:934-939.
- 5 12. Dattwyler, R.J., D.J. Volkman, J.J. Halperin, B.J. Luft, J. Thomas, and M.G. Golightly. 1988. Specific immune responses in Lyme borreliosis. *Ann. NY Acad. Sci. USA* 539:93-102.
- 10 13. Fikrig, E., S.W. Barthold, F.S. Kantor, and R.A. Flavell. 1992. Long-term protection of mice from Lyme disease by vaccination with OspA. *Infect. Immun.* 60:773-777.
- 15 14. Fikrig, E., S.W. Barthold, N. Marcantonio, K. Deponce, F.S. Kantor, and R.A. Flavell. 1992. Roles of OspA, OspB, and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 60:657-661.
- 20 15. Fikrig, E., H. Tao, F.S. Kantor, S.W. Barthold, and R.A. Flavell. 1993. Evasion of protective immunity by *Borrelia burgdorferi* by truncation of outer surface protein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4092-4096.
- 25 16. Fuchs, H., R. Wallich, M.D. Kramer, and M.M. Simon. 1994. The outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* is a plasmin (ogen) binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12594-12598.
17. Gern, L., U.E. Schaible, and M.M. Simon. 1993. Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice. *J. Infect. Dis.* 167:971-975.
- 30 18. Hughes, C.A.N., S.M. Engstrom, L.A. Coleman, C.B. Kodner, and R.C. Johnson. 1993. Protective immunity is induced by a *Borrelia burgdorferi* mutant that lacks OspA and OspB. *Infect. Immun.* 61:5115-5122.
- 35 19. Jonsson, M., L. Noppa, A.G. Barbour, and S. Bergström. 1992. Heterogeneity of outer membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*: Comparison of osp operons of three isolates of different geographic origins. *Infect. Immun.* 60:1845-1853.

20. Kurashige, S., M. Bissett, and L. Oshiro. 1990. Characterisation of a tick isolate of *Borrelia burgdorferi* that possesses a major low-molecular-weight surface protein. *J. Clin. Microbiol.* 28:1362-1366.
- 5 21. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
22. Lam, T.T., T.-P.K. Nguyen, R.R. Montgomery, F.S. Kantor, E. Fikrig, and R.A. Flavell. 1994. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*,
10 the agent of Lyme disease. *Infect. Immun.* 62:290-298.
23. Margolis, N., and P.A. Rosa. 1993. Regulation of expression of major outer surface proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:2207-2210.
- 15 24. Masuzawa, T., H. Kawabata, Y. Beppu, K. Miyamoto, M. Nakao, N. Sato, K. Muramatsu, R.C. Johnson, and Y. Yanagihara. 1994. Characterisation of monoclonal antibodies for identification of *Borrelia japonica*, isolates from *Ixodes ovatus*. *Microbiol. Immunol.* 38:393-398.
- 20 25. Miller, A.M., V.L. MacKay, and K.A. Nasmyth. 1985. Identification and comparison of two sequence elements that confer cell-type specific transcription in yeast. *Nature* 314: 598-603.
- 25a. Miller, J.F., J.J. Mekalanos, and S. Falkow. 1989. Co-ordinate regulation
25 and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* 243:916-922.
26. Needleman, S.B., and C.D. Wunsch. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- 30 27. Nguyen, T.-P.K., T.T. Lam, S.W. Barthold, S.R. Telford, III, R.A. Flavell, and E. Fikrig. 1994. Partial destruction of *Borrelia burgdorferi* within ticks that engorged on OspE- or OspF-immunised mice. *Infect. Immun.* 62:2079-2084.
- 35 28. Norris, S.J., C.J. Carter, J.K. Howell, and A.G. Barbour. 1992. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: Characterisation and

molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein.
Infect. Immun. 60:4662-4672.

29. O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional poly-acrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
30. Padula, S.J., A Sampieri, F. Dias, A. Szczepanski, and R.W. Ryan. 1993. Molecular characterisation and expression of p23 (OspC) from a North American strain of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:5097-5105.
31. Preac-Mursic, V., B. Wilske, E. Patsouris, S. Jauris, G. Will, E. Soutschek, S. Rainhardt, G. Lehnert, U. Klockmann, and P. Mehraein. 1992. Active immunisation with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *Infection* 20: 342-349.
32. Reindl, M., B. Redl, and G. Stöffler. 1993. Isolation and analysis of a linear plasmid-located gene of *Borrelia burgdorferi* B29 encoding a 27 kDa surface lipoprotein (P27) and its overexpression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 8:1115-1124.
33. Reindl, M., B. Redl, and G. Stöffler. 1994. A restriction map of the ospAB operon containing linear plasmid of *Borrelia garinii* B29, p.57-60. In: R. Cevenini, V. Sambri, M. Placa, (eds.) *Advances in Lyme Borreliosis research. Proc. of the VI. Int. Conf. on Lyme Borreliosis. Bologna, Italy.*
34. Sadziene, A., B. Wilske, M.S. Ferdows, and A.G. Barbour. 1993. The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61:2192-2195.
35. Schaible, U.E., L. Gern, R. Wallich, M.D. Kramer, M. Prester, and M.M. Simon. 1993. Distinct patterns of protective antibodies are generated against *Borrelia burgdorferi* in mice experimentally inoculated with high and low doses of antigen. *Immunol. Lett.* 36:219-226.
36. Schaible, U.E., M.D. Kramer, K. Eichmann, M. Modolell, C. Museteanu, and M.M. Simon. 1990. Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe

- combined immunodeficiency (scid) mice. Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 3768-3772.
37. Schaible, U.E., M.D. Kramer, C. Museteanu, G. Zimmer, H. Mossmann,
5 and M.M. Simon. 1989. The severe combined immunodeficiency (scid) mouse. A
laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis. J. Exp. Med.
170:1427-1432.
 38. Schaible, U.E., R. Wallich, M.D. Kramer, L. Gern, J.F. Anderson, C.
10 Museteanu, and M.M. Simon. 1993. Immune sera to individual *Borrelia*
burgdorferi isolates or recombinant OspA thereof protect SCID mice against
infection with homologous strains but only partially or not at all against those of
different OspA/OspB genotype. Vaccine 11:1049-1054.
 39. Schouls, L.M., H.G.J. van der Heide, and J.D.A. van Embden. 1991.
15 Characterisation of the 35-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*
recombinant lipoprotein TmpC and antibody response to lipidated and nonlipidated
T. pallidum antigens. Infect. Immun. 59:3536-3546.
 40. Simon, M.M., U.E. Schaible, M.D. Kramer, C. Eckerskorn, C. Museteanu,
20 H.K. Müller-Hermelink, and R. Wallich. 1991. Recombinant outer surface protein
A from *Borrelia burgdorferi* induces antibodies protective against spirochetal
infection in mice. J. Infect. Dis. 164: 123-132.
 41. Simon, M.M., U.E. Schaible, R. Wallich, and M.D. Kramer. 1991. A
25 mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: Approach to a vaccine against
Lyme disease. Immunol. Today 12:11-16.
 42. Simpson, W.J., W. Burgdorfer, M.E. Schrumph, R.H. Karstens, and T.G.
30 Schwan. 1991. Antibody to a 39-kilodalton *Borrelia burgdorferi* antigen (P39) as a
marker for infection in experimentally and naturally inoculated animals. J. Clin.
Microbiol. 29:236-243.
 43. Simpson, W.J., W. Cieplak, M.E. Schrumph, A. G. Barbour, and T.G.
35 Schwan. 1994. Nucleotide sequence and analysis of the gene in *Borrelia*
burgdorferi encoding the immunogenic P39 antigen. FEMS Microbiol. Lett.
119:381-388.

44. Steere, A.C. 1989. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321:586-596.
45. Wallich, R., C. Heimes, U.E. Schaible, Y. Lobet, S.E. Moter, M.D. Kramer, and M.M. Simon. 1992. Evaluation of genetic divergence among
5 *Borrelia burgdorferi* isolates by use of *OspA*, *fla*, HSP60, and HSP70 gene probes.
Infect. Immun. 60:4856-4866.
46. Wallich, R., S.E. Moter, M.M. Simon, K. Ebner, A. Heiberger, and M.D. Kramer. 1990. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen
10 (flagellin): Molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect. Immun.* 58:1711-1719.
47. Wallich, R., U.E. Schaible, M.M. Simon, A. Heiberger, and M.D. Kramer. 1989. Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A
15 (*OspA*) of a European *Borrelia burgdorferi* isolate. *Nucleic Acids Res.* 17:8864.
48. Wallich, R., M.M. Simon, H. Hofmann, S.E. Moter, U.E. Schaible, and M.D. Kramer. 1993. Molecular and immunological characterisation of novel
20 polymorphic lipoprotein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:4158-4166.
49. Wallich, R., et al. Unpublished data.
50. Wilske, B., A.G. Barbour, S. Bergström, N. Burman, B.I. Restrepo, P.A. Rosa, T. Schwan, E. Soutschek, and R. Wallich. 1992. Antigenic variation and
25 strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res. Microbiol.* 143:583-596.
51. Wu, H.C. 1987 Posttranslational modification and processing of membrane proteins in bacteria, p. 37-74; In: M. Inouye (ed.) *Bacterial outer membranes as model systems*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
30
52. Wu, H.C. and M. Tokunaga. 1986. Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125:127-157.

(1) Obecné informace

(i) Přihlašovatel

(A) Jméno: Max Planck Gesellschaft zur Forderung der
Wissenschaft e V

(B) Ulice: Busenstrasse 10

(C) Město: Gottingen

(E) Země: Německo

(F) Poštovní kod (ZIP): D-3400

(A) Jméno: Deutsches Krebsforschungszentrum Stitung des
offentilichen Rechts

(B) Ulice: Im Neuenheimer Feld 280

(C) Město: Heildelberg

(E) Země: Německo

(F) Poštovní kod (ZIP): D-6900

(ii) Název vynálezu: Vakciny

(iii) Počet sekvencí: 2

(iv) Počítačová čtecí forma:

(A) Typ media: Floppy disk

(B) Počítač: IBM PC compatibilní

(C) Operační system: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, verse #1.30 (EPO)

(2) informace pro sekvenci č.1:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 196 aminokyselin

(B) typ: aminokyselinová

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(iii) Hypotetický: ne

(iv) Anti-sense: ne

(v) Původní zdroj:

(A) organismus: B.burgdorferi

(B) jednotlivý izolát: Osp G

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 1:

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

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

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

Lys Asn Ile Glu Glu Glu Leu Glu Lys Leu Ala Glu Pro Gln Asn Ile
180 185 190

Glu Asp Lys Lys
195

(2) Informace pro sekvenci č.2:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 591 párů basí
(B) typ: nukleová kyselina
(C) typ řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(iii) Hypotetický: ne

(iv) Anti-sense: ne

(v) Původní zdroj:

- (A) organismus: *Borrelia burgdorferi*

(B) kmen: zs7

(vii) Bezprostřední zdroj:

(B) klon: ospG

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 2:

ATGAATAAGA AAATGAAAAA TTTAATTATT TGTGCAGTTT TTGTTTIGAT AATTTCCTTGC
60

AAGATTGATG CGAGTAGTGA AGATTTTAAAA CAAAATGTAA AAGAAAAAGT TGAAGGATTT
120

TTAGATAAAG AGTTAATGCA AGGTGACGAT CCTAATAACA GTCTGTTTAA TCCACCACCA
180

GTATTGCCCG CAAGTTCCCA CGATAACACA CCCGTATTAA AAGCGGTGCA AGCAAAAGAT
240

GGTGGTCAAC AAGAAGGAAA AGAAGAGAAA GAAAAAGAAA TTCAAGAATT AAAGGATAAA
300

ATAGATAAAA GAAAAAAGA ATTAGAAGAG GCTAGAAAGA AATTCAAGA ATTTAAAGAA
360

CAAGTTGAAT CTGCAACTGG AGAAAGTACT GAGAAAGTTA AAAACAAGG AAATATTGGA
420

CAAAAAGCTT TAAAGTATGC TAAAGAATTG GGTGTAAATG GAAGTTATTC TGTTAATGAT
480

GGTACTAATA CTAATGATTT TGTAAAAAAG GTTATAGATG ATGCTCTTAA AAATATTGAG
540

GAAGAACTTG AAAAGCTAGC AGAGCCTCAA AATATAGAAG ATAAAAATA A
591

Tabulka 1: Lipoproteiny zevního povrchu *Borrelia burgdorferi*

jméno	zdroj	délka	MW	pI	plasmid	podobnost	odkaz.
	(kmen)	(aa)	(kDa)		loc.	s OspG(%)	

OspA	ZS7	273	29.3	8.9	49 kb linear	48.4	(47)
OspB	B31	296	31.8	9.9	49 kb linear	43.1	(4)
OspC	B31	210	22.3	8.6	26 kb cirkul.	41.8	(30)
OspD	B31	257	28.4	5.2	38 kb linear	45.6	(28)
OspE	N40	171	19.2	8.1	45 kb	52.9	(22)
OspF	N40	230	26.1	5.3	45 kb	64.9	(22)
							tato
OspG	ZS7	196	22	5.2	55 kb		studie
P27	B29	248	28.9	8.6	49 kb linear	45.2	(32)

Tabulka 2: Vývoj klinické artritidy u jednotlivých SCID myší neošetřených nebo předem ošetřených i.p. jednotlivým imunitním sérem a následně inokulovaných 1×10^5 *Borrelia burgdorferi* ZS7

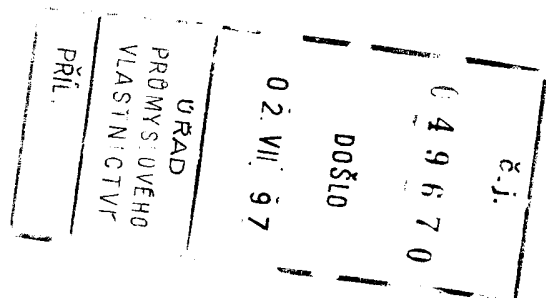
Transfer. sérum	myš č.	klin. artritida za cenu p.i.					rekultivace
		6	13	18	20	27	(ucho)
None	1	-	+/+	++/++	++/++	++/++	+
	2	(±)/(±)	+/+	++/++	++/++	++/++	+
NMS [5 µg/ myš]	1	(±)/±	+/+	++/++	++/++	++/++	+
	2	±/(±)	+/+	++/++	++/++	++/++	+
	3	(±)/(±)	+/+	++/++	++/++	++/++	+
IS anti-10 ³ (DBA/2) [4,5 µg spec. lg/ myš]	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	±/±	-	-	-	±/(±)	-
	4	-	-	-	(±)/-	±/-	-
IS anti-10 ⁸ (C.B-17) [4,4 µg spec. lg/ myš]	1	±/-	±/-	-	-	-	-
	2	-	-/±	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	±/±	-/±	-	-	±/-	-
IS anti- lipOspA (BALB/c) [5 µg spec. lg/ myš]	1	(±)/(±)	-	-	-	(±)/-	-
	2	±/±	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-/(±)	-	-
IS anti- recOspG (BALB/c) [72 ng spec. lg/ myš]	1	-	(+)/(+)	±/-	+/++	++/++	+
	2	-	(+)/(+)	±/±	(+)/(+)	++/++	+
	3	-	(+)/(+)	±/±	++/++	++/++	+
	4	-	(+)/(+)	(+)/+	++/++	++/++	+
mAb LA 10* [5 µg spec. lg/1 myš:]	1	-	-	-	(±)/±	(+)/(+)	+
	2	-	(+)/(+)	+/+	++/++	++/++	+
	3	-	(+)/(+)	+/+	++/++	++/(+)	+
	4	-	(+)/(+)	++/++	++/++	++/++	+
mAb LA2* [5 µg spec. lg/1 myš:]	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	±/-	(±)/-	-	-	-
	3	-	±/-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

Hodnocení: ++ těžká, + méně těžká, (+) střední, ± mírný otok, (±) hraniční otok, zarudnutí, - žádné klinické známky na pravém nebo levém tibiotarsálním skloubení.

* mAb byly popsány dříve (20, 35, 39)

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Purifikovaný Osp G z B.burgdorferi nebo jeho imunologicky funkční derivát.
2. Purifikovaný Osp G z B.burgdorferi, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má zřejmou molekulární hmotnost 22 kDa, izoelektrický bod PI okolo 5,2, a má 196 aminokyselin, nebo jeho imunologicky funkční derivát.
3. Purifikovaný OspG z B.burgdorferi jak je v podstatě daný na Obrázku 1.
4. Purifikovaný OspG podle nároku 3, mající z alespoň 80 % homologii s aminokyselinovou sekvencí danou na Obrázku 1.
5. Purifikovaný OspG podle nároků pro použití v lékařství.
6. Kompozice vakciny obsahující dále purifikovaný OspG podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4.
7. Kompozice vakciny podle nároku 6 obsahující dále jiný antigen B.burgdorferi.
8. Kompozice vakciny podle nároku 6, obsahující dále OspA antigen B.burgdorferi.
9. Kompozice vakciny podle jakéhokoliv z nároků 6 - 8 obsahující dále QS21 nebo 3D-MPL.



- 5 10. Použití OspG antigenu podle nároků 1 až 4 pro přípravu vakciny pro imunoprophylaktickou nebo imunoterapeutickou léčbu pacientů trpících nebo vnímavých k Lymské chorobě.
- 10 11. Izolovaná DNA sekvence kodující OspG protein nebo jeho imunologicky funkční derivát podle nároků 1 až 4.
13. Izolovaná DNA sekvence kodující OspG protein podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že má sekvenci v podstatě danou na Obrázku 1.
- 15 14. Expresní vektor obsahující DNA sekvenci podle nároků 12 až 13.
15. Hostitelská buňka transformovaná DNA sekvencí podle nároku 12 nebo 13.
- 20 16. Způsob produkce purifikovaného OspG podle nároků 1 až 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje transformování buněk expresním vektorem podle nároku 14 a izolování kultury těchto buněk a izolování výsledného proteinu.
- 25 17. Způsob produkce vakciny obsahující OspG podle nároků 1 až 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje smísení uvedeného OspG nebo jeho funkčního derivátu s farmaceuticky přijatelným excipientem.
- 30 18. Diagnostický kit, obsahující OspG z B.burgdorferi.