



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329227**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/20 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20010412	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.07.30 PCT/US99/17270
(22)	Inng.dag	2001.01.24	(85)	Videreføringsdag	2001.01.24
(24)	Løpedag	1999.07.30	(30)	Prioritet	1998.07.31, US, 94955
(41)	Alm.tilgj	2001.03.29			
(45)	Meddelt	2010.09.20			
(73)	Innehaver	Gundersen Lutheran Medical Foundation Inc, 1836 South Avenue, LaCrosse, WI 54601, US-, USA Ronald F Schell, 157 Neutilus Drive, Madison, WI 53706, US-, USA Steven M Callister, 2050 Grand View Boulevard, Onalsaska, WI 54650, US-, USA Steven D Lovrich, Onalaska, WI, US-, USA Dean A Jobe, LaCrosse, WI, US-, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Acapo AS, Postboks 1880 Nordnes, 5817 BERGEN, Norge			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av borreliacidal(e) epitoper av <i>Borrelia burgdorferi</i> ytre overflateprotein C som vaksine			
(56)	Anførte publikasjoner	WO974221, WO9425596			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives et OspC Dra-fragment fusjonsprotein isolert fra *Borrelia burgdorferi* for å hindre, behandle og tidlig diagnostisere Lyme-sykdom i mennesker og andre dyr. Oppfinnelsen vedrører også screeningsmetoder for å detektere anti-OspC borreliacidal antistoffaktivitet, og antistoff som reagerer med et proteinfragment som kodes for av Dra-Smal DNA-fragment av OspC.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et isolert immunogenisk polypeptidfragment av OspC av *Borrelia burgdorferi*, et isolert polypeptid, et isolert DNA-molekyl, en ekspresjonsvektor, en farmasøytisk sammensetning for å vaksinere mot, og for å behandle borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker, anvendelse av et isolert polypeptid, en fremgangsmåte for å detektere borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker, samt et kit for diagnostisering av borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker.

Derved vedrører den foreliggende oppfinnelse materialer og fremgangsmåter som er nyttige for å hindre, og behandle og tidlig diagnostisere Lyme-sykdom i mennesker og andre dyr. Nærmere bestemt vedrører foreliggende oppfinnelse polypeptider av ytre overflateprotein (OSP) som er i stand til å utløse, i en pasient, dannelsen av en spesifikk immunrespons som er effektiv for å diagnostisere, predikere suksessfull utrydding av infeksjon eller beskytte mot Lyme-sykdommen i en mammalske vert. Oppfinnelsen vedrører også screene-metoder for å detektere anti-Osp borreliacidale antistoffaktivitet, og antistoff som reagerer med et proteinfragment kodet for av et DraI-SmaI DNA-fragment av OspC. Også innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse er et diagnosekit omfattende antistoffer eller polypeptidene, og vaksiner som anvender borreliacidale epitoper av OspA, OspB eller OspC eller et konserverte DNA-sekvensfragment sammen med eller uten en vaksinebærer.

Lyme-sykdommen (Lyme borreliosis) spredes med et bitt fra en infisert midd, og er den mest vanlige rapporterte blodmiddbårede infeksjon i Europa og i Nord-Amerika. Denne multiforstyrrelse har forårsaket signifikant dødelighet verden over.

Lyme-sykdommen er forårsaket av spirocheten *Borrelia burgdorferi* (*B.b*), som i hovedsak overføres ved blodmating av *Ixodes spp* blodmidd. Innledningsvis infiserer spirochetene huden, og i de fleste av de tidligere tilfeller, forårsaker en skade i erythema migrans (2). De som blir

rammet trenger ikke bli syk før etter uker, og nervesystem-symptomer (hodepine, svimmelhet, høreproblemer, prikking og konsentrasjonsvansker) trenger ikke å forekomme før etter uker eller måneder. Det er kjent at infeksjon kan spredes
5 til nervesystemet eller ledd, og risikoen for nevrologiske komplikasjoner eller komplikasjoner i ledd øker jo lenger sykdommen får foregå ubehandlet. Infeksjonen kan være asymptomatisk, eller ha en rekke kliniske presentasjoner avhengig av det vev som er angrepet, infeksjonens varighet,
10 vertfaktorer såsom immunsystemets sårbarhet og immunogeniske faktorer som kan predisponere en pasient for utvikling av visse komplikasjoner.

Behandlingen av symptomatiske pasienter foregår i dag med en rekke antibiotika, f.eks. tetracykliner, penicillin
15 og cefalosporiner, men forsøk viser blandete resultater. Dersom den ikke blir behandlet kan bakteriene spredes til det sentrale nervesystem, hjerte, hjerne eller ledd, og forårsake arthrititis, hjerteinfeksjoner og neurologiske problemer, og i sjeldne tilfeller død (3-6).

20 Ved infeksjon med *Borrelia* starter B-celler i kroppen å produsere antistoff som gjenkjenner den fremmede organisme. Det er minst to funksjonelle typer antistoff produsert i respons til en *Borrelia* infeksjon. En respons er en ikke-spesifikk binding/opsonering (belegging) respons
25 som «markerer» antigenet og kan resultere i et opptak av B.b. av fagocytiske celler. Disse ikke-spesifikke antistoff produseres mot proteiner som er felles for flere bakterieformer (viz. 41 kDa proteiner for mange bakterielle flageller). Disse antistoff vil således gjenkjenne og
30 koples til liknende antigener på andre bakterier. På grunn av dette er diagnostiske tester som detekterer disse ikke-spesifikke binding/opsonerings antistoff generelt ikke-spesifikke.

En andre funksjonell antistoffrespons er produksjon av
35 *Borrelia*-spesifikt antistoff som spesifikt gjenkjenner epitoper på noen av proteinene på B.b. organismer. Etter feste av disse antistoff til B.b. organismene vil komplement interagere med antistoffene for

å danne et membranangreps kompleks som dreper *B.b.*-organismene uten hjelp av de utryddende phagocytiske celler. Denne sterkt spesifikke borreliacidale antistoffrespons er ofte detekterbar i løpet av de to første uker etter infeksjon. Suksessrik deteksjon og indusjon av borreliacidale antistoff får økende viktighet i Lyme-sykdomsdiagnostikk, og hindring og utrydding.

Kort tid etter oppdagelse av Lyme-borreliosis, bestemte forskere at vaksinerings av eksperimentdyr med hele *B.b.* tilveiebrakte beskyttelse mot utfordringen (7,8). Ytterligere forsøk etablerte rollen for antistoff-mediert beskyttelse, og bekreftet evnen til vaksinerings med *B.b.* til å indusere antistoff som tilveiebrakte beskyttelse mot *B.b.* infeksjon (9-11). Opptil i dag har vaksinerings av dyr med Osp'er av *B.b.*, spesielt OspA (12-14), OspB (12,14), og OspC (14-16), tilveiebrakt beskyttelse mot infeksjon med Lyme-spirocheten. Beskyttelse etter vaksinerings med OspA og OspB har blitt vist å være grunnet i induksjon av borreliacidale antistoff som spesifikt dreper *B.b.*-organismene (13,14,17-24). I motsetning har anti-OspC borreliacidale antistoff ikke blitt detektert etter vaksinerings (14-16), og forskere har postulert at beskyttelse etter vaksinerings med OspC skyldes andre mekanismer (16).

De fleste forsøk opptil i dag på å utvikle en OspA-vaksine har i hovedsak fokusert på de store mengder OspA uttrykt på overflaten av mange *B.b.* laboratorieisolater. I dag har de fleste borrelia spirocheter ytre overflater som omfatter i hovedsak OspA. Derfor har det blitt antatt at å indusere borreliacidale antistoff mot OspA vil tilveiebringe beskyttelse mot spirochetene. SmithKline Beecham (Philadelphia, Penn.) og Pasteur Merieux Connaught (Lyon, France) har utviklet vaksiner basert på dannelsen av borreliacidale antistoff mot OspA. SmithKline Beecham-vaksinen har blitt godkjent for generell bruk, og vaksinen til Pasteur Merieux Connaught undersøkes i dag av U.S. Food and Drug Administration. Som man kan forvente har OspA-vaksiner blitt vist å være effektive i dyremodeller dersom

dyrene har blitt utfordret med en nål. I tillegg har OspA-vaksinering gitt beskyttelse mot blodmidd infisert med *B.b.* Imidlertid har beskyttelse mot en blodmiddutfordring vært avhengig av nærvær av høye nivåer av anti-OspA-borreliacidale antistoff. Schwan et al (28) har nylig vist at spirocheter i infiserte blodmidd nedregulerer OspA på deres overflate ved inntak av et blodmåltid. Dermed må OspA-vaksiner indusere høye titer av anti-OspA borreliacidale antistoff for å ødelegge spirochetene i midttarmen av infisert blodmidd før de nedregulerer OspA. Derfor er varighet av høye titer av anti-OspA borreliacidale antistoff en kritisk faktor i langtids effekt av en OspA-vaksine.

Søkere av foreliggende patentsøknad har nylig dokumentert en kommersiell OspA-vaksinering manglende evne til å opprettholde det adekvate nivået til anti-OspA borreliacidale antistoff i mennesker (23). Det er også usannsynlig at en anamnestic respons vil forekomme hurtig nok til å eliminere *B.b.* organismer fra infiserte blodmidd. Til støtte, har infeksjoner med *B.b.* blitt dokumentert i OspA-vaksinerte mennesker og hunder (26,27). Disse resultater understreket behovet for å evaluere andre Lyme-borreliosis vaksinekomponenter.

I tillegg vil Lyme-sykdommen vanligvis diagnostiseres ved å detektere antistoff i blodet eller spinalvæske, men de mest vanlige tester som anvendes er ofte unøyaktige. Falske-negative, eller mer vanlig, falske-positive resultater fortsetter å ødelegge for serodiagnose av Lyme-sykdom. Flere regimer som anvender konvensjonelle diagnostiske analyser har blitt utviklet for mer nøyaktig å detektere Lyme-sykdom. Dessverre har liten forbedring forekommet, og feildiagnoser fortsetter å forårsake konstante økonomiske og helsemessige effekter. I tillegg vil den nylig godkjente OspA-Lyme-sykdomsvaksinen videre «forvirre» konvensjonell diagnostisk testing. Det er således fremdeles behov for en sensitiv og spesifikk Lyme-test som kan gjøres bredt tilgjengelig som et kommersielt

kitt og som kan diskriminere mellom vaksinerte individer og pasienter med Lyme-sykdom.

Deteksjon av borreliacidale antistoff kan også løse dette problem. Borreliacidale antistoff har blitt vist å
5 fungere som basis for en sensitiv og sterkt spesifikk serodiagnostisk test (17,25-27). Faktisk har en diagnoseanalyse for Lyme-sykdom, som detekterer denne antistoffrespons, tidligere blitt utviklet, patentert (37), og er kommersielt tilgjengelig. Denne test er basert på
10 deteksjon av sterkt spesifikke borreliacidale antistoff som induseres av flere *B.b.* Osp'er kort tid etter infeksjon. Det er viktig å bemerke at dersom tilstrekkelig høye nivåer av borreliacidale antistoff induseres ved vaksinerings så beskyttes den vaksinerte. Imidlertid, dersom et individ
15 infiseres før de borreliacidale antistoff foreligger, kan personen få Lyme-sykdom til tross for nærvær til slutt av høye konsentrasjoner av borreliacidale antistoff. Denne test gir en mer sensitiv og spesifikk alternativ løsning for påvisning av Lyme-sykdom. I tillegg vil antistoff
20 detektert av den borreliacidale antistofftest ikke korrelere med antistoff detektert ved konvensjonelle analyser. I forsøk med hamster ble deteksjon av borreliacidale antistoff redusert med eliminering med av *B.b.* fra verten (43). I motsetning forble antistoff-
25 responsen detektert ved konvensjonelle analyser fortsatt høye, eller fortsatte å stige. Disse resultater antyder at testen med borreliacidale antistoff er en prognoseindikator for klaring av spirocheter.

Callister et al. (30) viste nylig muligheten for å øke
30 sensitiviteten for borreliacidale antistofftest mens man fortsatt opprettholdt den fortreffelige spesifisitet gjennom anvendelse av et testantigen (*B.b.* 50772) som ikke inneholder OspA eller OspB på overflaten. Den forbedrede sensitivitet med *B.b.* 50772 foreslås av søkerne av
35 foreliggende oppfinnelse å skyldes deteksjon av borreliacidale antistoff av OspC eller andre Osp'er. Disse resultater øker sterkt evnen av den borreliacidale

antistoffprosedyren beskrevet i US-patent 5.385.826, av Schell et al.

I tillegg har flere forsøk vist evnen av vaksinerings med OspC til å beskytte laboratoriedyr mot nålutfordring
5 (14-15) og naturlig infeksjon (16). En nylig undersøkelse har vist at passiv overføring av immunserum til OspC kan løse problemet med arthritis, carditis og infeksjon med *B.b.* (44). Disse resultater viser at vaksinerings med OspC kan være mer effektiv enn vaksinerings med OspA. Imidlertid,
10 siden høye konsentrasjoner av anti-OspC borreliacidale antistoff ikke har blitt detektert i immunserum (14-16), så har det vært spekulasjoner om at ytterligere mekanismer er ansvarlig for OspC-medierte beskyttelse (16). Å ikke vite mekanismen gjør det langt mer vanskelig å forfølge en OspC
15 Lyme-sykdomsvaksine. I tillegg har forfølgelse av OspC som en kandidat for Lyme-borreliosis-vaksine blitt hindret på grunn av at OspC synes å være mer immunogen og genetisk heterogen enn OspC (35-37), noe som har forårsaket at forskere spekulerer i at utvikling av en omfattende OspC-
20 vaksine er økonomisk ugunstig. Imidlertid har Schwan et al (28) nylig vist at relativt store mengder OspC hurtig syntetiseres av *B.b.* kort tid etter feste av en infisert blodmidd til mammalsk vert, og at OspA ikke lenger uttrykkes i høye konsentrasjoner på overflaten av *B.b.*

25 Det er nylig blitt rapportert at *B.b.* organismer oppregulerer OspC, og samtidig nedregulerer OspA kort tid før blodmiddinokkulering av verten med spirocheten (31,32). Dette forklarer hvorfor anti-OspC-antistoff er blant de første antistoffresponser detektert i pasienter med tidlig
30 Lyme-borreliosis. Som en respons til dette har flere forskere forsøkt, eller forsøker å utvikle enzymkomplett immunosorbente analyser (ELISA) ved anvendelse av hele rekombinante OspC-proteiner (38-42). Disse diagnoseanalyser har vært ganske sensitive, men mangler fortsatt spesifisitet. I tillegg har anti-OspC-antistoffresponser detektert
35 med disse analyser forblitt forhøyet, eller har fortsatt å utvide seg selv etter klaring av *B.b.* fra verten. Spesiell bekymring knytter seg til utsiktene for OspC til å kryss-

reagere med antistoff i serum fra pasienter til andre sykdommer, som cytomegggalovirus (CMV) eller Epstein-Barr (EBV) og gi en falsk positiv reaksjon. På grunn av denne signifikante mangel på spesifisitet og mangel på

5 prognosepotensiale forblir OspC ELISAer ikke ideell.

Således er det isolerte immunogeniske polypeptidfragmentet av OspC av *Borrelia burgdorferi* i følge oppfinnelsen kjennetegnet ved at det består av en

10 etitop av OspC som har en immunosyresekvens som angitt i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2. Likeledes er det isolerte polypeptidet i følge oppfinnelsen kjennetegnet ved at det har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, og det Isolerte DNA-molekylet kjennetegnet ved

15 at det koder for et polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 SEQ. ID. NO: 2, og ekspresjonsvektoren kjennetegnet ved at den omfatter en isolert DNA som koder for et polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO:

20 2. Således er den farmasøytiske sammensetningen i følge oppfinnelsen kjennetegnet ved at den omfatter en mengde av et isolert polypeptid med en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, idet mengden er effektiv for å hindre eller for å behandle borrelia-infeksjoner i

25 pattedyr.

Således er anvendelsen følge oppfinnelsen kjennetegnet ved at et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, anvendes for fremstilling av et medikament for å hindre og behandle

30 borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker.

Således er fremgangsmåten i følge oppfinnelsen kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter:

- a) å sette et kroppsfluid fra en mammalsk vert som er mistenkt for å lide av borreliainfeksjon, i

35 forbindelse med et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, og deretter

- b) bestemme om det isolerte polypeptid konjugeres

til antistoff som foreligger i kroppsfluidet i den mammalske vert, idet nærvær av konjugering indikerer nærvær av borrelia-infeksjon i verten.

Således er kittet i følge oppfinneslen kjennetegnet
5 ved at det omfatter et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, arrangert i en dertil egnet beholder, og med instruksjoner for anvendelse.

Videre utførelser av oppfinnelsen er beskrevet i de
10 uselvstendige kravene.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et isolert, immunogenisk polypeptidfragment av OspC fra *Borrelia burgdorferi* som i hovedsak består av en epitop av OspC som
15 har en aminosyresekvens med enheter 145 til 194 i SEQ, ID. NO: 2.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2.

20 Den foreliggende oppfinnelse vedrører også et isolert DNA-molekyl som koder for et polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en ekspresjonsvektor omfattende et isolert DNA-molekyl som
25 koder for et polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2.

Videre vedrører foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk materiale for å vaksinere mot, eller for å
30 behandle borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker, idet materialet omfatter en mengde av et isolert polypeptid i hovedsak med en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, idet mengden er effektiv for å hindre eller behandle borrelia-infeksjon i pattedyr.

35 Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en anvendelse av et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, for fremstilling av et medikament for å hindre hindre

og/eller behandle borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også et kitt for å diagnostisere borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert
5 mennesker, idet kittet omfatter et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, anordnet i en egnet beholder dertil, og instruksjoner for anvendelse av kittet.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en
10 fremgangsmåte for å detektere borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker, omfattende å sette et kroppsfluid fra mammalsk vert, som er mistenkt for å lide av borrelia-infeksjon, i forbindelse med et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter
15 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, og deretter bestemme om det isolerte polypeptid er konjugert til antistoff som foreligger i kroppsfluidet fra den mammalske vert, hvor nærværet av konjugering indikerer nærvær av borrelia-infeksjon i verten.

20 Fortrinnsvis «forvirres» ikke polypeptidet ifølge oppfinnelsen av tidligere vaksinerings av Lyme-sykdom. Deteksjon av anti-OspC borreliacidale antistoff mot Dra-fragmentet er nyttig for diagnostisering av Lyme-sykdom i pasienter fra alle steder i verden, og også for vaksinerings
25 mot Lyme-sykdom forårsaket av *Borrelia* ssp. Det er tre hovedformer av Lyme-sykdomsspirocheter som ikke er kjent: *B.b.*, *B. garinii* og *B. afzelii*. Oppfinnerne har detektert anti-OspC borreliacidale antistoff i pasienter fra Slovenia infisert med *B. afzelii*. De detekterte disse anti-OspC
30 borreliacidale antistoff ved anvendelse av *B.b.* 50772, det samme isolat som ble anvendt for å detektere en respons i pasienter infisert med *B.b.* Således synes Dra-fragmentet av OspC å være konserveret i alle borrelia-former.

En Dra-fragmentbasert ELISA er en utmerket komplement-
35 test til den borreliacidale antistofftest. Viktigere er det at en Dra-fragmentbasert ELISA er enkel å fremstille som et kommersielt kitt idet det diskriminerer mellom pasienter vaksinert med tidlig Lyme-sykdom.

En test som detekterer borreliacidale antistoff mot de(n) borreliacidale epitop(er) av OspA og OspB i tillegg til OspC vil gi redusert kryssreaktivitet, økt spesifisitet, større nøyaktighet og færre falske positive diagnoser. Deteksjon av anti-OspC borreliacidale antistoff gir fordelaktig en tidlig diagnose som anti-OspA og anti-OspB borreliacidale antistoff ikke er i stand til. Imidlertid er identifiseringen av de(n) borreliacidale epitop(er) av OspB og OspA også verdifulle i tillegg til en diagnostisk test.

Inklusjon av borreliacidale epitoper av OspA og OspB med Dra-fragmenter av OspC gir også en mer komprehensiv Lyme-borreliosis-vaksine.

Ytterligere formål og fordeler ved foreliggende oppfinnelse vil fremgå av den påfølgende detaljerte beskrivelse av den foretrukne utførelse av oppfinnelsen, i forbindelse med de medfølgende tabeller og figurer.

Fig. 1 er et restriksjonskart over plasmid pX3-22. Det mørke felt representerer området inneholdende genet *B.b. S-1-20 ospC*.

Fig. 2 er et skjematisk diagram over trinnene anvendt for å etablere plasmid pX2-22-Dra som koder for OspC Dra-fragment-fusjonsproteinet.

Fig. 3 er et restriksjonskart over plasmid pX2-22-Dra. Det mørke felt representerer området inneholdende *B.b. S-1-10 ospC* Dra-fragmentgenet.

Fig. 4 er DNA og den kodete aminosyresekvens av Dra-fragment-fusjonsproteinet. Området som er innfelt i boksen er DNA og predikert aminosyresekvens som er unik for OspC-Dra-fragment av *B.b. S-1-10*. Se også SEQ ID NO:1.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører identifisering og karakterisering av epitopen(e) av OspC som er ansvarlig for å indusere borreliacidale antistoff kort tid etter infusjon med *B.b.* Denne antigenterminant tilveiebringer et overlegent diagnostisk antigen som detekterer tidlig Lyme-sykdomsinfeksjon, predikerer suksessrik utrydding av organismen fra verten, og diskriminerer mellom individer med Lyme-sykdom og som har blitt vaksinert med en OspA-

Lyme-sykdomsvaksine. I tillegg er de(n) borreliacidale OspC-epitop(er) nyttige som en vaksine mot infeksjon med *B.b.* og de borreliacidale antistoff generert mot OspC-epitopen er nyttig som terapi for å løse etablert *B.b.* infeksjon og sykdom.

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har påvist anti-OspC borreliacidale antistoff. Oppdagelsen av antistoffene i Lyme-sykdomssera som spesifikt dreper *B.b.* 50772 (*infra.*), et blodmiddisolat som ikke har genene for å kunne fremstille OspA eller OspB, førte oppfinnerne til den spekulasjon at overflateproteinet var OspC og at en sterkt spesifikk borreliacidale antistoffrespons ble generert av dette protein.

I et tidligere forsøk fant Schwan et al (28) at idet et blodmidd ble matet på et menneske, utløste opptaket av blod *B.b.*-organismene til å nedregulere OspA og OspB, og oppregulere OspC. Søkerne av foreliggende oppfinnelse spekulerte dermed i at dette sannsynligvis hadde noe å gjøre med spirochetens evne til å passere fra blodmidden og inn i mennesket. Hypotesen var at spirocheten trenger OspC for å overleve i en ny vert. Hypotesen var derfor at spirocheten stenger ned OspA og OspB, og plasserer dermed OspC på dets overflate, og anti-OspC-antistoff vil derfor være mer effektive i å hindre infeksjon med *B.b.*

Dersom OspC faktisk induserer en tidlig *B.b.* borreliacidale antistoffrespons så følger det at deteksjon av denne sterkt spesifikke antistoffrespons kan anvendes for å detektere Lyme-sykdom mer nøyaktig, og å monitorere eliminering av organismen etter terapi bedre enn med andre diagnostiske analyser som ikke detekterer anti-OspC borreliacidale antistoff.

Dra-fragmentet

Ved å trekke dette videre oppdaget oppfinnerne at borreliacidale epitop(er) er lokalisert på et lite fragment på OspC-proteinet. Genet for OspC-protein har en totallengde på ca. 600 basepar (bp). DNA som koder for det borreliacidale fragment er ca. 151 bp. Dette fragment er

unikt for borrelia. Med henvisning til eksempel 2 er DNA-sekvensen av *DraI-SmaI ospC*-genfragmentet (OspC Dra fragment) vist i fig. 4. Den kodete aminosyresekvens for dette «trunkerte» fusjonsprotein er også vist i fig. 4.

5 Fragmentet benevnes Dra-fragmentet, i hovedsak på grunn av at *DraI* er det restriksjonsenzym som ble anvendt for å kutte DNA-sekvensen ved et bestemt sted av baser som representerer enzymets gjenkjenningssete. Ved å anvende delen av *ospC*-genet som inneholder borreliacid(e)
 10 epitop(er), forbedres spesifisiteten og det prognostiske potensiale for den diagnostiske test, uten signifikant tap av sensitivitet.

Dra-fragmentet av OspC-proteinet er også en mer levedyktig vaksinekomponent sammenlignet med full-lengde
 15 OspC-proteinet. Ved å eliminere resten av OspC-proteinet minimeres vaksineringsproblemer på grunn av at de andre deler av proteinet ikke foreligger, og dermed elimineres vaksineringsbieffekter noe som gjør det enklere å indusere, opprettholde og monitorere den effektive beskyttende
 20 antistoffrespons. I tillegg kan immunoresponsen enkelt forhøyes mot kun den beskyttende del av OspC-proteinet ved å kombinere Dra-fragmentet med en adjuvans såsom tetanustoksoid eller andre vaksineadjuvanter som forårsaker immunresponsen til å økes. OspC-Dra-fragmentet kan også
 25 syntetiseres *de novo* ved anvendelse av konvensjonell løsnings- eller fastfase-peptidkjemi.

Vaksine-kandidat

Anvendelse av den borreliacidale antistofftest for å
 30 monitorere nivåene av anti-OspA borreliacidalt antistoff har gitt viktig innsikt med hensyn til effektiviteten av dagens OspA borreliosis-vaksiner (13,21,23). Faktisk er borreliacidale antistofftester kjennetegnet for monitorering av OspA-Lyme-sykdomsvaksinens evne til å
 35 tilveiebringe beskyttelse. Vaksinerings av gerbiler og laboratoriemus med OspC fører også til fullstendig beskyttelse mot eksperimentell utfordring og/eller blodmidd-bårete infeksjoner med homologe *B.b.* isolater. I

tillegg kan forskjellig vaksinerings med OspA, og vaksinerings med OspC også resultere i klaring av spirocheter og lindring av symptomer selv om det administreres etter infeksjon med *B.b.* En Osp-vaksine vil
 5 derved være et verdifullt tillegg for å lindre virkningen av Lyme-sykdom.

Som angitt tidligere har forskere ikke tidligere funnet bevis for at OspC-vaksiner gir beskyttelse ved å inducere borreliacidale antistoff. Andre forskere har ikke
 10 detektert anti-OspC borreliacidale antistoff etter vaksinerings til tross for OspC-vaksinerings til å inducere beskyttelse. Våre resultater bekrefter imidlertid at OspC faktisk inducerer borreliacidale antistoff, og andre forskere vil hurtig realisere at de mest sannsynlig ikke er
 15 i stand til å detektere anti-OspC borreliacidale antistoff på grunn av at de anvendte en *B.b.* organisme, for testing som ikke uttrykte OspC på overflaten.

I dag anvender ingen vaksiner isolert borreliacidale(e) epitop(er). Den foreliggende oppfinnelse beskriver
 20 anvendelse av borreliacidale(e) epitop(er) av OspC, som en diagnostisk test for, og som en vaksine mot Lyme-sykdom.

Farmasøytisk materiale

Som et farmasøytisk materiale omfatter foreliggende
 25 oppfinnelse en farmasøytisk akseptabel bærer og en terapeutisk effektiv mengde av OspC-Dra-polypeptidet ifølge oppfinnelsen. Med termen «terapeutisk effektiv mengde» benevnes den mengde av polypeptidet eller antistoffet som, idet det administreres til et dyr, utløser en immunrespons
 30 som er effektiv til å hindre eller redusere alvorligheten, for en viss tidsperiode av *B.b.* infeksjon.

Administrering av polypeptidet eller antistoffer ifølge oppfinnelsen til dyret, kan utføres på en rekke standardmåter. Fortrinnsvis, dersom et polypeptid anvendes,
 35 vil det administreres ed en farmasøytisk akseptabel adjuvans, såsom fullstendig eller ufullstendig Freund's adjuvans, RIBI (muramyl dipeptider) eller ISCOM (immunostimulerende komplekser). Slike adjuvanter kan

beskytte polypeptidet fra hurtig oppløsning ved å «sekvestrere» det i en lokal avleiring, eller de kan inneholde substanser som stimulerer verten i å sekrere faktorer som er kjemotaktiske for makrofager og andre komponenter av immunsystemet. Fortrinnsvis, dersom polypeptidet administreres, vil immunoseringsregime involvere 2 eller flere administreringer av polypeptider, spredt over en tidsperiode på flere uker.

Det farmasøytiske materialet kan anvendes for å behandle eller hindre Lyme-sykdom i forskjellige dyr, inkludert mennesker. Det farmasøytiske materialet kan være i en rekke konvensjonelle former, såsom tabletter, piller, pulvere, væsker eller suspensjoner, kapsler, stikkpiller, injiserbare og infuserbare løsninger, slik det er kjent innen fagfeltet. Den foretrukne form avhenger av den tiltenkte modus for administrering, og den profylaktiske applikasjon. Imidlertid er i de fleste tilfeller den foretrukne administreringsvei parenteral, og i de fleste tilfeller intramuskulær.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et kitt for diagnostisering av borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker. Kittet omfatter et isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, anordnet i egnet beholder dertil, og instruksjoner for anvendelse av kittet. Fortrinnsvis har det isolerte polypeptid en aminosyresekvens som vist i SEQ. ID. NO: 2.

Eksempler

For å bedre illustrere foreliggende oppfinnelse tilveiebringes de påfølgende eksempler. Eksemplene som gir henvisning til de medfølgende figurer er kun tiltenkt som illustrasjonsformål og for å lette en bedre forståelse av oppfinnelsen. Eksemplene skal ikke begrense rammen av oppfinnelsen slik den er beskrevet og angitt i patentkravene.

Eksempel 1

Dette eksempel illustrerer *B.b.* OspCs evne til å indusere høye nivåer av borreliacidale antistoff idet det administreres kort tid etter *B.b.* infeksjon.

5 Materialer og metoder

10 Organismer. *B.b.* sensu stricto isolat 297 (deponert ved American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110 under ATTC Accession Number 53899) ble isolert fra humant spinalfluid. *B.b.* sensu
 10 stricto isolat 50772 (deponert med American Type Culture Collection den 30. juli 1999, i samsvar med Budapest traktaten), opprinnelig isolert fra en *I. scapularis* blodmidd, var tilgjengelig fra John F. Anderson (Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven,
 15 Connecticut). Blodmidden mangler OspA/B operonet, og uttrykker dermed ikke OspA eller OspB (25). Den opprinnelige suspensjon av spirocheter ble seriefortynnet 10 ganger i Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) medium i stand til å støtte vekst fra en enkelt organisme (46). Den
 20 resulterende populasjon av spirocheter ble deretter passert 10 ganger i ferskt BSK-medium ved 30°C eller 35°C, dispensert i 200 µl alikvoter i 1,5 ml skrukorkrør (Sarstedt, Newton, North Carolina), og lagret ved -70°C inntil bruk. *E. coli* JM109 (Promega Corp., Madison,
 25 Wisconsin) ble anvendt i alle kloneforsøk.

Dyr 10 ukers gamle hunnkjønn C3H/HeJ-mus (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) ble oppbevart tre i hvert bur, ved omgivende temperatur. Næringsstoffer og vann var tilgjengelig *ad libitum*.

30 Sera Lyme borreliosis sera ble opptatt fra pasienter ved Gundersen Lutheran Medical Center, La Crosse, Wisconsin. Ti prøver Lyme borreliosis sera var fra individer med klinisk dokumentert enkelt eller multippelt erythema migrans skader. To av disse sera prøver var fra
 35 pasienter med dermale hudkulturer positiv for *B.b.* Serum fra et individ ikke disponert til *B.b.* sensu lato ble anvendt som en normal serumkontroll. Denne serumprøve ble testet av 516 laboratorier som deltar i den nasjonale «Lyme

Proficiency Survey» sponset av Wisconsin State Laboratory of Hygiene og College of American Pathologists, og ble rapportert som negativ for antistoff mot *B.b.* (31).

Western blotting Western blotting ble utført som tidligere beskrevet (17). Kort forklart ble *B.b.* 50772 celler kokt i en prøvebuffer i 5 min. og 150 µg totalt protein ble applisert på en 0,1% SDS-12% polyakrylamidgel (4% polyakrylamid stacking gel uten komb.). Proteinkonsentrasjoner ble bestemt med Bio-Rad proteinbestemmelseskit ved å følge produsentens instruksjoner (Bio-Rad Inc., Richmond, California). To geler ble kjørt samtidig i en elektroforeseenhet (SE600; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California) ved 55 mA i 3 timer med buffersystemet til Laemmli (32). Etter elektroforese ble proteinene overført til nitrocellulose i 3 timer ved 300 mA under betingelser beskrevet av Towbin et al. (33). Nitrocellulosen ble kuttet opp i strimler og blokkert med fosfatbuffret løsning (PBS)-0,3% Tween 20 detergent i 30 min. ved 22°C. Strimlene ble inkubert i 1 time ved 22°C med humant serum fortynnet 1:100 og vasket 3 ganger med PBS-0,05% Tween 20 detergent. Peroksidase-merket antihumant IgM eller IgG fra pepperrot (tunge og lette kjeder; Organon Teknika Cappel, Malvern, Pennsylvania) ble tilsatt, og strimlene ble inkubert i 30 min. ved 22°C. Etter inkubering ble strimlene vasket og utviklet (TMB Membrane Peroxidase Substrate System; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland).

Kloning og amplifisering av *ospC* genet Plasmid-anrikt DNA ble isolert fra sensu stricto isolat S-1-10 (13). DNAen ble anvendt som en templat for mangfoldiggjøring av *ospC*-genet ved anvendelse av GeneAmp-kittet (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut) (34). Primer ble anvendt ved en finalkonsentrasjon ved 1,0 µM i en 1,5 mM konsentrasjon av MgCl₂. Termiske cykliske parametre var 95°C i 5 minutter etterfulgt av 35 sykluser av følgende: 1) 95°C i 30 sek., 2) 50°C i 30 sek., 3) 72°C i 90 sek. Den finale ekstensjon ble utført ved 72°C i 7 min. for fullt ut å utvide ethvert trunkert DNA-tråd. Den amino-

terminale primer C1 (5'-
 CGTGGATCCATGAAAAGAATACATTAAGTGCATA-3') og den karboksy-
 terminale primer C2 (5'-AATCCCGGGTTAAGGTTTTTTTGGACTTTCTGC-
 3') ble anvendt for mangfoldiggjøring. Understrekninger
 5 indikerer regioner gjenkjent av primerne. Mangfoldiggjort
 DNA ble rensset ved anvendelse av GeneClean (Bio101, La
 Jolla, California). Etter oppkutting med *SmaI* og *BamHI*
 (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland), rensete DNA-fragmenter
 ligert inn i PinPoint pXa-3 vektor (Promega Corp., Madison,
 10 Wisconsin) med T4 DNA-ligase (Gibco BRL, Rockville,
 Maryland). Ligeringsblandingen ble anvendt for å
 transformere kompetent *E. coli* JM109. Transformert *E. coli*
 ble utsådd på 2xTY medium inneholdende ampicillin (100 µg
 per ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), og
 15 inkubert i 24 timer ved 37°C. Kolonier som uttrykker *OspC*
 ble detektert med Western blott analyser ved anvendelse av
 streptavidin-pepperrot-peroksidase konjugat (Gibco BRL), og
 et tidlig Lyme-sykdomsserum inneholdende anti-*OspC*
 antistoff.

20 DNA-sekvensen av *ospC*-genet ble bestemt med
 dobbelttrådet sekvensering (TaqTrack, Promega, Madison,
 Wisconsin). Analyser og BLAST-søk ble utført ved anvendelse
 av GCG-programvaresystem (GCG, Madison, Wisconsin). *ospC*-
 genet av *B.b. sensu stricto* S-1-10 var tilsvarende (78,5%)
 25 til *B.b. sensu stricto* B31 (35). I tillegg var S-1-10 *OspC*-
 nukleotidsekvensen forskjellig ved 3 baser (98% homologi)
 med *B.b. sensu stricto* B31 (36).

Rensing av rekombinant *OspC*. *E. coli* inneholdende
OspC-genet fikk vokse i 100 ml 2xTY inneholdende ampicillin
 30 i 12 timer ved 37°C. Kulturen ble fortynnet 1:10 med 2xTY,
 og inkubert i ytterligere 1 time. Isopropyl-β-D-
 tiogalaktopyranosid (finalkonsentrasjon 0,1 mM, Sigma) ble
 tilsatt til kulturen og inkubert i ytterligere 4 timer.
 Suspensjonen ble sentrifugert ved 10.000 x g i 15 min. ved
 35 4°C, resuspendert i rensebuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 50 mM
 NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) og lysert med en
 sonikator (Model W350; Branson Sonic Power Co., Danbury,
 Connecticut). Sonikert *E. coli* ble sentrifugert ved 10.000

x g i 15 min. og supernatanten ble overført til en kolonne inneholdende SoftLink resin (Promega, Madison, Wisconsin) med en hastighet på 0,5 ml per min. ved 4°C. Kolonnen ble deretter vasket med 5 kolonnevolumer rensebuffer. OspC ble eluert med 5 mM biotin (Sigma), og de gjenvunnete fraksjoner ble analysert med SDS-PAGE.

OspC ELISA. Rekombinant OspC ble fortynnet til 750 ng/mL i coatebuffer (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,6), og 100 µl mengder ble tilsatt til individuelle flatbunnete mikrotiterbrønner (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA). Mikrotiterplatene ble inkubert ved 35°C i 4 timer, etterfulgt av en inkubering over natten ved 4°C. Etter inkubering ble platene vasket 3 ganger med fosfatbuffret saltløsning (PBS, pH 7,2) inneholdende 0,05% TWEEN 20 detergent forseglet og lagret ved 4°C. Før anvendelse ble platene blokkert med PBS-0,05% TWEEN 20 detergent inneholdende 1% bovint serumalbumin i 30 min. ved 22°C, vasket 2 ganger med PBS-0,05% TWEEN 20 detergent, og 100 µl av en seriell 2 gangers fortynning av normal eller Lyme-borreliosis serum i PBS ble tilsatt til de individuelle brønner. Platene ble inkubert i 1 time ved 22°C, etterfulgt av 3 vaskinger med PBS-0,05% TWEEN 20 detergent. 100 mikroliter anti-humant IgM pepperrot-peroksidase-konjugert antistoff (Organon Teknika Cappel) fortynnet 1:3000 i PBS-0,05% TWEEN 20 detergent ble tilsatt, og platene ble inkubert ved 22°C i 1 time. Etter inkubering ble 100 µl o-fenylendiaminfosfat (0,4 mg/ml, Sigma) tilsatt til hver brønn og inkubert ved 22°C i 30 min. Reaksjonene ble stoppet ved tilsetning av 100 µl 1 N H₂SO₄, og absorbansen ved 490 nm (Model EL307, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont) ble umiddelbart bestemt. En OD-verdi større enn 0,200 over den normale serumkontroll ble bestemt som positive.

Deteksjon av borreliacidale antistoff. Den flow-cytometriske borreliacidale antistofftest ble utført i samsvar med Callister et al. (29,30). Hurtig forklart, en frossen 200 µl alikvot av B.b. isolatet 50772 eller 297 ble opptint, inokulert i 6 ml ferskt BSK-medium, og kulturer

ble inkubert i 72 timer ved 35°C. Etter inkubering ble konsentrasjonen av spirocheter bestemt ved anvendelse av Petroff-Hausser tellekammer, og fortynnet i ferskt BSK-medium til en konsentrasjon av 10^6 organismer per ml.

5 Serumprøver ble fortynnet 1:20 i ferskt BSK-medium, og sterilisert ved passering igjennom et 0,2 μm mikrofugefilter (Costar, Cambridge, Massachusetts). En 100 μl alikvot ble overført til et 1,5 ml skrulokkmikrofugerør (Sarstedt), og det fortynnete serum ble varme-inaktivert
10 ved 56°C i 10 min. Etter varmeinaktivering ble en 100 μl alikvot av B.b. 50772 og 15 μl sterilt serum fra marsvin (200, 50% hemolytiske komplementenheter per ml, Sigma) tilsatt til de fortynnete sera. Etter forsiktig røring ble analysesuspensjonene inkubert i 16-24 timer ved 35°C.

15 Etter inkubering ble 100 μl av analysesuspensjonene fortynnet 1:50 med PBS (0,01 mol/L, pH 7,2) inneholdende akridinorange (finalkonsentrasjon, $5,4 \times 10^9$ mol/L). Borreliacidale antistoff ble detektert med et FACScan enkellaser flowcytometer (Becton-Dickinson Immunocytometry
20 Systems, San Jose, California). Forløp ble opptatt i 1 til 20 minutter med strømningshastighet satt lavt (12 $\mu\text{l}/\text{min}$) og analysert med FACScan Lysys II forskningsprogramvare. Side-scatter og fluorescens-intensitetsparametre ble anvendt for å skille B.b. fra BSK og komplementpartikler.
25 Spirocheter ble «gated» under dataopptak og fluorescencesignaler ble logaritmisk amplifisert og omdannet til en lineær skala. En $\geq 13\%$ økning i fluorescence-intensitet sammenlignet med normale serumkontroller ble vurdert som positive (30). Alle
30 analyser ble utført i duplikat eller triplikat.

Vaksinering av mus, og gjenvinning av anti-OspC Sera.

Mus ble vaksinert intramuskulært med 75 μg rensed OspC i 100 μl Freund's komplette adjuvans (Sigma). Deretter ble mus «boosted» med 75 μg -mengde OspC i 100 μl Freund's
35 ufullstendige adjuvans (Sigma) 2 og 4 uker etter den primære vaksinering. To uker etter den andre boost, ble blod innsamlet ved intrakardiær punktering. Blod til tillatt å klotte, og serum ble separert ved sentrifugering

ved 3500 rpm i 5 min. Serum ble fjernet og lagret i 50 μ l alikvoter ved -70°C inntil bruk.

Flow-cytometrisk immunofluorescens analyse.

Museserumprøver inneholdende anti-OspC-antistoff ble
 5 serielt fortynnet i BSK-medium (1:20 til 1:40960). 100
 mikroliter BSK-medium inneholdende 10^5 levende *B.b.* 297
 eller 50772 organismer ble tilsatt til hver fortynning.
 Suspensjonene ble forsiktig blandet og inkubert ved 35°C i
 30 min. Etter inkubering ble 10 μ l fluorescein-isotiocyanat
 10 (FITC)-konjugert anti-muse IgG fra geit (ICN/Cappel,
 Aurora, Ohio) antistoff fortynnet 1:20 i sterilt PBS (pH
 7,2) tilsatt til hver analyse. Analysene ble forsiktig
 blandet og inkubert ved 35°C i ytterligere 30 min. Etter
 inkubering ble 100 μ l alikvoter av hver suspensjon
 15 kombinert med 400 μ l av 0,22 μ m filter-sterilisert PBS.
 Disse suspensjoner ble deretter analysert ved anvendelse av
 FACScan flow-cytometer.

Nøytralisering av borreliacidal aktivitet.

Borreliacidal aktivitet av serumprøver etter fjerning av
 20 IgM eller IgG antistoff ble bestemt som tidligere beskrevet
 (17). Kort forklart ble 125 μ l dialysert anti-human IgM
 eller IgG fra geit (tung og lett kjede; Kallestad
 Diagnostics, Chaska, Minnesota) tilsatt til 25 μ l normal
 eller Lyme-borreliosis serum, og blandingen ble inkubert i
 25 2 timer ved 37°C . Etter sentrifugering ved $5000 \times g$ i 10
 min. (Surespin; Helena Laboratories, Beaumont, Texas), ble
 supernatanten fortynnet 2 ganger med fersk BSK-medium,
 sterilisert ved passering gjennom et 0,2 μ m mikrofugefilter
 (Costar), og analysert for borreliacidal aktivitet. Den
 30 borreliacidale aktivitet i normale og Lyme-borreliosis sera
 uten behandling med anti-IgM eller anti-IgG ble bestemt
 etter tilsetning av 125 μ l PBS (pH 7,2).

Adsorpsjon av Lyme-borreliosis sera med OspC.

Adsorpsjon av anti-OspC antistoff fra Lyme-borreliosis sera
 35 ble utført ved anvendelse av en modifisering av en
 tidligere beskrevet prosedyre (17). TetraLink Tetrameric
 Avidin resin (Promega) ble vasket med PBS, og 1 ml volum
 ble applisert på en kolonne. Tre mikrogram dialysert

biotinyllert OspC i et 1 ml volum ble plassert over kolonnen og absorbans (OD) ved 280 nm ble monitorert for å bekrefte bindingen av OspC til kolonnen. En 1 ml prøve av hver av 10 humane Lyme-borreliosis sera fortynnet 10 ganger med PBS (pH 7,2) ble deretter passert over kolonnen 10 til 15 ganger ved 4°C for å fjerne anti-OspC antistoff. Fjerning av anti-OspC antistoff ble bekreftet med Western blotting.

Dette forsøk viste at vaksinerings av mus med OspC induerte høye konsentrasjoner av anti-OspC borreliacidale antistoff, og førte til økte anstrengelser (i de påfølgende eksempler) for å evaluere evnen til OspC til å tilveiebringe beskyttelse mot infeksjon med *B.b.* på grunn av at det tilveiebringer en plausibel immunmekanisme som forklarer en OspC vaksinerings evne til å beskytte mot eller kurere Lyme-sykdom. Videre ble det oppdaget at store konsentrasjoner av anti-OspC borreliacidale antistoff kan enkelt detekteres i serum fra pasienter over hele U.S.A., idet kun en enkelt organisme, *B.b.* 50772, anvendes som testantigen, noe som også indikerer at anti-OspC borreliacidale epitop(er) kan være konserverte. OspC-heterogenisiteten vil således ikke hindre anstrengelser for å utvikle en komprehensiv OspC-vaksine.

Disse funn er i direkte kontrast til andre publiserte observasjoner. I tidligere rapporter var deteksjon avhengig av nærvær av høye nivåer av OspC på overflaten av *B.b.* Disse anti-OspC borreliacidale antistoff ble detektert kun når *B.b.* isolat 50772, som uttrykker høye nivåer av OspC på overflaten, ble anvendt.

30 Eksempel 2

Dette eksempel viser at borreliacidale epitoper av OspC er lokalisert innen Dra-fragmentregionen.

Trinn a: Isolering av plasmider, kloning og mangfoldiggjøring av genet ospC.

35 Plasmid-anrikt DNA ble isolert fra *B.b.* sensu stricto isolat S-1-10 ved anvendelse av standardteknikker (13). DNA ble deretter anvendt som et templat for mangfoldiggjøring av genet ospC ved anvendelse av GeneAmp protokoll (Perkin

Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut) ved anvendelse av polymerase kjedereaksjon (34). Primere ble anvendt ved en finalkonsentrasjon på 1,0 μM med en MgCl_2 -konsentrasjon på 1,5 mM. Termiske sykleringsparametre var 95°C i 5 min. etterfulgt av 35 sykluser av det følgende: 1) 95°C i 30 sek., 2) 50°C i 30 sek., 3) 72°C i 90 sek. Den finale ekstensjon ble utført ved 72°C i 7 min. for fullt ut å utvide enhver trunkert DNA-tråd. Amino-terminale primer C1 5'-CGTGGATCCATGAAAAGAATACATTAAGTGCATA-3') og karboksy-terminal primer C2 5'-AATTCCTGGGTTAAGGTTTTTTTGGACTTCTGC-3' ble anvendt for mangfoldiggjøring. Det mangfoldiggjorte DNA ble renset ved anvendelse av GeneClean (Bio101, La Jolla, California). Etter oppkutting med *SmaI* og *BamHI* (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland), ble de rensete DNA-fragmenter ligert inn i PinPoint pXa-3 vektor (Promega Corp., Madison, Wisconsin). Innskuddet og plasmidet ble ligert med T4 DNA ligase (Bethesda Research Laboratories), og ligeringsblandingen ble anvendt for å transformere kompetent *E. coli* JM109. Deretter ble organismene utsådd på 2x tryptongjær (TY) medium inneholdende ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), og inkubert i 24 timer ved 37°C. Kolonier som uttrykker OspC fusjonsproteinet ble detektert med Western blott analyser ved anvendelse av et streptavidin-alkalisk fosfatasekonjugat (Bethesda Research Laboratories), og et tidlig Lyme-sykdomsserum inneholdende anti-OspC antistoff. Dette plasmid ble gitt designering pX3-22 og er illustrert i fig. 1.

Trinn b: Etablering av ospC-trunkeringen. For å konstruere karboksyterminalfragment av OspC-proteinet ble plasmid pX3-22 oppkuttet med restriksjonsenzymer *BamHI* og *SmaI* (Gibco). Det ~ 0,6 kb *BamHI-SmaI*-fragment inneholdende OspC-genet ble deretter oppkuttet med restriksjonsenzymet *DraI* (Gibco) som illustrert i fig. 2. Denne oppkutting resulterte i et ~ 0,4 kb *BamHI-DraI*-fragment som koder for aminoterminalenden av OspC-proteinet og et ~ 0,2 kb *DraI-SmaI*-fragment som koder for karboksyterminalenden. Dette *DraI-SmaI*-fragment ble deretter ligert med *SmaI*-oppkuttet

PinPoint vektor pXa-2 (Promega Corporation, Madison, WI) for å preservere den egnete leseramme i det resulterende trunkerte protein. Ligeringsblandingen ble anvendt for å transformere kompetent *E. coli* JM109. Restriksjonskuttene ble utført for å identifisere en klon med den egnete håndtering av *ospC*-genfragmentinnskuddet. Dette plasmid ble designert pX2-22-Dra, og er illustrert i fig. 3.

Trinn c: Molekylær analyse av genfragmentet *ospC*. DNA-sekvensen av pX2-22-Dra ble bestemt ved dobbelttrådet sekvensering. Primer C2 (se trinn A i eksempel 2), konstruert for mangfoldiggjøring, og PinPoint sekvenseringsprimer (Promega) ble anvendt. Sekvensen av *DraI-SmaI ospC*-genfragmentet (*OspC* Dra-fragment) er vist i fig. 4. Den predikerte aminosyresekvens av dette trunkerte *OspC*-fusjonsprotein er også vist i fig. 4.

Trinn d: Rensing av DNA-fragmentet *ospC*. Transformerte *E. coli*-organismer inneholdende enten pX3-22 eller pX2-22-Dra fikk vokse i 100 ml 2xTY inneholde ampicillin i 12 timer ved 37°C. Kulturen ble fortynnet 1:10 med 2xTY og inkubert i ytterligere 1 time. Isopropyl- β -tiogalaktopyranosid (finalkonsentrasjon 0,1 mM, Sigma) ble tilsatt til kulturen og inkubert i ytterligere 4 timer. Suspensjonen av bakterier ble deretter sentrifugert (10.000 x g i 15 min. ved 4°C), resuspendert i rensebuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 buffer), og lysert ved 5 x 30 sek. pulser med en sonikator (Model W350; Branson Sonic Power Co., Danbury, Connecticut). De sonikerte *E. coli* organismer ble sentrifugert ved 10.000 x g i 15 min. for å fjerne uløselig materiale, og supernatanten fikk passere over en kolonne av typen SoftLink resin (Promega) med en hastighet på 0,5 ml per min. ved 4°C. Kolonnen ble deretter vasket med 5 kolonnevolumer av rensebuffer. Kolonne-bundet *OspC* Dra-fragment fusjonsprotein ble eluert ved anvendelse av rensebuffer inneholdende 5 mM biotin (Sigma). Fraksjonen ble analysert med natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese.

Trinn e: Adsorpsjon av Lyme borreliosis sera med hele og Dra-fragment-ospC.

Adsorpsjon av anti-OspC eller Dra-fragmentantistoff fra Lyme-borreliosis sera ble utført ved å anvende en
 5 modifisering av en tidligere beskrevet prosedyre (17). TetraLink Tetrameric Avidin resin (Promega) ble vasket med PBS, og et 1 ml volum ble applisert på en kolonne. Tre mikrogram dialysert biotinyllert hele OspC (fusjonsprotein fra pX3-22) eller Dra-fragment OspC (fusjonsprotein fra
 10 pX2-22-Dra) i et 1 ml volum fikk deretter passere over kolonnen, og absorbans ved 280 nm ble monitorert for å bekrefte binding av protein til kolonnen. En 1 ml prøve av hvert serum fortynnet 10 ganger med PBS (pH 7,2) fikk deretter passere over kolonnen 10 til 15 ganger for å
 15 fjerne anti-OspC eller anti-Dra-fragment antistoff.

Ved anvendelse av materialer og metoder gitt i eksempler 1 og 2 ble det innledningsvis testet 7 tidlig Lyme-sykdoms serumprøver som inneholdt høye titer av anti-OspC borreliacidale antistoff, og bekreftet at de
 20 boreliacidale antistoff var mot en spesifikk region av OspC-proteinet innen DNA-fragmentet beskrevet heri.

OspC- eller Dra-fragmentfusjonsproteinene ble bundet til agarosekuler, og separate immuno-affinitetskolonner ble fremstilt. Lyme-sykdomssera ble passert over kolonnene for
 25 å fjerne anti-OspC eller anti-Dra-fragment antistoff ved adsorpsjon til OspC eller Dra-fragmentfusjonsproteinet, respektivt. Borreliacidale aktivitet mot *B.b.* 50772 ble bestemt før og etter fjerning av antistoffene. Fjerning av anti-OspC og anti-Dra-fragmentantistoffer fra tidlig Lyme-
 30 sykdomssera forårsaket omtrent fullstendig reduksjon av den borreliacidale aktivitet som illustrert i tabell 1.

Tabell 1. Borrelicidal aktivitet av tidlig Lyme-sykdomssera etter fjerning av antistoff mot hele OspC eller Dra-
 35 fragment.

<i>Pasientnummer</i>	Borreliacidale aktivitet ^a før og (etter) fjerning av OspC-antistoff	Borreliacidale aktivitet ^a før og (etter) fjerning av Dra-antistoff
1	10240 (20)	20480 (80)
2	40960 (20)	40960 (20)
3	10240 (40)	20480 (40)
4	640 (20)	1280 (20)
5	2560 (20)	5120 (20)
6	1280 (40)	5120 (20)
7	10240 (320)	20480 (1280)

^aResiprokale fortynninger av serum-titer

Tabell 1 viser borreliacidale antistoff-titer av tidlige Lyme-sera etter fjerning av antistoff mot hele OspC-fusjonsprotein eller OspC Dra-fragment. Med henvisning til tabell 1, fremgår det at borreliacidale antistoff var mot den spesifikke region av OspC-proteinet lokalisert innen Dra-fragmentet. Disse resultater viser at anti-OspC borreliacidale antistoff omtrent er fullstendig induisert av epitop(er) lokalisert innen Dra-fragmentregionen av OspC.

Eksempel 3

Dette eksempel viser at anti-OspC antistoff som er spesifikk for Dra-fragmentregionen av OspC kan detekteres med ELISA.

Dra-fragment ELISA. Renset OspC Dra-fragment ble fortynnet til 750 ng/ml i coatbuffer (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,6) og ble tilsatt til flatbunnede N-oksylsuccinimid-overflate-aminobindende mikrotiter brønner. ELISA-platene ble inkubert ved 35°C i 4 timer, etterfulgt av en inkubering over natten ved 4°C. Etter inkubering ble platene vasket 3 ganger med PBS inneholdende 0,05% TWEEN 20 detergent, forseglet og lagret ved 4°C. Før anvendelse ble platene blokkert med PBS-0,05% TWEEN 20 inneholdende 1% bovint serumalbumin i 30 min. ved omgivende temperatur. Platene ble vasket 2 ganger med PBS-0,05% TWEEN

20 detergent, og 100 μ l serielle 2-gangers fortynninger av serum i PBS ble tilsatt til de individuelle mikrotiter brønner. Platene ble inkubert i 1 time ved 22°C, etterfulgt av 3 vask med PBS-0,05% TWEEN 20 detergent. Anti-humant IgM eller IgG peroksidase-konjugert antistoff fra pepperrot (Organon Teknika Cappel, Malvern, Pennsylvania) ble fortynnet 1:3000 eller 1:5000 i PBS-0,05% TWEEN 20 detergent. Alikvoter (100 μ l) av konjugater ble tilsatt til brønnene og inkubert ved 22°C i 1 time. Deretter ble 100 μ l o-fenylendiaminfosfat (Sigma) tilsatt, og platene ble inkubert ved 22°C i 30 min. Reaksjoner ble stoppet ved tilsetning av 100 μ l 1 N H₂SO₄, og absorbanser ved 490 nm ble bestemt.

Det ble bestemt om anti-Dra fragmentantistoffene som foreligger i de 7 tidlig Lyme-sykdoms serumsprøvene enkelt kunne detekteres ved anvendelse av et Dra-fragment med IgM eller IgG ELISA. Dra-fragment ELISA-plater ble fremstilt og anvendt for å måle mengden DRA-spesifikt antistoff detektert idet serumet ble fortynnet 1:200 med PBS (pH 7,2) inneholdende 0,5% TWEEN 20 detergent. Dette er en fortynning som vanligvis anvendes av diagnoselaboratorier ved utføring av ELISA-analyser. Signifikante nivåer av IgM anti-Dra-fragment antistoff ble detekterbare i alle 7 tidligere Lyme-sykdomsserumsprøver som illustrert i tabell 2. IgG ELISA detekterte også anti-Dra antifragment antistoff i 3 (42%) av de 7 tidlig seraprøver. Tabell 2 illustrerer OspC (helt protein) og Dra-fragment IgM-ELISA reaktivitet ved anvendelse av tidlig Lyme-sykdomssera (n=7) inneholdende anti-OspC og anti-Dra borreliacidale antistoff. Tabell 2 viser at et Dra-fragment ELISA kan detektere anti-Dra fragment antistoff i tidlig Lyme-sykdomssera ved en 0,200 absorbanse og en 1:200 fortynning.

Tabell 2. Dra-fragment ELISA^a reaktivitet ved anvendelse av tidlig Lyme-sykdomssera (n=7) inneholdende anti-Dra borreliacidale antistoff.

5 Antall (%) sera IgM Antall (%) sera IgG
 reaktive ved: reaktive ved

≥ 0,1	≥ 0,2	≥ 0,3	≥ 0,1	≥ 0,2	≥ 0,3
7 (100)	7 (100)	7 (100)	3 (43)	0	0

10 ^aSera fortynnet 1:200 i fosfat-buffret saltløsning (pH 7,2)
 inneholdende 0,05 TWEEN 20. Reaktivitet bestemt ved
 absorbans ved 490 nm.

Eksempel 4

15 Dette eksempel ble konstruert for å illustrere
 spesifisitet av en *B.b.* OspC ELISA og en Dra-fragment ELISA
 for å detektere Lyme-sykdom.

20 Det ble bestemt om Dra-fragment ELISA var mer
 spesifikk enn OspC ELISA ved å undersøke normale sera og
 sera fra pasienter med EBV- og CMV-infeksjoner. Også testet
 var seraprøver inneholdende rheumatoidfaktor og seraprøver
 fra pasienter med syfilis på grunn av at disse prøver sera
 også er kjent å reagere sterkt med konvensjonelle Lyme-
 sykdomstester. I tillegg ble seraprøver fra individer som
 tidligere var vaksinert med en OspA Lyme-sykdomsvaksine
 25 testet. Begge ELISAer ble ikke påvirket av tidligere
 vaksinerings mot Lyme-sykdom. Tilsvarende lave antall
 normale serumsprøver, var sera inneholdende den rheumatoide
 faktor og syfilissera positive ved anvendelse av IgM OspC
 eller Dra-fragment ELISA. Imidlertid var OspC ELISA ofte
 30 falskt positiv ved anvendelse av sera fra pasienter med
 andre sykdommer inkluderende EBV og CMV, primært ved
 testing for IgM. Dette er ikke overraskende siden IgM-
 antistoff foreligger i høye konsentrasjoner under tidlig
 Lyme-sykdom. IgG-antistoff forekommer vanligvis ikke før
 35 ved senere trinn av sykdommen. I motsetning var IgM Dra-

fragment ELISA langt mindre reaktiv ved anvendelse av sera fra pasienter med CMV og EBV. Det henvises til tabell nedenfor. Dermed var Dra-fragment ELISA langt mer signifikant enn ELISA inneholdende hele OspC-proteinet.

5 Tabell 3 viser IgM OspC (helprotein) og Dra-fragment ELISA versus Lyme-sykdom kryssreaktive sera (serumsfortynning 1:200). Ved henvisning til tabell 3, var Dra-fragment ELISA signifikant mere spesifikk enn OspC ELISA.

10 Tabell 3. Antall (%) av potensielt kryssreaktivt sera med OspC og Dra-fragment IgM ELISA reaktivitet^a.

Sera (Antall testet)	Antall (%) sera positive resultater ved anvendelse av OspC ELISA			Antall (%) sera positive resultater ved anvendelse av Dra ELISA		
	≥ 0,100	≥ 0,200	≥ 0,300	≥ 0,100	≥ 0,200	≥ 0,300
Endemisk normal (28)	1 (3,6)	0	0	0	0	0
CMV (39)	11 (28,2)	7 (17,9)	3 (7,6)	3 (7,6)	0	0
EBV (47)	12 (25,5)	3 (6,4)	3 (6,4)	1 (2,1)	0	0
Syfilis (25)	3 (12,0)	2 (8,0)	0	4 (16,0)	2 (8,0)	1 (4,0)
Rheuma- toid faktor (15)	2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)
Total (154)	29 (18,8)	14 (17,0)	8 (5,2)	10 (6,5)	8 (5,2)	3 (1,9)

^aSera fortynnet 1:200 i fosfat-buffret saltløsning (pH 7,2)
15 inneholdende 0,05% TWEEN 20. Absorbans målt ved 490 nm.

Eksempel 5

Dette eksempel ble etablert for å vise at OspC og Dra-fragment ELISA hadde tilsvarende sensitiviteter.

Sensitiviteten av Dra-fragment ELISA ble sammenlignet med
 5 OpsC ELISA ved å undersøke 20 seraprøver fra pasienter med kultur-definert Lyme-sykdom. Disse sera inneholdt også varierende nivåer av anti-OspC borreliacidale antistoff.
 OspC og Dra-fragment ELISAer hadde tilsvarende sensitivitet. OspC og Dra-fragment ELISAer detekterte IgM
 10 antistoff (absorbans $\geq 0,200$) i 12 (60%) og 10 (50%) av de 20 tidlig Lyme-sykdomssera, respektivt som illustrert i tabell 4.

Tabell 4. Deteksjon av OspC og Dra-fragment antistoff med
 15 IgM ELISA^a i 20 tidlig Lyme-sykdomssera prøver inneholdende anti-*B. burgdorferi* 50772 borreliacidale antistoff.

	Antall (%) sera IgM reaktive ved:	
ELISA	> 0,100	> 0,200
OspC	15 (75)	12 (60)
Dra-fragment	12 (60)	10 (50)

^asera fortynnet 1:200 i fosfatbuffret saltløsning (pH 7,2)
 20 inneholdende 0,05% TWEEN 20. Absorbansverdier ble bestemt ved 490 nm.

I tillegg korrelerte evnen til å detektere anti-OspC eller anti-Dra-fragment antistoff nært med anti-*B. b.* borrelicidal aktivitet. Med få unntak ble høye
 25 konsentrasjoner av anti-OspC eller anti-Dra-fragmenter IgM antistoff detektert i tidlig Lyme-sykdomssera som også inneholdt høye konsentrasjoner av borreliacidale antistoff. Når borreliacidale aktivitet var lav var begge ELISAer ofte negative. Dette var ikke forventet siden den borreliacidale
 30 antistofftest har blitt vist å være ca. 3 ganger mer sensitiv enn en kommersiell ELISA (30).

Eksempel 6.

Vi arbeider for tiden med å forbedre sensitiviteten av Dra-fragment ELISA ved å senke fortynninger av testet serum. Dette skulle være mulig på grunn av den høye spesifikk natur av Dra-fragment antistoffresponsen. Vi antar at foredling av Dra-fragment ELISA testprosedyrene (f.eks. serumsfortynning, konsentrasjon av antigen/brønn) signifikant vil øke sensitiviteten til nivåer som er nærmere anti-*B. b.* 50772 borrelicidal antistoff deteksjonssensitivitet.

Eksempel 7

Dette eksempel bekrefter prognosemulighetene for Dra-fragment ELISA. Multiple seraprøver fra 2 tidlig Lyme-sykdomspasienter ble testet ved anvendelse av Dra-fragment ELISA. Serumprøvene ble innsamlet før, under og etter behandling med antimikrobielle midler. Anti-50772 borreliacidale aktivitet ble monitorert med Dra-fragment ELISA. I pasient 1 var anti-OspC antistoff detekterbare 5 dager etter infeksjon og 6 og 11 dager etter at antibiotikabehandling ble startet. Anti-50772 borreliacidale antistoff og anti-Dra-fragment antistoff var detekterbare 5 dager etter infeksjon og 6 dager etter behandling, men var ikke lenger detekterbare etter 11 dager. Tilsvarende var anti-OspC antistoff detekterbare 7 dager etter infeksjon og 10 og 24 dager etter antibiotisk behandling i serum fra pasient 2. Imidlertid var borreliacidale antistoff og anti-Dra-fragment antistoff kun detekterbare før antibiotisk behandling. Disse resultater demonstrerer evnen av Dra-fragment ELISA til å korrelere med infeksjon med *B. b.* Således er Dra-fragment ELISA også nyttig som en «test på behandling».

Eksempel 8

OspCs evne til å indusere borreliacidale antistoff har muliggjort identifisering av epitop(er) som er ansvarlig for å indusere aktiviteten. På grunn av at beskyttelse etter vaksinerings med OspA er avhengig av induksjon og

opprettholdelse av høye nivåer av anti-OspA borreliacidale antistoff vil beskyttelse eller klaring av *B. b.* fra infiserte individer også være avhengig av induksjon av anti-OspC borreliacidale antistoff. På grunn av at anti-OspC borreliacidale antistoff kan fjernes fra tidlig Lyme-sykdomssera ved adsorpsjon til Dra-fragmentet bør vaksinerings med Dra-fragmentet også indusere borreliacidale antistoff. Mus vaksinert med rekombinant OspC produserer faktisk borreliacidale antistoff.

Ved å benytte fremgangsmåtene i eksempel 1 ble mus vaksinert med *B. b.* 50772, og nivåer av borreliacidale antistoff ble bestemt ved forskjellige tidsintervaller etter vaksinerings. Borreliacidale aktivitet var detekterbar 14 dager etter den innledende vaksinerings, og hadde en topp 56 dager etter, som vist i tabell 5.

Tabell 5. Utvikling av anti-*B. burgdorferi* 50772 borreliacidale antistoff i mus etter vaksinerings med *B. burgdorferi* 50772 organismer.

	Borreliacidale aktivitet mot <i>B. burgdorferi</i> 50772	
Dager etter primær vaksinerings	Mus 1	Mus 2
14	20 ^b	20
28	320	320
42	160	160
56	2560	640
112	1280	320

^aMus ble vaksinert ved dag 0, og gitt 4 booster-vaksinerings med to ukers intervaller

^bResiprokale av høyeste serumsfortynning med signifikant borreliacidale aktivitet.

I et liknende forsøk ble anti-Dra-fragment antistoff fjernet ved adsorpsjon ved anti-Dra-fragment fusjonsprotein. De borreliacidale antistoffnivåer ble

deretter målt før og etter adsorpsjon og fjerning av anti-Dra-fragment antistoff. Borreliacidale aktivitet ble redusert fra 1:2560 til 1:640 etter fjerning av anti-Dra-fragment antistoff. Vaksinerings med Dra-fragment vil således inducere beskyttende borreliacidale antistoff.

Eksempel 9

Dette eksempel er konstruert for å vise at Dra-fragmentet er en bedre kandidat som vaksine enn det hele OspC-protein. Dyr ble vaksinert med OspC, og serum med høye nivåer av borreliacidale aktivitet ble innsamlet. Serumet deles, og den borreliacidale aktivitet fra en prøve elimineres ved fjerning av anti-Dra-fragment antistoff. Dyrene som inneholder, eller som ikke inneholder borreliacidale antistoff (anti-Dra-fragment) til separate grupper av mottakende dyr administreres deretter passivt før de utfordres med *B. b.* og ved forskjellige intervaller etter infeksjon. Det serum som inneholder anti-Dra fragment borreliacidale antistoff vil beskytte mot og eliminere organismer og kliniske symptomer etter infeksjon. I motsetning forventer vi at anti-OspC serum uten borreliacidale antistoff å være ineffektiv i å hindre eller behandle infeksjon. Det er således definitive bevis på anvendelse av Dra-fragmentet som en viktig Lyme-sykdomsvaksinekomponent.

Eksempel 10

Lyme-sykdom forårsaker også betydelig morbiditet og noe dødelighet blant hunder og katter. Det er likheter mellom sykdommen i mennesker og hunder, inkluderende migrering av spirocheter til ledd, og utvikling av Lyme-arthritis (45). Det er interessant at *Straubinger et al.* (27) nylig har rapportert, at i motsetning til i mennesker, så produserer naturlig infiserte hunder ikke borreliacidale antistoff.

Vi har imidlertid nylig vist at naturlig infiserte hunder faktisk utvikler høye konsentrasjoner av borreliacidale antistoff. Vi infiserte naturlig 15 12-24

ukers gamle patogen-frie harehunder ved å feste 10 hunkjønn og 6 hannkjønn *Ixodus scapularis* blodmidd til dyrene og lot dem deretter fore seg til de var fulle. Ca. 44% av blodmiddene var infisert med *B. b.* Høye konsentrasjoner av anti-*B. b.* 50772 borreliacidale antistoff var detekterbare i 8 (53%) av 15 hunder 1 uke etter at blodmiddelet ble festet. Det henvises til tabell 6.

Tabell 6. Deteksjon av borreliacidale antistoff mot *B. burgdorferi* 50772 i hundesera etter utfordring med blodmidd.

Uker etter utfordring	Antall sera med cidale antistoff/total (%)	Gjennomsnittlig borreliacidale aktivitet
Førutfordring	0/14 (0)	NRD ^d
1	8/15 (53)	518
2	12/14 (86)	402
3	13/15 (87)	558
4	13/15 (87)	1645
5	13/15 (87)	2074
6	13/15 (87)	3700
7	13/15 (87)	3814
8	12/14 (86)	2552
9	12/13 (92)	2407

a Ti hunkjønn og seks hannkjønn *Ixodes scapularis* blodmidd fikk fore seg til de var fulle (44% av blodmiddelet ble infisert med *B. burgdorferi*.) Sannsynligheten for at den sist utfordrede hund mottok minst én infisert blodmidd var 99,4%. Alle blodmidd ble innsamlet fra en endemisk Lyme-sykdom fokus nær Ettrick, WI.

b Signifikant borreliacidale aktivitet ved en serumfortynning ≥ 20 .

c Resiprok fortynning av gjennomsnittlig borreliacidale antistoff titer.

d NRD, ingen respons detektert.

Fra 2 til 9 uker etter infisering, hadde $\geq 86\%$ av hundene høye konsentrasjoner av borreliacidale antistoff i deres serum. I tillegg hadde 83% av de infiserte hundene utviklet kliniske tegn og symptomer (halthet) assosiert med Lyme-sykdom, og *B. b.* organismer ble gjenvunnet fra deres hud og ledd i $> 90\%$ i dyrene. Vi fjernet også anti-OspC og anti-Dra-fragment antistoff fra 3 hundesera med høye titer av anti-*B.b.* 50772 borreliacidale antistoff. Fjerning av disse antistoff resulterte i omtrent fullstendig eliminering av den borreliacidale aktivitet. Disse funn er omtrent identiske til våre resultater der humant sera ble anvendt. Det er således sannsynlig at OspC Dra-fragment vil være nyttig for kjæledyr på samme måte som beskrevet for mennesker.

Referanseliste.

1. Centers for Disease Control and Prevention. (1996)
Morbid. Mortal. Weekly Report 45:481-484
- 5 2. Centers for Disease Control and Prevention. (1996)
Morbid. Mortal. Weekly Report 46:531-535
3. Steere A.C. et al. (1983) *Ann. Intern. Med.* 99:76:82
4. Pachner A.R. (1985) *Neurology* 35:47-53.
5. Steere A.C. (1980) *Ann. Intern. Med.* 93:8-16
- 10 6. Agger W. A. (1991) *Medicine* 70:3-90
7. Johnson R.C. et al. (1986) *Infect. Immun.* 53:713-4
8. Schmitz J.L. et al. (1990) *Infect. Immun.* 58:144-8
9. Schmitz J.L. et al. (1991) *Infect. Immun.* 59:1916-21
10. Lovrich S.D. et al. (1993) *Infect. Immun.* 61:4367-74
- 15 11. Lovrich S.D. et al. (1994) *J. Infect. Dis.* 170:115-21
12. Fikrig E. et al (1992) *Infect. Immun.* 60:657-61
13. Lovrich S.D. et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:2113-9
- 20 14. Probert W.S. et al. (1994) *Infect. Immun.* 62:1920-6
15. Probert W.S. et al. (1997) *J. Infect. Dis.* 175:400-5
16. Gilmore R.D. e al. (1996) *Infect. Immun.* 64-2234-9
17. Callister S.M. et al. (1993) *J. Infect. Dis.*
167:158-64
- 25 18. Fikrig E. et al (1994) *J. Infect. Dis.* 169:568-74
19. Sadziene A. et al. (1993) *J. Infect. Dis.* 167:165-72
20. Sambri V. e al. (1993) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*
7:67-72
21. Johnson B.J.B. et al (1995) *Vaccine* 13:1086-94
- 30 22. Ma J. et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:2221-7
23. Padilla M.L. e al. (1996) *J. Infect. Dis.* 174:739-46
24. Sadziene A. et al. (1994) *Infect. Immun.* 62:2037-45
25. Zhang Y.Q. et al. (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:233-8
26. Schutzer S.E. et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 337:794-5
- 35 27. Straubinger R.K. et al. (1995) *J. Clin. Microbiol.*
33-2745-51
28. Schwan T.G. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
92:2909-13

29. Callister S.M. et al. (1994) *J. Clin. Microbiol.* 29:1773-6
30. Callister S.M. et al. (1996) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:399-402
- 5 31. Bakken L.L. et al. (1997) *J. Clin. Microbiol.* 33:537-43
32. Laemmli I. K. (1970) *Nature* 227:680-5
33. Towbin H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4
- 10 34. Leck K. et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons
35. Padula S.J. (1993) *Infect. Immun.* 61:5097-105
36. Thiesen M. et al. (1995) *J. Bacteriol.* 177:3036-44
37. Schell R et al. (1997) *J. Spiro. Tick-borne Dis.* 4:4-6
- 15 38. Rauer S. et al. (1998) *J. Clin. Microb.* 36:857-861
39. Magnarellli L. et al (1996) *J. Clin. Microb.* 34:237-240
40. Fung B. et al. (1994) *Infect. Immun.* 62:3213-3221
41. Gerber M. et al. (1995) *J. Infect. Dis.* 171:724-727
- 20 42. Padula S. et al. (1994) *J. Clin Microb.* 32:1733-1738
43. Creson J. et al. (1996) *Clin. & Diag. Lab. Immun.* 3/2:184-190
44. Zhong W. et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:946-947
45. Appel M et al. (1993). *J. Infect. Dis.* 67:651-654
- 25 46. Callister S et al. (1990) *J. Clin Microb.* 28:363-5

P A T E N T K R A V .

1. Isolert immunogenisk polypeptidfragment av OspC av *Borrelia burgdorferi*,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av en etitop av OspC som har en aminosyresekvens som angitt i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2.
2. Isolert polypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e
10 d at det har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2.
3. Isolert DNA-molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e
15 d at det koder for et polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 SEQ. ID. NO: 2.
4. Isolert DNA-molekyl i samsvar med krav 3, k a r a k
t e r i s e r t v e d at det har en nukleotidbaseparsekvens som vist i nukleotider 433-582 i
20 SEQ. ID. NO: 1.
5. Isolert DNA-molekyl i samsvar med krav 3, k a r a k
t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter et *DraI* gjenkjenningssete ved dets 5' terminus, og et *SmaI*
25 gjenkjenningssete ved dets 3' terminus.
6. Ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den omfatter en isolert DNA som koder for et polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i
30 SEQ. ID. NO: 2.
7. Farmasøytisk sammensetning for å vaksinere mot, og for
å behandle borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert mennesker, k a r a k t e r i s e r t v e d at
35 sammensetningen omfatter en mengde av et isolert polypeptid med en aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, idet mengden er effektiv for å hindre eller for
å behandle borrelia-infeksjoner i pattedyr.

8. Farmasøytisk sammensetning i samsvar med krav 7, k a
r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter
en farmasøytisk egnet bærer.

5

9. Farmasøytisk sammensetning i samsvar med krav 7, k a
r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter
en adjuvans.

10 10. Anvendelse av et isolert polypeptid som har en
aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID. NO:
2, for fremstilling av et medikament for å hindre og
behandle borrelia-infeksjon i pattedyr, inkludert
mennesker.

15

11. Anvendelse i samsvar med krav 10, for å hindre og
behandle infeksjon av *Borrelia burgdorferi*.

12. Fremgangsmåte for å detektere borrelia-infeksjon i
20 pattedyr, inkludert mennesker,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten
omfatter:

a) å sette et kroppsfluid fra en mammalsk vert som er
mistenkt for å lide av borreliainfeksjon, i
25 forbindelse med et isolert polypeptid som har en
aminosyresekvens som vist i enheter 145-194 i SEQ. ID.
NO: 2, og deretter

b) bestemme om det isolerte polypeptid konjugeres
til antistoff som foreligger i kroppsfluidet i den
30 mammalske vert, idet nærvær av konjugering indikerer
nærvær av borrelia-infeksjon i verten.

13. Fremgangsmåte i samsvar med krav 12, k a r a k t e r
i s e r t v e d at i trinn b) detekteres nærvær av
35 konjugering ved anvendelse av enzym-koplet
immunosorbentanalyse.

14. Kit for diagnostisering av borrelia-infeksjon i
pattedyr, inkludert mennesker,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kittet omfatter et
isolert polypeptid som har en aminosyresekvens som vist i
5 enheter 145-194 i SEQ. ID. NO: 2, arrangert i en dertil
egnet beholder, og med instruksjoner for anvendelse.

081003--SeqList_amended
SEQUENCE LISTING

<110> Callister, Steven M
Lovrich, Steven D
Schell, Ronald F
Jobe, Dean A

<120> Compositions and Method Using the Borreliacidal
Epitope(s) of Borrelia burgdorferi Outer Surface
Protein C (OspC) for the Diagnosis and Prevention of
Lyme Disease

<130> B. burgdorferi ospc

<140>

<141>

<150> 60/094,955

<151> 1998-07-31

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 600

<212> DNA

<213> Borrelia burgdorferi

<220>

<221> misc_feature

<222> (433)..(582)

<223> DNA sequence unique to OspC Dra fragment of B.
burgdorferi S-1-10.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(582)

<400> 1

atg aaa ctg aag gta aca gtc aac ggc act gcg tat gac gtt gac gtt 48

Met Lys Leu Lys Val Thr Val Asn Gly Thr Ala Tyr Asp Val Asp Val

1 5 10 15

gac gtc gac aag tca cac gaa aac ccg atg ggc acc atc ctg ttc ggc 96

Asp Val Asp Lys Ser His Glu Asn Pro Met Gly Thr Ile Leu Phe Gly

081003--SeqList_amended

20

25

30

ggc ggc acc ggc ggc gcg ccg gca ccg gca gca ggt ggc gca ggc gcc 144

Gly Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala

35

40

45

ggt aag gcc gga gag ggc gag att ccc gct ccg ctg gcc ggc acc gtc 192

Gly Lys Ala Gly Glu Gly Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ala Gly Thr Val

50

55

60

tcc aag atc ctc gtg aag gag ggt gac acg gtc aag gct ggt cag acc 240

Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Lys Ala Gly Gln Thr

65

70

75

80

gtg ctc gtt ctc gag gcc atg aag atg gag acc gag atc aac gct ccc 288

Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Asn Ala Pro

85

90

95

acc gac ggc aag gtc gag aag gtc ctg gtc aag gag cgt gac gcg gtg 336

Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val Lys Glu Arg Asp Ala Val

100

105

110

081003--SeqList_amended

cag ggc ggt cag ggt ctc atc aag atc ggg gat ctc gag ctc atc gaa 384

Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly Asp Leu Glu Leu Ile Glu

115

120

125

ggc cgc gaa agc ttc agc tgg gat ccg gta ccg ata tca gat ctc cca 432

Gly Arg Glu Ser Phe Ser Trp Asp Pro Val Pro Ile Ser Asp Leu Pro

130

135

140

aaa aca cat aat act aaa gac aag ggt gct gaa gaa ctt gta aag tta 480

Lys Thr His Asn Thr Lys Asp Lys Gly Ala Glu Glu Leu Val Lys Leu

145

150

155

160

gct gaa tca gta gca ggc ttg cta aaa gta gcg caa gaa aca cta aat 528

Ala Glu Ser Val Ala Gly Leu Leu Lys Val Ala Gln Glu Thr Leu Asn

165

170

175

aat tca gtt aaa gaa ctt aca agt cct gtt gtg gca gaa agt cca aaa 576

Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys

180

185

190

aaa cct taacccgggg cggccgcg

600

Lys Pro

081003--SeqList_amended

<210> 2

<211> 194

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 2

Met Lys Leu Lys Val Thr Val Asn Gly Thr Ala Tyr Asp Val Asp Val

1

5

10

15

Asp Val Asp Lys Ser His Glu Asn Pro Met Gly Thr Ile Leu Phe Gly

20

25

30

Gly Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala

35

40

45

Gly Lys Ala Gly Glu Gly Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ala Gly Thr Val

50

55

60

Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Lys Ala Gly Gln Thr

65

70

75

80

Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Asn Ala Pro

85

90

95

081003--SeqList_amended

Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val Lys Glu Arg Asp Ala Val

100

105

110

Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly Asp Leu Glu Leu Ile Glu

115

120

125

Gly Arg Glu Ser Phe Ser Trp Asp Pro Val Pro Ile Ser Asp Leu Pro

130

135

140

Lys Thr His Asn Thr Lys Asp Lys Gly Ala Glu Glu Leu Val Lys Leu

145

150

155

160

Ala Glu Ser Val Ala Gly Leu Leu Lys Val Ala Gln Glu Thr Leu Asn

165

170

175

Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys

180

185

190

Lys Pro

<210> 3

<211> 36

081003--SeqList_amended

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 3

cgtggatcca tgaaaaagaa tacattaagt gcgata

36

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 4

aattcccggg ttaaggtttt ttggacttt cgtc

34

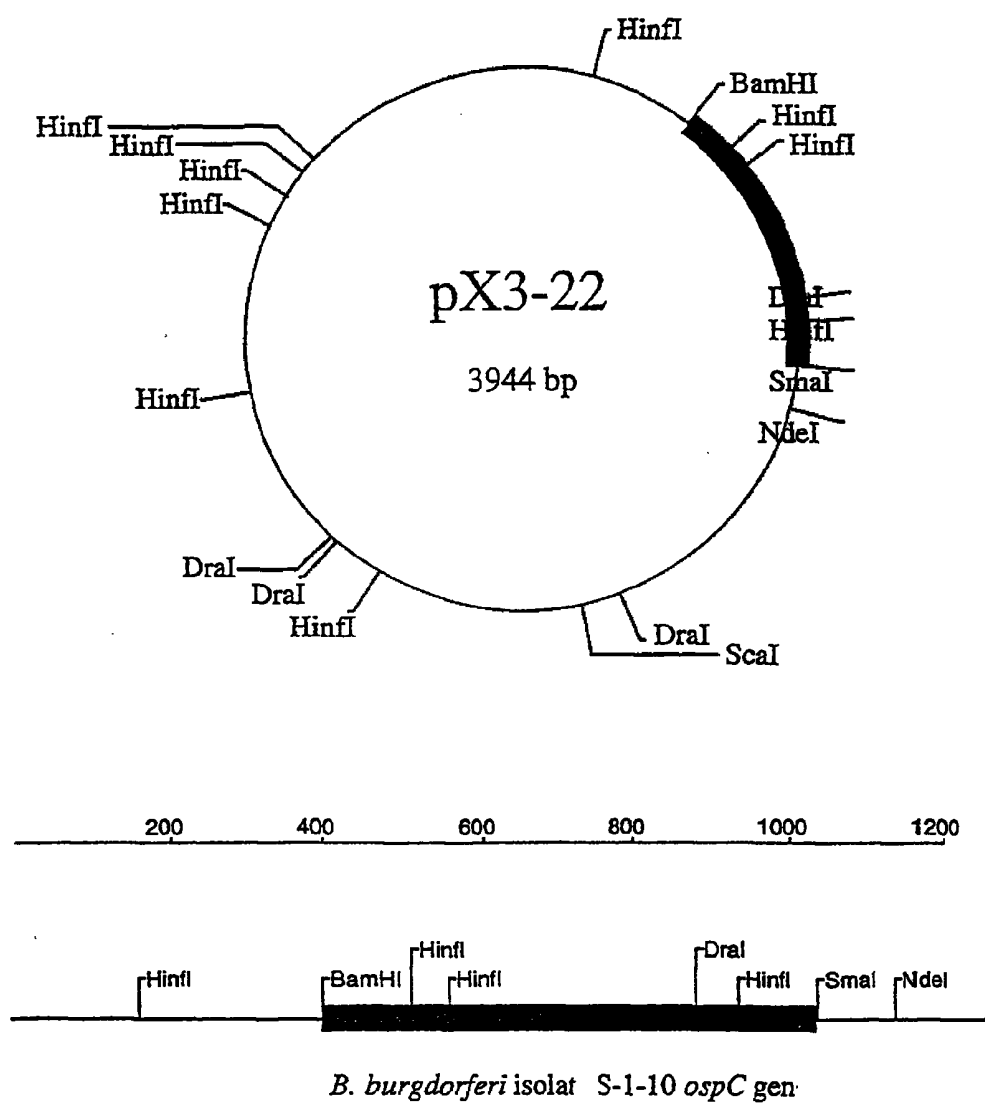
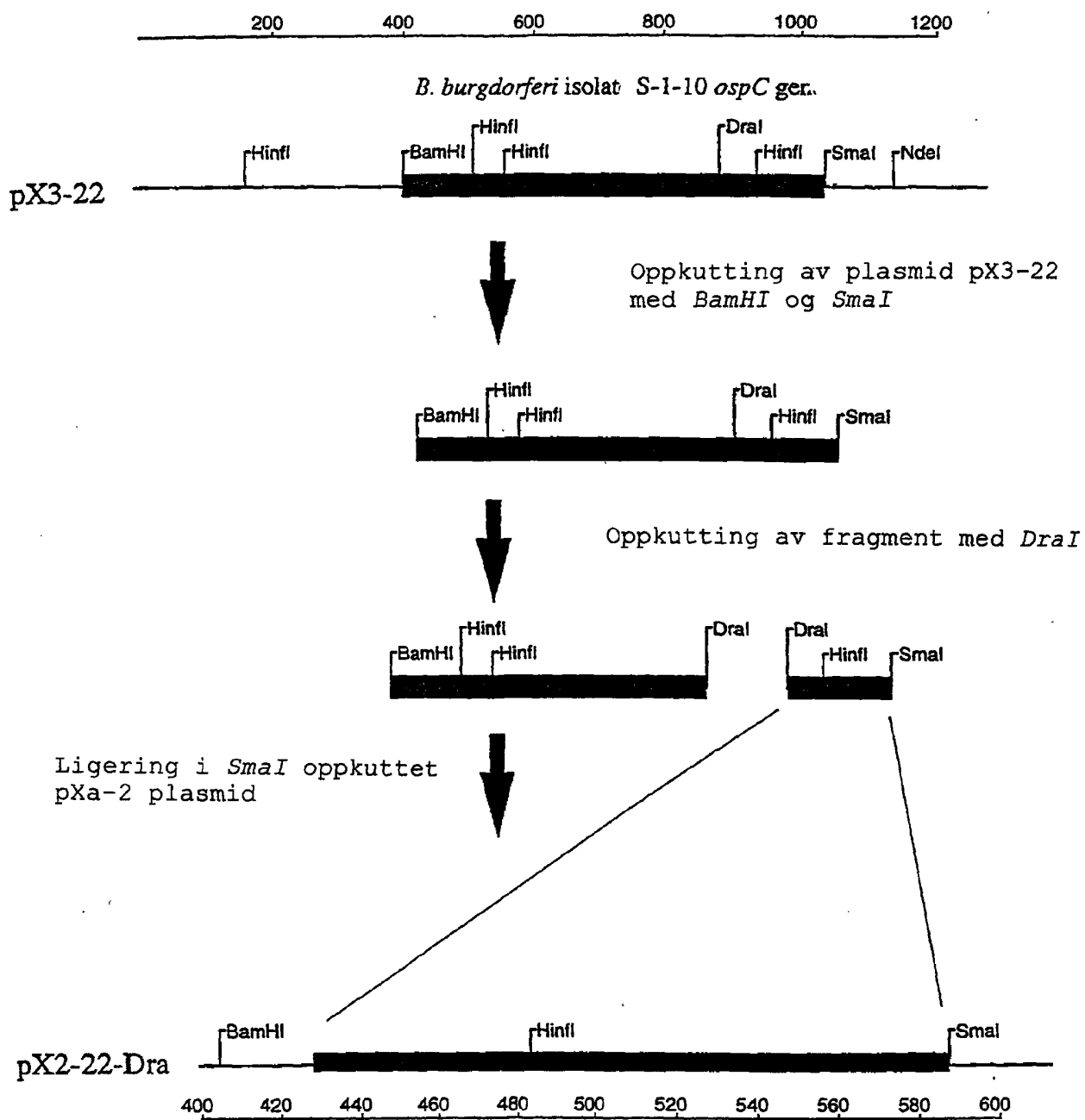


FIG. 1



B. burgdorferi isolat S-1-10 *ospC* gen. Dra fragment

FIG. 2

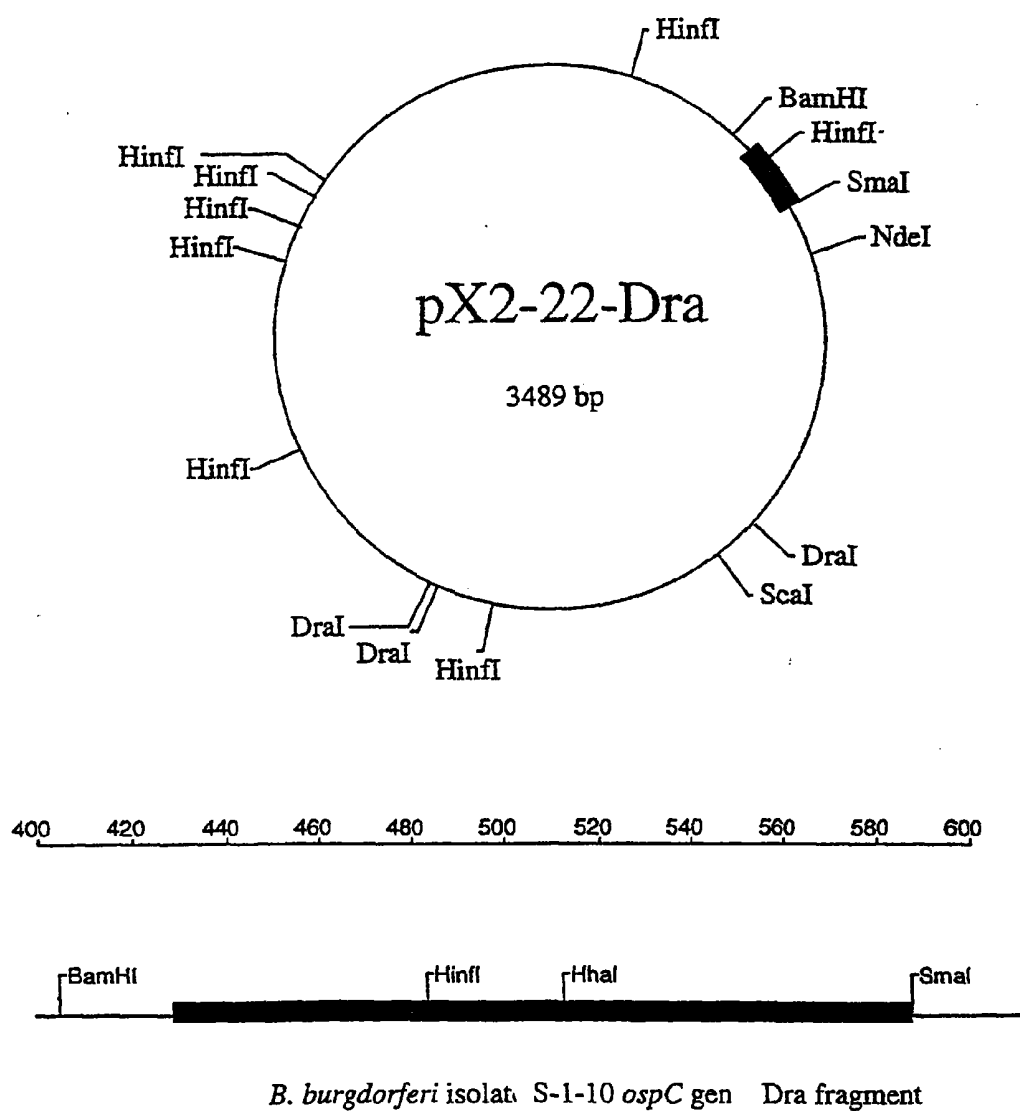


FIG. 3

10 20 30 40 50
 ATGAAACTGAAGGTAACAGTCAACGGCACTGCGTATGACGTTGACGTTGA
 M K L K V T V N G T A Y D V D V D>

60 70 80 90 100
 CGTCGACAAGTCACACGAAAACCCGATGGGCACCATCCTGTTCCGGCGCG
 V D K S H E N P M G T I L F G G>

110 120 130 140 150
 GCACCGGCGCGCGCGCGCACCGGCAGGCTGGCGCAGGCGCGCGTAAG
 G T G G A P A P A A G G A G A G K>

160 170 180 190 200
 GCCGGAGAGGGCGAGATTCCCGCTCCGCTGGCCGGCACCGTCTCCAAGAT
 A G E G E I P A P L A G T V S K I>

210 220 230 240 250
 CCTCGTGAAGGAGGGTGACACGGTCAAGGCTGGTCAGACCGTGCTCGTTC
 L V K E G D T V K A G Q T V L V>

260 270 280 290 300
 TCGAGGCCATGAAGATGGAGACCGAGATCAACGCTCCCACCGACGGCAAG
 L E A M K M E T E I N A P T D G K>

310 320 330 340 350
 GTCGAGAAGGTCTCGTCAAGGAGCGTGACGCGGTGCAGGGCGGTCAAGG
 V E K V L V K E R D A V Q G G Q G>

360 370 380 390 400
 TCTCATCAAGATCGGGGATCTCGAGCTCATCGAAGGTCCGGAAGCTTCA
 L I K I G D L E L I E G R E S F>

410 420 430 440 450
 GCTGGGATCCGGTACCGATATCAGATCTCCCAAAAACACATAATACTAAA
 S W D P V P I S D L P K T H N T K>

460 470 480 490 500
 GACAAGGGTGCTGAAGAACTTGTAAGTTAGCTGAATCAGTAGCAGGCTT
 D K G A E E L V K L A E S V A G L>

510 520 530 540 550
 GCTAAAAGTAGCGCAAGAACTAAATAATTAGTTAAAGAACTTACAA
 L K V A Q E T L N N S V K E L T>

560 570 580 590 600
 GTCCTGTTGTGGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAACCCGGGGCGGCGCGCG
 S P V V A E S P K K P *

144

FIG. 4