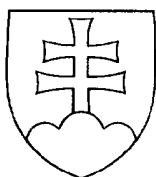


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **1341-95**
(22) Dátum podania: **29.04.94**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **08/053 863**
(32) Dátum priority: **29.04.93**
(33) Krajina priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia: **08.05.96**
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **11.06.99**
(86) Číslo PCT: **PCT/EP94/01365, 29.04.94**

(11) Číslo dokumentu:

279 968

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶

C 12N 15/31
C 12N 15/70
C 12N 15/74
A 61K 39/02
C 12N 5/10
C 07K 14/00

(73) Majiteľ patentu: Immuno Aktiengesellschaft, Wien, AT;

(72) Pôvodca vynálezu: Livey Ian, Wien, AT;
Crowe Brian, Wien, AT;
Dorner Friedrich, Wien, AT;

(54) Názov vynálezu: **Imunogénny prostriedok, sekvencia rekombinantnej DNA, expresný vektor, hostiteľská bunka transformovaná týmto expresným vektorom a OspC antigény a ich použitie**

(57) Anotácia:
Opisuje sa imunogénny prostriedok, ktorý obsahuje: a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov Borrelia lymskej choroby v podstate vyčistených z každej z 20 bežne rozlišujúcich OspC skupín alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu; b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou. Ďalej je opísané použitie kombinácie antigénov na výrobu vakcíny na liečenie alebo predchádzanie lymskej borelióze cicavcov. Rekombinantný expresný vektor obsahujúci sekvenciu kódujúcu OspC antigén ktoréhokoľvek z 20 bežne rozlišujúcich OspC skupín a hostiteľská bunka, ktorá je transformovaná týmto expresným vektorom.

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka imunogénneho prostriedku, sekvencie rekombinantnej DNA, rekombinantného expresného vektora obsahujúceho sekvenciu kódujúcu OspC antigén a hostiteľskej bunky, ktorá je transformovaná týmto expresným vektorom. Tento vynález sa týka tiež spôsobu rekombinantnej prípravy OspC antigénu a spôsobu jeho použitia na imunizáciu cicavca proti lymskej borelióze.

Doterajší stav techniky

Lymská choroba alebo lymská borelióza sú pojmy, ktoré sa používajú pri opise rôznych klinických príznakov súvisiacich s kliešťovými spirochétovými infekciami, ktoré vyvolávajú lymské ochorenie *Borrelia*. Medzi známe príznaky lymského ochorenia patrí choroba pokožky [erythema migrans (EM)] alebo acrodermatitis chronica atroficans (ACA) a choroba nervového systému [neuroborelióza] a kĺbov [artritída]. Infikované a poškodené môžu byť i iné orgány a tkanivá. Lymská choroba je rozšírená na celom svete a je najčastejšou chorobou spôsobenou kliešťom, tak v USA, ako aj v Európe. Rozsah klinických príznakov obvyčajne súvisiacich s lymskou chorobou v Európe je väčší ako v USA. Ochorenie kože a nervového systému je v Európe bežné, v USA ojedinelé, zatiaľ čo artritída je bežnejšia v Amerike ako v Európe. Klinické príznaky v Severnej Amerike sa zdajú byť podpríznakmi tých, ktoré sú pozorované v Európe.

Lymská choroba sa obvyčajne lieči antibiotikami. Liečenie sa však často oneskoruje vzhľadom na zložitý klinický obraz a nedostatok všeobecne dostupných a spoľahlivých diagnostických testov. Ak choroba prejde do chronického stavu, liečenie antibiotikami je ťažšie a nie je vždy úspešné. Pravdepodobnosť perspektívy, že dôjde k stálemu poškodeniu, sa ďalej zvyšuje s predĺženou dobou infekcie. Je teda potrebná očkovacia látka, ktorá bude chrániť pred lymskou chorobou.

Opísané sú dva antigény z *Borrelie*, ktorá spôsobuje lymskú chorobu a ktoré môžu chrániť pred infekciou alebo chorobou spôsobenou týmto organizmom, ako to bolo dokázané na zvieracích modeloch lymskej choroby. Tieto antigény, OspA a OspC (alebo „pC“), sú teda pravdepodobnými kandidátmi na zahrnutie do vakcíny, ktorá je určená na ochranu proti lymskej chorobe, pozri Simon a kol.: európsky patent č. 418 827, Fikrig a kol.: Science 250, 553 (1990), Preac-Mursic a kol.: Infection 20, 342 (1992). OspA a OspC majú mnohé vlastnosti spoločné. Obidva sú lipoproteínmi, ktoré sa nachádzajú na povrchu buniek (Howe a kol.: Science 227, 645 (1985), Bergstrom a kol.: Mol. Microbiol. 3, 479 (1989), obidva sú kódované plazmidom (Barbour a kol.: Science 237, 409 (1987), Marconi a kol.: J. Bacteriol. 175, 926 (1993), gény týchto proteínov sú prítomné vo väčšine kmeňov (Barbour a kol.: J. Infect. Dis. 152, 478 (1985), Marconi a kol.: J. Bacteriol. 175, 926 (1993) a obidva existujú v násobných serologicky rozdielnych formách (Wilske a kol., 1989).

Existencia násobných, serologicky rozdielnych foriem týchto antigénov je prekážkou vývoja OspA a/alebo OspC vakcíny na ochranu proti väčšine, ak nie proti všetkým formám lymskej choroby. Bolo napríklad opísané (Fikrigom a kol.: J. Immun. 148, 2256, 1992), že imunizácia jednou serologickou formou OspA, akou je rekombinantný OspA kmeňa N40, nemusí chrániť proti

stimulácii kmeňom, ktorý exprimuje iný OspA, napríklad kmeňom 25015. Je teda nutné vyvinúť takú typizačnú schému na klasifikáciu a skupinu rôznych variantov antigénu (t. j. OspA a/alebo OspC), ktorá by mohla určiť optimálnu zmes serologicky rozdielnych foriem antigénu (antigénov), ktoré sú potrebné na dosiahnutie širokej ochrany.

Pre OspA bol ako typizačný nástroj pomocou obmedzeného množstva monoklonálnych protilátok vyvinutý serotypizačný systém. Týmto spôsobom bolo opísaných 7 serotypov OspA (Wilske a kol.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 539, 126, 1988). Analýza polymorfie dĺžky reštrikčného fragmentu (RFLP) OspA génov z 55 rôznych európskych a severoamerických kmeňov identifikovala šesť rôznych genoskupín (Wallich a kol.: Infection and Immunity 60, 4856, 1992). OspA proteíny zo severoamerických izolátov sa zdajú byť dostatočne jednotné, pretože 12 zo 14 OspA patrilo k OspA typu I a dva k OspA typu III. Oproti tomu OspA z európskych izolátov sú oveľa heterogénnejšie a zahŕňujú reprezentantov OspA typu I (18), II (17), IV (4) a V (1). Konštrukcia fylogenetického stromu na základe sekvenčných údajov pre 12 OspA proteínov z jednotlivých kmeňov *B. burgdorferi* podporuje zistenie RFLP analýzy, ale chýba ešte informácia o sekvencii izolátov dvoch zo šiestich genoskupín. V súčasnosti neexistuje žiadny typizačný systém pre OspC.

Iným zámerom pri výbere príslušných antigénov na zahrnutie do vakcíny je to, či sú odvodené od kmeňov, ktoré sú epidemiologicky dôležité pre chorobu. V polovici osemdesiatych rokov bolo považované za isté, že patogénne baktérie pochádzajú z obmedzeného počtu klonov veľmi príbuzných baktérií, ktoré majú v niektorom smere selektívnu výhodu pri vzniku ochorenia. Táto klonálna hypotéza bola od toho času potvrdená, pozri Achtman a kol.: J. Infect. Dis. 165, 53 (1992). Je teda veľmi pravdepodobné, že medzi mnohými kmeňmi *Borrelia* spôsobujúcimi lymskú chorobu a ktoré sa v prírode vyskytujú, existuje len obmedzený počet „klonov“, ktoré sú veľmi prispôbené na to, aby spôsobovali cicavcom, najmä ľuďom, toto ochorenie. Pri vývoji vakcíny na ochranu proti ochoreniu cicavcov a teda aj ľudí, je rozhodne dôležité identifikovať klony súvisiace s ochorením, a potom by sa úsilie mohlo sústrediť na tieto klony. Je nutné vysvetliť populačnú štruktúru druhu *Borrelia* spôsobujúcu lymskú chorobu a identifikovať klony súvisiace s týmto ochorením.

Doteraz boli na vyšetrovanie populačnej štruktúry *Borrelia* spôsobujúcej lymskú chorobu používané rôzne spôsoby, medzi ktoré patrí:

- RFLP analýza genomovej DNA alebo špecifických génov (LeFebvre a kol.: J. Clin. Microbiol. 27, 636, (1989), Marconi a Garon: J. Bacteriol. 174, 241 (1992), Postic a kol.: Res. Microbiol. 141, 465 (1990), Stahlgammar-Carlén a kol.: Zbl. Bak. 274, 28 (1990), Adam a kol.: Infect. Immun. 59, 2579 (1991), Wallich a kol.: Infect. Immun. 60, 4856 (1992)),
- DNA-DNA hybridizácia (LeFebvre a kol.: J. Clin. Microbiol. 27, 636 (1989), Postic a kol.: Res. Microbiol. 141, 465 (1990)),
- analýza 16S rRNA hybridizáciou na oligonukleotidové sondy (Marconi a kol.: J. Clin. Microbiol. 30, 628 (1992)), alebo sekvenovaním (Adam a kol.: Infect. Immun. 59, 2579 (1991), Marconi a Garon: J. Bacteriol. 174, 241 (1992)),
- ručným vytlačaním ľubovoľne senzibilizovaná polymerizovaná reťazová reakcia (Welsch a kol.: Int. J. System. Bacteriol. 42, 370 (1992)),

e) elektroforéza (multi-locus enzyme electrophoresis) (Boerlin a kol.: Infect. Immun. 60, 1677 (1992)) a
f) serotypizácia izolátov (Peter a Brett: Zbl. Bakt. 277, 28 (1992)).

Medzi výsledky, ktoré boli získané týmito rôznymi postupmi, existuje veľká zhoda. Všeobecne platí, že sa zdá, že izoláty *Borrelia*, ktoré spôsobujú lymskú chorobu, je možné rozdeliť do aspoň troch hlavných skupín. Niektorí výskumníci skutočne veria, že genetické rozdiely medzi členmi týchto skupín sú dostatočné na opodstatnenie rozdelenia na tri rôzne druhy: *B. burgdorferi sensu stricto* (typ kmeňa B31), *B. garinii* sp. nov. (typ kmeňa 20047) a druhý označený *B. afzelii* alebo „skupina VS461 *Borrelia*“, pozri Baranton a kol.: Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 378 (1992) a Marconi a Garon.

Ostáva úplne objasniť význam existencie týchto rôznych skupín na vývoj vakcíny. Z údajov Wallicha a kol.: Infection and Immunity 60, 4856 (1992) je jasné, že existuje silná asociácia medzi genoskupinou, ku ktorej izolát patrí, a typom OspA, ktorý je produkovaný: izoláty zo skupiny obsahujúcej kmeň B31 (genoskupina AAA alebo *B. burgdorferi sensu stricto*) produkujú OspA typ I (všetkých izolovaných 30 kmeňov), izoláty zo skupiny obsahujúcej kmeň 20047 (genoskupina BBB alebo *B. garinii* sp. nov.) obyčajne produkujú OspA typ II (17/19), boli ale tiež zaznamenané typy V (1/19) a VI (3/39), izoláty z klonu obsahujúceho kmeň B023 (genoskupina BBA alebo skupina VS 461) produkujú OspA typ IV (4/4), zvyšné dva izoláty (genoskupina B, B/A, A) produkujú OspA typ III.

Izoláty lymskej choroby zo Severnej Ameriky patria väčšinou k jednej skupine (genoskupina AAA alebo *B. burgdorferi sensu stricto*), reprezentovanej kmeňom B31, a výsledne produkujú OspA typ I. To ukazuje, že vakcína obsahujúca OspA typ I môže byť dnes postačujúca na ochranu proti väčšine izolátov spôsobujúcich lymskú chorobu v Severnej Amerike. V Európe je to zložitejšie, pretože tu boli nájdené všetky tri hlavné klony a tomu zodpovedá i zvýšená rozmanitosť prítomných typov OspA (genotypy I, II, IV, V, VI). Nebolo zistené, že by OspA chránil v dvoch štádiách, uskutočnených s izolátmi lymskej choroby z Európy, čo tiež dokázalo vhodnosť OspC ako ochranného antigénu, pozri US patentová prihláška č. 07/903 580 a Preac-Mursic a kol.: Infection 20, 342 (1992).

Dosiaľ nebolo známe, či bol OspC klonovaný dedične so špecifickými typmi OspC obmedzenými na príslušné skupiny lymskej choroby (t. j. na *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* sp. nov., alebo skupinu VS461). Pretože OspC je kódovaný plazmidom (Marconi a kol.: J. Bacteriol. 175, 926 (1993)), predpokladalo sa, že existoval plazmidom sprostredkovaný prenos génu OspC medzi rôznymi druhmi izolátov lymskej choroby. Ak ide o tento prípad, potom rôzne typy OspC, o ktorých je známe, že existujú, ale ktoré neboli definované, by sa nutne dedične neklonovali.

Podstata vynálezu

Predmetom tohto vynálezu je poskytnúť efektívnu OspC vakcínu so širokým skríženým ochranným účinkom na všetky klony proti lymskej chorobe u cicavcov, zvolením OspC prostriedkov založených na definovaných OspC skupinách rozlíšených fenotypickým typizovaním (OspC „sérovar“ typizovaním), RFLP typizačnou a

analýzou a sekvenčnou analýzou viacerých rozmanitých kmeňov z celého sveta.

Ďalej bol zistený OspC klon, ktorý sa dedične klonuje. Preto je teraz možné interpretovať výsledky OspC typizačných schém z pohľadu epidemiologickej informácie z opísanej „typizačnej schémy známeho membránového antigénu“ CMAT, ktoré bolo použité na objasnenie štruktúry klonovej populácie kmeňov *Borrelia* lymskej choroby. Z toho istého dôvodu je možné vybrať najvhodnejšie prostriedky OspC vakcíny buď a) na navrhnutie vakcín na ochranu proti kmeňom prevládajúcim v definovaných geografických oblastiach, alebo b) na špecifickú a preferenčnú ochranu proti klonom alebo klonovým klastrom *B. burgdorferi* súvisiacu s epidemiologicky dôležitým ochorením.

Na dosiahnutie tohto a ďalších predmetov bol získaný podľa jedného uskutočnenia tohto vynálezu imunogénny prostriedok, ktorý obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu v podstate vyčistených z každej z 20 bežne rozlišujúcich OspC skupín na obrázku 11, alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali produkciu ochranných látok, a

b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

Podľa ďalšieho uskutočnenia uvedený imunogénny prostriedok obsahuje jeden alebo viac, výhodne dva alebo viac OspC antigénov *Borrelia*, spôsobujúcich lymskú chorobu, z 20 bežne rozlišujúcich OspC skupín na obrázku 11 alebo OspC variant alebo OspC mimetik uvedených antigénov, ako je definované pod ad ii) a fyziologicky prijateľný nosič, ako je to tiež uvedené pod ad b).

Podľa ďalšieho uskutočnenia tohto vynálezu sa získava imunogénny prostriedok, ktorý obsahuje také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu v podstate vyčistených z každej OspC skupiny na obrázku 19 exprimovanej jedným alebo viacerými klonmi alebo klonovými klastrami súvisiacimi s ochorením ľudí (HDA) alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali produkciu ochranných látok, a fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

Výhodným uskutočnením je uvedený imunogénny prostriedok, ktorý obsahuje jeden alebo viac, výhodne dva alebo viac OspC antigénov OspC skupiny podľa obrázku 19, alebo OspC varianty alebo OspC mimetiká, ako je uvedené pod ad ii), a fyziologicky prijateľný nosič, ako je uvedené pod ad b).

Vo výhodnom uskutočnení je imunogénny prostriedok podľa tohto vynálezu navrhnutý ako ochrana proti kmeňom *Borrelia*, spôsobujúcich lymskú chorobu, prevládajúcim v príslušnej zemepisnej oblasti, ako je Severná Amerika, Európa alebo Rakúsko. Ako výhodné uskutočnenie je nárokováná kombinovaná OspA/OspC vakcína, ktorá je lepšia ako vakcína pripravená z ktoréhokoľvek antigénu samotného.

Tento vynález opisuje tiež rekombinantné spôsoby produkcie nových OspC antigénov spoločne s DNA sek-

venciarmi, expresnými vektormi a transformovanými hositeľskými bunkami.

Ďalšie možnosti, vlastnosti a výhody tohto vynálezu budú zrejme z nasledujúceho podrobného opisu. Je to potrebné chápať tak, že podrobný opis a špecifické príklady uskutočnenia, aj keď predstavujú výhodné uskutočnenia vynálezu, sú tu uvedené len ako ilustrácie, pretože odborníkom v oblasti techniky budú na základe tohto podrobného opisu zrejme rôzne možné zmeny a modifikácie v rozsahu tohto vynálezu.

V nasledujúcej časti opisu sú stručne opísané obrázky. Obrázok 1 opisuje 77 kmeňov *Borrelia*, ktoré boli použité v pokusoch tohto výskumu. Je opísaná krajina pôvodu a biologický zdroj (t. j. človek, kliešť alebo zviera), z ktorého boli tieto kmene izolované. Je uvedený tiež klinický materiál, z ktorého boli získané ľudské izoláty, a príznak ochorenia (skratky: CSF znamená mozgovomiechový mok, ACA znamená akrodermatitída chronická atrofická, EM znamená erytéma migrujúca). Sú tu uvedené taktiež vlastnosti 5 ďalších kmeňov, ktoré neboli experimentálne študované, pretože v niektorých analýzach boli použité publikované informácie týkajúce sa týchto kmeňov.

Obrázok 2 uvádza zoznam adries všetkých dodávateľov kmeňov. Obrázok 3 uvádza zoznam monoklonálnych protilátok a ich antigénové špecifiká. Je označený tiež homológny reagujúci kmeň a izotyp monoklonálnej protilátky.

Obrázok 4 uvádza jednotlivé skóre a reprezentatívne kmene každého CMAT vyriešeného CMAT typizačnou schémou.

Obrázok 5 ukazuje dendrogram klastrovej analýzy uskutočnený s CMAT typizačnými údajmi. Je uvedená taktiež frekvencia výskytu CMAT medzi testovanými kmeňmi, ako je zoskupenie jednotlivých CMAT klastrov (všetky CMAT s väčšou ako 50 % podobnosťou) a CMAT podskupín (všetky CMAT s väčšou ako 20 % podobnosťou).

Obrázok 6 ukazuje reakčnú zostavu panelu 16 OspC-špecifických monoklonálnych protilátok s kmeňmi rôznych sérovaných typov.

Obrázok 7 ukazuje veľkosti reštrikčných fragmentov získaných PCR amplifikáciou OspC génov (prípravených ako je uvedené v príklade 4) rozštiepených enzýmami Dpn11, DdeI a DraI. Sú tiež uvedené údaje, ktoré opisujú 35 jedinečných zostáv reštrikčných fragmentov (t. j. 35 OspC RFLP typov) identifikovaných analýzou údajov reštrikčných fragmentov z 82 kmeňov uvedených v zozname typov kmeňov vybraných ako reprezentantov každého z OspC RFLP typu.

Obrázok 8 ukazuje priradené čiastočné nukleotidové sekvencie 24 OspC génov vybraných z kmeňov patriacich OspC RFLP typov 1 až 24 na obrázku 1.

Obrázok 8a ukazuje úplné sekvencie nových OspC génov podľa obrázku 8 vrátane 3' konca. Obrázok 8a taktiež obsahuje sekvencie OspC génov kmeňov H13 a 28691.

Obrázok 9 ukazuje priradené čiastočné aminokyselinové sekvencie odvodené z nukleotidových sekvencií podľa obrázku 8. Oblasť, ktorá bola sekvenovaná, zodpovedá prvým 92 % maturovaného OspC proteínu.

Obrázok 9a ukazuje úplné aminokyselinové sekvencie nových OspC antigénov podľa obrázku 9 vrátane C-konca. Obrázok 9a obsahuje tiež sekvencie OspC antigénov kmeňov H13 a 28691.

Obrázok 10 znázorňuje dendrogram sekvenčných údajov OspC proteínu podľa obrázku 9 ukazujúci fylogenetický vzájomný vzťah medzi sekvenciami a stupňom identity sekvencie. Táto analýza bola použitá na zarade-

nie OspC proteínov do OspC skupín. Prvky OspC skupiny obsahujú príbuzné OspC sekvencie s väčšou ako 80 identitou. Je tiež uvedené, že OspC proteíny sa zhľukujú (kastrujú) druhovo špecifickým spôsobom, čo poukazuje na to, že OspC proteín sa dedične klonuje.

Obrázok 11 je zoznamom 20 OspC skupín a uvádza kmene vybrané ako predstaviteľov týchto skupín.

Obrázok 12 súhrnne uvádza výsledky CMAT a OspC typizačných analýz 82 kmeňov z obrázku 1. Tieto údaje sú zoradené podľa OspC skupiny a RFLP-typu, aby znázornili výskyt frekvencie, s ktorou kmene patria do príslušnej OspC skupiny. Kmene, ktoré neboli priradené k OspC skupine, sú označené 99. Sú uvedené biologické a zemepisné pôvody týchto kmeňov, aby sa umožnilo porovnanie týchto parametrov s OspC skupinou. Hodnoty CMAT boli priradené 5 kmeňom, pre ktoré bol publikovaný opis, ale ktoré neboli testované (t. j. kmene B. burgdorferi, B. afzelii a B. garinii odpovedajú CMAT 1, 3 a 4). OspC sérovary neboli priradené všetkým kmeňom; 5 kmeňov bolo nedostupných (NA), ďalšie neboli testované (NT), pretože exprimujú nedostatočné množstvá OspC na spoľahlivú typizáciu, a niektoré boli testované, ale boli nereaktívne (NR) s panelom monoklonálnych protilátok.

Obrázok 13 uvádza zoznam sekvencií mapovaných OspC epitopov spolu s frekvenciami ich výskytu medzi analyzovanými kmeňmi. Na konci tabuľky sú monoklony zoradené do kategórií podľa frekvencie, s ktorou reagujú so 77 kmeňmi v tejto štúdii.

Obrázok 14 ukazuje mapu generalizovaného OspC proteínu označujúceho umiestnenie epitopov mnohých BBM monoklonálnych protilátok označených ich číslami.

Obrázok 15 ukazuje výsledky pokusov aktívnej imunizácie použitím modelu gerbil. Skupiny zvierat boli imunizované vyčistenými variantmi OspC proteínov buď rovnakých (H7) alebo rôznych OspC skupín (ZS7, PKO a W) na vybraný kmeň Orth. Výsledky ukazujú, že existuje silná skrížená ochrana, ak sa imunizuje variantom rovnakej skupiny, ktorá je exprimovaná vybraným kmeňom, a tiež že existuje malá alebo žiadna ochrana, ak sa imunizuje OspC variantom inej OspC skupiny na vybraný kmeň.

Obrázok 16 zhrňuje informácie o OspC typizácii a distribúcii ľudských izolátov medzi rôznymi OspC typmi. Je uvedená tiež špecifickosť a prevaha OspC protilátok prítomných v ľudskom sére pri lymskej chorobe z Českej republiky. Špecifickosť OspC protilátky bola definovaná testovaním na panel 18 rôznych kmeňov *Borrelia* reprezentujúcich 16 OspC skupín.

Obrázok 17 ukazuje kvasinkový expresný vektor pPC-PP4 s OspC kódujúcou sekvenciou pod transkripčnou kontrolou metanolom indukovaného AOX-I promotóra.

Obrázok 18 ukazuje výsledky pokusov aktívnej imunizácie použitím modelu gerbil. Zvieratá boli imunizované vyčisteným OspC proteínom odvodeným od kmeňa Orth B. burgdorferi a rekombinantne produkovanom v P. pastoris GS115/pPC-PP4. Výsledky ukazujú na silnú ochranu OspC proteínom odvodeným od *Borrelia* i od kvasiniek.

Obrázok 19 ukazuje príklady prostriedkov OspC vakcíny navrhnutých ako ochrana proti klonom alebo klonovým klastrom *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu súvisiacich so špecifickým ochorením ľudí.

V ďalšej časti opisu je podrobne opísaný tento vynález. Pomocou sérovaru, polymorfie dĺžky reštrikčného fragmentu (RFLP) a sekvenčnej analýzy opísaných podrobnejšie, bolo zistené, že napriek vysokému stupňu

heterogenity OspC proteínu v rôznych izolátoch lymskej choroby, sa OspC proteíny môžu zostaviť do obmedzeného počtu skupín na základe, okrem iného, podobnosti v sekvencii aminokyselín. Závěry tohto zistenia sú podľa tohto vynálezu realizované navrhnutím vakcínových prostriedkov, ktoré vzhľadom na rôzne kmene dávajú vysokú úroveň skříženej ochrany, ktorá predtým nebola dosiahnutá.

Aby sa získala takáto skřížená ochrana, musí existovať schopnosť predpovedať efektívnosť zložiek príslušnej vakcíny pri ochrane proti všetkým možným kmeňom spôsobujúcich ochorenie. Podľa tohto vynálezu sa tento problém rieši tým, že heterogenita zložiek ochranných antigénov vo vakcíne odráža heterogenitu nachádzajúcu sa v prírode. Najmä potom v OspC proteíne sa toho dosiahne prípravou vakcín, ktoré obsahujú predstaviteľov všetkých OspC skupín zistených tu opísanou sekvenčnou analýzou. Príkladom takéhoto prostriedku je, že do vakcíny sa pridá 20 OspC proteínov, ktoré sú reprezentantmi všetkých uvedených OspC skupín. OspC skupina je definovaná sama osebe skupina OspC proteínov, ktorá má väčšiu ako 80 % identitu v sekvencii aminokyselín oproti 92 % identite maturovaného OspC proteínu, t. j. okrem informácií pre leader sekvenciu 18 aminokyselín a koncovú sekvenciu 16 aminokyselín, ako je uvedené na obrázkoch 9, 9a a 10.

Tento vynález sa týka teda imunogénneho prostriedku obsahujúceho jeden alebo viac OspC antigénov v podstate vyčistených z každej z 20 OspC skupín, ktoré prvýkrát opísali autori tohto vynálezu. Použitie napríklad 20 antigénov je zlepšením oproti perspektíve zahrnutia všetkých možných OspC variantov nájdených v prírode (pozri 35 tu opísaných OspC RFLP typov). Podľa iného aspektu tohto vynálezu sa prostriedok vakcíny lymskej choroby ďalej zjednoduší obmedzením počtu antigénnych zložiek takým spôsobom, ktorý neznižuje ochrannú účinnosť vakcíny, spojenou aplikáciou OspC typizačných údajov a epidemiologických údajov. Príkladmi tohto postupu, ako sú podrobnejšie opísané, sú a) návrh vakcínových prostriedkov na použitie v príslušnej zemepisnej oblasti, ako je Severná Amerika a Európa, alebo v príslušnej krajine, akou je Rakúsko a b) návrh vakcíny, ktorá je určená ako špecifická ochrana len proti tým klonom, identifikovaným CMAT analýzou, ktoré súvisia s ochorením ľudí.

V jednom uskutočnení podľa ad a) je pripravená vakcína na použitie v Severnej Amerike a obsahuje antigény, ktoré sú predstavované len tými OspC skupinami, ktoré boli pozorované v amerických kmeňoch, najmä v skupine 2 a 3 (pozri obrázok 12).

Podľa iného uskutočnenia sa pripravuje vakcína na použitie v Severnej Amerike, ktorá obsahuje kmene zo skupín 2, 3, 18 a 20. Na identifikáciu klonov *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu bola CMAT analýzou uskutočnená štruktúrna analýza populácie. „CMAT (typ)“ je definovaný ako jedinečný deväťmiestny výsledok pochádzajúci z kombinovaného skóre variantov molekulových hmotností deviatich detegovaných známych membránových antigénov, v niektorých prípadoch rôzne rozlíšiteľných daným radom monoklonálnych protilátok špecifických pre tieto antigény. „CMAT klaster“ je skupinou príbuznou CMAT (typov) s aspoň 50 % podobnosťou v ich CMAT výsledku. „CMAT skupina“ sa tu používa na označenie skupiny CMAT typov, ktoré majú viac ako 20 % podobnosť v ich CMAT výsledku. CMAT skupina môže teda obsahovať niekoľko CMAT

klasterov, ktoré ďalej môžu obsahovať niekoľko CMAT typov.

„Klon“ je definovaný ako CMAT typ obsahujúci viac ako jeden kmeň alebo inak, klon znamená skupinu kmeňov, ktoré majú rovnaký CMAT typ a sú teda považované za pochádzajúce zo všeobecného dedičného kmeňa. „Klonový klaster“ je skupinou príbuzných klonov na úrovni CMAT klastra (t. j. taká, že jej CMAT typy majú väčšiu ako 50 % podobnosť). „Klon súvisiaci s ochorením človeka“ je taký klon, o ktorom je možné na základe epidemiologických a klinických údajov uviesť, že často súvisí s ochorením človeka. Podobne „klonový klaster súvisiaci s ochorením človeka“ je taký klonový klaster, o ktorom je možné na základe epidemiologických a klinických údajov uviesť, že často súvisí s ochorením človeka. V uskutočnení podľa ad b) sa teda pripravuje OspC vakcína proti CMAT klonom 1.2.4 a 3.2.13 a klonovým klastrom 4.2.17, 4.2.18, 4.2.20 a 4.2.22, ktoré súvisia s ochorením človeka.

O OspC je známe, že je vhodným imunogénom na vyvolanie ochrannej imunitnej odpovede vo zvieracích modeloch lymskej choroby, ak vybraným organizmom je rovnaký izolát lymskej choroby, z ktorého je odvodený OspC. Ale vďaka sérologickej heterogenite OspC proteínov medzi kmeňmi *Borrelia* lymskej choroby sa predpokladalo, že imunizácia OspC z jedného kmeňa nemusí chrániť proti infekcii širokým rozpätím izolátov *Borrelia* lymskej choroby. Bola zistená potreba vyhodnotiť tento predpoklad založený na štúdiách skříženej ochrany (príklad 6). Na základe týchto štúdií je zrejme, že vakcína založená na OspC by mala obsahovať niekoľko serologicky rozdielnych foriem OspC. Predpokladom prostriedku takejto násobnej OspC vakcíny je znalosť stupňa rozdielnosti rôznych foriem OspC a toho, ako spolu tieto rozdielne formy súvisia. Táto informácia sa potom aplikuje podľa tohto vynálezu pri vývoji nových vakcínových prostriedkov proti lymskej chorobe, ktorú spôsobuje *Borrelia*.

Prvým stupňom, ktorý vedie na získanie potrebnej informácie, bol vývoj typizačného systému založeného na monoklonálnej protilátke (príklad 1) na charakterizovanie OspC proteínov z rôznych kmeňov *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu. Aby sa zistilo, že sa bude analyzovať najširšie rozpätie OspC proteínov, bol študovaný veľký počet kmeňov *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu (t. j. bolo vybratých 62 z 82 kmeňov uvedených na obrázku 1 ako produkujúcich dostatočné množstvo OspC, čo umožňuje rozumnú charakterizáciu) z rozmanitých zemepisných miest a izolovaných z ľudí (napríklad pokožky, mozgovomiechovej kvapaliny a krvi), zvierat a kliešťov. Iným kľúčovým aspektom tejto analýzy bolo použitie veľkého počtu monoklonálnych protilátok špecifických na OspC (uvedené v príklade 25), ktoré boli produkované nielen na jeden OspC proteín, ale na šesť rôznych OspC proteínov, čím sa zvyšuje rozmanitosť OspC epitopov schopných byť rozlíšených a teda zvyšuje sa účinnosť rozlišovať rôzne OspC proteíny. Údaje získané touto analýzou jasne ukázali, že existuje veľký stupeň sérologickej homogenity medzi OspC proteínmi z rôznych zdrojov. Príkladmi týchto reakčných zoskupení 16 rôznych typov, alebo sérovarov, OspC, ktoré boli identifikované v zbierke 13 monoklonálnych protilátok, sú uvedené na obrázku 6. 12 kmeňov bolo netypizovateľných, pretože nereagovali so žiadnou z monoklonálnych protilátok.

Aj keď typizácia OspC serologickými prostriedkami bola vysoko efektívna, nebola však úplná, pretože vyža-

duje jednak, aby OspC bol exprimovaný ako hlavný proteín a jednak, že je dostupný rad protilátok so širokým rozpätím špecifikácie. Z výsledkov serovarovnej analýzy bolo jasné, že úplné spektrum antigénovej rozmanitosti nebolo detegované použitými monoklonálnymi protilátkami, aj keď boli vybrané tak, aby sa tento problém minimalizoval. Heterogenita OspC bola preto ďalej študovaná analyzovaním polymorfie dĺžok reštrikčných fragmentov (RFLP), ku ktorej dochádza v OspC géne (príklad 3). Analýza údajov 82 kmeňov (t. j. experimentálne údaje zo všetkých 77 kmeňov v našej zbierke kultúr a informácie odvodené z 5 publikovaných OspC sekvencií - pozri obrázok 1) odhalili prítomnosť 35 rôznych RFLP OspC typov. Aj keď tento spôsob deteguje viac variácií, ako je zrejmé zo serovarového typizovania, medzi výsledkami získanými týmito dvoma spôsobmi existuje mimoriadne dobrá zhoda (obrázok 12).

Klasifikácia kmeňov *Borrelia* na serovary a RFLP-typy podľa ich OspC proteínu alebo génu umožňuje podľa tohto vynálezu zvoliť na podrobnejšiu charakterizáciu obmedzený počet OspC variantov, ktoré sú reprezentatívne na populáciu ako celok. Bol teda vybraný panel 29 kmeňov obsahujúci jeden alebo viac predstaviteľov každého z najčastejšie prítomných OspC typov. OspC gén bol amplifikovaný PCR a bola stanovená nukleotidová a odvodená aminokyselinová sekvencia (pozri príklad 4). Aminokyselinová sekvencia maturovaného OspC proteínu (od cysteínu 19; pozri US patentová prihláška č. 07/903 589, uvedená ako odkaz) bez posledných 16 aminokyselín bola použitá na stanovenie vzájomného vzťahu medzi OspC proteínmi rôznych OspC serovarov/RFLP-typov.

Ako ďalšia kontrola platnosti typizačných systémov a na zistenie, či existuje ďalšia heterogenita v danom OspC type, bol skúmaný vzájomný vzťah medzi blízko príbuznými OspC proteínmi od rovnakého OspC typu. Nukleotidová a odvodená aminokyselinová sekvencia OspC proteínov z 24 kmeňov sú uvedené na obrázkoch 8 a 9 (t. j. 22 sekvencií z tejto štúdie a 2 publikované sekvencie pre kmene 2591 a PBI). Dendrogram ukazujúci fylogenetický vzájomný vzťah medzi OspC proteínom je uvedený na obrázku 10.

Imunogén založený na OspC antigéne podľa tohto vynálezu obsahuje zmes rôznych serologických foriem prirodzene sa vyskytujúceho OspC proteínu. V inom uskutočnení podľa vynálezu imunogénny prostriedok obsahuje OspC varianty alebo OspC mimetiká OspC antigénov. Okrem OspC proteínu získaného z buniek *Borrelia* lymskej choroby, ako je uvedené, sa teda môžu používať rekombinantné OspC varianty prirodzene sa vyskytujúcej molekuly („OspC varianty“) a „mimetiká“ - zlúčeniny, ktoré majú mimotopy a ktoré napodobňujú OspC epitopy.

Do kategórie OspC variantov patria napríklad oligopeptidy a polypeptidy zodpovedajúce imunogénnym častiam OspC molekuly a akejkolvek neproteínovej imunogénnej časti OspC molekuly. Variant je teda chápaný tak, že zahŕňa polypeptid, ktorý je homológny s prírodným OspC molekulou a zachováva si nápadné imunologické vlastnosti prírodnej OspC molekuly. V tomto zmysle „homológia“ medzi dvoma sekvenciami zahŕňa podobnosť krátkej identity indukujúcej odvodenie prvej sekvencie od druhej. Napríklad polypeptid je „homológny“ s OspC vtedy, ak obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá zodpovedá epitopu rozlíšenému OspC špecifickými protilátkami alebo T-bunkami. Takáto sekvencia môže byť dlhá len s niekoľkými aminokyselinami a mô-

že byť lineárnou determinantou alebo sekvenciou, ktorá vznikne vtedy, ak aminokyseliny z oddelených častí lineárnej sekvencie sú priestorovo postavené vedľa seba za proteínovým vinutím alebo vtedy, ak sú podrobené modifikácii kovalentnej väzby. Aminokyselinové sekvencie, ktoré sú antigénnymi determinantmi na účely podľa tohto vynálezu, môžu byť stanovené napríklad technikou analýzy monoklonálneho mapovania, ktoré je odborníkom v oblasti techniky známe, pozri *Regenmortel: Immunology Today* 10, 266 (1989) a *Berzofsky a kol.: Immunological Reviews* 98, 9 (1987). Napríklad podľa tohto vynálezu OspC antigén obsahuje jednu alebo viac z nasledujúcich sekvencií aminokyselín (obrázok 13):

- 1) VKLSESVASLSKAA,
- 2) TDNDSKEAILKTNGT,
- 3) KELTSPVVAETPKKP,
- 4) FVLAVKEVETL,
- 5) YAISTLITEKLKAL,
- 6) PNLTEISKKITDSNA,
- 7) ASANSVKELTSPVV,
- 8) SPVVAETPKKP,
- 9) GKKIQQNGLGA a
- 10) SPWAESPCK,

alebo varianty, alebo mimetiká uvedených sekvencií epitopov. Vo výhodnom uskutočnení by vakcína obsahovala peptidy zodpovedajúce serotypovo špecifickým epitopom vybraným z jedného alebo z viacerých tu opísaných OspC proteínov z OspC skupín. Štúdie skríženej ochrany (príklad 6) ukazujú, že ochranná imunita je serotypovo indukovaná špecifickými epitopmi. Príkladom serotypového špecifického epitopu je sekvencia číslo 2 z kmeňa Orth, ktorá je rozlišovaná monoklonálnymi protilátkami BBM38 a BBM39, ktoré sú špecifické pre OspC proteíny z OspC skupiny 5 (serovar 4). Tento epitop zodpovedá predpokladanému epitopu (DNDSKE) predpovedanému z analýzy hydrofilnosti Orth OspC. Je možné predpokladať, že potenciálne serotypovo špecifické epitopy sa vyskytujú medzi aminokyselinovými zvyškami 120 až 155 (začínajúc od prvého cysteinového zvyšku) v OspC proteínoch z iných OspC skupín (príklad 4). Takáto vakcína môže obsahovať varianty alebo mimetiká peptidových sekvencií, ako je to ďalej opísané. Testovanie podobnosti tohto typu je možné uskutočňovať tiež štúdiom kompetitívnej inhibície v prípade protilátok alebo proliferáciou T-bunkami.

Polypeptidy, ktoré sa kvalifikujú ako OspC varianty podľa týchto kritérií, sa môžu pripravovať podľa tohto vynálezu konvenčnými reverznými genetickými spôsobmi, t. j. navrhnutím genetickej sekvencie založenej na aminokyselinovej sekvencii, alebo konvenčnými genetickými strihovými spôsobmi. Napríklad OspC varianty sa môžu produkovať technikami, ktoré zahŕňajú miestne riadenú mutagenézu alebo oligonukleotidom riadenú mutagenézu, pozri napríklad „*Mutagenesis of Cloned DNA*“ v *Current Protocols in Molecular Biology*“ 8.0.3 a nasl. (Ausubel a kol., re., 1989) („Ausubel“).

Inými OspC variantmi v tomto vynáleze sú molekuly, ktoré zodpovedajú časti OspC, alebo ktoré obsahujú časť OspC, ale nesúhlasia s prírodnou molekulou a ktoré majú imunogénnu aktivitu OspC vtedy, ak sú prítomné samotné, alebo ak sú napojené na nosič. OspC variant tohto druhu by mohol byť reprezentovaný skutočným fragmentom prirodzenej molekuly, alebo by mohol byť polypeptidom, ktorý je syntetizovaný de novo alebo rekombinantne.

Na použitie v rekombinantnej expresii OspC alebo OspC variantu by polypeptidová molekula kódujúca ta-

kúto molekulu výhodne obsahovala sekvenciu nukleotidov zodpovedajúcu požadovanej aminokyselinovej sekvencii, ktorá je optimalizovaná pre zvoleného hostiteľa, pokiaľ ide o použitý kodon, iniciáciu translácie a expresiu komerčne vhodného množstva OspC alebo požadovaného OspC variantu. Vektor vybraný na transformovanie zvoleného hostiteľského organizmu takouto polynukleotidovou molekulou by mal tiež umožňovať účinné zachovanie a transkripciu sekvencie kódujúcej polypeptid. Kódujúca polypeptidová molekula môže kódovať chimérny proteín, to znamená, že môže mať nukleotidovú sekvenciu kódujúcu imunologickú časť OspC molekuly odštiepiteľne napojenú na kódujúcu sekvenciu ne-OspC časti, akou je signálny peptid pre hostiteľskú bunku.

Na izolovanie DNA segmentu, ktorý kóduje OspC molekulu, sa podľa publikovaných spôsobov pripraví celková DNA Borrelie spôsobujúca lymskú chorobu, pozri napríklad Maniatis a kol.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, NY 1982) a Baess: *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (Sect. B)* 82, 780 (1974). Takto získaná DNA sa môže čiastočne rozštiepiť reštrikčným enzýmom. Získa sa viac-menej náhodná zostava genómových fragmentov. Na tento účel je vhodný enzým s tetranukleotidovým rozlišovacím miestom, akým je Sau3A (MboI). Fragmenty z tohto čiastočného štiepenia sa potom môžu frakcionovať podľa veľkosti, napríklad odštieňovaním sacharózovým stupňom, (pozri Maniatis) alebo elektroforézou na géle s pulzujúcim polom, pozri Anal. Trends in Genetics (november 1986), str. 278. Získajú sa tak fragmenty s dĺžkou, ktorá je porovnateľná s DNA kódujúcou OspC molekulou.

Podľa dobre známych opísaných spôsobov, napríklad v Ausubelovi na 5.0.1 a nasl., môžu byť vybrané fragmenty klonované do vhodného klonovacieho vektora. Takto získaná DNA by sa potom mohla vložiť napríklad do miesta BamHI klonovacieho vektora pUC18. Chimérne plazmidy alebo fág, okrem iného, produkované napojením fragmentov vybraných veľkostí na klonovací vektor, sa potom môžu transformovať do *E. coli* alebo do iných hostiteľských buniek, kde sú testované na expresiu kódovalého proteínu. Na prehľadávanie knižníc sa môžu použiť rozličné spôsoby, ktorými sa identifikuje klon obsahujúci OspC gén. Medzi tieto spôsoby patrí hybridizačné prehľadávanie sondou špecifickou pre OspC, akou je oligonukleotidová sonda, alebo vyhľadávanie exprese OspC antigénu pomocou imunologického činidla špecifického pre OspC. Posledné je možné uskutočňovať imunoblottovaním knižnice anti-OspC monoklonálnymi protilátkami alebo špecifickou polyklonálnou protilátkou pripravenou zo živočíchov imunizovaných vyčisteným OspC. Sotva je raz klon obsahujúci DNA kódujúci OspC v knižnici identifikovaný, môže sa izolovať DNA, úplne charakterizovať oblasť kódujúcu OspC proteín (ako je sekvenovanie) a následne je možné DNA použiť na prípravu OspC expresných vektorov vhodných na prípravu OspC-aktívneho proteínu.

Ako bolo uvedené, na získanie efektívneho imunogénu by mala byť štruktúra rekombinantne exprimovaného pC proteínu dostatočne podobná štruktúre prírodného (nedenaturovaného) OspC, aby proteín indukovoval produkciu ochranných protilátok. Je výhodné exprimovať DNA kódujúcu OspC tak, že nenastane intracelulárna proteolýza a agregácia expresného produktu v denaturovanej forme. Jedným zo spôsobov, ako zabrániť tomuto problému je rekombinantne produkovať pC v systéme hostiteľ-vektor, ktorý poskytuje sekréciu pC z hostiteľskej bunky, výhodne priamo do kultivačného média.

Jedným takýmto systémom je *Bacillus subtilis*. Je možné skonštruovať vhodný sekrečný vektor pre *B. subtilis* naviazaním signálnej sekvencie *B. amylooligofaciens* -amylázy, pozri Young a kol.: *Nucleic Acid Res.* 11, 237 (1983), na *Bacillus* plazmidový vektor pUB110, ako to opísal Ulmanen a kol.: *J. Bacteriol.* 162, 176 (1985). Podľa tohto prístupu sa sekvencia kódujúca cudzí proteín klonuje v smere vlákna promótoru a ribozómového väzbového miesta a signálnej -amylázy. Transkripcia a translácia OspC je pod kontrolou -amylázového promótoru translačného postupu tejto konštrukcie. Sekrécia pC z hostiteľskej bunky sa dosiahne -amylázovou signálnou sekvenciou. Tento vynález zahrnuje expresné vektory, ktoré sú funkčné v prokaryotoch rovnako ako v eukaryotoch. Boli opísané podobné vektory na použitie v kvasinkách. Týmto vektormi je možné dosiahnuť expresnú sekréciu OspC v kvasinkách. Vhodný expresný vektor je možné skonštruovať naviazaním sekvencie kódujúcej OspC na indukovateľný promótor v kvasinkovom replikačnom plazmide. Podľa tohto prístupu sa sekvencia kódujúca cudzí proteín klonuje v smere vlákna, napr. AOX-1 promótoru. Transkripciu a transláciu je možné indukovať pridaním metanolu ku kultivačnému médiu. Je možné získať buď intracelulárnu expresiu, alebo sekréciu cudzieho proteínu (naviazaním signálnej sekvencie na kódujúcu sekvenciu maturovaného proteínu). Výhodným kvasinkovým kmeňom je *Pichia pastoris*. V kvasinkách, najmä *P. pastoris*, boli získané vysoké výťažky expresných produktov.

Iným spôsobom exprimovania OspC v systéme hostiteľ-vektor, ktorý sa vyhýba proteolýze, agregácii a denaturácii, je použitie vírusu vakcínie ako vektora schopného exprese v rozličných hostiteľských bunkách cicavcov citlivých na infekciu vakcínou. Tento prístup by vyžadoval prípravu rekombinantného vektora odvodeného od vírusu vakcínie, v ktorom je pC gén umiestnený pod kontrolu promótoru, spolu so signálmi translácie a sekrécie vhodných na exprimovanie OspC proteínu u hostiteľa infikovaného vakcínou, pozri US patent č. 4 603 112, ktorého obsah je tu zahrnutý ako odkaz, tento plazmid by obsahoval tiež 5' k oblastiam kontroly transkripcie a 3' k 3' signálom terminácie a polyadenylácie, obklopujúcej sekvencie, ktoré prispievajú na homológnu rekombináciu v genóme vakcínie divokého typu. Ak sa do hostiteľskej bunky infikovanej vakcínou zavedie konštrukcia tohto druhu, obklopujúce sekvencie riadia rekombináciu medzi plazmidovým vektorom a vírusom vakcínou tak, že klonovaná štruktúra sekvencie (tu kódujúca OspC) sa stáva jej súčasťou, množí sa a je exprimovaná vírusom vakcínou. Oblasť medzi obklopujúcimi sekvenciami výhodne obsahuje tiež taký selektovateľný marker, že v prítomnosti selekčného média prežijú len tie bunky, ktoré obsahujú rekombinovaný vírus vakcínou (a v tejto súvislosti sekvenciu kódujúcu polypeptid s aktívnym OspC).

Rekombinantný vírus vakcínou produkovaný týmto spôsobom je možné použiť na infikovanie buniek cicavcov, akými sú bunky Vero, alebo bunky CVI, ktoré sú vhodné na fermentačný rast s vysokou hustotou. OspC-aktívny proteín exprimovaný v týchto bunkách počas fermentácie by mal byť sekretovaný do fermentačného média, z ktorého by bol vyčistený známymi spôsobmi.

Okrem prírodného OspC a OspC variantu zahrnuje tento vynález zlúčeniny („mimetiká“), ktoré napodobňujú OspC epitopy („mimotopy“). Jedným z príkladov mimetika je anti-idiotypová protilátka, t. j. protilátka, ktorá je produkovaná imunizovaním živočicha protilátkou, ktorá sa špecificky viaže na epitop na antigéne. An-

tiidiotypová protilátka rozlišuje a zodpovedá spojenému miestu na prvej protilátke. Tvar tohto miesta spojenia preto veľmi pripomína epitop, ktorý spadne do spojovacieho miesta prvej protilátky. Pretože antiidiotypová protilátka má miesto spojenia, ktorého tvar napodobňuje pôvodný antigén, môže byť používaná ako vakcína na vznik protilátok, ktoré reagujú s pôvodným antigénom, pozri Fineberg a Ertl: *CRC Critical Reviews in Immunology* 7, 269 (1987). Príslušné mimetiká je možné identifikovať testovaním pomocou OspC protilátky, ktorá deteguje, ktoré zlúčeniny sa na ňu viažu alebo by mohli byť produkované molekulárnym modelovaním, pozri Morgan a kol.: „Approaches to the Discovery of Non-Peptide Ligands for Peptide Receptors and Peptidases“ v *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Academic Press 1989), str., 243 a ďalšie.

Vakcína podľa tohto vynálezu je určená na imunizáciu živočích vrátane človeka, ktorý na ňu reaguje, proti lymfkej chorobe. Pojem „imunogén“ znamená antigén, ktorý vyvoláva špecifickú imunitnú odpoveď smerujúcu na humorálnu alebo bunkami sprostredkovanú imunitu, v tomto prípade na infekciu *Borrelia*. „Imunita“ teda znamená schopnosť jednotlivca ľahšie odolávať alebo prekonať infekciu v porovnaní s jednotlivcami, ktorí nie sú imunizovaní, alebo znášať infekciu bez toho, aby boli klinicky ovplyvnení.

Imunogén podľa tohto vynálezu môže ďalej obsahovať prijateľný fyziologický nosič. Takéto nosiče sú veľmi dobre známe z doterajšieho stavu techniky. Patria medzi nich makromolekulárne nosiče. Príkladom vhodného nosiča pre cicavcov je tuberkulínový PPD, hovädzí sérový albumín, oovalbumín alebo KLC (kezyhole limpet hemocuanin). Nosič by mal byť výhodne netoxický a nealergický.

Imunogén môže ďalej obsahovať pomocné činidlo, akým je hlinitá zlúčenina, voda, emulzia rastlinných alebo minerálnych olejov (napr. Freundov adjuvant), lipozómy, ISCOM (imunostimulačný komplex), vo vode nerozpustné sklá, polyanióny (akým je poly A:U, dextran-sulfát alebo lentinan), netoxické analógy lipopolysacharidov, muramylpeptid a imunomodulačné zlúčeniny (napríklad interleukíny 1 a 2) alebo ich kombinácie. Výhodným pomocným činidlom je hydroxid hlinitý. Imunogenita môže byť zvýšená tiež u tých cicavcov, ktorí dostali živé oslabené bakteriálne vektory, ako je *Salmonella* alebo *Mycobacteria*, alebo vírusové vektory podobné vakcín, ktoré exprimujú OspC aktívny polypeptid.

Spôsoby prípravy takýchto imunogénov sú dobre známe v danej oblasti techniky. Napríklad imunogén podľa tohto vynálezu môže byť lyofilizovaný na následnú rehydratáciu vo fyziologicky prijateľnom nosiči, akým je solný alebo iný fyziologický roztok. V každom prípade sa vakcína podľa tohto vynálezu pripravuje zmiešaním imunologicky efektívneho množstva OspC s nosičom v takom množstve, ktoré poskytuje požadovanú koncentráciu imunogénnej účinnej zložky vakcíny. Množstvo tejto zložky vo vakcíne bude závisieť od cicavca, ktorý je imunizovaný, pričom sa berie do úvahy vek a hmotnosť subjektu, rovnako ako imunogenita imunogénnej zložky prítomnej vo vakcíne. Vo väčšine prípadov bude množstvo imunogénnej zložky vakcíny v rozpätí od 1 do 100 g na antigén v dávke, výhodne od 10 do 50 g na antigén v dávke.

V ešte inom uskutočnení podľa vynálezu imunogénny prostriedok pozostáva z jedného alebo z viacerých OspC antigénov, OspC variantov, OspC mimetik alebo OspC antigénov v podstate vyčistených z každej OspC

skupiny na obrázku 11 exprimovaných klonmi a klonovými klastrami súvisiacimi s ľudským ochorením, ako je to opísané v príklade 1.

Tento vynález teda podľa nárokov 1 až 3 zahŕňa imunogénne prostriedky OspC antigénov *Borrelia* lymfkej choroby obsahujúce jeden alebo viac, výhodne dvoch alebo viac, OspC antigénov z 20 bežne rozlíšených OspC skupín, ako to dokumentuje obrázok 11, alebo jeden alebo viac OspC antigénov z každej z 20 bežne rozlíšených OspC skupín podľa obrázku 11. Okrem uvedených OspC antigénov môže táto kombinácia obsahovať OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, OspC variantov alebo OspC mimetik, ktoré majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC na indukovanie ochrany ochrannými protilátkami.

Obrázok 11 znázorňuje sekvenciu podstatných epitopov. Podľa tohto vynálezu sem patria OspC antigény, ktoré obsahujú jeden alebo viac takýchto epitopov. Tieto antigény alebo polypeptidy podľa tohto vynálezu teda obsahujú aspoň epitopolú sekvenciu, ktorá je uvedená na obrázku 13. Táto epitopová sekvencia môže byť taká krátka, ako je aminokyselinová sekvencia uvedená v zátvorkách na obrázku 13.

Ako ďalšie uskutočnenie tento vynález obsahuje tiež imunogénne prostriedky, ktoré obsahujú buď jeden alebo viac, výhodne dva alebo viac, OspC antigénov OspC skupín podľa obrázku 19 alebo jeden alebo viac antigénov z každej OspC skupiny podľa obrázku 19. Tieto imunogénne prostriedky sú obsiahnuté v patentových nárokoch 4 až 6.

V inom uskutočnení sa pripravuje imunogénny prostriedok na ochranu proti kmeňom *Borrelia* spôsobujúcich lymfskú chorobu v príslušnej zemepisnej oblasti. Podľa jedného uskutočnenia sa pripravuje teda vakcína, ktorá výhodne chráni proti takým kmeňom *Borrelia* spôsobujúcich lymfskú chorobu, ktorá sa najviac vyskytuje v Severnej Amerike. V inom uskutočnení sa pripravuje vakcína, ktorá výhodne chráni proti takým kmeňom *Borrelia* spôsobujúcich lymfskú chorobu, ktorá sa najviac vyskytuje v Európe. V treťom uskutočnení sa pripravuje vakcína proti takým kmeňom *Borrelia* spôsobujúcich lymfskú chorobu, ktoré sa najviac vyskytujú v Rakúsku. Vakcínové prostriedky pre každú z týchto zemepisných oblastí sú uvedené na obrázku 7.

Okrem OspC vakcínových prostriedkov sa uvažuje tiež o kombinovanej OspA/OspC vakcíne, pretože táto vakcína môže byť lepšia ako vakcína pripravená s každým antigénom samostatne z týchto dôvodov:

1. preto, že kmene *Borrelia* spôsobujúce lymfskú chorobu nemusia vždy exprimovať jeden alebo druhý z týchto antigénov, ale vždy exprimujú buď OspA alebo OspC,
2. bolo opísané, že existuje nepriamoúmerná regulácia týchto dvoch antigénov, t. j. taká, že ak je expresia jedného znížená (napríklad ako odpoveď na imunitnú odpoveď), expresia druhého je zvýšená,
3. aspoň v in vitro štúdiách s OspA bolo dokázané, že môžu vzniknúť mutanty, ktoré unikajú vakcíne. Existuje teda problém, ktorý je možné obísť zahrnutím druhého antigénu do vakcíny, pretože dvojité mutačné schopnosti v dvoch nezávislých antigénoch je nepravdepodobná,
4. imunitná odpoveď očkovaných na príslušný antigén nie je jednotná. Zahrnutím dvoch antigénov sa zvyšuje pravdepodobnosť, že jednotlivec, ktorý zle odpovedá buď na OspA alebo na OspC, by bol chránený vyvolaním ochrannej odpovede na iný antigén.

Nakoniec, očakáva sa, že by mohol existovať synergický efekt a že by sa vakcínou, ktorá obsahuje OspA i OspC, mohla získať väčšia imunita.

Podľa jedného uskutočnenia by sa jeden alebo viac OspC proteínov z OspC skupín 1 až 20 mohlo skombinovať s jedným alebo s viacerými OspA proteínmi, keď sú exprimované *Borrelia* kmeňmi B31, Orth, H4 a KL11.

Podľa iného uskutočnenia kombinovaná OspA/OspC vakcína pre USA obsahuje OspC z OspC skupiny 2 a 3 spoločne s OspA exprimovaným kmeňmi B31. Podľa ďalšieho uskutočnenia kombinovaná OspA/OspC vakcína na použitie v Európe obsahuje 14 OspC z OspC skupín 2, 4 až 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15 až 17 a 19 spoločne s OspA exprimovaným kmeňmi B31, Orth, H4 a KL11. Podľa ďalšieho uskutočnenia kombinovaná OspA/OspC vakcína pre Rakúsko obsahuje OspC zo skupín 2, 4 až 7, 10, 13 a 19.

Tento vynález opisuje tiež použitie kombinácie antigénov, ktoré sú obsiahnuté v uvedených imunogenných prostriedkoch, na výrobu vakcíny na liečenie alebo predchádzanie lymskej boreliózy cicavcov. Výhodným uskutočnením tejto vakcíny je vakcína pre človeka.

Spôsoby prípravy vakcín podľa tohto vynálezu sú navrhnuté tak, aby zabezpečili zachovanie identity a imunologického účinku špecifických molekúl a neobsahovali nežiaduce mikrobiologické znečistenia. Konečné produkty sa dodávajú a udržiavajú v aseptických podmienkach. Spôsob imunizácie cicavca proti lymskej chorobe spočíva v podávaní efektívneho množstva imunogénu tomuto cicavcovi. Podávanie sa môže uskutočňovať hociktorým spôsobom známym z doterajšieho stavu techniky. Medzi vhodné spôsoby podávania patrí napríklad podávanie uvedenej vakcíny cicavcom, u ktorých sa predpokladá, že budú napadnutí kliešťami nesúcimi *Borrelia*, spôsobujúceho lymskú chorobu, približne 6 mesiacov až 1 rok pred dobou predpokladaného styku s týmto kliešťom. Môže sa použiť akákoľvek imunizačná cesta, o ktorej sa predpokladá, že smeruje na vyvolanie príslušnej imunitnej odpovede podľa tohto vynálezu, aj keď výhodné je parenterálne podávanie. Medzi vhodné formy podávania patria subkutánne, intrakutánne alebo intramuskulárne injekcie alebo prostriedky vhodné na orálne, nážalné alebo rektálne podávanie.

Pojem „v podstate vyčistený“ znamená homogénny proteín, ktorý neobsahuje žiadne toxické zložky, čím sa znižuje pravdepodobnosť nepriaznivej reakcie. Pojem „homogénny“ v tejto súvislosti znamená, že aspoň 80 % (hmotn. k obj. dielom) proteínu znamená úplne celý a neporušený OspC a takmer celý zvyšok predstavuje rozkladné produkty OspC. Ak sú teda prítomné nečistoty ako zložky prostredia a ďalšie *Borrelia* proteíny, potom iba v stopových množstvách. Homogénny OspC môže pozostávať z viac ako jednej serologickej formy OspC.

Týmto spôsobom tento vynález umožňuje odstránenie nežiaducich, potencionálne imunogenných proteínov, ktoré by mohli indukovať protilátky a spôsobiť škodlivé autoimunné reakcie v imunizovanom cicavcovi. Uvedený spôsob čistenia zabezpečuje tiež reprodukovateľnosť prípravy vakcíny.

Výhodný spôsob čistenia zahŕňa nasledujúce stupne:

- rozušenie buniek *Borrelia*, ktoré spôsobujú lymskú chorobu, a frakcionáciu odstredovania na „membránové“ a „cytoplazmové“ zložky,
- extrakciu membránovej frakcie nedenaturujúcim detergentným činidlom a následné odstredovanie za získa-

nia supernatantu, ktorý obsahuje solubilizovaný proteín, pričom sa nerozpustný materiál odstráni ako peleta, a

c) frakcionácia solubilizovaného antigénu chromatografiou na iónex (dietylaminoetylový alebo „DEAE“) a eluovanie adsorbovaných antigénov gradientom chloridu sodného.

Spôsob čistenia môže zahŕňať zahusťovanie a ďalšie čistenie antigénov:

a) chromatografiou na hydroxylapatite, pričom adsorbované antigény sú eluované zvyšujúcim sa obsahom fosforečnanu v pufrí, a/alebo

b) afinitnou chromatografiou na imobilizovanom kove, pričom adsorbované antigény sú eluované imidazolom.

Medzi ďalšie účinné spôsoby známe v oblasti techniky patrí elúcia znížením pH alebo zvyšujúcej sa koncentrácie chloridu amónneho, histidínu alebo inej látky s afinitou na chelátovaný kov.

Rozbitie buniek sa môže uskutočniť lyzovaním buniek tak, že sa vytrepávajú ako suspenzie v bunkovom mlyne s malými sklenenými perličkami, pôsobením ultrazvuku alebo vo francúzskom mlyne. Antigény sa môžu extrahovať tiež priamo z povrchu buniek mikroorganizmu tým, že sa na bunky pôsobí detergentným činidlom, zmenou iónovej sily bunkového prostredia alebo miernym posunutím teploty. Môže sa tiež použiť východiskový materiál obsiahnutý v záhyboch membrán, ktorý sa uvoľňuje z buniek.

Extrakcia membránovej frakcie sa uskutočňuje detergentným činidlom, ktoré má výhodne dobré solubilizované vlastnosti, je nedenaturujúce a je zlučiteľné s chromatografiou na ionex. Výhodným obojakým detergentným činidlom je detergentné činidlo 3-14 vyrábané Calbiochom, aj keď je možné použiť akékoľvek detergentné činidlo alebo organické rozpúšťadlo, ktoré má uvedené vlastnosti. Detergentné činidlo sa typicky používa v koncentrácii 1 % (hmotn. k obj. dielom). Je však možné ho používať v rozpätí od 0,01 do 10 % (hmotn. k obj. dielom). Extrakcia detergentným činidlom sa uskutočňuje pri teplote od 0 do 60 °C výhodne pri 37 °C, a mala by trvať od 10 minút do 8 hodín, výhodne 1 hodinu. Okrem detergentného činidla sa na zlepšenie procesu solubilizácie môžu používať cheotropné činidlá, akým je močovina.

Antigény solubilizované detergentným činidlom sa potom frakcionujú DEAE-chromatografiou. Výhodne sa používa DEAE ionexová živica, môžu sa však používať iné anexové alebo katexové živice alebo ich kombinácie. Podľa tohto vynálezu ionexová živica obsahuje nerozpustnú maticu, na ktorú sa nakondenzujú nabitie skupiny. Medzi funkčné skupiny, ktoré sa používajú v anexoch, patrí skupina aminoetylová (AE), dietylaminoetylová (DE-AE) a kvartérna aminoetylová (QAE) skupina. Katexy môžu mať karboxymetylovú (CM), fosfo- alebo sulfopropylóvu (SP) skupinu. Aj keď sa vzorky nanášajú na kolónu v tris-pufrí obsahujúcom obojaké detergentné činidlo 3-14 (1 %) a antigény sa eluujú gradientom chloridu sodného, môžu byť rovnako účinné i iné prostriedky.

Antigény sa môžu zahusťovať naviazaním na hydroxylapatit spôsobmi známymi v doterajšom stave techniky. Iným alebo doplnkovým postupom, podľa ktorého sa antigény môžu ďalej zahusťovať alebo vyčistiť, je afinitná chromatografia na imobilizovanom kove. Tento spôsob je výhodný pre chromatografiu na hydroxylapatite pri čistení OspC, pretože sa dosiahne lepšie oddelenie OspC od OspB.

Výhoda uvedeného nedenaturujúceho čistiacieho postupu spočíva v tom, že sa zachováva trojrozmerná kon-

formácia proteínu, čím sa zachovávajú všetky kombinujúce miesta protilátky nachádzajúcej sa v prírodných proteínoch vrátane tých, ktoré fungujú pri ochrane. Ak je proteín denaturovaný, väzbové miesta môžu byť čiastočne alebo úplne zničené a kapacita antigénu indukovať protilátky proti antigénym miestam bude potom zodpovedajúcim spôsobom znížená. Takto zmenené proteíny by boli potom nežiaduce na použitie vo vakcínach.

Tento vynález ďalej opisuje rekombinantný prostriedok nových OspC antigénov, ktoré sú znázornené na obrázku 9a. Tento vynález opisuje tiež nové DNA sekvencie kódujúce OspC antigény podľa obrázku 9a. Tieto DNA sekvencie sú uvedené na obrázku 8a. Vynález opisuje tiež tie DNA sekvencie, ktoré majú aspoň 80 % homológiu s akoukoľvek sekvenciou na obrázku 8a.

Vynález opisuje tiež rekombinantné expresné vektory v prokaryotických a eukaryotických hostiteľských bunkách, najmä expresné vektory použiteľné v kvasinách, výhodne *Pichia pastoris*. Podľa výhodného uskutočnenia tohto vynálezu je expresný vektor indukovaný metanolom.

Vynález opisuje nové OspC antigény akými sú i) antigény kódované hociktorou sekvenciou podľa obrázku 8a alebo ii) antigény, ktoré majú aspoň 80 % homológiu s ktoroukoľvek aminokyselinovou sekvenciou podľa obrázku 9a.

Vynález je podrobnejšie opísaný v nasledujúcich príkladoch uskutočnenia, ktoré sú ilustračné a v žiadnom prípade nie je potrebné ich chápať ako obmedzenie rozsahu tohto vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

CMAT typizovanie kmeňov *Borrelia burgdorferi* a klastrová analýza výsledkov, ktoré umožňujú objasnenie CMAT klastrov, CMAT skupín a klonov a klonových klastrov „súvisiacich s ochorením ľudí“.

Z viacerých zdrojov, ktorých zoznam je uvedený na obrázku 2, bolo získaných 77 kmeňov (pozri obrázok 1). Starostlivosť bola venovaná tomu, aby zbierka obsahovala kmene rôzneho zemepisného pôvodu a z viacerých najrôznejších epidemiologických a klinických prípadov.

Zo všetkých kmeňov boli pripravené membránové frakcie nasledujúcim spôsobom:

Bunky *Borrelia* spôsobujúce lymskú chorobu boli získané odstredovaním (7 000 x G, 20 minút, teplota 4 °C), bunková peleta bola dvakrát premytá PBS obsahujúcom 5 mM MgCl₂ a bola stanovená sušina buniek. Premyté bunky boli potom lyzované vytrepávaním zmesi v bunkovom mlyne Vibrogen (model VI4, Buhler). Trojminútové cykly vytrepávania s chladením (4 °C) boli opakované dovtedy, pokiaľ lyzovanie nebolo vyššie ako 99 %, podľa vyhodnotenia mikroskopicky v tmavom poli. Lyzát sa potom sfiltraval filtrom zo sintrovaného skla, aby sa odstránili sklenené perličky. Zadržané perličky sa premyli pufrom na zvýšenie výťažku bakteriálnych antigénov vo filtráte. Lyzát sa potom odstredoval 20 minút pri 7 500 x G pri teplote 4 °C. Bola získaná surová membránová frakcia označená ako membránová frakcia 2 alebo „lsp“ (peleta získaná pri nízkej rýchlosti) frakcia. Supernatant sa ďalej odstredoval 30 minút pri 100 000 x G pri teplote 40 °C. Takto sa získala čistejšia membránová frakcia označená ako membránová frakcia 1 alebo „hsp“ (peleta získaná pri vysokej rýchlosti). Obe dve membránové frakcie sa dvakrát premyli 100 mM tris-HCl pufr-

om, pH 7,4 v pôvodných podmienkach odstredovania). Membránová frakcia 2 sa použije na typizovanie, zatiaľ čo membránová frakcia 1 sa nechá na čistenie antigénu.

Membránové proteíny prítomné v membránových frakciách 2 každého kmeňa sa potom analyzovali SDS-PAGE, ako to opísal Laemmli U. K.: *Nature* (London) 227, 680 (1970). Variácie v molekulovej hmotnosti boli stanovené porovnaním s elektroforetickou pohyblivosťou množstva štandardných proteínov zahrnujúcich rozsah molekulových hmotností plného spektra markerov membránových antigénov použitých v analýze.

Antigény sa preniesli na nitrocelulózový filter a identifikujú sa panelom monoklonálnych protilátok, napríklad spôsobmi imunoblotovania dobre známymi z oblasti techniky, pozri Ausubel a kol.: *2 Current Protocols in Molecular Biology* 10.8.1 a nasl. (1992). Monoklonálne protilátky sa pripravujú dobre známou technológiou hybridómov, pozri Kohler a Millstein: *Nature* 256, 495 (1975). Vo výhodnom uskutočnení tohto vynálezu sa analyzujú kmene uvedené na obrázku 1. Všeobecne platí, že výber membránového antigénu na zahrnutie do analýzy je daný:

- a) dostupnosťou monoklonálnych protilátok ich detegovať a rozlíšiť ich od početných iných antigénov prítomných v SDS-PAGE profiloch membránových antigénov bakteriálnych kmeňov,
- b) antigénom, o ktorý ide, prítomným vo významnom podiele analyzovaných kmeňov, t. j. všeobecným antigénom,
- c) skutočnosťou, že môže byť reprodukovateľne detegovaný vo viacerých, oddelene pripravených membránových frakciách rovnakého kmeňa, t. j. že neexistuje žiadny dôkaz na intra-kmeňovú variáciu príslušného antigénu,
- d) skutočnosťou, že antigénový marker je stabilne exprimovaný v rovnakom izoláte po násobnej kultivácii a pasážovaní a po značnom čase skladovania (až dva roky) a
- e) chýbajúcim dôkazom v publikovanej vedeckej literatúre o tom, že gény kódujúce markery sú extrachromozomálne dedené alebo že variácie antigénov boli pod špecifickým mechanizmom antigénovej variácie, ktorá smeruje k intra-kmeňovej variácii.

Obrázok 3 znázorňuje monoklonálne protilátky použité na identifikáciu 9 známych antigénov použitých v analýze (E90, E 59, E 43, F1a, E29, E22 antigény, kombinovaný antigén E18 + E20 a E10 antigén). Tieto antigény sú zoradené podľa molekulovej hmotnosti a v prípade, v ktorom existuje viac ako jedna monoklonálna proti látka, podľa ich nepatrne sa odlišujúcej reaktivity (napríklad E60 a E43) a podľa reakčnej zostavy antigénu s monoklonálnymi protilátkami.

Obrázok 4 uvádza zoznam všetkých jedinečných kombinácií 9 zistených výsledkov analyzovaných kmeňov, ktoré sú reprezentované deväťmiestnym číslom. Toto deväťmiestne číslo je považované za známy typ membránového antigénu (CMAT) tohto kmeňa. Na stanovenie vzájomného vzťahu medzi všetkými pozorovanými CMAT bola uskutočnená klastrová analýza a to stanovením genetickej odlišnosti každého antigénu a stanovením neváženej nepodobnosti vypočítanej z údajov všetkých jedinečných CMAT. Neprítomnosť výsledkov jednotlivých známych antigénov bola považovaná tak, ako keby tieto údaje chýbali. Vytvorená matrica bola podrobená klastrovej analýze spôsobom skupiny váženého páru použitím aritmetických priemerov (Sneath a Sokal) na osobnom počítači kompatibilným s IBM s programom CSS Statistica Statsoft.

Výsledný dendrogram klastrovej analýzy je uvedený na obrázku 5. Tento dendrogram skutočne ukazuje, že populácia *Borrelia* spôsobujúca lymskú chorobu je dobre štruktúrovaná. Vynesením vlastných hodnôt, pri ktorých dochádza ku každému klastrovému stupňu, do grafu je možné vybrať najvhodnejšiu hladinu, pri ktorej je možné baktérie zaradiť do kategórií.

Najideálnejšími miestami na rozdelenie pre nasledujúce stupne klastrovania sú tie body na krivke, kde sú hlavné skoky vo vlastných hodnotách. Ako ukazuje dendrogram na obrázku 5, dochádza k tomu tam, kde je rozdiel v CMAT výsledkom medzi 68 a 88 %. Toto delenie delí populáciu na štyri hlavné skupiny označené ako CMAT skupiny. K druhému hlavnému skoku vo vlastných hodnotách na postupné klastrovanie dochádza tam, kde je rozdiel v CMAT výsledku 40 a 52 %. Toto delenie rozdelí každú CMAT skupinu na dva alebo tri klastre jednotlivých CMAT. Z dôvodu vhodnosti bol rozdiel výsledku 80 % uvažovaný ako hladina, pri ktorej dochádza k zoskupeniu CMAT a 50 % ako hladiny, pri ktorej dochádza ku klastrovaniu.

Z predchádzajúceho je zjavné, že populácia *B. burgdorferi* sa môže rozdeliť na štyri hlavné CMAT skupiny, každá z nich pritom pozostáva z dvoch až troch CMAT klastrov. Každý CMAT klastre bol sám zložený z jedného až piatich jednotlivých CMAT. Porovnanie týchto výsledkov s výsledkami taxonomických štúdií štruktúrnej analýzy iných populácií [Marconi a Garon: *J. Bacteriol.* 174, 241 (1992), Boerlin a kol.: *Infect. Immun.* 60, 1677 (1992), Baranton a kol.: *Int. J. System Bacteriol.* 42, 378 (1992)] ukazuje, že skupina CMAT 1 zodpovedá génovému druhu *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, že skupina CMAT 3 je ekvivalentná s *Borrelia afzelii*, tiež známa ako „skupina VS461“, a že skupiny CMAT 2 a 4 zodpovedajú *B. garinii* sp. nov. Dôvod, prečo CMAT analýza rozdelila génové druhy *B. garinii* na dve CMAT skupiny, nie je jasný, ale môže to byť preto, že bolo použitých menej markerov ako v prípade izoenzymovej elektroforetickej štúdie (Boerlin a kol.: *Infect. Immun.* 60, 1677 (1992)).

Ak si pozrieme výskyt príslušných kmeňov v každom CMAT (obrázok 5), je zjavné, že 7 CMAT má viac ako jedného reprezentanta a môžu byť teda považované za klony, t. j. kmene, ktoré majú všeobecnú príbuznosť. V skutočnosti 67 % všetkých kmeňov patrí práve do troch rôznych CMAT klonov, napríklad CMAT 4 (klon 1:2:4) obsahuje 12 kmeňov, CMAT 13 (klon 3:2:13) obsahuje 23 kmeňov a CMAT 18 (klon 4:2:18) 15 kmeňov. Je pozoruhodné, že bolo zistené, že 76 % (31 z 41) analyzovaných ľudských izolátov je distribuovaných medzi tieto tri hlavné kmene. Ďalej je pozoruhodné, že ak sa CMAT 17, 18, 20 a 22 považujú spoločne ako časť príbuzného klonového klastra, všetky patria k CMAT klastru 4.2 a potom súvislosť s ochorením ľudí je až 87 %. Vďaka tejto úzkej súvislosti s ochorením ľudí môžu byť považované za klony alebo klanové klastre „súvisiace s ochorením ľudí“ (HRA) (pozri definícia). Ak si pozrieme typy izolátov nachádzajúcimi sa medzi týmito tromi hlavnými klonmi, je zjavné, že napríklad CMAT 13 súvisí s chronickým syndrómom pokožky ACA (5 kmeňov) a že tento klon všeobecne súvisí so syndrómami pokožky (17 z 19). Oproti tomu zdá sa, že ďalšie dva HDA kmene majú prevahu pri šírení ochorenia, to znamená, že sú izolované z krvi alebo CSF pacientov trpiacich na neuroboreliózu alebo lymskú artritídu. V prípade CMAT klastra 4.2 (t. j. CMAT 17, 18, 20 a 22) epidemiologické údaje ukazujú na úzku súvislosť s neurobore-

liózou. Z 10 ľudských izolátov 6 ich bolo izolovaných z CSF materiálu alebo z pacientov s neuroboreliózou a 4 boli izolované z pacientov s ECM, syndrómom normálne súvisiacim s akútnym ochorením, ktoré môže tiež súvisieť s neuroboreliózou. Súvislosť kmeňov CMAT 4 s príznakmi nie je celkom jasná, pretože 2 z ľudských izolátov bolo izolovaných z krvi, 3 z CSF a 1 z pacienta s EM.

Ďalšou analýzou epidemiologických údajov týkajúcich sa rôznych kmeňov bolo zistené, že tri hlavné klony alebo klonové klastre majú rozdielne zemepisné rozšírenie a že táto vlastnosť zodpovedá všeobecným rozdielom v primárnom syndróme lymskej choroby pozorovanej v týchto oblastiach. Napríklad CMAT 4 je najviac prevládajúci CMAT pozorovaný v Severnej Amerike, v oblasti, kde prevládajú príznaky artritídy. Bolo zistené, že CMAT 13 a CMAT 18 boli potvrdené prevažne v severnej strednej Európe, kde prevládajú neurologické príznaky a príznaky chronického ochorenia pokožky. Z 3 hlavných kmeňov len CMAT 4 bol zistený jednak v Severnej Amerike, jednak v Európe (Francúzsko, Rakúsko, Rusko), pričom v oboch svetadieloch je veľmi rozšírený. Je zaujímavé, že v oblastiach strednej Európy, najmä v Rakúsku a Švajčiarsku, kde je lymská choroba endemická, existujú spoločne všetky tri hlavné klony súvisiace s ochorením ľudí.

Uvedomujúc si skutočnosť, že ochorenie ľudí spôsobuje práve jeden klon (CMAT 4) v skupine CMAT 1 (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto), jedným klonom (CMAT 18) skupiny CMAT 3 (*Borrelia afzelii*) a klonovým klastrom (CMAT klastre 4.2) skupiny CMAT 4 (*B. garinii* sp. nov.) umožňuje, v súlade s týmto vynálezom, sústrediť sa na tieto klony/klonové klastre s cieľom navrhnuť vakcíny, akou je OspC vakcína alebo kombinovaná OspC/OspA vakcína, ktoré proti nim špecificky chránia. Táto vakcína by potom mohla byť využívaná v tých zemepisných oblastiach, v ktorých tieto klony extrémne prevládajú. Ďalej potom, vzhľadom na to, že rôzne klinické príznaky súvisia s rôznymi klonmi, je možné zacieliť vakcínu proti týmto klonom. Výsledkom je teda navrhnuť takú vakcínu, ktorá chráni proti špecifickým príznakom.

Príklad 2

Vývoj OspC serovarevej typizačnej schémy na analyzovanie serologickej variácie OspC antigénu *Borrelia* spôsobujúceho lymskú chorobu

Príprava anti-OspC protilátok

Bol pripravený panel 25 monoklonálnych protilátok oproti a) štyrom vyčisteným OspC proteínom odvodených od 1) rakúskeho kmeňa Orth (BBM 34 až 39), 2) nemeckého kmeňa PKO (BBM 42 až 45), 3) československých kmeňov E61 (BBM 46, 47 a 49) a 4) KL10 (BBM 40 až 41), b) OspC proteínom obohatenej zmesi antigénov odvodených od rakúskeho kmeňa W (BBM 22, 24, 25, 27, 28 a 29) a c) membránovej frakcii 2 českého kmeňa M57 (BBM 75 až 77).

Špecifickosť anti-OspC proteínu rôznych monoklonálnych protilátok bola potvrdená blotovou analýzou proti membránovej frakcii kmeňa W alebo M57 v prípade BBM 22, 24, 25, 27 až 29 a BBM 75 až 77, v prípade ďalších potom radovou blotovou analýzou oproti príslušne vyčistenému proteínu.

Membránová ELISA

Serotypizácia OspC proteínov sa uskutočňuje štandardným spôsobom membránovej ELISA. Membránové frakcie 2 kmeňov, pripravených podľa príkladu 1, sa

zriedi na 0,1 mg/ml fosforečnanom pufovaným soľným roztokom (PBS), pH 7,4 a rozdelí sa do jednotlivých jamiek mikrotitrovacích dosiek. Dosky sa nechajú vysušiť pri teplote 37 °C cez noc. Pred použitím sa dosky dvakrát premyjú v PBS, potom sa do každej jamky pridá 50 l zriedeného roztoku protilátky v PBS obsahujúcom 1 % ľudského albumínu a dosky sa inkubujú hodinu pri teplote 37 °C. Dosky sa potom štyrikrát premyjú pred pridaním protilátky konjugovanej s anti-myšími IgG alkalickými fosfátmi. Tieto dosky sa inkubujú ďalšiu hodinu pri teplote 37 °C, potom sa štyrikrát premyjú, pridá sa substrát, aby sa vyhodnotilo množstvo naviazanej protilátky.

Pôvodne boli všetky kmene testované proti všetkým 25 monoklonálnym protilátkam, aby bolo vidieť, ktoré monoklony boli najvhodnejšie na sérotypizačné účely. Boli robené pokusy, aby sa zistili jednotné pozitívne a negatívne testovacie kritériá. Ukázalo sa však, že to nie je možné pre veľmi rozdielne úrovne expresie OspC antigénov v rôznych kmeňoch. Na prekonanie tohto problému boli membránové frakcie 2 analyzované spôsobom Westernového blotovania, prenesené na nitrocelulózu a zafarbené farbivom Aurogold. Tie kmene, ktoré neexprimovali žiadne alebo exprimovali len malé množstvo OspC proteínu (celkom 15 kmeňov), čo bolo posúdené na základe neprítomnosti hlavného proteínu s molekulovou hmotnosťou v rozpätí 22 000 až 28 000, boli zo štúdie odstránené. Napriek tomu vo viacerých prípadoch (napríklad, ak sa používa BBM 28, 29, 37, 43 a 45), ešte stále nebolo možné pozorovať rozdiely medzi pozitívnymi a negatívnymi výsledkami. Tieto monoklonálne protilátky boli teda považované za nevhodné na typizačné účely. Všetky tieto protilátky rozlišujú známe epitopy a majú teda malú diskriminačnú hodnotu. Na základe údajov pôvodnej analýzy kmeňov bolo tiež zistené, že mnohé monoklonálne protilátky rozlišujú podobné epitopy, napríklad BBM 24, 25 a 27, BBM 38 a 39 a BBM 75, 76 a 77. Preto bol použitý v konečnej sérovarovej typizačnej schéme len jeden z každej skupiny (BBM 24, BBM 39 a BBM 77). Odstránením týchto kmeňov a monoklonálnych protilátok bolo potom možné stanoviť kritériá pozitívnej reakcie, ktorými sú tie, v ktorých získané hodnoty optickej hustoty boli významne (trikrát) vyššie ako hodnota pozadia negatívnych kmeňov. V praxi to znamená, že pozitívny výsledok má hodnota optickej hustoty (OD) väčšia ako 0,6. Všetky pozitívne reakcie boli potom potvrdené analýzou Westernovým blotovaním rovnakých membránových prostriedkov. Výsledkom analýzy Westernovým blotovaním bolo zistenie, že BBM 48 silne skrížene reaguje s proteínom s veľkosťou asi 60 000 hmotn. jednotiek a že poskytuje mnohé falošné pozitívne výsledky pri analýze ELISA. BBM 48 bol teda tiež vynechaný zo sérovarovej analýzy. Dôsledkom bolo, že sérovarová analýza bola trochu zjednodušená použitím len 13 z pôvodných 25 dostupných anti-OspC protilátok.

Nasleduje izolácia reakčnej zostavy každého kmeňa s úplným panelom 13 monoklonálnych protilátok. Každá jednotlivá zostava sa označí ako „sérovár“ (pozri obrázok 6). V zbierke konečne analyzovaných 62 kmeňov bolo pozorovaných 16 jedinečných sérovarov, čo ukazuje na veľký stupeň sérologickej heterogenity tohto membránového proteínu. Počet pozorovaných pozitívnych reakcií medzi jednotlivými sérovarmi bol medzi 1 a 7.

Na obrázku 12 je uvedený úplný zoznam sérovarov zistených pre každý kmeň. Ako je vidieť, 12 kmeňov (19 % z analyzovaných kmeňov) nereagovalo so žiadnou z panelu 13 monoklonálnych protilátok (označené „NR“, t. j. nereaktívne) a boli považované za netyrizovateľné. Spo-

ločne s kmeňmi, ktoré boli vynechané pre chýbajúcu alebo nízku expresiu (15 kmeňov), nemohlo byť typizovaných celkom 22 % z dostupných kmeňov. Frekvencia výskytu sérovarov medzi 78 kmeňmi, ktoré mohli byť jednoznačne typizované, boli značne premenné. Bol pozorovaný len jediný reprezentant sérovarov 6, 8 a 9, zatiaľ čo 10 kmeňov malo sérovar 2, najobvyklejší sérovar. Existuje úzky vzájomný vzťah medzi skupinou a genotypom OspC proteínu a jeho sérovaru. Vo väčšine prípadov sa zdá, že pomer je 1 : 1, napríklad v skupinách 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 14 a 15. Skupiny 3, 12, 13, 17, 18 a 19 buď nemohli byť testované, alebo neboli typizovateľné pri použití bežne dostupných monoklonálnych protilátok. Skupiny 6, 8 a 11 môžu byť ďalej sérologicky rozdelené na 2 alebo 3 sérovary. Je však zaujímavé si všimnúť, že genotypy týchto skupín majú tiež istú rôznorodosť. Jeden sérovar (sérovár 16) bol zistený vo viac ako v jednej skupine (skupina 16 a 20). To môže nastať preto, že v tomto sérovaru existujú len dve pozitívne reakcie a teda bežné monoklonálne protilátky neboli schopné rozlíšiť medzi týmito skupinami.

Príklad 3

Analýza polymorfie dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP) OspC heterogenity

Klonovaný bol gén OspC z kmeňa Orth. Uvedeným spôsobom (US patentová prihláška č. 07/903 580) bola stanovená sekvencia nukleotidov. Oligonukleotidy zodpovedajúce susednému (kódujúci vlákno, ATGAA-AA.AGAATACATTAAGTGC, štart kódom podčiarknutý) a vzdialenému (nekódujúci vlákno, TAATTA-AGGTTTTTTGGAGTTCTG, stop kodon podčiarknutý) koncu OspC génu z kmeňa Orth boli potom použité na polymerizačnú reťazovú reakciu (pozri príklad 4) na amplifikáciu OspC génu zo 77 kmeňov našej zbierky kultúr. Všetky testované kmene vrátane 14 kmeňov zo Spojených štátov amerických, dávali PCR fragmenty predpovedanej veľkosti (627 až 642 p. n.), čo ukazuje, že plazmidom kódovaný OspC gén nie je len stabilne udržiavaný, ale prevláda oveľa viac, ako bolo dosiaľ predpokladané. Zlyhanie detekcie OspC antigénu v kultúrach rastúcich in vitro je nepravdepodobné pre neprítomnosť OspC génu, alebo skôr pre neprítomnosť alebo nízku hladinu antigénu, ktorý je exprimovaný.

Polymorfia medzi OspC génmi z rôznych kmeňov bola stanovená analýzou zostavy reštrikčných fragmentov získaných po štiepení PCR amplifikovaného OspC génu (pripraveného, ako je to opísané) reštrikčnými enzýmami DpnII, DdeI a DraI. Analýza údajov z 82 kmeňov (t. j. experimentálne údaje zo všetkých 77 kmeňov našej zbierky kultúr + informácie odvodené z 5 publikovaných OspC sekvencií, pozri obrázok 1) potvrdili prítomnosť 35 rôznych RFLP OspC typov. Počet a veľkosť fragmentov experimentálne stanovených štandardnými postupmi bola potvrdená mnohými príkladmi sekvenovania, t. j. pre aspoň jedného reprezentanta RFLP typov 1 až 23 a typu 24 je založená na sekvenčných údajoch Padula a kol. RFLP zostavy súvisiace s každým RFLP typom sú uvedené na obrázku 7. Ak sú dostupné, boli namiesto zmeraných hodnôt výhodne uvedené veľkosti fragmentov odvodené od informácií o sekvencií (RFLP typy 1 až 24). Úplný zoznam RFLP typov pre každý analyzovaný kmeň je uvedený na obrázku 12.

Príklad 4

PCR amplifikácia a sekvenovanie nukleotidov rôznych alel OspC génu a klastrová analýza odvodených aminokyselinových sekvencií

Ako je to opísané v príkladoch 1 a 2 a súhrnne uvedené na obrázku 12, bolo možné roztriediť kmene *Borrelia* na OspC sérovary a OspC RFLP typy. Boli vybraté kmene predstavujúce OspC RFLP typy 1 až 17 a 19 až 23, OspC gén bol amplifikovaný polymerizačnou reťazovou reakciou a bola stanovená sekvencia nukleotidov a odvodená sekvencia aminokyselín. V niekoľkých prípadoch bol študovaný vzájomný vzťah medzi veľmi príbuznými OspC proteínmi ako ďalšia kontrola platnosti typizačných systémov a ako kontrola na ďalšiu nedetegovanú heterogenitu OspC typov. Celkom bolo PCR amplifikovaných a sekvenovaných, ako je to uvedené, 27 OspC génov. Informácie o sekvenciách boli použité na klasifikáciu OspC proteínov do OspC skupín.

Materiály a spôsoby

Suspensia zmrazených zásobných buniek *Borrelia* bola roztopená a 2 l (5.10^6 až 1.10^8 buniek/ml) tejto suspenzie sa odstreďovalo 5 minút pri najvyššej rýchlosti v mikrodostredivke Heraeus Biofuge A. Peleta buniek bola resuspendovaná v 10 l 1 x TAQ-pufri (Boehringer Mannheim), prevrstvená 50 l minerálnym olejom (Pharmacia), inkubovaná 8 minút vo vriacom vodnom kúpeli a potom hneď umiestnená na ľad. K bunkovému lyzátu sa pridalo 90 l zmesi reakčných činidiel [9 l 10 x Tag polymerizačného pufri, Boehringer Mannheim, 2 l 10 mM dNTP roztoku, Boehringer Mannheim, 5 l primeru 2 (ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC), 10 mM zásobný roztok, 5 l primeru 2 (AATTAAGTTTTTTGGAGTTTCTG), 10 mM zásobný roztok, 0,5 l Tag polymerázy s koncentráciou 5000 jedn./ml, Boehringer Mannheim, a 68,5 l vody]. DNA amplifikácia bola uskutočnená v zariadení LKB Thermocycler (95 °C 26 sekúnd, 53 °C 60 sekúnd a 70 °C 84 sekúnd, 30 cyklov). Amplifikácia bola sledovaná analyzovaním 5 l produktu na 1 % (hmotn. k obj. dielom) agarového gélu v tris-acetátovom pufri (40 mM tris-acetát, 2 mM EDTA, pH 8,0), zafarbením etidumbromidom a pozorovateľná pod UV svetlom. Amplifikované produkty boli zahustené mikrodostredujúcou kazetou Spin Bind (FMC). DNA bola izolovaná v 30 l vody. Izolácia bola sledovaná v 2 l vyčisteného produktu na agarovom géle, ako je to uvedené.

Amplifikované DNA fragmenty (2 až 7 l) boli na sekvenovanie pripravené na zariadení LKB Thermocycler (25 cyklov: 36 sekúnd pri 95 °C, 30 sekúnd pri 53 °C a 80 sekúnd pri 70 °C) pomocou sekvenančnej súpravy Auto Cycle Sequencing Kit (Pharmacia) s primermi 5'-ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC-3' a 5'-ATTAAGTTTTTTGGAGTTTCTG-3'. Vzorky boli elektroforezované na 6 polyakrylamidovom sekvenančnom géli automatickou sekvenančnou aparátúrou s laserovou fluorescenciou (ALF) (Pharmacia LKB) podľa opisu uvedeného výrobcem. Údaje o sekvenciách nukleotidov z ALF boli zhromaždené a analyzované programom DNASIS, odvodené sekvencie proteínov programom PROSIS (Pharmacia LKB).

Aminokyselinové sekvencie OspC proteínov z 24 rôznych kmeňov spirochét lymskej choroby (t. j. 22 sekvencií z tejto štúdie a 2 publikované sekvencie pre kmene 2591 a PBI) boli zoradené rýchlou približnou metódou podľa Wilburyho a Lipmana: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726 (1983). Takto získaný podrobný výsledok bol použitý na skonštruovanie dendrogramu spôsobom UPGMA (forma klastrovej analýzy) podľa Sneatha a Sokala. Tieto analýzy boli uskutočnené programom Clustal,

známom z Higgins a Sharp: CABIOS 5, 151 (1989) a Higgins a kol.: CABIOS (1991).

Výsledky a diskusia

Zoradené nukleotidové a odvodené čiastočné aminokyselinové sekvencie OspC génov a proteínov z 24 kmeňov predstavujúcich 24 rôznych RFLP typov sú uvedené na obrázku 8 a 9. Pretože aminokyseliny predchádzajúce prvý cysteinový zvyšok (aminokyselina 19 v Orth sekvencii) v OspC proteíne znamenajú leader sekvenciu a nie sú prítomné v maturovanom proteíne (sekvenca FISC je predpokladaným miestom štiepenia signálnymi peptidmi), neboli zahrnuté na porovnanie sekvencií. Na karboxylovom konci proteínu bolo vynechaných 16 aminokyselín. Tieto aminokyseliny zahŕňujú oblasť zodpovedajúcu väzbovému miestu primeru 2 (ekvivalent posledných 7 aminokyselín) a potom medzeru 9 ďalších aminokyselín, pokiaľ sa nezískajú údaje prvej sekvencie. Zdá sa, že táto koncová časť OspC génov je vo veľkej časti zachovaná a má menšiu dôležitosť pri vzniku rozmanitosti pozorovanej medzi OspC proteínmi, ako ukazuje schopnosť amplifikovať a sekvenovať OspC gén vo všetkých testovaných kmeňoch pomocou primeru 2. Navyše, monoklonálne protilátky, ktoré sa viažu na túto oblasť OspC, sú veľmi reaktívne (napríklad BBM 29, 42 a 45 na obrázkoch 13 a 14).

OspC sekvencie sú veľmi variabilné s najvzdialenejšími príbuznými aminokyselinovými sekvenciami (*B. burgdorferi* kmeň 297 a *B. garinii* kmeň IP90), pričom majú len 59 % identitu aminokyselinovej sekvencie (80 % podobnosť). Žiadne rozdiely medzi sekvenciami neboli však zistené medzi členmi rovnakého RFLP typu, čo poukazuje na to, že tento typizačný spôsob veľmi presne predstavuje heterogenitu medzi OspC génmi (t. j. OspC sekvencie kmeňov VS215, VS219 a DK7 RFLP typu 1 sú identické so ZS7, kmeňmi IP2 a 26816 RFLP typu 2 sú identické s B31, kmeňmi H15 a ACAI RFLP typu 6 sú rovnaké, kmene PKO a DK62 RFLP typu 7 sú identické s JSB, kmene H4 a W RFLP typu 10 sú rovnaké, kmene 871104 a KL11 RFLP typu 13 sú identické a kmene 20047 a VS185 RFLP typu 14 sú rovnaké).

Stupeň príbuznosti medzi čiastočnými OspC aminokyselinovými sekvenciami stanovený klastrovou analýzou je reprezentovaný ako dendrogram na obrázku 10. OspC proteíny z kmeňov rovnakého druhu sú príbuznejšie ako OspC proteíny z rôznych druhov. V každom druhu sú však zrejme značné odlišnosti. Rozdielnosti OspC sekvencie sú zvlášť veľké medzi kmeňmi *B. garinii*, ako ukazuje hlbšie vetvenie pozorované v tejto časti fylogenetického stromu a väčší počet OspC variantov súvisiacich s *B. garinii* ako s ďalšími dvomi druhmi *Borrelia*. Klonálna štruktúra OspC dedičnosti predpokladá, že neexistuje žiadna významná výmena genetického materiálu ani intragérovou rekombináciou, ani horizontálnym prenosom plazmidom kódovaného OspC medzi rôznymi druhmi *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu.

OspC proteíny boli priradené k OspC skupinám. OspC skupina je definovaná ako taká skupina OspC proteínov, ktoré majú vyššiu ako 80 % identitu aminokyselinovej sekvencie oproti predchádzajúceho 92 % maturovaného OspC proteínu, t. j. okrem informácie pre leader sekvenciu s 18 aminokyselinami a poslednými 16 aminokyselinami. Na obrázku 1 je uvedených 18 rôznych OspC skupín, ale dve ďalšie OspC skupiny (19 a 20) boli identifikované z neúplnej informácie o sekvencii OspC proteínov z kmeňov H13 a 28691, ktoré neboli zahrnuté v dendrograme.

Napriek veľkej rozmanitosti OspC proteínov je zachovaná prvá tretina maturovaného OspC proteínu (obrázok 10), kmene rovnakého druhu majú 80 až 90 % identitu sekvencií v tejto oblasti. Ale identita sekvencií medzi OspC proteínmi z rôznych kmeňov nie je v tejto časti proteínu tak vysoká vďaka prítomnosti kmeňovo špecifickým sekvenčným motívom na aminovom konci OspC proteínu. Ako bolo uvedené, časť OspC na karboxylovom konci, ktorá nebola uvedená, je zrejme tiež vo vysokom stupni zachovaná. Intervenujúca oblasť (t. j. dolné dva bloky na obrázku 9 medzi aminokyselinovými zvyškami KKI a NS) je veľmi premenná a je hlavným zdrojom rozmanitosti súvisiacej s OspC. Je potrebné očakávať, že sérotypovo špecifické epitopy sú vnútri tejto premenlivej oblasti. Analýza profilov hydrofilnosti sekvencií jednotlivých proteínov spôsobom podľa Hoppa a Woodsa zistila, že najvyššie hydrofilné maximum, veľmi predpovedajúce existenciu epitopu, leží vnútri tejto oblasti. Napriek veľkej premenlivosti medzi OspC sekvenciami v tejto oblasti, predpokladaný epitop nemenne leží medzi zvyškami aminokyselín 120 až 155 maturovaného proteínu. V OspC kmeni Orth sa hydrofilné maximum vyskytuje vo zvyškoch 136 až 141 (DNDSKE), oblasti s vysokou flexibilitou a predpokladanou otáčkou, čo sú parametre, ktoré by tiež naznačovali epitop (analýzy uskutočňované pomocou PC/GENE).

Príklad 5

Mapovanie epitopu anti-OspC monoklonálnych protilátok

Epitopy niektorých anti-OspC monoklonálnych protilátok boli mapované komerčne dostupnou súpravou Custom Designated Epitope Scanning Kit od firmy Cambridge Research Biochemicals Ltd., Gradbrook Park, Northwich, Cheshire, Anglicko. Táto zostava používa alebo spôsob pin technológie opísaný Geysenom a kol. J. Immunol. Methods 102, 259 (1987), analýzu E-LISA s biotinylovaným peptidom alebo spôsob bodového blotovania opísaný výrobcom. Jediným stupňom bolo 2026 syntetizovaných testovaných peptidov, pokrývajúcce 10méry sekvencií OspC proteínov sú uvedené na obrázku 9. Do analýzy boli tiež zahrnuté pokrývajúce peptidy sekvencie signálneho proteínu kmeňa Orth a C konce OspC proteínov kmeňov Orth PKO a B31.

Kombinovaná sekvencia sekvenčných peptidov reagujúcich s monoklonálnou protilátkou je opísaná ako „úplná sekvencia epitopu“. Obrázok 13 uvádza úplnú sekvenciu epitopu týchto monoklonálnych protilátok, ktorými sa tieto epitopy mohli rozlišovať. Sekvencia uvedená v hranatých zátvorkách zahŕňa aminokyseliny bežné pre všetky reagujúce peptidy a tvorí teda dôležitú časť epitopu. Umiestnenie každej úplnej sekvencie v generalizovanom OspC proteíne je uvedené na obrázku 14. V jednom prípade je dané (obrázok 13) a uvedené (obrázok 14) číslo epitopov, ktoré by mohli byť rozlíšené, ale len pre prvé, t. j. pre najreaktívnejšie. V prípadoch, keď monoklonálne protilátky reagujú s peptidmi zodpovedajúcimi podobným oblastiam vo viac ako jednom OspC proteíne, je uvedená len monoklonálna látka pre kmeň Orth. Naopak, ak monoklonálna protilátka nereaguje s Orth proteínom (napríklad BBM 43), je uvedená reagujúca sekvencia pre homológny kmeň (PKO). Dole na obrázku 13 sú monoklonálne protilátky zoradené do kategórií na základe frekvencie výskytu toho epitopu, ktorý rozlišujú, čo je uvedené v hornej časti tohto obrázku. Ako je vidieť, viac ako polovica z nich rozlišuje vysoko špecifické epitopy, v ktorých sa vyskytuje menej ako 10 z analyzovaných kmeňov. Päť z monoklonálnych proti-

látok rozlišuje epitopy vyskytujúcich sa medzi produktov, zatiaľ čo sedem ostávajúcich je možné považovať za protilátky, ktoré rozlišujú bežné epitopy, pretože sa vyskytujú vo viac ako 25 zo 77 analyzovaných kmeňov. Monoklonálne protilátky, o ktorých bolo zistené, že sú vhodné na sérovarovú analýzu, sú na obrázku 13 označené hviezdíčkou. Je zaujímavé poznamenať, že to boli primárne monoklonálne protilátky, ktoré rozlišujú bežné epitopy (BBM 28, 29, 34, 37, 42, 43 a 45), alebo epitopy vyskytujúce sa ako medzi produkty (BBM 22, 35 a 40), ktoré by mohli byť jednoznačne zmapované. V skutočnosti by mohli byť zmapované len 3 monoklonálne protilátky, ktoré by mohli byť považované za typovo špecifické (BBM 38, 39 a 44), t. j. reagujúce s menej ako 10 kmeňmi. Ako BBM 38, tak aj 39 majú rovnakú zostavu reakcií kmeňov a mapovali rovnakú oblasť (aminokyseliny 155 a 170). Na základe hydrofilnosti sekvencie aminokyselín proteínu Orth hydrofilné maximum a predpokladaná -otáčka sa zhoduje s touto oblasťou, parametrami vysoko indikatívnymi pre epitop. Epitop BBM 44 leží medzi aminokyselinami 79 a 90, čo je tiež značne premenná oblasť. Nanešťastie nemohol byť zmapovaný žiadny z epitopov iných typovo špecifických monoklonálnych protilátok, čo poukazuje na to, že sú závislé od konformácie molekuly. Pretože však všetky 3 typovo špecifické protilátky mapujú oblasti, ktoré sú medzi najpremenlivejšími oblasťami proteínu, je veľmi pravdepodobné, že sú tiež v iných typovo špecifických epitopoch. Je zaujímavé, že BBM 28, ktorý reaguje s epitopom vysokej frekvencie, tiež mapuje rovnaké oblasti ako BBM 38 a 39. Dôvody tejto skutočnosti nie sú známe. Môžu tu však existovať malé rozdiely v počte a skutočných aminokyselinách, ktoré sú vo väzbovom mieste, čo je príčinou tejto nejednoznačnosti. Štyri z protilátok (BBM 29, 42, 43 a 45), ktoré reagujú s obvyklým epitopom, mapujú proteín na vzdialenom C konci (aminokyseliny 200 až 212), pričom dva ďalšie reagujú blízko N konca tohto proteínu (aminokyseliny 41 až 67), v oblastiach, ktoré sú veľmi konzervatívne. Monoklonálne protilátky rozlišujú epitopy s výskytom medzi produktov mapovaných vnútri polozachovaných oblastí (aminokyseliny 103 až 114 a aminokyseliny 176 až 196) molekuly. Tieto výsledky boli potvrdené tiež ďalším pokusom, v ktorom bolo testované viacmocné králičie sérum špecifické pre membránové frakcie 2 kmeňov, z ktorých každý exprimuje 16 sérovarových variantov OspC proteínu proti 203 pokrývajúcim peptidom Orth proteínu. Boli nájdené skrížene reagujúce epitopy v hore zachovaných a polozachovaných oblastiach. Je zaujímavé, že séra z kmeňov CMAT skupiny 1 (B. burgdorferi sensu stricto) nereagujú skrížene tak často ako séra z kmeňov CMAT skupiny 3 (B. afzelii) a 4 (B. garinii).

Príklad 6

Štúdie skríženej ochrany gerbil

Na zistenie, či je možná skrížená ochrana medzi rôznymi skupinami OspC, boli vyčistené OspC proteíny z B. burgdorferi kmeňa ZS7 (OspC skupina 1), B. afzelii kmeňa PKO (OspC skupina 7) a B. garinii kmeňa W (OspC skupina 10) a použité ako imunogény v modeli lymfatickej boreliózy gerbil proti stimulácii kmeňom Orth B. afzelii (OspC skupina 5). Na testovanie vnútri skupiny bol ako imunogén proti kmeňu Orth použitý OspC z kmeňa H7 (OspC skupina 5). OspC z kmeňa H7 patrí k rovnakému sérovaru a RFLP typu ako OspC z kmeňa Orth.

Gerbilám bola podaná alebo jedna subkutánna imunizácia vyčisteného OspC (20 g proteínu/200 l) s po-

mocným činidlom TiterMax # R-1 (CytRx), t. j. bola pripravená ako emulzia vody v oleji (skvalen) so syntetickým imunomodulátorom (kopolymér CRL89-41), alebo gerbilám boli podané dve intraperitoneálne injekcie OspC (10 g proteínu/500 l) s hydroxidom hlinitým ako pomocným činidlom. Vyčistené antigény boli pripravené z kmeňov podľa spôsobov opísaných v USA patentovej prihláške č. 07/903 580, ktorej obsah bol už skôr zahrnutý ako odkaz. Tri a pol týždňa po prvej imunizácii boli z očí a plazmy odobraté vzorky krvi pripravenej tak, aby mohla byť zistená protilátková odpoveď na imunogén v čase stimulácie (podobne bolo postupované s neimunizovanými kontrolnými zvieratami). Po štyroch týždňoch od prvej imunizácie bolo zvieratám podaných intraperitoneálne 104 buniek (ID50 25 až 100) kmeňa Orth, rovnako ako skupine neimunizovaných kontrolných zvierat. Podávaná supenzia bola tiež titrovaná u neimunizovaných gerbil, aby sa stanovila potrebná dávka na infikovanie 50 % zvierat. Po ďalších dvoch týždňoch boli zvieratá stimulované kmeňom 104 zabitým a mechúr, srdce, ľadviny a slezina boli kultivované v médiu BSK. Kultúry boli skúmané na prítomnosť spirochét v týždňových intervaloch od druhého do šiesteho týždňa po naočkovaní, mikroskopiou v tmavom poli. Bola tiež odobratá krv a získaná plazma bola analyzovaná Westernovým blotovaním na sérokonverziu, t. j. na vyvinutie protilátok po stimulácii na antigény z kmeňa Orth iných ako imunogén. Bola zistená dobrá zhoda medzi kultivačnými a sérologickými testami použitými na zistenie, ktoré zvieratá boli infikované. Na stanovovanie ID50 bolo použité len sérologické testovanie, ale v tomto prípade zvieratá sa nechali vykrvácať 3 týždne po stimulácii. Ďalší čas bol poskytnutý na to, aby protilátková odpoveď v infikovaných gerbilách bola dostatočne silná a aby mohla byť ľahko zistiteľná.

Medzi druhmi neexistovali žiadne známky skríženej ochrany, t. j. OspC proteíny z OspC skupín 1 (B. burgdorferi) a 10 (B. garinii) boli neúčinné ako imunogény proti podanému kmeňu Orth (B. afzelii). Podobne neexistovala žiadna známka skríženej ochrany medzi rôznymi OspC skupinami rovnakých druhov, t. j. OspC proteín z izolátu OspC skupiny 7 (kmeň PKO B. afzelii) bol neúčinný ako imunogén proti podanému kmeňu Orth, ktorý exprimuje OspC proteín z OspC skupiny 5. Oproti tomu imunizácia OspC proteínom z kmeňa H17 (OspC skupina 5) bola účinná na kmeň Orth (OspC skupina 5). Tieto údaje (obrázok 15) ukazujú, že skrížená ochrana medzi OspC skupinami je nepravdepodobná a že je možná ochrana vnútri jednej skupiny. Na ochranu proti väčšine kmeňov *Borrelia* spôsobujúcich lymskú chorobu by mala byť účinná násobná vakcína obsahujúca jeden alebo viac typov OspC proteínov z každej OspC skupiny.

Príklad 7

Frekvencia zemepisného rozšírenia rôznych skupín OspC proteínov súvisiacich s ochorením ľudí

Vzhľadom na vysoký stupeň premenlivosti OspC proteínu je mimoriadne náročné navrhnúť vakcínové prostriedky, ktoré poskytujú dobré ochranné krytie a pritom nevyžadujú zahnutie mimoriadne vysokého počtu variantov na dosiahnutie tohto cieľa. Jedným spôsobom optimalizovania výberu OspC variantov by bolo stanovenie, ktoré OspC varianty súvisia s ochorením ľudí a vyskytujú sa veľmi často. Vzácné OspC varianty alebo OspC varianty vzácné súvisiace s ochorením ľudí by tak boli z akéhokoľvek vakcínového prostriedku vylúčené s minimálnou stratou účinnosti vakcíny. A ďalej, ak je vakcína určená len na použitie v príslušnej zemepisnej

oblasti, nebolo by nutné zahrnúť do nej tie OspC varianty, ktoré neprevládajú v *Borrelia* spôsobujúcej lymskú chorobu v tejto oblasti. Využitím epidemiologických a OspC typizačných informácií o kmeňoch *Borrelia* použitých v tejto štúdii (obrázok 12) je možné vybrať OspC varianty, ktoré by mali byť vo vakcíne (vakcínach) obsiahnuté.

Analýza izolátov *B. burgdorferi* (CMAT skupina 1 zahrnujúca kmeň 25015, celkom 23 kmeňov) ukazuje, že najviac prevládajúce OspC varianty medzi týmito kmeňmi sú tie, ktoré patria k skupinám 1 a 2. Kmene skupiny 1 sú všetky európskymi izolátmi a môžu spôsobovať ochorenie ľudí, aj keď len 1 z 5 kmeňov bol ľudským izolátom. To môže znamenať, že tieto kmene nie sú vysoko virulentné. Kmene skupiny 2 sú jediným najobvyklejším typom OspC skupiny s 10 členmi. Na rozdiel od kmeňov skupiny 1 sú tieto kmene veľmi rozšírené v izolátoch zo Spojených štátov amerických, Európy a Ruska. Kmene skupiny 2 úzko súvisia s ochorením ľudí, pričom 50 % izolátov sú klinickými vzorkami. Zvyšných 8 testovaných izolátov *B. burgdorferi* sú všetko izolátmi zo Spojených štátov amerických a sú veľmi rozmanité, pokiaľ ide o OspC, ktoré exprimujú, pretože každý kmeň exprimuje iný ospC RFLP typ. Iba jeden z týchto kmeňov (kmeň 297, skupina 3) bol izolovaný z prípadu lymskej choroby. Kmene skupiny 2 a 3 patria s výnimkou kmeňa 25015 k jednému z troch hlavných klonov CMAT typu 1.2.4. súvisiacich s ochorením ľudí (obrázok 5).

26 kmeňov *B. afzelii* (t. j. skupina VS461, CMAT skupina 3) patrí do 6 rôznych skupín: OspC skupín 4 až 8 a skupiny 16 s 5, 4, 6, 2, respektíve so 4 členmi. Okrem jedného japonského izolátu boli všetky tieto kmene z Európy: Rakúsko (14), Česká republika (4), Dánsko (1), Nemecko (2), Taliansko (1), Slovinsko (1), Švédsko (1) a Švajčiarsko (1). 28 % európskych izolátov bolo ľudského pôvodu, z toho 80 % izolátov bolo zo vzoriek pokožky a 8 % zo vzoriek krvi. Tieto údaje dokladujú veľkú súvislosť medzi kmeňmi *B. afzelii* a vývojom dermatologických foriem lymskej choroby. Ľudské izoláty boli rovnomerne rozšírené i v rôznych OspC skupinách. Rakúske izoláty patrili predovšetkým k skupinám 4 až 6 (86 %), ale jednotliví predstavitelia boli nájdení tiež v skupinách 7 a 8. Nízky výskyt rakúskych izolátov medzi OspC skupinou 7 (t. j. 1/5) a neprítomnosť izolátov zo skupiny 16 (0/4) ukazuje, že vnútri Európy sú zemepisné variácie s prevládaním rôznych *B. afzelii* OspC skupín, ale kmene *B. afzelii* z OspC skupín 4 až 8 a 16 sú v Európe veľmi rozšírené. Tieto kmene sú takmer výlučne členmi iného klonu súvisiaceho s ochorením človeka, konkrétne 3.2.13 (obrázok 5).

Tridsať kmeňov *B. garinii* (t. j. CMAT skupina 4, vylučujúca atypické kmene 19857 a 19952 a CMAT 2 kmene 20047, IP90 a NBS16) môže byť ďalej rozdelených do 9 OspC skupín a 2 RFLP typov, pre ktoré neexistuje žiadne priradenie do skupín. 53 % testovaných kmeňov *B. garinii* bolo ľudskými izolátmi a tieto kmene boli rozšírené vo všetkých OspC typoch okrem jedného (RFLP 34). 75 (12/16) z týchto kmeňov *B. garinii* bolo izolovaných z prípadov neuroboreliózy, ostatné boli izolátmi z pokožky. *B. garinii* teda primárne súvisí s neuroboreliózou, aj keď sa predpokladá výskyt izolátov z pokožky, pretože poranenie pokožky (EM) je príznakom bežným pre všetky formy lymskej choroby bez ohľadu na príčinné činidlo. Kmene OspC skupiny 13 boli najobvyklejšie izolovanými OspC typmi, 23 % (7/30) bolo *B. garinii* OspC typov a 25 % (4/16) ľudskými izolátmi. Kmene tejto OspC skupiny sú veľmi rozšírené v Európe

a zahrnujú izoláty zo šiestich rôznych krajín. OspC skupina 11 je tiež veľmi rozšírená, vyskytuje sa často (17 % alebo 5/30), ale súvislosť s ochorením ľudí je menej jasná, pretože len jeden izolát bol ľudského pôvodu. To ale môže ukazovať na chybu vo vzorke a na malý počet izolovaných kmeňov. Je to možné tiež aplikovať na kmene OspC skupiny 14 (4 kmene, ale len jeden ľudský izolát). Izoláty z iných OspC skupín (9, 10, 12, 15, 17, 19 a RFLP typy 33 a 34) boli nájdené menej často. Na vakcínu proti rakúskej B. garinii by však mali byť ďalej uvažované OspC skupiny 10 a 19, pretože všetky štyri izoláty B. garinii z Rakúska patria k týmto 2 OspC skupinám.

Okrem priamej analýzy kmeňov *Borrelia*, ako je to uvedené, je možné stanoviť tiež prevládajúce z rôznych OspC variantov a ich súvislosť s ľudskou boreliózou nepriamo. To sa uskutočňuje testovaním špecifickosti OspC protilátok v sére od pacientov s lymskou chorobou. Na protilátky na OspC bolo testovaných 50 sér odoberatých pacientom v oblasti Prahy (Česká republika), z ktorých malo EM (15), ACA (15), neurologické poruchy (10) a príznaky súvisiace s kĺbmi a svalmi (10). Pri testovaní proti panelu 18 kmeňov bolo zistené, že 17 vzoriek sér (34 %) (3 EM, 10 ACA, 3 lymská artritída a 1 neuroborelióza) reaguje s jednou alebo s viacerými zo 16 testovaných OspC skupín (obrázok 16). 12 sér reagovalo špecificky práve s jednou OspC skupinou [skupina 5 (4 x), skupina 7 (3 X), skupina 6 (2 x), skupina 8, 13 a 14 (1 x)]. Tri séra reagovali aj so skupinou 4, aj so skupinou 6, zatiaľ čo 2 ďalšie séra boli široko skrížené reaktívne reagujúce so 6 a 8 z testovaných skupín. V Českej republike sú teda prítomné kmene *Borrelia* exprimujúce OspC varianty z OspC skupín 5 až 17, 13, 14 a možno aj 4. Tieto sérologické údaje sú v súlade a teda podporujú výsledky získané analýzou kmeňov v susednej krajine - v Rakúsku.

Na základe opísaných výsledkov boli pripravené vakcíny na použitie v:

- 1) Spojených štátoch amerických: OspC z OspC skupín 2 a 3,
- 2) Európe: 14 OspC variantov z OspC skupín 2, 4 až 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15 až 17 a 19 a
- 3) Rakúsku: 8 alebo viac OspC z OspC skupín 2, 4 až 7, 10, 13 a 19.

Príklad 8

Expresia rekombinantného OspC v *P. pastoris* Konštrukcia *Pichia pastoris* OspC expresného vektora Rekombinantný *P. pastoris* / *E. coli* vektor pre viac hostiteľov pHIL-A1 (získaný od Phillips Petroleum) bol použitý na klonovanie OspC kódujúcej sekvencie B. burgdorferi. Zvolený bol panel kmeňov obsahujúcich jeden alebo viac predstaviteľov z každej skupiny. OspC gén bol amplifikovaný polymerázovou reťazovou reakciou. Kódujúce sekvencie maturovaného OspC proteínu začínajúce prvou aminokyselinou cysteínom (aminokyselina 19 v sekvencii OspC proteínu z kmeňa Orth) bola amplifikovaná použitím primerov špecifických pre kmeň odvodený od OspC nukleotidových sekvencií, ako je to opísané v USA patentej prihláške 07/903 580 (európsky patent 0 522 560).

Na vytvorenie 5' a 3' konca B. burgdorferi Orth OspC génu bola uskutočnená polymerázová reťazová reakcia (PCR) v podstate tak, ako je to opísané v príklade 4 s použitím aminokoncového primeru PC-F so sekvenciou 5'-AAATGTGTAATAATTCAGGAAAGG-3' a primeru PC-B na karboxylovom konci so sekvenciou 5'-ATTAAGGTTT. TTTGGAGTTTCTG-3'. Podčiarknutá sekvencia v primeri PC-F je identická s translač-

ným štartovacím kodónom maturovaného OspC proteínu a v primeri PC-B s translačným stop kodónom.

Stratégia klonovania (reštrikčné miesto vo vektore a v primeroch použitých na PCR) na vloženie OspC kódujúcej sekvencie B. burgdorferi kmeň B31, PKO, ZS7, KL10 a E61 do pHIL-A1 je súhrnne uvedená v tabuľke I.

Vektor pHIL-A1 sa rozštiepi pôsobením SfuI. Prečnievajúce konce sa doplnia Klenowovou polymerázou za vzniku zarovnaných koncov. Vyčistený PCR fragment obsahujúci sekvenciu kódujúcu OspC sa cez noc liguje s vektorom. Táto ligačná zmes sa použije na transformáciu príslušnej *E. coli* DH5. Na ďalšiu amplifikáciu plazmidu sa vyberú na LB-Amp doskách kolónie rezistentné na ampicilín. Minipreparácia (Maniatis a kol., 1982) sa testujú a analyzujú podľa dĺžky reštrikčného fragmentu. Plazmid, ktorý má OspC gén, sa označí pPC-PP4 (obrázok 17). Pripravi sa vyčistená pPC-PP4 DNA. Sekvencie sa potvrdia sekvenovaním DNA. Vyčistený plazmid pPC-PP4 sa preniesie do *P. pastoris* kmeňa GS115 NR-RL-Y 11430 (Gregg a kol.: Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985)) spôsobom, ktorý opísal Dohmen a kol. (Yeast 7, 691) a na MD doskách sa vyberú transformanty.

kmeň B. burgdorferi	primer	vektor pHIL-A1 rozštiepený
Orth	5'-AAACGATGTTT AAT AAT TCA GGG AAA-3' 5'-GGATTAAAGGTTT TTTTGGTTTCTG-3'	SfuI/Klenow
KL10	5'-GGGACTTCGAAACGA ATG TGTATAAT- TCA-3' 5'-GGTGGG GGA ATT CAT TAA GGT TTT-3' 5'-TTT GGA-3'	SfuI/EcoRI
ZS7	5'-CGGAAAAAACTTCGAAACGA ATG TGTA-3' 5'-TAATTCAGGGAAG GGA AAT CAT TAA-3' 5'-GGT TTT TTT GGA-3'	SfuI/EcoRI
B31	5'-CGGAAAAAACTTCGAAACGA ATG TGTA-3' 5'-TAATTCAGGGAAG GGA AAT CAT TAA-3' 5'-GGT TTT TTT GGA-3'	SfuI/EcoRI
E61	5'-CGGAAAAAAPTTCGAAACGA ATG TGTA-3' 5'-TAATTCAGGGAAG GGA AAT CAT TAA-3' 5'-GGT TTT TTT GGA-3'	SfuI/EcoRI
PKO	5'-CGGAAAAAAAPTTCGAAACGA ATG TGTA-3' 5'-TAATTCAGGGAAG GGA AAT CAT TAA-3' 5'-GGT TTT TTT GGA-3'	SfuI/EcoRI

Tabuľka I uvádza oligonukleotidové primery použité na PCR amplifikáciu kódujúcu sekvenciu maturovaného OspC proteínu rôznych kmeňov *Borrelia* lymskej choroby. Sú uvedené tiež reštrikčné enzýmy použité na vloženie sekvencie kódujúcej OspC do vektora pHIL-A1.

Expresia rekombinantného OspC v *P. pastoris*

Z MD dosiek boli odoberaté *P. pastoris* GS115/pPC-PP4 transformanty a nechali sa rásť v 3 ml MG médiu pri teplote 30 °C za stáleho miešania do optickej hustoty (OD 600) 2 až 10. Na indukciu OspC syntézy sa 1 ml kultúry odstreďuje, premyje sa raz MM, nesuspenduje sa v 3 ml MM alebo v MMY1-médiu a inkubuje sa 2 dni pri 30 °C za stáleho miešania. Expresia OspC sa indukuje prítomnosťou metanolu v rastovom médiu. Podiely kultúry sa odoberajú a lyzáty sa analyzujú Westernovým blotovaním pomocou OspC špecifickej monoklonálnej protilátky BBM 45.

[¹ všetko v nasledujúcich médiách je vyjadrené ako množstvo/l]

MD: kvasinková dusíková báza (YNB, 13,4 g), síran amónny (5 g), biotín (400 mg), glukóza (2 %)

MG: YNB, síran amónny, biotín, glycerol (10 ml/l), fosforečnan draselný (100 mM)

MMY: MM, kvasinkový extrakt (10 g), kazein (20 g)].

Čistenie rekombinantného OspC

P. pastoris GS115/pPC-PP4 bunky boli izolované odstreďovaním (3000 x G, 5 minút, 4 °C). Premyté bunky sa resuspendujú v 150 mM tris/HCl pufri, pH 7,4 a táto suspenzia sa pridá k skleneným perličkám. Bunky sa potom lyzujú vytrepávaním zmesi v bunkovom mlyne Vibrogen(R) (model V14, Bühler). Lyzát sa potom odfiltruje na filtri zo sintrovaného skla, aby sa odstránili sklenené perličky. Lyzát sa odstreďuje 5 minút pri 3000 x G a pri teplote 4 °C. Supernatant sa potom ďalej odstreďuje hodinu pri 100 000 x G a teplote 4 °C. „Supernatant získaný pri vysokej rýchlosti“ sa použije na ďalšie čistenie OspC antigénu.

OspC antigény sa frakcionujú DEAE-chromatografiou, ktorých príklad je uvedený.

kolóna: Proteín-PAK DEAE 5PW od firmy Waters
vzorka: 45 ml dialyzovaného antigénového prostriedku rovnovážny pufr (A): 10 mM tris/HCl, pH 7,5
elučný pufr (B): 10 mM tris/HCl, 1 M NaCl, pH 7,5
prietok: 4 ml/min.

stupeň: 0 % B 70 minút, 0 až 100 % 50 minút.

Kolóna sa ekvilibruje puframi A. Antigény sa eluujú zvyšujúcimi sa množstvami NaCl. Na identifikáciu frakcií, ktoré obsahujú príslušný antigén, sa časti frakcií vyzrážajú acetónom a pelety sa analyzujú SDS-PAGE a/alebo imunoblotovaním. Frakcie z delenia DEAE ionexovou chromatografiou obohatené OspC antigénom sa ďalej čistia afinitnou chromatografiou na imobilizovanom kove, ako je to opísané v európskom patente 0 522 560.

Príprava OspC proteínu vo veľkej mierke vo fermentore

Príprava OspC bola skúmaná v kontinuálnom fermentačnom cykle. Každý cyklus bol uskutočnený s fermentorom opatreným monitormi a kontrolami pre pH, rozpustený kyslík, rýchlosť miešania, teplotu, prietok vzduchu a prietok kyslíka. Teplota bola udržiavaná na 30 °C. Výťažok buniek bol stanovovaný z mokrej hmotnosti premytých buniek.

Očká na fermentačné cykly sa nechali rásť v 2 l Erlenmeyerových bankách obsahujúcich 500 ml modifikovaného FM21 média, ako je to opísané v európskom patente 0 263 311. Fermentačné kultúry vyrastené po dávkach boli množené s glycerolom, ako jediným zdrojom uhlíka a energie. Kontinuálne kultúry mali stály prívod glycerolu, pokiaľ koncentrácia biomasy nedosiahla 500 až 700 g hmotnosti vlhkých buniek na liter. Sotva sa odoberú kontrolné vzorky, do kultúry sa pridáva metanol ako napájanie zmesou metanol-soli-biotín počas niekoľkých dní tak, aby sa koncentrácia metanolu udržiavala medzi 0,05 a 1,5 % hmotn. Produkovaná biomota sa každý deň odstraňuje. P. pastoris bunky sa izolujú odstreďovaním a resuspendujú sa v pufrí (150 mM tris/HCl, 3 mM EDTA, 1 mM hydrochlorid bezamidínu, 0,01 % hmotn. NaN₃, pH 7,4). Na francúzskom lise sa získajú bunkové lyzáty. Koncentrácia OspC proteínu bola stanovená spôsobom podľa Bradforda. Predbežné výsledky ukázali, že došlo k asi 100-násobne zvýšenému výťažku OspC antigénu (na objemovú jednotku kultúry) v P. pastoris v porovnaní s výťažkami získanými v kmeňoch B. burgdorferi.

Štúdie imunizácie a stimulácie (ochrany) OspC antigénu odvodeného od P. pastoris

Štúdie ochrany boli uskutočňované na gerbilách, ako je to opísané v príklade 5. Na ochrannú účinnosť bola testovaná 25 mg množstva OspC z P. pastoris (klonovaný z kmeňa Orth) alebo Borrelia kmeňa Orth, ako to ukazuje

obrázok 18. Všetky gerbily imunizované OspC odvodeným od P. pastoris boli chránené proti homológemu kmeňu Orth. Výsledky sú porovnateľné so štúdiami ochrany získanými s OspC antigénom odvodeným od Borrelia.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Imunogénny prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov Borrelia lymskej choroby v podstate vyčistených z každej z 20 bežne rozlišovaných OspC skupín na obrázku 11, alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

2. Imunogénny prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) dva alebo viac OspC antigénov Borrelia lymskej choroby z 20 bežne rozlišovaných OspC skupín na obrázku 11, alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

3. Imunogénny prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov Borrelia lymskej choroby v podstate vyčistených z každej z OspC skupiny na obrázku 19 exprimovanej jedným alebo viacerými klonmi a klonovými klastami súvisiacimi s ochorením ľudí (HDA), alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému ospC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

4. Imunogénny prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) dva alebo viac OspC antigénov Borrelia lymskej choroby z OspC skupín na obrázku 19 exprimovaných jedným alebo viacerými klonmi alebo klonovými klastami súvisiacimi s ochorením ľudí (HDA), alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

5. Imunogénny prostriedok podľa nároku 1 alebo 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že je určený na ochranu proti kmeňom *B. burgdorferi* prevládajúcich v príslušnej zemepisnej oblasti.

6. Imunogénny prostriedok podľa nároku 7 na použitie v Severnej Amerike, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov *Borrelia* lymskej choroby v podstate vyčistených z každej z OspC skupiny 2 a 3, alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou chorobou.

7. Imunogénny prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že tento materiál ďalej obsahuje OspA antigén z *B. burgdorferi* B31.

8. Imunogénny prostriedok podľa nároku 5 na použitie v Európe, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov *Borrelia* lymskej choroby v podstate vyčistených z každej OspC skupiny 2, 4 až 7, 9, 10, 12 až 17 a 19, alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

9. Imunogénny prostriedok podľa nároku 7 na použitie v Rakúsku, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje:

a) také množstvo materiálu obsahujúceho i) jeden alebo viac OspC antigénov *Borrelia* lymskej choroby v podstate vyčistených z každej OspC skupiny 2, 4 až 7, 9, 10, 12 až 17 a 19, alebo ii) OspC varianty alebo OspC mimetiká uvedených OspC antigénov, pričom tieto OspC varianty alebo OspC mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému OspC, aby indukovali ochrannú imunitu, a
b) fyziologicky prijateľný nosič, ktorý je dostatočný na vyvolanie, u cicavcov, ktorí sú citliví na lymskú boreliózu, imunitnej odpovede, ktorá ich chráni pred lymskou boreliózou.

10. Imunogénny prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 alebo 9, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že tento materiál obsahuje antigény z OspA antigénov z *Borrelia* kmeňov B31, Orth, H4 a KL10.

11. Imunogénny prostriedok podľa nároku 1 alebo 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že tento materiál obsahuje antigény zo skupiny i) alebo ii), ktoré sú vyčistené z celých buniek *Borrelia* lymskej choroby.

12. Imunogénny prostriedok podľa nároku 1 alebo 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že tento materiál obsahuje antigény zo skupiny i) alebo ii), ktoré sú produkované rekombinantnými technikami v eukaryotickom hostiteľovi a sú vyčistené.

13. Imunogénny prostriedok podľa nároku 12, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že hostiteľom je kvasinka.

14. Imunogénny prostriedok podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že hostiteľom je *P. pastoris*.

15. Imunogénny prostriedok podľa nároku 1 alebo 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že antigény obsahujú jeden alebo viac epitopov so sekvenciou aminokyselín, ktorá je vybratá zo skupiny pozostávajúcej z:

1. VKLSSEVASLSKAA,
2. TDNDSKEAILKTNGT,
3. KELTSPWAETPKKP,
4. FVLAVKEVETL,
5. YAISTLITEKLKAL,
6. PNLTEISKKITDSNA,
7. ASANSVKELTSPW,
8. SPWAETPKKP,
9. GKIKQNNGLGA a
10. SPWAESPCK,

alebo varianty alebo mimetiká týchto epitopov, pričom tieto varianty alebo mimetiká majú takú štruktúru, ktorá je dostatočne podobná prírodnému epitopu, aby indukovali ochrannú imunitu.

16. Imunogénny prostriedok podľa nároku 15, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje každý z epitopov 1) až 10).

17. Imunogénny prostriedok podľa nároku 15 alebo 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ďalej obsahuje pomocné činidlo.

18. Imunogénny prostriedok podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pomocným činidlom je hydroxid hlinitý.

19. Imunogénny prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ochranným množstvom je množstvo od 1 do 100 g na antigén na dávku.

20. Imunogénny prostriedok podľa nároku 19, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ochranným množstvom je množstvo od 10 do 50 g na antigén na dávku.

21. Imunogénny prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že cicavcom je človek.

22. Imunogénny prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 25, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ochranným množstvom je také množstvo, ktoré je preventívne pre lymskú boreliózu alebo ktoré zlepšuje lymskú boreliózu.

23. Sekvencia rekombinantnej DNA, ktorá obsahuje sekvenciu nukleotidov ktorejkoľvek sekvencie OspC génu z kmeňov 28691, 25015, SZ7, 297, SIMON, E61, ACA1, H9, J1, VS461, M57, W, VSDA, NBS23a, 20047, KL10, IP90, NBS1AB, KL11 a H13 podľa obrázku 8a.

24. Sekvencia rekombinantnej DNA kódujúca OspC antigény kmeňov 28691, 25015, SZ7, 297, SIMON, E61, ACA1, H9, J1, VS461, M57, W, VSDA, NBS23a, 20047, KL10, IP90, NBS1AB, BITS, KL11 a H13 podľa obrázku 9a.

25. Sekvencia rekombinantnej DNA podľa nároku 23, pričom táto DNA sekvencia je aspoň z 80 % homologná s ktoroukoľvek sekvenciou OspC génu podľa obrázku 8a.

26. Rekombinantný expresný vektor obsahujúci sekvenciu kódujúcu OspC antigén ktoréhokoľvek z 20 bežne rozlišujúcich OspC skupín podľa obrázku 11.

27. Rekombinantný expresný vektor podľa nároku 26, ktorý obsahuje sekvenciu rekombinantnej DNA podľa nárokov 23 až 25.

28. Expresný vektor podľa nároku 26 alebo 27, ktorý znamená vektor pre viac hostiteľov pre eurokaryotické/prokaryotické bunky hostiteľa.

29. Expresný vektor podľa nároku 28, ktorý sa replikuje v kvasinkách, výhodne v *P. pastoris* a v *E. coli*.

30. Expresný vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 29, pričom expresia *OspC* génu je transkripčne kontrolovaná indukovateľným promótorom.

31. Expresný vektor podľa nároku 30, pričom expresia sekvencie kódujúcej *OspC* je indukovateľná metanolom.

32. Hostiteľská bunka, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že je transformovaná expresným vektorom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 31.

33. *OspC* antigén, ktorý
i) je kódovaný ktoroukoľvek sekvenciou podľa nárokov 23 až 25, alebo
ii) má aspoň 80 % homológie.

34. Použitie kombinácie antigénov, ktoré sú obsiahnuté v imunogénnom prostriedku podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 33 na výrobu vakcíny na liečenie alebo predchádzanie lymskej boreliózy u cicavca.

35. Použitie kombinácie antigénov podľa nároku 34, pričom efektívnym množstvom je od 1 do 100 g na antigén na dávku.

36. Použitie antigénov podľa nároku 35, pričom efektívnym množstvom je od 1 do 50 g na antigén na dávku.

54 výkresov

Kmene *Borrelia* použité v tejto štúdiu

kmeň	krajina	človek	kliešť	zvíra	odkaz na darcu
König	Rakúsko		I. ricinus		I. Livey
Orth	Rakúsko		I. ricinus		I. Livey
HB1	Rakúsko	krv (myozitída)			E. Aberer
W	Rakúsko	CSF			G. Stanek
H1	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H10	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H11	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H13	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H15	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H2	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H5	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H6	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H8	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H9	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
Simon	Rakúsko	pokožka			E. Aberer
H12	Rakúsko	pokožka (ACA)			E. Aberer
H14	Rakúsko	pokožka (ACA)			E. Aberer
H7	Rakúsko	pokožka (ACA)			E. Aberer
H4	Rakúsko	pokožka (EM)			E. Aberer
KL10	Česká rep.		I. ricinus		J. Jirous
KL11	Česká rep.		I. ricinus		J. Jirous
KL5	Česká rep.		I. ricinus		J. Jirous
KL6	Česká rep.		I. ricinus		J. Hercogová
KC10	Česká rep.	krv (kardiak)			J. Hercogová
C78	Česká rep.	krv (NB)			J. Hercogová
M57	Česká rep.	CSF			J. Hercogová
E180	Česká rep.	pokožka (EM)			J. Hercogová
E51	Česká rep.	pokožka (EM)			J. Hercogová
E61	Česká rep.	pokožka (EM)			J. Jirous

Obr. 1

Kmene *Borrelia* použité v tejto štúdii (pokračovanie)

kmeň	krajina	človek	kliešť	zvíra	odkaz na darcu
DK6	Dánsko	CSF		Theisen a kol.: J. Clin. Microbiol. <u>31</u> , 2570 (1993)	
DK7	Dánsko	pokožka (ACA)		Theisen a kol.: J. Clin. Microbiol. <u>31</u> , 2570 (1993)	
DK26	Dánsko	pokožka (EM)		Theisen a kol.: J. Clin. Microbiol. <u>31</u> , 2570 (1993)	
153	Francúzsko		<i>I. ricinus</i>		G. Baranton
20047	Francúzsko		<i>I. ricinus</i>		G. Baranton
IPI	Francúzsko	CSF			G. Baranton
IP2	Francúzsko	CSF			G. Baranton
ZS7	Nemecko		<i>I. ricinus</i>		DMS (5527)
PBI	Nemecko	CSF		Jauris-Heipke a kol.: Med. Microbiol. Imunol. <u>182</u> , 37 (1993)	
P1H	Nemecko	pokožka (ACA)			V. Preac-Mursic
PKO	Nemecko	pokožka (AM)			J. Jirous
MK5	Maďarsko		<i>I. ricinus</i>		A. Lakos
MK6	Maďarsko		<i>I. ricinus</i>		A. Lakos
BITS	Taliansko		<i>I. ricinus</i>		M. Cinco
Gaultier	Taliansko	pokožka (EM)			M. Cinco
J1	Japonsko		<i>I. persulcatus</i>		G. Baranton
Litva	Litva		<i>I. ricinus</i>		J. Bunikis
IP21	Rusko		<i>I. persulcatus</i>		E.L. Kornberg
IP90	Rusko		<i>I. persulcatus</i>		S. Bergstrom
IR210	Rusko		<i>I. ricinus</i>		E.L. Kornberg
JSB	Slovinsko	pokožka			E. Ruzic
871104	Švédsko	CSF			J. Jirous
NBS16	Švédsko	Neuroborrelios			S. Bergstrom
NBS1ab	Švédsko	Neuroborrelios			S. Bergstrom
NBS23a	Švédsko	Neuroborrelios			S. Bergstrom
NBS23b	Švédsko	Neuroborrelios			S. bergstrom

Obr. 1 (pokračovanie)

Kmene *Borrelia* použité v tejto štúdii (dokončenie)

kmeň	krajina	človek	kliešť	zvíra	odkaz na darcu
ACA1	Švédsko	pokožka (ACA)			S. Bergstrom
IRS	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		ATCC (35211)
VS102	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		O. Peter
VS116	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		O. Peter
VS185	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		O. Peter
VS215	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		O. Peter
VS219	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		O. Peter
VS461	Švajčiarsko		<i>I. ricinus</i>		G. Baranton
VSBM	Švajčiarsko	CSF			O. Peter
VSBP	Švajčiarsko	CSF			O. Peter
VSDA	Švajčiarsko	CSF			O. Peter
26815	USA		deňka		J.F. Anderson
19857	USA		králik		J.F. Anderson
26816	USA		hraboš		J.F. Anderson
21347	USA		myš/biele tlapky		J.F. Anderson
2591	USA		myš/biele tlapky		Padula a kol.: Infect. Immun. <u>61</u> , 5097 (1993)
25015	USA		<i>I. dammini</i>		J.F. Anderson
27579	USA		<i>I. dammini</i>		J.F. Anderson
27985	USA		<i>I. dammini</i>		J.F. Anderson
28354	USA		<i>I. dammini</i>		J.F. Anderson
28691	USA		<i>I. dammini</i>		J.F. Anderson
B31	USA		<i>I. dammini</i>		ATCC (35210)
19952	USA		<i>I. dentatus</i>		J.F. Anderson
Son 188	USA		<i>I. pacificus</i>		J. Jirous
HB4	USA	krv			J. Jirous
297	USA	CSF			J. Jirous

Obr. 1 (dokončenie)

Adresy dodávateľov kmeňov

Dr. G. Stanek: Viedenská univerzita, Ústav hygieny, Kinderspital Gasse 15, 1095 Viedeň, rakúsko

J. Bunikis, Vilnius University, Lab. of Zosmoses, P.O. Box 472, 232007 Vilnius 7, Lithmgmiam, USA

ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776

Dr. G. Baranton, Pasteur Institute, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Ced 15 Paris, Francúzsko

Dr. J. Jirous, Ústav hygieny a epidemiologie, SvobaroVa 48, 100 42 Praha 10, Česká republika

Doc. S. Bergström, University of Umeå, Mikrobiologické oddelení, 901 87 Umea, Švédsko

Dr. M. Cinco, University of Trieste, Mikrobiologický ústav, Via Flemin 22, Trieste, Taliansko

Dr. J. F. Anderson, Danderyd Hospital, Oddelenie infekčných chorôb, 182 88 Dandery, Švédsko

Dr. V. Preac-Mursic, Pettenkofer Institute, Pettenkoferstr. 9a, 8000 München, Spolková republika Nemecko

Dr. E. Aberer, II. oddelenie dermatológie, Alserstrasse 4, 1090 Viedeň, Rakúsko

Prof. G. Stierstedt, danderyd Hospital, Oddelenie infekčných chorôb, 182 88 Dandery, Švédsko

Dr. J. Hercogová, dermatovenerologická klinika, Karlova univerzita, Bodimova 2, 180 81 Praha 8, Česká republika

Dr. R. Ruzic, Mikrobiologický ústav, Zaleska 4, 61105 Ljubljana, Slovinsko

Prof. E. Korenberg, The Gamaleya Institute, Vector Laboratory, Gemeleya Strasse 18, 123098 Moskva, Rusko

Dr. A. Lakos, Central Hospital, Infect. Dis. P.O.Box 29, 1450 Budapešť, Maďarsko

Dr. O. Peter, Institut Central des Hospitaux Val, 1950 Sion, Švajčiarsko

Obr. 2

BBM série monoklonálnych protilátok použitých v CMAT analýze

BBM monoklonálna protilátka	antigénová špecifita	mol. hmotn. homológneho antigénu	homológny kmeň	izotyp
BBM 33	E 90	90,5	W/B31	IgG1
BBM 26	E 60	60,4	W/B31	IgG1
BBM 20	E 60	60,4	W/B31	IgG1
BBM 21	E 59	58,7	W/B31	IgG1
BBM 14	F 1a	42,2	W	IgG1
BBM 17	E 43	43,1	W	IgG1
BBM 16	E 43	43,1	W	IgG1
BBM 1	E 29	29	B31	IgG1
BBM 12	E 22	22	B31	IgG1
BBM 10	E 20	20	B31	IGG1
BBM 32	E 18	18	W/B31	IgG1
BBM 11	E 10	< 15,0	B31	IgG3

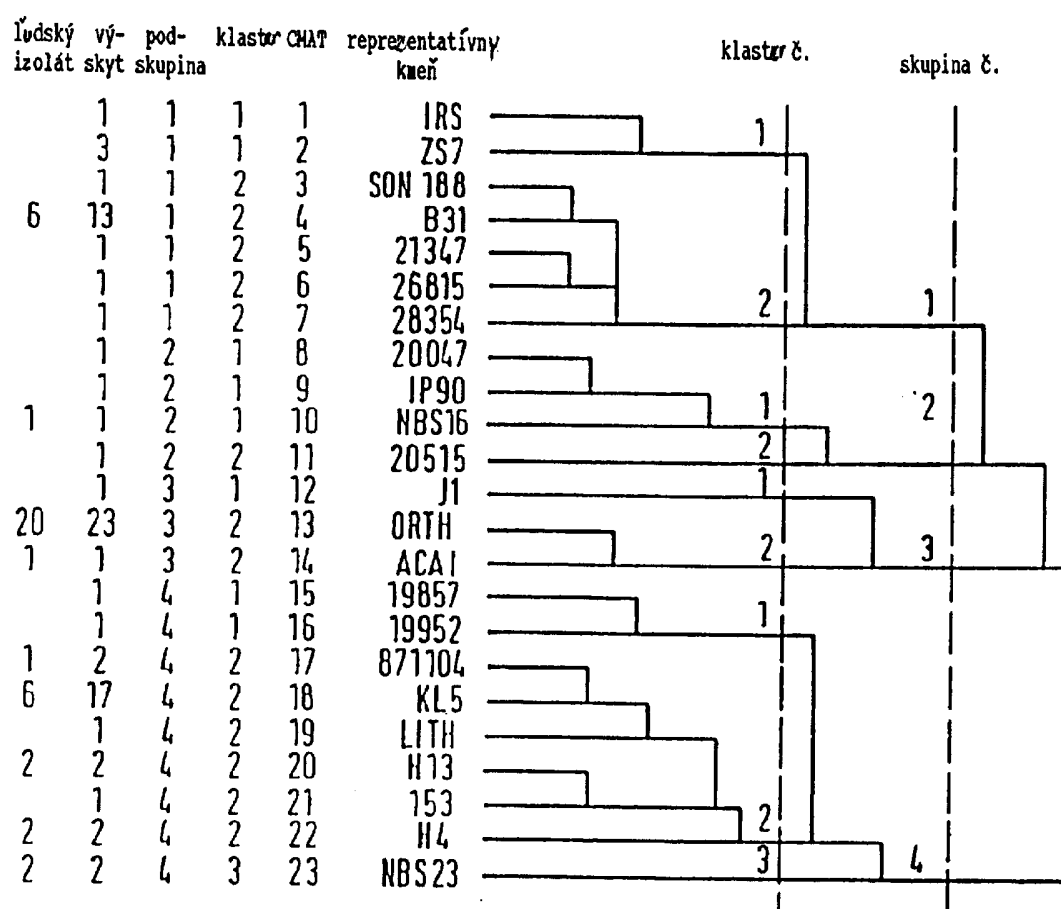
Obr. 3

Bežné výsledky antigénov použitých v klastrovej analýze

CMAT	kmeň	E 90	E 60	E 50	E 41	E 43	E 29	E 19	E 17+E1	E 10	podsk. klastro	CMAT
1	IRS		3	2		2		2	2		1	1
2	ZS7	2	3	2	1	3	1	2	2	2	1	2
3	SON 188		3	3	1	4	2	1	2	2	1	3
4	B31	2	3	3	1	4	2	2	2	2	1	4
5	21347	2	3	3	1	4	1	2	2	2	1	5
6	26815	2	3	3	1	4	1	1	2	2	1	6
7	28354	2	3	3	1	4	3	2	2	2	1	7
8	20047	2	5	4	1	4		1	1		2	8
9	IP90	2	5	4	1	4		2	1		2	9
10	NBS16	2	6	4	1	4		4	1		2	10
11	20515	1	1	4	1	4	4	1			2	11
12	J1	1	2	2	1	1		1			3	12
13	ORTH	3	2	1	1	5		1			3	13
14	ACA1	3	2	1	1	4		1			3	14
15	19857	1			1	6		4		2	4	15
16	19952	1		4	1	6		3		2	4	16
17	871104	4	5	3	1	6		4	1		4	17
18	KL5	5	5	3	1	6		4	1		4	18
19	LITH	5	5	5	1	6		4	1		4	19
20	H13	4	6	5	1	6		4	1		4	20
21	153	5	6	5	1	6		4	1		4	21
22	H4	6	2	1	1	6		4	1		4	22
23	NBS23	4	5	1	1	6		1			4	23

Obr. 4

Populačná štruktúra ochorenia lymskou boreliózou



Obr. 5

Obr. 6

Reakčné schéma OSpC Serovac monoklonálne protilátky

Serovar	BBM22	BBM24	BBM35	BBM36	BBM39	BBM40	BBM41	BBM43	BBM44	BBM46	BBM47	BBM49	BBM77	typ kmeňa
1			+/-			+					+			VS215
2						+/-		+						B31
3								+			+			H5
4	+		+	+	+	+								ORTH
5								+						H2
6	+		+	+		+		+			+			H15
7				+				+	+					PKO
8	+		+			+		+		+	+			E61
9	+							+			+			Simon
10	+					+				+	+		+	M57
11	+										+			W
12		+				+					+			KL10
13							+		+	+				NBS1ab
14									+					20047
15											+			NBS23a
16				+				+	+		+			VS461

+ silná reakcia
 +/- niekedy slabá reakcia

Polymorfia dĺžky restriktčných fragmentov(RFLP) medziOspC gémi

RFLP typ	typ kmeňa	neštiepenie	Dpn11	Dde1	Dra1
1	ZS7	639	103, 189, 347	258, 381	120, 159, 360
2	B31	636	148, 204, 284	255, 381	156, 480
3	25015	639	287, 352	045, 141, 453	104, 535
4	297	636	010, 149, 206, 271	120, 135, 381	156, 480
5	H9	642	284, 358	255, 387	052, 104, 486
6	J1	639	284, 355	639	052, 104, 483
7	ORTH	642	287, 355	120, 135, 387	642
8	ACA1	639	206, 433	032, 223, 348	052, 104, 483
9	JSB	642	027, 149, 175, 287	165, 222, 255	040, 116, 213, 273
10	E61	639	287, 352	255, 384	156, 483
11	Simon	642	149, 206, 287	089, 553	156, 486
12	M57	633	089, 176, 179, 189	253, 378	154, 222, 255
13	W	636	065, 086, 117, 179, 189	636	156, 480
14	KL10	639	122, 235, 282	114, 261, 264	155, 484
15	NBS1ab	639	235, 404	114, 120, 141, 264	156, 483
16	IP90	639	115, 120, 404	114, 120, 141, 264	156, 483
17	BITS	639	101, 115, 120, 303	639	052, 104, 483
18	PBI	627	627	027, 228, 372	052, 104, 471
19	KL11	627	115, 512	005, 027, 223, 372	156, 471
20	20047	633	189, 444	261, 372	025, 104, 477
21	NBS23a	639	215, 424	162, 213, 262	154, 483
22	VS461	633	149, 206, 278	135, 498	104, 529
23	VSDA	630	119, 160, 355	255, 375	052, 104, 474
24	2591	642	281, 361	219, 423	156, 228, 258
25	H13	627	189, 438	024, 213, 390	156, 471
26	Son188	642	110, 240, 290	205, 437	152, 490
27	28691	633	633	255, 378	052, 104, 477
28	21347	633	290, 343	108, 132, 393	145, 488
29	26815	642	642	083, 559	095, 547
30	28354	642	642	245, 397	095, 547
31	19857	639	281, 358	275, 382	298, 341
32	19952	639	67, 197, 375	260, 373	639
33	NBS16	633	090, 195, 348	240, 393	150, 483
34	153	642	267, 375	120, 120, 402	160, 482
35	VS116	633	155, 200, 278	633	633

Obr. 7

2591 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAAT---ACATCTGCAAATTCCTGCTGA
 B31 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAAT---ACATCTGCAAATTCCTGCTGA
 25015 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAACGCTGCATCTACTAATCCTGCTGA
 ZS7 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAAT---ACATCTGCAAATTCCTGCTGA
 297 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAAT---ACATCTGCAAATTCCTGCTGA
 SIMON TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCACATCTACTAATCCTGCTGA
 E61 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCACATCTACTAATCCTGCTGA
 ORTH TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCGCACTACTAATCCTGCTGA
 ACA1 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCGCACTACTAATCCTGCTGA
 H9 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCGCACTACTAATCCTGCTGA
 J1 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCGCACTACTAATCCTGCTGA
 JSB TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCGCACTACTAATCCTGCTGA
 VS461 TGTAAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATTCGCACTACTAATCCTG---A
 M57 TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACCGCATCTACTAATCCTG---A
 W TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACGTCATCTACTAATCCTG---A
 VSDA TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACGTCATCTACTAATCCTG---A
 NBS23a TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACGTCATCTACTAATCCTG---A
 20047 TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACGTCATCTACTAATCCTG---A
 KL10 TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACCGCATCTACTAATCCTG---A
 IP90 TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATAGTCATCTACTAATCCTG---A
 NBS1AB TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACGTCATCTACTAATCCTG---A
 BITS TGTAAATAATTCAGG-----TGGAGATTCTGCATCTACTAATCCTG---A
 KL11 TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATACGTCATCTACTAATCCTG---A
 PBI TGTAAATAATTCAGG-----TGGGGATTCTGCATCTACTAATCCTG---A
 ***** * * * * *

2591	AATCTAACGCAGTTGTTCTCGCCGTGAAAGAGTTGAAACTCTGCTTGCA
B31	ATTCTAATGCGGTTTACTTGCTGTGAAAGAGGTTGAAGCGTTGCTGTCA
25015	ATTCTAATACGGTTGTGCTAGCTGTAAAGAAAGTTGAAGCTTTGCTTACA
257	ATTCTAATGCGGTTTACTTGCTGTGAAAGAGGTTGAAGCGTTGCTGTCA
297	AATCTAACGCAGTTGTTCTCGCCGTGAAAGAGTTGAAACTTTTGCTTACA
SIMON	ATTCTAATGCATTTGTACTTGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTGCA
E61	ATTCTAATGCATTTGTACTTGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTGCA
ORTH	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTTCA
ACA1	ATTCTAATGCATTTGTACTTGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTTCA
H9	ATTCTAATGCATTTGTACTTGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTTCA
J1	ATTCTAATGCATTTGTACTTGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTTCT
JSB	ATTCTAATGCATTTGTACTTGCTGTAAAGAAAGTTGAGACTTTGGTTTCA
VS461	ATTCTAATGCAGTTGTACTAGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
M57	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGATCTCA
W	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGATCTCA
VSDA	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
NBS23a	ATTCTAATGCATTTGTACTCGCCGTTAAAGAAAGTTGAGGCTTTGATTTCA
20047	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGATCTCA
KL10	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
IP90	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
NBS1AB	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
BITS	ATTCTAATGCAGTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
KL11	ATTCTAATGCAGTTGTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
PBI	ATTCTAATGCATTTTACTGGCTGTGAAAGAAAGTTGAGGCTTTGCTTCA
	* * * * *

Obr. 8 (strana 1) (pokračovanie)

31

2591 TCTATAGATGAAGTTGCTAAGAAAGCTATTGGGAAATTGTAGCCCCAAA
 B31 TCTATAGATGAAATTGCTGCTAAAGCTATTGGTAAAAAATACACCAAAA
 25015 TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAAGCTATTGGTAAAAAATACACCAAAA
 ZS7 TCTATAGATGAGCTTGCTA--AAGCTATTGGTAAAAAATAAAAACGA
 297 TCTATAGATGAGCTTGCTA--AAGCTATTGGTAAAAAATAAAAACGA
 SIMON TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAAGCTATTGGTAAAAAATAAAAATGA
 E61 TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAAGCTATTGGTAAAAAATAAAAATGA
 ORTH TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAAGCTATTGGTAAAAAATACAACAAA
 ACA1 TCTATAGATGAACCTTGCCAAATAAAGCTATTGGTAAAAAATACAACAAA
 H9 TCTATAGATGAACCTTGCTGCTCAAGCTATTGGTAAAAAATACAA--AA
 J1 TCTATAGATGAACCTTGCTAATAAAGCTATTGGTCAAAAATACAA--AA
 JSB TCTATAGATGAACCTTGCTAAGAAAGCTATTGGTCAAAAATAGACAATAA
 VS461 TCTATAGATGAACCTTGCTA--AAACTATTGGTAAAAAATAGAGGCAAA
 M57 TCTATAGATGAACCTTGCTAATAAAGCTATTGGTAAAGTAATACATCAAAA
 W TCTATAGATGAACCTTGCTAATAAAGCTATTGGTAAAAAATAAATCAAAA
 VSDA TCTGTAGATGAACCTTGCCA--AAGCTATTGGTAAAAAGATACATCAAAA
 NBS23a TCTGTAGATGAACCTTGCTA--AGGCTATTGGTAAAAAATAGATAACAA
 20047 TCTATAGATGAACCTTGCTA--AAGCTATTGGTCAAAAGAAATACACCAAAA
 KL10 TCTATAGATGAACCTTGCTA--AAGGTAATTGGTAAAAAATAGATCAAAA
 IP90 TCTATAGATGAACCTTGCTA--AAGCTATTGGTCAAAAATAGATCAAAA
 NBS1AB TCTATAGATGAACCTTGCTA--AAGCTATTGGTCAAAAATAGATCAAAA
 BITS TCTATAGATGAACCTTGCTA--AAGCTATTGGTCAAAAATAGATCGAAA
 KL11 TCTATAGATGAACCTTCTA--AAGCTATTGGTAAAAAATAAGAAATGA
 PBI TCTATAGATGAACCTTCTA--AAGCTATTGGTAAAAAATAAAAAATGA
 *** ***** ** * ***** * *** *

Obr. 8 (strana 2)

2591 T---GGTTTAAATGCCGGTGC---TAATCAAAACGGATCATTTGTTAGCGG
 B31 TAATGGTTTGGATACCGAAA---TAATCACAATGGATCATTTGTTAGCGG
 25015 TAATGGTTTGGATACCGAAA---TAATCACAATGGATCATTTGTTAGCGG
 ZS7 TGGTAGTTTAGGTGATGAAGC---AAATCACAACGAGTCATTTGTTAGCAG
 297 TGTTAGTTTAGATAATGAGGC---AGATCACAACGGATCATTTAATATCAG
 SIMON TGGCACCTTAGAGAACGAAGC---AAATCACAACGGATCATTTGTTAGCGG
 E61 TGGCACCTTTAGATAACGAAGC---AAATCACAACGGATCATTTGTTAGCAG
 ORTH TAATGGTTTAGGGCCCAATGC---GGATAAAACGGATCATTTGTTAGCAG
 ACA1 T---GGTTTAGGGCCGAAGC---GAATCGCAACGAATCATTTGTTAGCAG
 H9 CAATGGTTTGACTGCCGAACA---GAATCAAAACGGATCATTTGTTGGCCG
 J1 CAATGGTTTGAGTGCCGAACA---GAATCAAAACGGATCATTTATTAGCAG
 JSB TAATGGTTTAGCTGCTTTAA---TAATCAGAATGGATCGTTGTTAGCAG
 VS461 ---TGTTTGGGTAACGAAGC---GGATAAAACGGATCATTTATTAGCAG
 M57 TAATGGTTTAAATGCTAATGC---GGGTCAAAACGGATCATTTGTTAGCAG
 W T---GGTTTAGATGCTGATGC---TAATCACAACGGATCATTTGTTAGCAG
 VSDA TAATGGTTTAGATACTCTGTC---AAATCAAAACGGATCATTTGTTAGCAG
 NBS23a TACTGGTTTAAGTGCTAATCA---GAATCATAACACTTCATTTGTTAGCAG
 20047 T---GGTTTAGTTGCTGATGC---GGGTCAACACAGCGCATTTGTTAGCAG
 KL10 TAGTGGTTTAGCTGCTGCTACTCAGAAATAAAACACCTCGTTGTTAGCAG
 IP90 TAATGGTTTAGCTGCTGCTACTCAGGATAAAACACCTCATTTGTTAGCAG
 NBS1AB TAATGGTTTAGCTGCTGCTACTCAGGATAAAACACCTCATTTGTTAGCAG
 BITS TAATGGTTTAGCTGCTGGAAGC---GAATTTTAAACACCTCATTTGTTAGCAG
 KL11 TGGTACTTTAGATAACGAAGC---AAATCGAAACGAATCATTTGATAGCAG
 PBI TGGTACTTTAGATAACGAAGC---AAATCGAAACGAATCATTTGATAGCAG

Obr. 8 (strana 2) (pokračovanie)

2591 GAGCCTACGTAATATCAACCCCTAATAGCAGAAAAAATTAGATGGATTGA--
 B31 GAGCTTATGCAATATCAACCCCTAATAAACACAAAAAATTAGATGGATTGA--
 25015 GGGCCTATGCAATATCAACGCTAATAACACAAAAAGTTAGGTGGATTGA--
 ZS7 GAGCTTATACAAATATCAACCTTAAATAACACAAAAAATTAAAGTAAATTAA--
 297 GAGCATATTTAATTTCAACATTAATAACAAAAAAATAAGTGCAATAA--
 SIMON GAGCTTATGCAATATCAAAATCTAATAAAACAAAAAATTAGATGGATTGA--
 E61 GAGCCTATGCAATATCAACTCTAATAACACAAAAAATTAAAGTGTATTGA--
 ORTH GAGCTTATGCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTAAAGGCATTGA--
 ACA1 GAGTTTCATGAAATATCAACACTAATAACAGAAAAAATTAAAGTAAATTGA--
 H9 GAGCCTATGCAATATCAGCCCTAATAACAAAAAAATTAGATGAATTGACC
 J1 GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAAAACAAAAAATTAGATGGATTAA--
 JSB GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTGAGTAAATTGA--
 VS461 GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAAAACAAAAAATTAGATGGATTGA--
 M57 GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTAAAGTAAATTGA--
 W GAGCCCATGCAATATCAACTCTAATAAAACAAAAAACAGATGGATTGA--
 VSDA GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAACAAAAAATTAGATGGATTGA--
 NBS23a GAGCCTATTCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTAAAGTAAATTAA--
 20047 GAGCCCATGAAATATCAATCCTAATAACACAAAAAATTAGATGGATTAA--
 KL10 GAGCCTATGCAGTATCAGCTCTAATAAAACAAAAAATTAGATGGATTGC--
 IP90 GAGCCTATGCAATATCAGCCCTAATAAAACAAAAAATTAGATGGATTGC--
 NBS1AB GAGCCTATGCAATATCAGCTCTAATAAAACAAAAAATTAGATGGATTGC--
 BITS GAGCCTATACAAATATCAACCCCTAATAACAAAAAATTAGATGAATTGATC
 KL11 GAGCTTATGAAATATCAAAACTAATAACACAAAAAATTAAAGTGTATTGA--
 PBI GAGCTTATGAAATATCAAAACTAATAACACAAAAAATTAAAGTGTATTGA--
 *

Obr. 8 (strana 2) (pokračovanie)

2591	-AAAATTCAGAAGAAATTAAGGAAAAAATTGAAGATGCTAAAAAATGTAA
B31	-AAAAT--GAAGGATTAAAGGAAAAAATTGATCGGCTAAGAAATGTTC
25015	-AAAAT--GAAGAAATTAAGGAAAAAGATTGCCGAGTCAAGAAATGTTC
2S7	-ACGGATCAGAAGGTTTAAAGGAAAAAGATTGCCGAGCTAAGAAATGCTC
297	-AAGATTCAGGAGAAATTGAAGGCAGAAATTGAAGGCTAAGAAATGTTC
SIMON	-AAGGTTTAGAAGGATTAAATAAGGAAATTGCGGAGGCCAAGAACTGTTC
E61	----ATTCAGAAGAAATTAAGGCAGAAATTGTAAAGGCTAAGAAATGTTC
ORTH	-AAAATTCAGGAGAAATTAAGGCCAAAAATTGAAGATGCTAAGAAATGTTC
ACA1	-AAAATTCAGGAGAAATTAAGGCCAAAAATTGAAGATGCTAAGAAATGTTC
H9	AAAAATTCAGGAGAAATTAAGGAGAAAGTTGAAAAAGCTAAGAAATGTTC
J1	-AAGGTCTAGAAGGATTAAATAAAGAAATTACAGAGGCCAAAAAATGTTC
JSB	-AAAATTTAGAAGAAATTAAGACAGAAATTGCCAAGGCTAAGAAATGTTC
VS461	-AAGGTCTAGAAGGATTAAATAAAGAAATTGCGGAGGCCAAGAAATGTTC
M57	-AAAATTCAGAAGAGTTAAATAAAGAAATTGAAGAGGCTAAGAAACCATTC
W	-AAGATCTAGAAGGGTTAAGTAAGAAATTGCCAAGGTGAAGGAATGTTC
VSDA	-AAGGTTTCAGAAGGATTAAAGCAGAAATTGCCAGAAAGCTAAGAAATGTTC
NBS23a	-AAAATTTAGAAGGGTTAAAGCAGAGATTGCAGAAAGCTAAGAAATGTTC
20047	-AAGGTTTAGAAGGATTAAAGCAGAGATTGCAGAAAGCTAAGAAATATTC
KL10	-AAGGTCCAGAAGGGTTAAATAAAGAAATTGAAGCGGCTAAGAAATGTTC
IP90	-AAGGTCCAGAAGGGTTAAATAAAGAAATTGAAGCGGCTAAGAAATGTTC
NBS1AB	-AAGGTCCAGAAGGGTTAAATAAAGAAATTGAAGCGGCTAAGAAATGTTC
BITS	AAAAATTCAGGAGAAATTAAGGAGAAAGTTGAAAGGCTAAGAAACTGTTC
KL11	----ATTCAGAAGAAATTAAGGAAAAAATTAAAGAGGCTAAGGATTGTTC
PBI	-----ATTCAGAAGAAATTAAGGAAAAAATTAAAGAGGCTAAGGATTGTTC

* * * * *

Obr. 8 (strana 3)

2591 CAAAGCATTTACTGATAAACTAAAGTAGTCATGCGAACTCGGT---A
 B31 TGAACAACATTTACTAATAAATTAAAGAAACACACAGATCTTGGT---A
 25015 TGAAGAATTTACTAATAAATAAAGTAGTCACACAGAGCTCGGC---A
 ZS7 TGAAGAGTTTACTACTAACTAAAGATAATCATGCACAGCTTGGT---A
 297 TGAAGAATTTACTGCTAAATTAAGGTGAACACACAGATCTTGGT---A
 SIMON TGAAGCATTTTACTAAAAAACTAAAGAGAAAGCACACAGATCTTGGG---A
 E61 CGAAGACTTTTACTAAAAAACTAAAGATAAGCACACAGAACTTGGT---A
 ORTH TGAAGATTTTACTAAAAAACTAGCTGCTGGCATGCACAGCTTGGT---A
 ACA1 TGAAGAATTTTACTAATAAATAAGAGTTAGTCATGCAGATCTTGGT---A
 H9 CGAAGAATTTTACTAATAAATAAGGTGGTCATGCAGAGCTTGGG---C
 J1 TCAAGACTTTTATCAATAAATAAGGTGGTCATGCAGAGCTTGGG---C
 JSB CGAAGAATTTTACTAATAAATAAGGTGGTCATGCAGATCTTGGC---A
 VS461 CGAAGCATTTTACTAAAAAGCTACAAGATAGTAACGCAGATCTTGGG---A
 M57 TGAAGCATTTTACTAATAAGACTAAAGGTTCTCATGCACAACTTGGAGT--
 W CGATAAATTTTACTAAAAAGCTAACAGATAGTCATGCACAGCTTGGAGCAG
 VSDA TGAAGACTTTTACTAAAAAACTAAAGAGAGCATACAGAACTTGGAGTTG
 NBS23a TGAAGACTTTTACTAAAAAACTAAAGGATAATCATGCAGATCTTGGAGTGG
 20047 TGAAGCATTTTACTAAAAAACTAAAGATAATCATGCACAGCTTGGTAT-A
 KL10 TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGA
 IP90 TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGG
 NBS1AB TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGG
 BITS TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGG
 KL11 CGAAAAATTTTACTACTAAGCTGAGAGATAGTCATGCAGAGCTTGGTAT-A
 PBI CCAAAAATTTTACTACTAAGCTAAAGATAGTCATGCAGAGCTTGGTAT-A
 * **** * * * * * * * * *

Obr. 8 (strana 3) (pokračovanie)

2591	TAGCGAATGGAGCTGCTAGTGATGCTAATGC AAAAGCGGCTATTTTAAAA
B31	AAGAAAGGTG-----TTACTGATGCTGATGC AAAAAGAGCCATTTTAAAA
25015	AACAGGATG-----CTCAGGATGATGATGC AAAAAGGCTATCTTAAGA
2S7	TACAGGGCG-----TTACTGATGAAAATGC AAAAAGCTATTTTAAAA
297	AAGAAGGCG-----TTACTGATGATAATGC AAAAAGCCATTTTAAAA
SIMON	AAGAGAATG-----CTACCGATGAAGATGC AAAAAGCTATTTTAAAA
E61	AACAGGATG-----CTAATGATGATGATGC AAAAAGCTATTTTAAAA
ORTH	TAGACGGAG-----CTACTGATAATGATTC AAAAAGCAATTTTGAAA
ACA1	AACAAGGTG-----TTAATGACGATGATGC AAAAAGCTATTTTAAAA
H9	TTGCTGCTG-----CTACTGATGAAAATGC AAAAAGCCATTTTAAAA
J1	TTGTTGCTG-----CTACTGATGCTAATGC AAAAAGCAGCCATTTTAAAA
JSB	AACAGGATG-----CTACCGATGATCATGC AAAAAGCAGCTATTTTAAAA
VS461	AACATAATG-----CTACTGATGCTGATTC AAAAAGCAATTTTGAAA
M57	-----TGCTGCTACTGATGATCATGC AAAAAGAGCTATTTTAAAG
W	TTGG-----TGGTGCTATTAAATGATGATCGTG AAAAAGAGCTATTTTAAAA
VSDA	CTG-----CTGCTACTGATGATAATGC AAAAAGCTATTTTAAAA
NBS23a	CGGGAATGGAGCTTCTACTGATGAAAATGC ACAGAAAGCTATTTTAAAA
20047	C--AGAATGGTGCTTCTCTTGATGATGAGGC AAAAAGCTATTTTAAAA
KL10	A---TGGTGGTGATACTACTGATGATAATGC AAAAAGCAGCTATTTTAAA
IP90	C---GAATGGTGATACTACTGATAATAATGC AAAAAGCAGCTATTTTAAAA
NBS1AB	C---GAATGGTGATACTACTGATAATAATGC AAAAAGCAGCTATTTTAAAA
BITS	C---GGCTGGTGCTACTGATATTGATGCAAAA AAAAAGCTATTTTAAAA
KL11	CAAAA-----CGTTCAGGATGATAATGC AAAAAGAGCTATTTTAAAA
PBI	CAAAG-----CGTTCAGGATGATAATGC AAAAAGCTATTTTAAAA

* * * * * * * * * *

Obr. 8 (strana 3) (pokračovanie)

2591 ACAATGGTAC---TAAAGATAAGGGTGCTCAAGAGCTTGAAAAGTTATT
 B31 ACAATGGTAC---TAAAACTAAAGGTGCTGAAGAACTTGGAAAATTATT
 25015 ACACATAATAC---TAAGGATAAGGGTGCTGAAGAACTTGATAAGTTATT
 ZS7 GCAAATGCAGCGGGTAAAGATAAGGGCGTTGAAGAACTTGAAAAGTTGTC
 297 ACAATAATGA---TAAAACTAAAGGGCGCTGATGAACCTTGAAAAGTTATT
 SIMON ACAGATGCTAC---TAAAGATAAGGGTGCTGCTGAACCTTGAAAAGCTATC
 E61 ACAATGGCGA---TAAAACTTTGGTGCTGCTGAACCTTGAAAAGCTATC
 ORTH ACAATGGGAC---TAAAACTAAAGGTGCTGAAGAACTTGTAAGTTATC
 ACAL ACAATGCAGA---TAAAACTAAAGGTGCTGAAGAACTTGGAAAAGTTATT
 H9 ACAATGGAAC---TAAAGATAAGGGGCTGAAGAACTTGAAAAGTTATT
 J1 ACAATGGCGA---TAAAACTAAAGGGGCTGACGAACTTGAAAAGCTATT
 JSB ACACATGCAAC---TACCGATAAAGGTGCTAAAGAACTTTAAAGATTTATT
 VS461 ACAATGGGAC---TAAAACTAAAGGTGCTAAAGAACTTGAAGAGTTGTT
 M57 TCAATCCTAC---TAAAGATAAGGGTGCTAAAGAACTTAAAGACTTATC
 W ACACATGGGAC---TAACGATAAGGGTGCTAAAGAACTTAAAGAGTTATC
 VSDA GCAATGGGGA---TAAGACTTTAGGTGTTGAAGAGCTTGAAAAGTTATT
 NBS23a ACAATGCGAT---TGTCGATAAGGGTGCTAAAGACCTTAAAGAGTTATT
 20047 ACAATGTGGA---CAAAACCAAGGGTGCTGAAGAGCTTGAAAAGTTATT
 KL10 ACACATCCTAC---TAAAGATAAGGGTGCTCGAAGATCTTGAAAAGTTATC
 IP90 ACACATGGGAC---TGAGGACAAAGGGTGTTAAAGAACTTAAAGATTTGTT
 NBS1AB ACACATGGGAC---TGAGGACAAAGGGTGTTAAAGAACTTAAAGATTTGTT
 BITS ACAATAGGGA---CAAGGACCTAGGTGCTGATGAACCTTGCAAGTTATT
 KL11 ACACATGGGAA---TAAAGACAAAGGGTGCTAAAGAACTTAAAGAGTTATC
 PBI ACACATGGAAC---TAAAGACAAAGGGTGCTAAAGAACTTGAAAGAGTTATT
 ** ** ** * * * * *

Obř. 8 (strana 4)

2591	CA
B31	CA
25015	CA
2S7	CA
297	CA
SIMON	CA
E61	CA
ORTH	CA
ACA1	CA
H9	CA
J1	CA
JSB	CA
VS461	CA
M57	CA
W	CA
VSDA	CA
NBS23a	CA
20047	CA
KL10	CA
IP90	CA
NBS1AB	CA
BITS	CA
KL11	CA
FBI	CA
	**

Obr. 8 (strana 4) (pokračovanie)

40

28691	TGTAATAATT	CAGGAAAGATGGGAAT---	GCATCTGCAAATTTCTGCTGA
2591	TGTAATAATT	CAGGAAAGATGGGAAT---	ACATCTGCAAATTTCTGCTGA
IP2	TGTAATAATT	CAGGAAAGATGGGAAT---	ACATCTGCAAATTTCTGCTGA
25015	TGTAATAATT	CAGGAAAGATGGGAACGCTG	CATCTACTAATCCTGCTGA
ZS7	TGTAATAATT	CAGGAAAGATGGGAAT---	ACATCTGCAAATTTCTGCTGA
297	TGTAATAATT	CAGGAAAGATGGGAAT---	ACATCTGCAAATTTCTGCTGA
SIMON	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTA	CATCTACTAATCCTGCTGA
E61	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTA	CATCTACTAATCCTGCTGA
ORTH	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTG	CATCTACTAATCCTGCTGA
ACA1	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTG	CATCTACTAATCCTGCTGA
H9	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTG	CATCTACTAATCCTGCTGA
J1	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTG	CATCTACTAATCCTACTGA
JSB	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATTTCTG	CATCTACTAATCCTGCTGA
VS461	TGTAATAATT	CAGGAAAGGTGGGATATTG	CATCTACTAATCCTG---A
M57	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CCGCATCTACTAATCCTG---A
W	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
VSDA	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
NBS23a	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
20047	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
KL10	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CCGCATCTACTAATCCTG---A
IP90	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
NBS1AB	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
BITS	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
KL11	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
PBI	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
H13	TGTAATAATT	CAGG-----TGGGGATA	CTGCACTACTAATCCTG---A
	*****	***	* * * * *

Obr. 8a (strana 1)

28691 TGAGTCTGTTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACAG
 2591 TGAGTCTGTTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACAG
 IP2 TGAGTCTGTTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACGG
 25015 TGAGTCTGTTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACAG
 2S7 TGAGTCTGTTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACGG
 297 TGAGTCTGTTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACAG
 SIMON CGAGTCTGCTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACAA
 E61 CGAGTCTGCTAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACAG
 ORTH CGAGTCTGCGAAAGGACCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 ACA1 CGAGTCTGCGAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 H9 CGAGTCTGCGAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 J1 CGAGTCTGCGAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 JSB CGAGTCTGCGAAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 VS461 TGAGTCTGCGAAAGGACCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 M57 TGAGTCTGCAAAAGGACCTAATCTTACAGTAATAAGCAAAAAAATTACAG
 W TGAGTCTGCGAAAGGACCTAATCTTATAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 VSDA TGAATCTGCGAAAGGACCTGATCTTACAGTAATAAGCAAAAAAATTACAG
 NBS23a TGAGTCTGCGAAAGGACCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 20047 TGAATCTGTTAAGGGCCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 KL10 TGAGTCTGCAAAAGGACCTAATCTTATAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 IP90 TGAGTCTGCGAAAGGACCTGATCTTACAGTAATAAGCAAAAAAATTACAG
 NBS1AB TGAGTCTGCAAAAGGACCTAATCTTATAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 BITS TGAGTCTGCAAAAGGACCTGATCTTACAGTAATAAGCAAAAAAATTACAG
 KL11 TGAATCTGCGAAAGGACCTGATCTTACAGTAATAAGCAAAAAAATTACAG
 PBI TGAGTCTGCAAAAGGACCTAATCTTACCGTAATAAGCAAAAAAATTACAG
 H13 TGAGTCCACTAAAGGACCTAATCTTATAGAAATAAGCAAAAAAATTACAG
 ** * * * * *

Obr. 8a (strana 1) (pokračovanie)

28691	AATCTAACGCAGTTGTTCTTGCCCGTGAAAGAGTTGAGACCTTACTTGCA
2591	AATCTAACGCAGTTGTTCTCGCCGTGAAAGAGTTGAAACTCTGCTTGCA
IP2	ATTCTAATGCGGTTTACTTGTGTGAAAGAGGTTGAAGCGTTGCTGTCA
25015	ATTCTAATACGGTTGTGCTAGCTGTAAAGAGTTGAAGCTTTGCTTACA
2S7	ATTCTAATGCGGTTTACTTGTGTGAAAGAGGTTGAAGCGTTGCTGTCA
297	AATCTAACGCAGTTGTTCTCGCCGTGAAAGAGTTGAAACTTTGCTTACA
SIMON	ATTCTAATGCATTTGTACTTGTCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTGCA
E61	ATTCTAATGCATTTGTACTTGTCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTGCA
ORTH	ATTCTAATGCATTTGTACTGCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTTCA
ACA1	ATTCTAATGCATTTGTACTTGTCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTTCA
H9	ATTCTAATGCATTTGTACTTGTCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTTCA
J1	ATTCTAATGCATTTGTACTTGTCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTTCT
JSB	ATTCTAATGCATTTGTACTTGTCTGTTAAAGAGTTGAGACTTTGGTTTCA
VS461	ATTCCAATGCAGTTGTACTAGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
M57	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGATCTCA
W	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGATCTCA
VSDA	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
NBS23a	ATTCTAATGCATTTGTACTCGCCGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGATTTCA
20047	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGATCTCA
KL10	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
IP90	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
NBS1AB	ATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
BITS	ATTCTAATGCAGTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
KL11	ATTCTAATGCAGTTGTACTGGTTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
PBI	ATTCTAATGCATTTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGCTTTCA
H13	ATTCCAATGCAGTTGTACTGGCTGTGAAAGAGTTGAGGCTTTGATCTCA

Obr. 8a (strana 1) (pokračovanie)

28691 TCTATAGATGAACCTTGCTACCAAAGCTATTGGTAAAAAATAGGCAATAA
 2591 TCTATAGATGAAGTTGCTAAGAAAGCTATTGGGAATTGATAGCCCCAAA
 IP2 TCTATAGATGAAATTGCTGCTAAGCTATTGGTAAAAAATACACCAAAA
 25015 TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAGCTATTGGTAAAAAATACACCAAAA
 ZS7 TCTATAGATGAGCTTGCTA---AAGCTATTGGTAAAAAATAAAAACGA
 297 TCTATAGATGAGCTTGCTA---AAGCTATTGGTAAAAAATAAAAACGA
 SIMON TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAGCTATTGGTAAAAAATAAAAATGA
 E61 TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAGCTATTGGTAAAAAATACAACAAA
 ORTH TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAGCTATTGGTAAAAAATACAACAAA
 ACA1 TCTATAGATGAACCTTGCTACTAAGCTATTGGTAAAAAATACAACAAA
 H9 TCTATAGATGAACCTTGCTGCTCAAGCTATTGGTAAAAAATACAA---AA
 J1 TCTATAGATGAACCTTGCTAATAAAGCTATTGGTCAAAAAATACAA---AA
 JSB TCTATAGATGAACCTTGCTAAGAAAGCTATTGGTCAAAAAATAGACAATAA
 VS461 TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAACTATTGGTAAAAAATAGAGGCAAA
 M57 TCTATAGATGAACCTTGCTAATAAAGCTATTGGTAAAGTAATACATCAAAA
 W TCTATAGATGAACCTTGCTAATAAAGCTATTGGTAAAAAATAAATCAAAA
 VSDA TCTGTAGATGAACCTTGCCA---AAGCTATTGGTAAAAAAGATACATCAAAA
 NBS23a TCTGTAGATGAACCTTGCTA---AGGCTATTGGTAAAAAATAGATAACAA
 20047 TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGCTATTGGTCAAAAGAAATACAACAAA
 KL10 TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGGTATTGGTAAAAAATAGATCAAAA
 IP90 TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGCTATTGGTCAAAATAAGATCAAAA
 NBS1AB TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGCTATTGGTCAAAATAAGATCAAAA
 BITS TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGCTATTGGTCAAAATAAGATCGAAA
 KL11 TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGCTATTGGTAAAAAATAAGAAATGA
 PBI TCTATAGATGAACCTTGCTA---AAGCTATTGGTAAAAAATAAAAAATGA
 H13 TCTATAGATGAACCTTGCTA---AGGCTATTGGTAAAAAAGTAGAGGCAAA
 *** ***** ** * **** * * *

Obr. 8a (strana 2)

28691	T---	GGTTTAGAGGCCAATCA---	GAGTAAAAACACATCATTTGTTATCAG
2591	T---	GGTTTAAATGCCGGTGC---	TAATCAAAAACGGATCATTTGTTAGCGG
IP2	TAATGGTTT	GGATACCGAAA---	TAATCACAAATGGATCATTTGTTAGCGG
25015	TAATGGTTT	GGATACCGAAA---	TAATCACAAATGGATCATTTGTTAGCGG
ZS7	TGGTAGTTT	AGGTGATGAAGC---	AAATCACAAACGAGTCATTTGTTAGCAG
297	TGTTAGTTT	AGATAAATGAGGC---	AGATCACAAACGGATCATTTAATATCAG
SIMON	TGGCACTTT	AGAGAACGAAGC---	AAATCACAAACGGATCATTTGTTAGCGG
E61	TGGCACTTT	AGATAAACGAAGC---	AAATCACAAACGGATCATTTGTTAGCAG
ORTH	TAATGGTTT	AGGCCCAATGC---	GGATAAAAACGGATCATTTGTTAGCAG
ACA1	T---	GGTTAGGCCCGAAGC---	GAATCGCAACGAATCATTTGTTAGCAG
H9	CAATGGTTT	GACTGCCGAACA---	GAATCAAAAACGGATCATTTGTTGCCG
J1	CAATGGTTT	GAGTGCCGAACA---	GAATCAAAAACGGATCATTTATTAGCAG
JSB	TAATGGTTT	AGCTGCTTTAA---	TAATCAGAAATGGATCGTTGTTAGCAG
VS461	---	TGGTTGGTAACGAAGC---	GGATAAAAACGGATCATTTATTAGCAG
M57	TAATGGTTT	AAATGCTAATGC---	GGTCAAAAACGGATCATTTGTTAGCAG
W	T---	GGTTAGATGCTGATGC---	TAATCACAAACGGATCATTTGTTAGCAG
VSDA	TAATGGTTT	AGATACTCTGTC---	AAATCAAAAACGGATCATTTGTTAGCAG
NBS23a	TACTGGTTT	AGTGCTAATCA---	GAATCATAAACACTCATTTGTTAGCAG
20047	T---	GGTTAGTTGCTGATGC---	GGTCAACAACGCGCATTTGTTAGCAG
KL10	TAGTGGTTT	AGCTGCTACTCAGATAAAAACACCTCGTTGTTAGCAG	
IP90	TAATGGTTT	AGCTGCTACTCAGGATAAAAACACCTCATTTGTTAGCAG	
NBS1AB	TAATGGTTT	AGCTGCTACTCAGGATAAAAACACCTCATTTGTTAGCAG	
BIT5	TAATGGTTT	AGCTGCTGAAGC---	GAATTTTAAACACCTCATTTGTTAGCAG
KL11	TGGTACTTT	AGATAACGAAGC---	AAATCGAAAACGAATCATTTGATAGCAG
PBI	TGGTACTTT	AGATAACGAAGC---	AAATCGAAAACGAATCATTTGATAGCAG
H13	T---	GGTTGGTTAACGAAGC---	GGATAGAAAACACCTCATTTGTTAGCAG

* * * * *

Obr. 8a (strana 2) (pokračovanie)

28691 GAGCTTATGCAATATCTGACCTAATAGCAGAAAAAATTAAATGTATTGA--
 2591 GAGCCTACGTAATATCAACCCCTAATAGCAGAAAAAATTAGATGGATTGA--
 IP2 GAGCTTATGCAATATCAACCCCTAATAAACAACAAAAATTAGATGGATTGA--
 25015 GGGCCTATGCAATATCAACGCTAATAACACACAAAAAGTTAGGTGGATTGA--
 ZS7 GAGCTTATACAAATATCAACCTTAAATAACACACAAAAATTAAAGTAAATTAA--
 297 GAGCATATTTAATTTCAACATTAATAACAAAAAAATAAGTGCAATAA--
 SIMON GAGCTTATGCAATATCAAAATCTAATAAAGAAAAAATTAGATGGATTGA--
 E61 GAGCCTATGCAATATCAACTCTAATAACACACAAAAATTAAAGTGTATTGA--
 ORTH GAGCTTATGCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTAAAGGCATTGA--
 ACA1 GAGTTCATGAAATATCAACACTAATAACAGAAAAAATTAAAGTAAATTGA--
 H9 GAGCCTATGCAATATCAGCCCTAATAACAAAAAAATTAGATGAATTGACC
 J1 GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAAACAACAAAACTAGATGGATTAA--
 JSB GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTGAGTAAATTGA--
 VS461 GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAAACAACAAAAATTAGATGGATTGA--
 M57 GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTAAAGTAAATTGA--
 W GAGCCCATGCAATATCAACTCTAATAAACAACAAAAACAGATGGATTGA--
 VSDA GAGCCTATGCAATATCAACCCCTAATAACAAAAAAATTAGATGGATTGA--
 NBS23a GAGCCTATTCAATATCAACCCCTAATAACAGAAAAAATTAAAGTAAATTAA--
 20047 GAGCCCATGAAATATCAATCCCTAATAACACACAAAAAATTAGATGGATTAA-
 KL10 GAGCCTATGCAATATCAGCTCTAATAAACAACAAAAATTAGATGGATTGC--
 IP90 GAGCCTATGCAATATCAGCCCTAATAAACAACAAAAATTAGATGGATTGC--
 NBS1AB GAGCCTATGCAATATCAGCTCTAATAAACAACAAAAATTAGATGGATTGC--
 BITS GAGCCTATACAAATATCAACCCCTAATAAACAACAAAAAATTAGATGAATTGATC
 KL11 GAGCTTATGAAATATCAAAACTAATAACACACAAAAAATTAAAGTGTATTGA--
 PBI GAGCTTATGAAATATCAAAACTAATAACACACAAAAAATTAAAGTGTATTGA--
 H13 GAGCTCATGAAATATCAATTCTAATAAACAACAAAAAATTAACTGCATTAA--
 *

Obr. 8a (strana 2) (pokračovanie)

28691 -AAAAT---GAAGAATTAAAGGAAAAGATTGATACAGCTAAGCAAATGTTTC
 2591 -AAAATTCAGAAAGAAATTAAAGGAAAAAATTGAAGATGCTAAAAAATGTAA
 IP2 -AAAAT---GAAGGATTAAAGGAAAAAATTGATCGGCTAAGAAAATGTTTC
 25015 -AAAAT---GAAGAATTAAAGGAAAAGATTGCCGAGTCAAGAAAATGTTTC
 ZS7 -ACGGATCAGAAAGGTTTAAAGGAAAAGATTGCCGAGCTAAGAAAATGCTC
 297 -AAGATTTCAGGAGAAATTGAAGGCAGAAATTGAAAAGGCTAAGAAAATGTTTC
 SIMON -AAGGTTTAGAAGGATTAAATAAGGAAATTGCCGAGGCCAAGAACTGTTTC
 E61 ---ATTTCAGAAAGAAATTAAAGGCAGAAATTGTAAAGGCTAAGAAAATGTTTC
 ORTH -AAAATTCAGGAGAAATTAAAGGCCAAAAATTGAAGATGCTAAGAAAATGTTTC
 ACA1 -AAAATTCAGGAGAAATTAAAGGCCAAAAATTGAAGATGCTAAGAAAATGTTTC
 H9 AAAAATTCAGGAGAAATTAAAGGAGAAAGTTGAAAAGCTAAGAAAATGTTTC
 J1 -AAGGCTAGAAGGATTAAATAAAGAAATTACAGAGGCCAAAAAATGTTTC
 JSB -AAAATTTAGAAGAAATTAAAGACAGAAATTGCAAAAGGCTAAGAAAATGTTTC
 VS461 -AAGGCTAGAAGGATTAAATAAAGAAATTGCCGAGGCCAAGAAAATGTTTC
 M57 -AAAATTCAGAAAGAGTTAAATAAAGAAAATTGAAGAGGCTAAGAAACCATTC
 W -AAGATCTAGAAGGGTTAAGTAAAGAAATTGCAAAAGGTGAAGGAATGTTTC
 VSDA -AAGGTTTCAGAAAGGATTAAAGCAGAAATTGCAGAAAGCTAAGAAAATGTTTC
 NBS23a -AAAATTTAGAAGGGTTAAAGCAGAGATTGCAGAAAGCTAAGAAAATGTTTC
 20047 -AAGGTTTAGAAGGATTAAAGCAGAGATTGCAGAAAGCTAAGAAAATGTTTC
 KL10 -AAGGTCAGAAAGGGTTAAATAAAGAAATTGAAGCGGCTAAGAAAATGTTTC
 IP90 -AAGGTCAGAAAGGGTTAAATAAAGAAATTGAAGCGGCTAAGAAAATGTTTC
 NBS1AB -AAGGTCAGAAAGGGTTAAATAAAGAAATTGAAGCGGCTAAGAAAATGTTTC
 BITS AAAAATTCAGGAGAAATTAAAGGAGAAAGTTGAAAAGGCTAAAAACTGTTTC
 KL11 ---ATTTCAGAAAGAAATTAAAGGAAAAAATTAAAGAGGCTAAGGATTGTTTC
 FBI ---ATTTCAGAAAGAAATTAAAGGAAAAAATTAAAGAGGCTAAGGATTGTTTC
 H13 -AAGATTTCAGGAGGATTAAAGCAGAGATTGCAGAAAGCTAAGAAAATGTTTC
 * * * * *

Obr. 8a (strana 3)

28691 TACAGAAATTTACTAATAAACTAAAAAGTGAACATGCAGTGTGGT---C
 2591 CAAAGCATTTTACTGATAAACTAAAAAGTAGTCATGCGAACTCGGT---A
 IP2 TGAAACATTTTACTAATAAATTAAGAAACACACAGATCTTGGT---A
 25015 TGAGAAATTTTACTAATAAACTAAAAAGTAGTCACACAGAGCTCGGC---A
 ZS7 TGAAGAGTTTACTAGTAACTAAAGATAATCATGCACAGCTTGGT---A
 297 TGAAGAAATTTTACTGCTAAATTAAGGTGAACACACAGATCTTGGT---A
 SIMON TGAAGCATTTTACTAAAACTAAAGAGAGACACACAGATCTTGGG---A
 E61 CGAAGACTTTTACTAAAACTAAAGATAAGCACACAGAACTTGGT---A
 ORTH TGAAGATTTTACTAAAACTAGCTGCTGGGCATGCACAGCTTGGT---A
 ACA1 TGAAGAAATTTTACTAATAAAGAGTTAGTCATGCAGATCTTGGT---A
 H9 CGAAGAAATTTTACTAATAAACTAAAAAGGTGGTCATGCAGAGCTTGGG---C
 J1 TCAAGACTTTTATCAATAAACTAAAAAGGTGGTCATGCAGAGCTTGGG---C
 JSB CGAAGAAATTTTACTAATAAACTAAAAAGGTGGTCATGCAGATCTTGGC---A
 VS461 CGAAGCATTTTACTAAAAAGCTACAAGATAGTAACGCAGATCTTGGG---A
 M57 TGAAGCATTTTACTAATAGACTAAAAAGGTTCTCATGCACAACTTGGAGT---
 W CGATAAATTTTACTAAAAAGCTAACAGATAGTCATGCACAGCTTGGAGCAG
 VSDA TGAAGACTTTTACTAAAACTAAAGAGAGAGCATACAGAACTTGGAGTTG
 NBS23a TGAAGACTTTTACTAAAACTAAAGGATAATCATGCAGATCTTGGAGTGG
 20047 TGAAGCATTTTACTAAAACTAAAGAGATAATCATGCACAGCTTGGTAT-A
 KL10 TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGACGCGCAGAACTTGGAGTGA
 IP90 TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGACCCAGACCTTGGAGTGG
 NBS1AB TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGACCCAGACCTTGGAGTGG
 BITS TGAAGCATTTTACTAATAAATTAAGAGAGAGACCCAGAACTTGCAGTGG
 KL11 CGAAAAATTTTACTACTAAGCTGAGAGATAGTCATGCAGAGCTTGGTAT-A
 PBI CCAAAAATTTTACTACTAAGCTAAAAAGATAGTCATGCAGAGCTTGGTAT-A
 H13 TGAAGCATTTTACTAAAAAACTAAAGAGATAATAATGCACAGCTTGGTAT-A
 *** * * *

Obr. 8a (strana 3) (pokračovanie)

28691	TACAGAAATTTACTAATAAACTAAAAAGTGAAACATGCAGTGCTTGGT---	C
2591	CAAAGCATTTTACTGATAAACTAAAAAGTAGTCATGCGGAACTCGGT---	A
IP2	TGAAACATTTTACTAATAAAATTAAAAAGAAAAACACACAGATCTTGGT---	A
25015	TGAAGAAATTTTACTAATAAACTAAAAAGTAGTCACACAGAGCTCGGC---	A
ZS7	TGAAGAGTTTGTAGTACTAACTAAAAAGATAATCATGCACAGCTTGGT---	A
297	TGAAGAAATTTTACTGCTAAATTAAAAAGGTGAACACACAGATCTTGGT---	A
SIMON	TGAAGCATTTTACTAAAAAACTAAAAAGAGAGCAGATCTTGGG---	A
E61	CGAAGACTTTTACTAAAAAACTAAAAAGATAAGCAGACAGAACTTGGT---	A
ORTH	TGAAGATTTTACTAAAAAACTAGCTGCTGGGCATGCACAGCTTGGT---	A
ACA1	TGAAGAAATTTTACTAATAAACTAAAGAGTTAGTCATGCAGATCTTGGT---	A
H9	CGAAGAAATTTTACTAATAAACTAAAAAGGTGGTTCATGCAGAGCTTGGG---	C
J1	TCAAGACTTTTATCAATAAACTAAAAAGGTGGTTCATGCAGAGCTTGGG---	C
JSB	CGAAGAAATTTTACTAATAAACTAAAAAGGTGGTTCATGCAGATCTTGGC---	A
VS461	CGAAGCATTTTACTAAAAAGCTACAAAGATAGTAACGCAGATCTTGGG---	A
M57	TGAAGCATTTTACTAATAGACTAAAAAGGTTCTCATGCACAACTTGGAGT---	
W	CGATAAAATTTTACTAAAAAGCTAACAGATAGTCATGCACAGCTTGGAGCAG	
VSDA	TGAAGACTTTTACTAAAAAACTAAAAAGAGAGCATACAGAACTTGGAGTTG	
NBS23a	TGAAGACTTTTACTAAAAAACTAAAGGATAATCATGCAGATCTTGGAGTGG	
20047	TGAAGCATTTTACTAAAAAACTAAAAAGATAATCATGCAGCTTGGTAT--A	
KL10	TGAAGCATTTTACTAATAAAATTAAAAAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGA	
IP90	TGAAGCATTTTACTAATAAAATTAAAAAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGG	
NBS1AB	TGAAGCATTTTACTAATAAAATTAAAAAGAGAGCAGCAGAACTTGGAGTGG	
BITS	TGAAGCATTTTACTAATAAAATTAAAAAGAGAGCAGCAGAACTTGCAGTGG	
KL11	CGAAAAAATTTTACTACTAAGCTGAGAGATAGTCATGCAGAGCTTGGTAT--A	
PBI	CCAAAAAATTTTACTACTAAGCTAAAAAGATAAGTCATGCAGAGCTTGGTAT--A	
H13	TGAAGCATTTTACTAAAAAACTAAAAAGATAATAATGCACAGCTTGGTAT--A	

**** * * *
 * * *

Obr. 8a (strana 3) (pokračovanie)

50

28691 TAAAGCGGTAGAAAACCTTATCAAAAAGCAGCTCAAGACACATTAATAAATG
 2591 TGAATCAGTAAAAAATCTGTCAAAAAGCAGCTCAAGAAACACTAAATAATT
 IP2 TGAATCAGTAGAGGTCTTGTCAAAAAGCAGCTAAAGAGATGCTTGCTAATT
 25015 TAAACCGGTGAGAACTTGTCAAAAAGCGCTAAAGAGATGCTATCCAATT
 ZS7 CGGATCATTAGAAAAGCTTATCAAAAAGCAGCTAAAGAGATGCTTGCTAATT
 297 TGAATCAGTAAAAAATCTGTCAAAAAGCAGCTAAAGAGATGCTTACTAATT
 SIMON TGAATCAGTAGCAAGCTTAGTAAAGCGGCTCAAGAGCCTAACTAATT
 E61 TGAATCAGTAACAAGCTTGTCAAAAAGCAGCTAAAGAAATCACTAACCAATT
 ORTH TGAATCAGTAGCAAGCTTGTCAAAAAGCGGCTCAAGAGCCTCAGCTAATT
 ACA1 TAAATCAGTGGAAAGTTTGGTAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTAACTAATT
 H9 TAAATCAGTAGAAAAGCTTGGCAAAAAGCAGCTAAAGAAATCACTAACCAATT
 J1 TAAATCAGTAGAAAGTTTGTAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTAACTAATT
 JSB TGAATCAGTAGAAAGTTTGTAAAGCAGCTCAAGTAGCCTAACTAATT
 VS461 TAAATCAGTAGAAAAGCTTGTCAAAAAGCAGCTAAAGAAAGCCTAACTAATT
 M57 TGAATCAGTAGAAAAGCTTGGCAAAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTAACTAATT
 W TGAATCAGTAGAAAAGCTTGGCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTTAGCTAATT
 VSDA TAAATCAGTAGAAAATTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTAGCTAATT
 NBS23a TGAATCAGTAGAAAATTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTAGCTAATT
 20047 TAAATCAGTAGAAAAGCTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTAACTAATT
 KL10 TGAATCAGTAGAAAAGTTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTTAAGCAATT
 IP90 GAAATCAGTAGAAAAGCTTGGCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTCAAGCAATT
 NBS1AB GAAATCAGTAGAAAAGCTTGGCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTCAAGCAATT
 BITS TAAATCAGTAGAAAAGCTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGAAAGCCTCAGCTAATT
 KL11 TGAATCAGTAGAAAATTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTAGCTAATT
 FBI TAAATCAGTAGAAAAGCTTGTCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTAACTAATT
 H13 TGAATCAGTAGAAAAGCTTGGCAAAAAGCAGCTCAAGCAGCCTAGCTAATT

Obz. 8a (strana 4) (pokračovanie)

[illegible]

2591	AQN-GLNAGANQ-NGSLLAGAYVISTLIAEKL DGL-KNSEELKEKIEDAKKCNKAFTDKLKSSH
B31	HQNNGLDTENN H-NGSLLAGAYAI STLIKQKL DGL-KN-EGLKEKIDA AKKCS EFTFNKLKEKH
25015	HQNNGLDTENN H-NGSLLAGAYAI STLI TQKL GGL-KN-EELKEKIAAVKKCSE EFTFNKLKSSH
2S7	KNDGSLGDEAN H-NESLLAGAYTI STLI TQKL SKL-NGSEGLKEKIAAAKKCSE EFTFNKLKDNH
297	KNDVSLDNEADH-NGSLISGAYLI STLI TKKISAI-KDSGELKAEIEKAKKCS EFTFNKLKGEH
SIMON	KNDGTLENEAN H-NGSLLAGAYAIN LIKQKL DGL-KGLEGLNKEIAEAKNCS EFTFNKLKEKH
E61	KNDGTLDNEAN H-NGSLLAGAYAI STLI TQKL SVL-NS-EELKAEIVKAKKCS EFTFNKLKDKH
ORTH	QQNGLGANADK-NGSLLAGAYAI STLI TEKL KAL-KNSGELKAKIEDAKKCS EFTFNKLKLAAGH
ACAI	QQN-GLGAEANR-NESLLAGVHEI STLI TEKL SKL-KNSGELKAKIEDAKKCS EFTFNKL RVSH
H9	QNN-GLTAEQNQ-NGSLLAGAYAI SALITKKLDELTKNSGELKGEVEKAKKCS EFTFNKLKGGH
J1	QNN-GLSAEQNQ-NGSLLAGAYAI STLIKQKL DGL-KGLEGLNKEITEAKKCSQDFINKLKGGH
JSB	DNNGLAALNNQ-NGSLLAGAYAI STLI TEKL SKL-KNLEELKTEIAKAKKCS EFTFNKLKSGH
VS461	EAN-GLGNEADK-NGSLLAGAYAI STLIKQKL DGL-KGLEGLNKEIAEAKKCS EFTFNKLQDSN
M57	HQNNGLNANAGQ-NGSLLAGAYAI STLI TEKL SKL-KNSEELNKKIEEAKNHSEAFNRLKGS
W	NQN-GLDADAN H-NGSLLAGAHAI STLIKQKT DGL-KDLEGLSKEIAKVKECSDKFTKKLTDSH
VSDA	HQNNGLDTLSNQ-NGSLLAGAYAI STLI TKKL DGL-KGSEGLKAEIAEAKKCS EFTFNKLKEKH
NBS23A	DNNTGLSANQNH-NTSLLAGAYSISTLI TEKL SKL-KNLEGLKAEIAEAKKCS EFTFNKLKDNH
20047	QQN-GLVADAGH-NSALLAGAHEISILITQKL DGL-KGLEGLKAEIAEAKKYSEAFNKLKDNH
KL10	DQNSGLAAATQNKNTSLLAGAYAVSALIKQKL DGL-QGPEGLNKEIEA AKKCS EFTFNKLKEKH
IP90	DQNNGLAAATQDKNTSLLAGAYAI SALIKQKL DGL-QGPEGLNKEIEA AKKCS EFTFNKLKEKH
NBS1AB	DQNNGLAAATQDKNTSLLAGAYAI SALIKQKL DGL-QGPEGLNKEIEA AKKCS EFTFNKLKEKH
BITS	DRNNGLAVEANF-NTSLLAGAYTISTLI TKKLDELINSGELKGEVEKAKNCS EFTFNKLKEKT
KL11	RNDGTLDNEAN-RNESLIAGAYEISKLI TQKL SVL--NSEELKEKIEAKDCSEKFTTKLRD SH
PBI	KNDGTLDNEAN-RNESLIAGAYEISKLI TQKL SVL--NSEELKEKIEAKDCSQKFTTKLKD SH

Obr. 9 (pokračovanie)

2591	AELGIAN-GAASDANAKAAILKTNGT-KDKGAQELEKLFESVKNLSKAAQETLNN
B31	TDLGKEG---VTDADAKEAILKTNGT-KTKGAEEELGKLFESVEVLSKAAKEMLAN
25015	TELGKQD---AQDDDAKKAILRTHNT-KDKGAEEELDKLFKPVENLSKAAKEMLSNS
257	AQLGIQG---VTDENAKKAILKANAAAGDKGVEELEKLSGLESLSKAAKEMLAN
297	TDLGKEG---VTDDNAKKAILKTNN-DKTKGADELEKLFESVKNLSKAAKEMLTNS
SIMON	TDLGKEN---ATDEDAKKAILKTDAT-KDKGAEELEKLFESVASLVKAAQEAALTN
E61	TELGKQD---ANDDDAKKAILKTNGD-KTLGAEELEKLFESVTSLSKAAKESLTNS
ORTH	AQLGIDG---ATDNDSKEAILKTNGT-KTKGAEEELVKLSESVASLSKAAQEAASNS
ACAI	ADLGKQG---VNDDDAKKAILKTNAD-KTKGAEEELGKLFKSVEGLVKAAQEAALTN
H9	AELGLAA---ATDENAKKAILKTNGT-KDKGAEELEKLFKSVESLAKAAKESLTNS
J1	AELGLVA---ATDANAKAAILKTNGD-KTKGADEFKLFKSVEGLLAKAAQEAALTN
JSB	ADLGKQD---ATDDHAKAAILKTHAT-TDKGAKEFKDLFESVEGLLAKAAQVALLTN
VS461	ADLGKHN---ATDADSKEAILKTNGT-KTKGAKELEELFKSVESLSKAAKEALSNS
M57	AQLGVAA-AT--DDHAKEAILKSNPT-KDKGAKELKDLSESVESLAKAAQEAALNS
W	AQLGAVG-GAINDDRAKEAILKTHGT-NDKGAKELKELSESVESLAKAAQAAALNS
VSDA	TELGVA---AATDDNAKKAILKANGD-KTLGVEELEKLFKSVEKLSKAAQEAALNS
NBS23A	ADLGVAGNGASTDENAQKAILKTNAI-VDKGAKDLKELFESVEKLSKAAQEAALNS
20047	AQLGIQ-NGASLDDEAKKAILKTNVD-KTKGAEELEKLFKSVEKLSKAAQEAALTN
KL10	AELGVNG-GDTTDDNAKAAIFKTHPT-KDKGVEDLEKLFSESVKSLKAAQAAALNS
IP90	QDLGVAN-GDTTDDNNAKAAAILKTHGT-EDKGVKELKDLKSVESLAKAAQAAASSNS
NBS1AB	QDLGVAN-GDTTDDNNAKAAAILKTHGT-EDKGVKELKDLKSVESLAKAAQAAASSNS
BITS	QELAVAA-GAATDIDAKKAILKTNRD-KDLGADELGKLFKSVEKLSKAAQEAASNS
KL11	AELGIQN---VQDDNAKRAILKTHGN-KDKGAKELKELSELEKLSKAAQAAALNS
PBI	AELGIQS---VQDDNAKRAILKTHGT-KDKGAKELKELSELEKLSKAAQAAALTN

28691	CNNSGKDGN	A-SANS	AD	ESVKG	ENL	TEIS	KKIT	ESNA	W	LAV	KE	VE	T	L	AS	I	DE	L	A	K	A	I	G	K	K									
2591	CNNSGKDGN	T-SANS	AD	ESVKG	ENL	TEIS	KKIT	ESNA	W	LAV	KE	VE	T	L	AS	I	DE	V	A	K	A	I	G	N	L	I								
IP2	CNNSGKDGN	T-SANS	AD	ESVKG	ENL	TEIS	KKIT	DSNA	V	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	A	K	A	I	G	K	K								
25015	CNNSGKDGN	AAS	TN	PA	DES	SVKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	TN	V	LAV	KE	VE	A	L	T	S	I	DE	L	A	K	A	I	G	K	K					
ZS7	CNNSGKDGN	T-SANS	AD	ESVKG	ENL	TEIS	KKIT	DSNA	V	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	A	I	G	K	K	I							
297	CNNSGKDGN	T-SANS	AD	ESVKG	ENL	TEIS	KKIT	ESNA	W	LAV	KE	VE	T	L	S	I	DE	L	A	-	K	A	I	G	K	K	I							
SIMON	CNNSGKGG	D	ST	STN	PA	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	NS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	T	K	A	I	G	K	K			
E61	CNNSGKGG	D	ST	STN	PA	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	T	K	A	I	G	K	K			
ORTH	CNNSGKGG	D	SA	STN	PA	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	T	K	A	I	G	K	K			
ACPI	CNNSGKGG	D	SA	STN	PA	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	T	K	A	I	G	K	K			
H9	CNNSGKGG	D	SA	STN	PA	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	T	K	A	I	G	K	K			
J1	CNNSGKGG	D	SA	STN	PT	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	A	Q	A	I	G	K	K			
JS3	CNNSGKGG	D	SA	STN	PA	DES	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	T	V	A	S	I	DE	L	A	K	K	A	I	G	K	K			
VS461	CNNSGKGG	D	I	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	W	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	T	I	G	K	K				
M57	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	T	V	I	SS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	T	I	G	K	K
W	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	T	V	I	SS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	T	I	G	K	K
VS2A	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	T	V	I	SS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	T	I	G	K	K
NBS23A	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	T	V	I	SS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	T	I	G	K	K
20C47	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SVKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	A	I	G	K	K	I		
KL10	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	A	I	G	K	K	I		
IP90	CNNSG--	-G	D	S	A	STN	P-DE	SAKG	ENL	T	V	I	SS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE	A	L	SS	I	DE	L	A	-	K	A	I	G	K	K
NBS1A3	CNNSG--	-G	D	T	AS	TN	P-DE	SAKG	ENL	TEIS	KKIT	DS	NA	F	LAV	KE	VE</																	

Obr. 9a

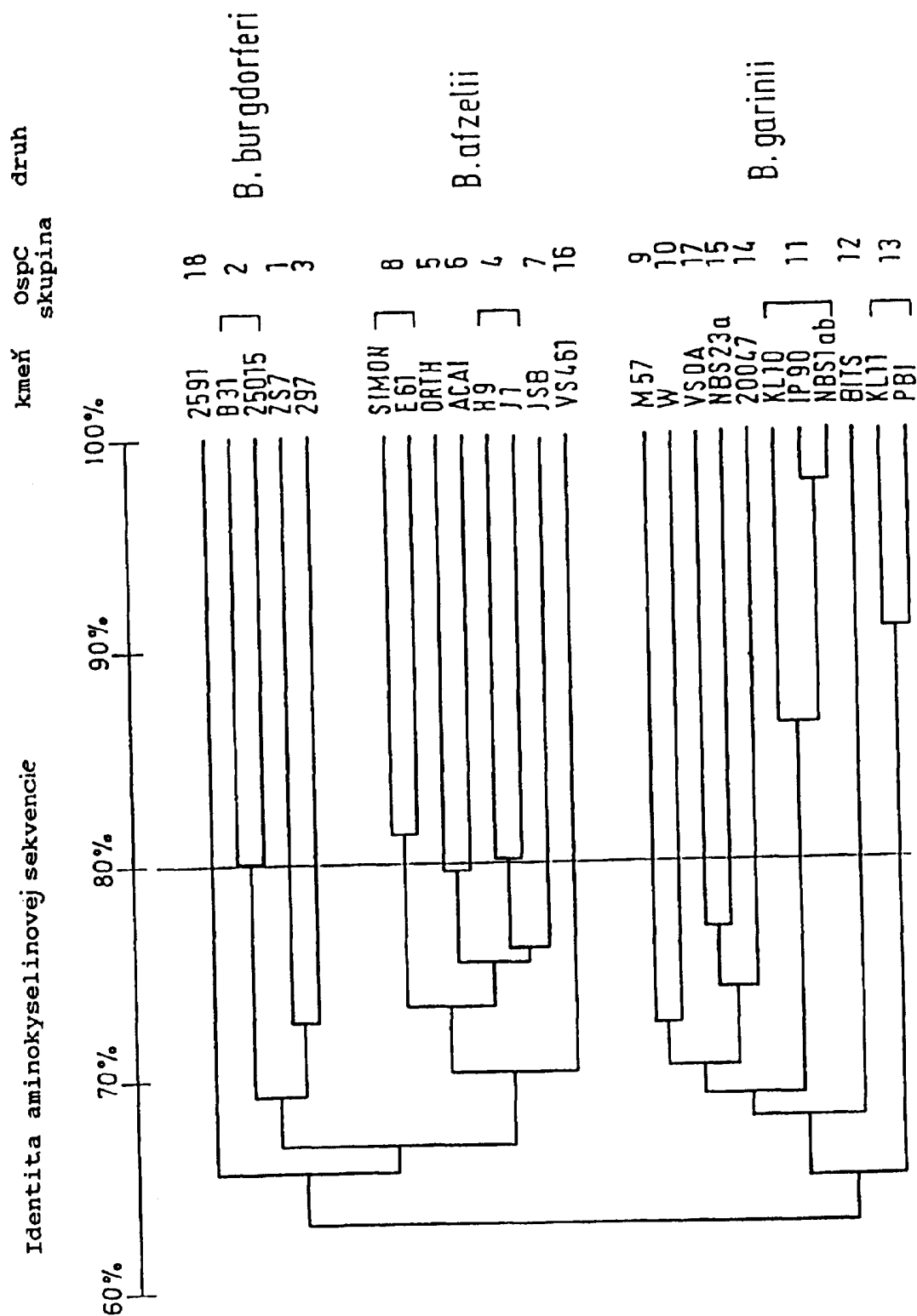
28691	GNN-GLERNQSK-NTSLLSGAYAI	SDLIAEKLNVL-KN-EELKEKIDTA	KQCSTETNKLKSEH
2591	AQN-GLNAGANQ-NGSLLAGAYVIST	LIAEKLDEL-KNSEELKEKIEDAKKCNKAFT	DKLKSSH
IP2	HQNGCLDTENNHH-NGSLLAGAYAI	STLIKQKLDGL-KN-EGLEKKEIDAKKCCSEFT	TNKLKEKH
25015	HQNGCLDTENNHH-NGSLLAGAYAI	STLIQKLGGL-KN-EELKEKIAVAKKCCSEFT	TNKLKSSH
257	KNDGSLGDEANHH-NESLLAGAYTIST	LIQKLSKL-NGSEGLKEKIAAFAKKCCSEFT	KLKDNH
297	KNDVSLDNEADH-NGSLLISGAYLIST	LIKXISPI-KDSGELKAEIEKAKKCCSEFT	AKLKEGH
SIMON	KNDGTLTENEANHH-NGSLLAGAYAI	SNLIKQKLDGL-KGLEGLNKEIAEAKNCCSEFT	KLKEKH
E61	KNDGTLTENEANHH-NGSLLAGAYAI	STLIQKLSVL-NS-EELKEKIEIVAKKCCSEFT	KLKDKH
ORTH	QQNNGCLGANADK-NGSLLAGAYAI	STLITKELKAL-KNSGELKAKIEDAKKCCSEFT	KLAPAGH
ACAI	QQN-GLGAEANR-NESLLAGAVHEI	STLITKELSKL-KNSGELKAKIEDAKKCCSEFT	TNKL RVSH
H9	QQN-GLTAEQNQ-NGSLLAGAYAI	SALITKLDDELTKNSGELKGEVEKAKKCCSEFT	TNKLKGGH
J1	QQN-GLSAEQNQ-NGSLLAGAYAI	STLIKQKLDGL-KGLEGLNKEITEAKKCCSQDEFT	NKLKGGH
JSB	DNNNGCLALNNQ-NGSLLAGAYAI	STLITKELSKL-KNLEELKTEIAKAKKCCSEFT	TNKLKSGH
VS461	EAN-GLGNEADK-NGSLLAGAYAI	STLIKQKLDGL-KGLEGLNKEIAEAKKCCSEFT	KLQDSN
M57	HQNGCLNANAGQ-NGSLLAGAYAI	STLITKELSKL-KNSEELNKKIEEAKNHSEFT	TNRLKGS
W	NQN-GLDADANHH-NGSLLAGAHAI	STLIKQKTDGL-KDLEGLSKEIAKVKECSDKFT	KLTD SH
VSDA	HQNGCLDTLSNQ-NGSLLAGAYAI	STLITKLDGL-KGSEGLKAEIAEAKKCCSEFT	KLKEKH
NBS23A	DNNGLSANQNH-NTSLLAGAYSIST	LIQKLSKL-KNLEGLKAEIAEAKKCCSEFT	KLKDNH
20047	QQN-GLVADAGH-NSALLAGAHESI	SILITQKLDGL-KGLEGLKAEIAEAKKYSEFT	KLKDNH
KL10	DQNSGLAFAATQN:KNTSLLAGAYAV	SALIKQKLDGL-QGPEGLNKEIEAFAKKCCSEFT	TNKLKEKH
IP90	DQNNGLAFAATQD:KNTSLLAGAYAI	SALIKQKLDGL-QGPEGLNKEIEAFAKKCCSEFT	TNKLKEKH
NBS1A3	DQNNGLAFAATQD:KNTSLLAGAYAI	SALIKQKLDGL-QGPEGLNKEIEAFAKKCCSEFT	TNKLKEKH
BITS	DRNNGLAVEANF-NTSLLAGAYTIST	LIQKLDGL-KNSGELKGEVEKAKKCCSEFT	NKLKEKT
KL11	RNDGTLTENEANR-NESLLAGAYEIS	KLITQKLSVL--NSEELKEKIEAKKCCSEFT	TKL RDSH
PBI	KNDGTLTENEANR-NESLLAGAYEIS	KLITQKLSVL--NSEELKEKIEAKKCCSQFT	TKLKDSH
H13	EAN-GLGNEADR-NTSLLAGAHESI	SILITQKLTAL-KDSGGLKAEIAEAKKCCSEFT	KLKDNH

* * * * *

Obr. 9a (pokračovanie)

228691	AVLGLDN---	LTDDNAQRAILK	KHAN-KDKGAELE	KLFXAVENLS	KAAQD	TLKNAVKEL	TSPIVAES	PKKP
22591	AEGLIAN-GA	ADANAKPAAIL	KTN	GT-KDKGAQ	QELEKL	FESVKNLS	KAAQETLN	NSVKELTS
II2	TDLGKGG---	VTDA	DAKEAILK	TNGT-KTKGA	AEELGKL	FESVEVLS	KAAKEMLAN	SVKELTS
225015	TELGKQD---	AQDDDAK	KAILR	THNT-KDKGA	AEELDKL	FXKZVENLS	KAAKEMLS	NS
ZS7	AQLGIQG---	VTDENAK	KAILKAN	AAGKDG	VEELES	KL	SGLESLS	KAAKEMLAN
297	TDLGKGG---	VTDDNAK	KAILK	TNND-KTKGA	DELEKL	FESVKNLS	KAAKEKIT	NSVKELTS
SIMON	TDLGKEN---	ATDEDAK	KAILK	TDAT-KDKGA	AELEKL	SES	VASLV	KAAQEAL
E61	TELGKQD---	ANDDDAK	KAILK	TNGD-KTLGA	AELEKL	SES	VTLS	KAAKESLT
ORTH	AQLGIDG---	ATDND	SKAEAIL	KTN	GT-KTKGA	AEELVKL	SES	VASLS
ACAI	ADLGKQG---	VNDDDAK	KAILK	TNAD-KTKGA	AEELGKL	FXKSVGL	VKAAQEAL	TNSVKELTS
H9	AEGLIA---	ATDENAK	KAILK	TNGT-KDKGA	AEELSKL	FXSVESL	AKAAKESL	TNSVKELTN
J1	AEGLVA---	ATDANAK	KAILK	TNGD-KTKGA	DEFEKL	FXKSVGL	LKAAQEAL	TNS
JSB	ADLGKQD---	ATDDHAK	KAILK	THAT-TDKGA	KEFKDL	FESVEGL	LKAAQ	VALTNSVKELTS
V5461	ADLGKHN---	ATDADSKE	AILK	TNGT-KTKGA	KELEEL	FXKSVESLS	KAAKEAL	NSVKELTS
M57	AQLGVAA---	ATDDHAK	EAAILK	SNPT-KDKGA	KELKDL	SES	VESLAKAAQEAL	TNSVKELTS
W	AQLGAVG-G	AINDDRAKE	AILK	THGT-NDKGA	KELKEL	SES	VESLAKAAQ	QAALANSVKELTS
VSDA	TELGVA---	ATDDNAK	KAILK	ANGD-KTLG	VEEELKL	FXKSVEXL	SKAAQEAL	TNSVQELTS
NBS23A	ADLGVA	NGASTDEN	AQKAILK	TNAI-VDKGA	KDLKEL	FESVEKL	SKAAQEAL	TNSVKELTS
20047	AQLGIQ-NG	ASLDD	EAKKAILK	TNVD-KTKGA	EELEKL	FXKSVESLS	KAAQEAL	TNSVKELTN
KL10	AELGVNG-G	DTTDDNAK	AAIFK	THPT-KDKG	VEDLEKL	SES	VKSLLKAAQ	AAALNSVKELTS
II290	QDLGVAN-G	DTTDDNNAK	PAAILK	THGT-EDKG	VKELKDL	LKSVESL	AKAAQ	QAASSNS
NBS1A3	QDLGVAN-G	DTTDDNNAK	AAAILK	THGT-EDKG	VKELKDL	LKSVESL	AKAAQ	QAASSNS
BITS	QELAVAA-G	AATDIDA	KKAILK	TNRD-KDLGA	DELGKL	FXKSVESLS	KAAQEAS	ANSVKELTS
KL11	AELGION---	VQDDNAK	RAILK	THGN-KDKGA	KELKEL	SESEKL	SKAAQ	QAALANSVKELTS
PBI	AELGIQS---	VQDDNAK	KAILK	THGT-KDKGA	KELEEL	FXKLSLS	SKAAQ	QAALTNS
H13	AQLGION---	VQDVEAK	KAILK	TNGD-ISKGA	KELKEL	FESVESL	AKAAQ	QAALANSVQELTS

Obr. 9a (pokračovanie)



Obr. 10

OspC skupiny a typy kmeňov	
OspC skupina	reprezentant
1	ZS 7
2	B31
3	297
4	H9
5	Orth
6	ACA1
7	JSB
8	E61
9	M57
10	W
11	KL10
12	BITS
13	KL11
14	20047
15	NBS23a
16	VS461
17	VSDA
18	2591
19	H13
20	28691

Obr. 11

Biologický a zemepisný pôvod kmeňa *Borrelia* a asociácia s CMAT a OspC typmi

kmeň	CMAT	sku- pina	RFLP	séro- var	človek	kliešť	zvíra	krajina
IRS	1.1.01	1	1	NT		<i>I. ricinus</i>		Švajčiarsko
ZS7	1.1.02	1	1	NT		<i>I. ricinus</i>		Nemecko
DK7	NT(1)	1	1	NA	pokožka (ACA)			Dánsko
VS215	1.1.02	1	1	01		<i>I. ricinus</i>		Švajčiarsko
VS219	1.1.02	1	1	01		<i>I. ricinus</i>		Švajčiarsko
27985	1.2.04	2	2	02		<i>I. dammini</i>		USA
B31	1.2.04	2	2	02		<i>I. dammini</i>		USA
HB4	1.2.04	2	2	02	krv			USA
IP1	1.2.04	2	2	02	CSF			Francúzsko
IP2	1.2.04	2	2	02	CSF			Francúzsko
26816	1.2.04	2	2	02			hraboš	USA
HB1	1.2.04	2	2	02	krv (myozitída)			Rakúsko
H3	1.2.04	2	2	NT	pokožka (EM)			Rakúsko
IP21	1.2.04	2	2	02		<i>I. persulcatus</i>		Rusko
25015	2.2.11	2	3	02		<i>I. dammini</i>		USA
297	1.2.04	3	4	NT	CSF			USA
H9	3.2.13	4	5	03	pokožka			Rakúsko
H10	3.2.13	4	5	03	pokožka			Rakúsko
H5	3.2.13	4	5	03	pokožka			Rakúsko
H1	3.2.13	4	5	03	pokožka			Rakúsko
J1	3.1.12	4	6	03		<i>I. persulcatus</i>		Japonsko
H7	3.2.13	5	7	04	pokožka (ACA)			Rakúsko
Gaul-								
tier	3.2.13	5	7	04	pokožka (EM)			Taliansko
H11	3.2.13	5	7	04	pokožka			Rakúsko
Orth	3.2.13	5	7	04		<i>I. ricinus</i>		Rakúsko
König	3.2.13	6	8	05		<i>I. ricinus</i>		Rakúsko
H2	3.2.13	6	8	05	pokožka			Rakúsko
ACA1	3.2.14	6	8	NR	pokožka (ACA)			Švédsko

Obr. 12

Biologický a zemepisný pôvod kmeňov *Borrelia* a asociácia s CMAT a OSpC typmi (pokračovanie)

kmeň	CMAT	sku- pina	RFLP	séro- var	človek	kliešť	zvíra	krajina
H15	3.2.13	6	8	06	pokožka			Rakúsko
H6	3.2.13	6	8	05	pokožka			Rakúsko
H14	3.2.13	6	8	05	pokožka (ACA)			Rakúsko
JSB	3.2.13	7	9	07	pokožka			Slovinsko
PKO	3.2.13	7	9	07	pokožka (EM)			Nemecko
DK26	NT(3)	7	9	NA	pokožka (EM)			Dánsko
P1H	3.2.13	7	9	07	pokožka (ACA)			Nemecko
H12	3.2.13	7	9	NT	pokožka (ACA)			Rakúsko
E61	3.2.13	8	10	08	pokožka (EM)			Česká rep.
Simon	3.2.13	8	11	09	pokožka			Rakúsko
IR210	4.2.18	9	12	10		I. ricinus		Rusko
KL5	4.2.18	9	12	10		I. ricinus		Česká rep.
M57	4.2.18	9	12	10	CSF			Česká rep.
H4	4.2.22	10	12	11	pokožka (EM)			Rakúsko
W	4.2.22	10	13	11	CSF			Rakúsko
MK6	4.2.18	11	14	12		I. ricinus		Maďarsko
KL10	4.2.18	11	14	12		I. ricinus		Česká rep.
NBS.	4.2.18	11	15	13	Neuroborrelióza			Švédsko
lab								
Lithu-								
ania	4.2.19	11	15	13		I. ricinus		Litva
IP90	2.1.09	11	16	13		I. persulcatus		Rusko
VSBM	4.2.18	12	17	NR	CSF			Švajčiarsko
BITS	4.2.17	12	17	NR		I. ricinus		Taliansko
PBI	NT(4)	13	18	NA	CSF			Nemecko
DK6	NT(4)	13	18	NA	CSF			Dánsko
VSPB	4.2.18	13	19	NR	CSF			Švajčiarsko
KL11	4.2.18	13	19	NR		I. ricinus		Česká rep.

Obr. 12 (pokračovanie)

Biologický a zemepisný pôvod kmeňov *Borrelia* a asociácia s CMAT a OspC typmi (pokračovanie)

kmeň	CMAT	sku- pina	RFLP	séro- var	človek	kliešť	zvíra	krajina
871. 104	4.2.17	13	18	NT CSF				Švédsko
KL6	4.2.18	13	19	NR		I. ricinus		Česká rep.
MK5	4.2.18	13	18	NT		I. ricinus		Maďarsko
E180	4.2.18	14	20	14 pokožka (EM)				Česká rep.
VS102	4.2.18	14	20	14		I. ricinus		Švajčiarsko
VS185	4.2.18	14	20	14		I. ricinus		Švajčiarsko
20047	2.1.08	14	20	14		I. ricinus		Francúzsko
NBS 23a	4.3.23	15	21	15 Neuroborrelióza				Švédsko
NBS 23b	4.3.23	15	21	15 Neuroborrelióza				Švédsko
VS461	3.2.13	16	22	16		I. ricinus		Švajčiarsko
C78	3.2.13	16	22	NT krv (NB)				Česká rep.
KC90	3.2.13	16	22	NT krv (kardiak)				Česká rep.
E51	3.2.13	16	22	16 pokožka (EM)				Česká rep.
VSDA	4.2.18	17	23	NR CSF				Švajčiarsko
2591	NT(1)	18	24	NA	myši s bielymi tlapkami			USA
H13	4.2.20	19	25	NR pokožka				Rakúsko
H8	4.2.20	19	25	NR pokožka				Rakúsko
28691	1.2.04	20	26	16		I. dammini		USA
Son 188	1.2.03	99	27	NT		I. pacificus		USA
27579	1.2.04	99	27	NT		I. dammini		USA
21347	1.2.05	99	28	NT	myši s bielymi tlapkami			USA
26815	1.2.06	99	29	NR		deňka		USA
28354	1.2.07	99	30	NR		I. dammini		USA

Obr. 12 (pokračovanie)

Biologický a zemepisný pôvod kmeňov *Borrelia* a asociácia s CMAT a OspC typmi (dokončenie)

kmeň	CMAT	sku- pina	RFLP	séro- var	človek	kliešť	zvier	krajina
19857	4.1.15	99	31	NT			králik	USA
19952	4.2.16	99	32	NT		I.dentatus		USA
NBS16	2.1.10	99	33	NR	Neuroborrelióza			Švédsko
153	4.2.21	99	34	16		I.ricinus		Francúzsko
VS116	NA	99	35	NT		I.ricinus		Švajčiarsko

Obr. 12 (dokončenie)

Frekvencia epitopu OspC proteínu medzi 77 kmeňmi testovanými membránovou ELISA pomocou série BBM monoklonálnych protilátok

BBM číslo	počet reakcií	sekvencia primárneho epitopu
BBM 22*	14	VKLS[ESVASL]SKAA
BBM 24*	2	
BBM 25	2	
BBM 27	2	
BBM 28	29	TDNDS[KEAIL]KTNGT
BBM 29	41	KELT[SPVVAET]PKKP
BBM 34	37	F[VLA VKEVET]L
BBM 35*	17	YA[ISTLITEK LK]AL
BBM 36*	12	
BBM 37	47	PNLTE[ISKKI]TDSNA
BBM 38	4	TDNDSKEAIL
BBM 39*	4	TDNDS[KEAIL]KTNGT
BBM 40*	23	ASAN[SVKELT]SPVV
BBM 41*	2	
BBM 42	49	S[PVVAETPKK]P
BBM 43*	32	SPVVAESP KK
BBM 44*	9	GK[KIQQNGL]GA
BBM 45	66	S[PVVAETPKK]P
BBM 46*	1	
BBM 47*	21	
BBM 48	6	
BBM 49*	9	
BBM 75	3	
BBM 76	3	
BBM 77*	3	

* znamená monoklonálne protilátky poslednýkrát použité v analýze sérovar

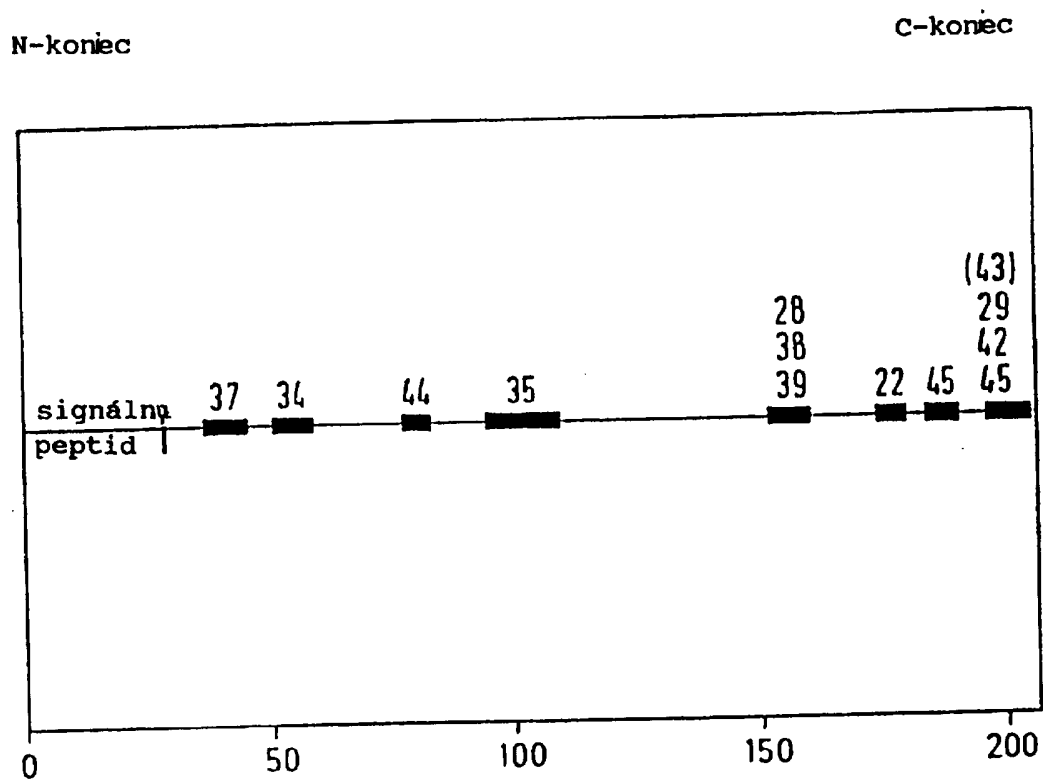
Obr. 13

II. Zoradenie frekvencií reakcií

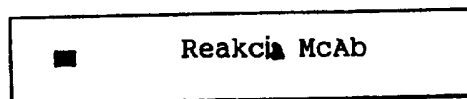
BBM číslo	počet reakcií		
	nízky (0 až 10)	stredný (10 až 24)	vysoký (>25)
frekvencia:	13	5	7

Obr. 13 (dokončenie)

Umiestnenie mapovaných OspC epitopov
na generalizovanom OspC proteíne



Peptid č. 1-0203



Obr. 14

Skrížená ochrana medzi proteínmi OspC z rôznych OspC skupín

pokus	testovaný OspC antigén		počet infikovaných/testovaných		
	OspC skupina	zdroj	imunizované		neimunizované
			test. OspC	Orth OspC ^a	
A	1	ZH7	10/10	1/10	10/10
B	5	H7	0/10	0/10	10/10
C	7	PKO	10/10	2/10	9/10
D	10	W ^b	9/10	5/10	10/10

^a Ospc skupina 5

^b s hydroxidom hlinitým ako pomocným činidlom a bez Titermaxu ako v pokusoch A až C.

Obr. 15

Súhrnné údaje a frekvencie špecifických anti OspC protilátok pri ľudskej humorálnej odpovedi

OspC sku- pina	OspC geno- typ	OspC séro- var	počet kmeňov	počet ľudských izolátov	kmeň použitý pri štúdiu frekvencie	frekven- cia (%)*
1	1	1	5	1	ZS7	6
2	2	2	9	5	B31 (IP2)	12
2	3	2	1	-		
3	4	-	1	1	297	6
4	5	3	4	4	H5	29
4	6	3	1	-		
5	7	4	4	3	ORTH	35
6	8	5	4	3	H14	12
6	8	6	1	1	H15	29
6	8	n.r.	1	1		
7	9	7	5	3	JSB	18
8	10	8	1	1	E61	12
8	11	9	1	1		
9	12	10	3	1	M57	6
10	13	11	2	2	W	0
11	14	12	2	-	KL10	0
11	15	13	3	1	NSBlab	0

Obr. 16

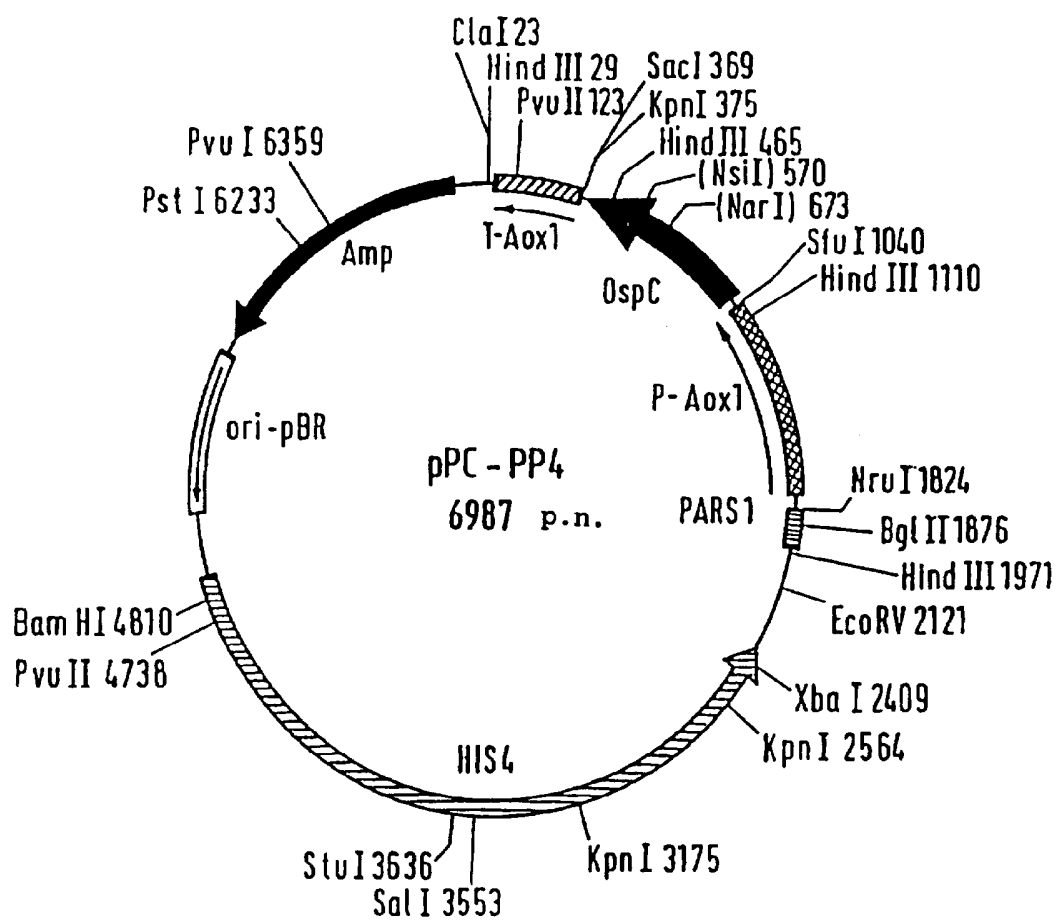
Súhrnné údaje a frekvencia špecifických anti OspC protilátok pri ľudskej humorálnej odpovedi (dokončenie)

OspC sku- pina	OspC geno- typ	OspC séro- var	počet kmeňov	počet ľudských izolát	kmeň použitý pri štúdiu frekvencie	frekven- cia (%)*
12	17	n.r.	2	1	BITS	0
13	18		2	1	KL11	6
13	19	n.r.	4	1		
14	20	14	4	1	20047	12
15	21	15	2	2		
16	22	16	4	3	VS461	6
17	23	n.r.	1	1		
18	24		1	-	H8	0
19	25	n.r.	2	2		
20	26	16	1	-		

* celkový počet pozitívnych OspC séra-17
n.r. znamená nereaktívny

Obr. 16 (dokončenie)

Plazmid pPC - PP4



Obr. 17

antigén	pomocné činidlo	vybraný kmeň	vybraná dávka	infikované/ /testované/
OspC	Titermax	Orth	$1 \cdot 10^4$	2/10
OspC/P. pastoris	Titermax	Orth	$1 \cdot 10^4$	0/10
žádný	Titermax	Orth	$1 \cdot 10^4$	9/10

Obr. 18

Príklady prostriedkov OspC vakcín určených na ochranu proti klonom alebo klonovým klastrom *Borrelia* ochorenia lymskou boreliózou súvisiacich so špecifickým ľudským ochorením

vakcína proti HDA klonu (CMAT 4) <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	vakcína proti HDA klonu (CMAT 13) <i>Borrelia afzelii</i>	vakcína proti HDA klonálnemu klastru (CMAT 17, 18, 20 a 22) <i>Borrelia garinii</i> sp.nov.
skupina 2	skupina 4	skupina 9
skupina 3	skupina 5	skupina 10
skupina 20	skupina 6	skupina 11
	skupina 7	skupina 12
	skupina 8	skupina 13
	skupina 16	skupina 14
		skupina 17
		skupina 19

Obr. 19

Koniec dokumentu