

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-519244
(P2009-519244A)

(43) 公表日 平成21年5月14日(2009.5.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4C085
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4H045
A61K 39/02 (2006.01)	A61K 39/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-543571 (P2008-543571)
 (86) (22) 出願日 平成18年11月29日 (2006.11.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月23日 (2008.7.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/061327
 (87) 国際公開番号 W02007/065098
 (87) 国際公開日 平成19年6月7日 (2007.6.7)
 (31) 優先権主張番号 60/740, 272
 (32) 優先日 平成17年11月29日 (2005.11.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/789, 588
 (32) 優先日 平成18年4月6日 (2006.4.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/790, 530
 (32) 優先日 平成18年4月10日 (2006.4.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502066627
 ヴァージニア コモンウェルス ユニバー
 シティ
 アメリカ合衆国ヴァージニア州 2321
 9, リッチモンド, イースト・リー・スト
 リート 800, スイート 113
 (74) 代理人 100065916
 弁理士 内原 晋
 (72) 発明者 マーコーニ, リチャード トーマス
 アメリカ合衆国 ヴァージニア州 231
 12 ミドローシアン, ヒッコリ ナッ
 ト ポイント 13718

最終頁に続く

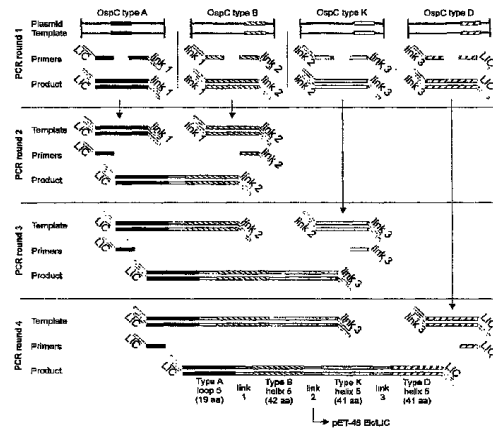
(54) 【発明の名称】 多価キメラOSPCワクシノーゲンおよび診断用抗原

(57) 【要約】

【課題】 ライム病に対するワクチンおよび診断薬を創る。

【解決手段】 ライム病のためのワクチンとして、また診断薬として用いるキメラ多価組換えタンパク質を提供する。このキメラタンパク質は、外表面タンパク質C (OspC) タイプ別のループ5領域および/またはアルファヘリックス5領域からのエピトープ類を含む。このOspCタイプ別は、哺乳類ボレリア感染と関連づけられ得る。

【選択図】 図9 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 種以上の外表面タンパク質 C (O s p C) タイプ類のループ 5 領域またはアルファヘリックス 5 領域、または両者からのエプトープ類を含むキメラ組換えタンパク質。

【請求項 2】

前記 O s p C タイプ類が S m a r、P L i、H 1 3、P F i M、S L 1 0、P M i t、P K i、P b e s、H T 2 2、P k o、P L j 7、V S 4 6 1、D K 1 5、H T 2 5、A、7 2 a、F、E、M、D、U、I、L、H、S z i d、P H e z、P W a、B、K、N、および C から構成される群から選択される請求項 1 記載のキメラ組換えタンパク質。

【請求項 3】

前記キメラ組換えタンパク質が、O s p C タイプ類 A、B、K および D からのエプトープ類を含む請求項 2 記載のキメラ組換えタンパク質。

【請求項 4】

前記キメラ組換えタンパク質が、O s p C タイプ類 E、N、I、C、A、B、K および D からのエプトープ類を含む請求項 2 記載のキメラ組換えタンパク質。

【請求項 5】

前記キメラ組換えタンパク質が、配列番号 7 5 または配列番号 2 4 9 によって表される一次アミノ酸配列を有する請求項 1 記載のキメラ組換えタンパク質。

【請求項 6】

前記 O s p C タイプ類が侵襲性ボレリア (B o r r e l i a) 感染に関連している請求項 1 記載のキメラ組換えタンパク質。

【請求項 7】

ボレリアに対する免疫応答を必要としている個体においてそれを惹起するための方法であって、

前記個体に対して 2 種以上の外表面タンパク質 C (O s p C) タイプ類のループ 5 領域またはアルファヘリックス 5 領域、または両者からのエプトープ類を含むキメラ組換えタンパク質を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 8】

前記 O s p C タイプ類が S m a r、P L i、H 1 3、P F i M、S L 1 0、P M i t、P K i、P b e s、H T 2 2、P k o、P L j 7、V S 4 6 1、D K 1 5、H T 2 5、A、7 2 a、F、E、M、D、U、I、L、H、S z i d、P H e z、P W a、B、K、N、および C から構成される群から選択される請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記キメラ組換えタンパク質が、O s p C タイプ類 A、B、K および D からのエプトープ類を含む請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記キメラ組換えタンパク質が、O s p C タイプ類 E、N、I、C、A、B、K および D からのエプトープ類を含む請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

前記キメラ組換えタンパク質が、配列番号 7 5 または配列番号 2 4 9 によって表される一次アミノ酸配列を有する請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

前記 O s p C タイプ類が侵襲性ボレリア (B o r r e l i a) 感染に関連している請求項 7 記載の方法。

【請求項 13】

個体がボレリアに暴露したかまたはボレリアに感染したかまたはその両者であるかどうかを確認するための方法であって、

前記個体から生体サンプルを得る過程と、

前記生体サンプルを少なくとも 1 種の組換えキメラタンパク質、すなわち 2 種以上の外表面タンパク質 C (O s p C) タイプ類のループ 5 領域またはアルファヘリックス 5 領域

10

20

30

40

50

、または両者からのエピトープ類を含む少なくとも1種の組換えキメラタンパク質に暴露させる過程と、

前記生体サンプル中における抗体類が前記少なくとも1種の組換えキメラタンパク質に結合するかどうかを決定する過程とを含み、

抗体結合検出がボレリアに対する過去の暴露または感染を表すことを特徴とする方法。

【請求項14】

前記OspCタイプ類がSmar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szid、PHez、PWa、B、K、N、およびCから構成される群から選択される請求項13記載の方法。

10

【請求項15】

前記キメラ組換えタンパク質が、OspCタイプ類A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む請求項13記載の方法。

【請求項16】

前記キメラ組換えタンパク質が、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む請求項13記載の方法。

【請求項17】

前記キメラ組換えタンパク質が、配列番号75または配列番号249によって表される一次アミノ酸配列を有する請求項13記載の方法。

20

【請求項18】

前記OspCタイプ類が侵襲性ボレリア(Borreliia)感染に関連している請求項13記載の方法。

【請求項19】

2種以上の外表面タンパク質C(OspC)タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域または両者からのエピトープ類を含むキメラ組換えタンパク質に対する抗体。

【請求項20】

前記OspCタイプ類がSmar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szid、PHez、PWa、B、K、N、およびCから構成される群から選択される請求項19記載の抗体。

30

【請求項21】

前記キメラ組換えタンパク質が、OspCタイプ類A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む請求項19記載の抗体。

【請求項22】

前記キメラ組換えタンパク質が、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む請求項19記載の抗体。

【請求項23】

前記キメラ組換えタンパク質が、配列番号75または配列番号249によって表される一次アミノ酸配列を有する請求項19記載の抗体。

40

【請求項24】

前記OspCタイプ類が侵襲性ボレリア(Borreliia)感染に関連している請求項19記載の抗体。

【請求項25】

前記抗体がポリクローナルである請求項19記載の抗体。

【請求項26】

前記抗体がモノクローナルである請求項19記載の抗体。

【請求項27】

前記抗体がボレリアスピロヘータ類に対して殺菌性である請求項19記載の抗体。

50

【請求項 28】

キメラ組換えタンパク質類の免疫原性カクテルであって、前記カクテル中の各キメラ組換えタンパク質が2種以上の外表面タンパク質C(OspC)タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域または両者からのエプトープ類を含むことを特徴とするカクテル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概括的には、ライム病のためのワクチンおよび診断薬に関する。より詳しくいうと、本発明は、哺乳類感染に関連する外表面タンパク質C(OspC)のループ5および/またはアルファヘリックス5領域/ドメインの免疫優性エプトープ類を含むキメラ多価組換えタンパク質を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

ライム病は、北アメリカおよびヨーロッパで最もよくみられる節足動物が媒介する疾患である。それは、スピロヘータ類ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・ガリニイ(*B. garinii*)およびボレリア・アフゼリイ(*B. afzelii*)によって引き起こされる。哺乳類への伝染は、感染したマダニ属ダニ[Burgdorferら、1982、Benachら、1983]に咬まれることにより、起こる。かなりの罹患率がライム病に結び付けられており、米国およびヨーロッパでは、人口の3%までが毎年感染する地域もある[Fahrerら、1991]。感染の結果多全身性炎症性疾患となり、遊走性紅斑、低い発熱、関節痛、筋肉痛、および頭痛を含むこともある初期症状を有する[Steereら、1977a]。後期臨床症状は重篤とることがあり、一部に関節炎[Steereら、1977a; Eifflerら、1998; Steereら、2004]、心臓炎[Aschら、1994; Nagiら、1996 Bartholdら、1991]および神経系合併症[NachmanおよびPontrelli、2003; CoyneおよびSchutzer 2002]を含む。さらに、ライム病は、ダニにさらされることの懸念から屋外レクリエーションおよび社会活動の減少によりあらわれる重大な社会経済的コストを伴っている。

20

【0003】

薬学経済研究では、毎年の疾病リスクが1%を越える公衆において特にライム病ワクチンに対する明らかな必要性があることを示している[Meltzerら、1999; Shadickら、2001]。しかし、現時点では、ワクチンは市販されていない。最初のヒトライム病ワクチンは、OspAに基づくLYMERIXであった(GlaxoSmithKline);しかし、その在任期間は短く、売り上げ低下を引き合いに出して、市場から2002年、自発的に撤退した。売り上げの低下は、現実的であるか想定に過ぎないかはともかくとして、HLA-DR4陽性レシピエントで理論的に出現するかもしれない慢性炎症性関節炎などの起こりうる副作用への懸念に起因するものと判断できる[Kalishら、1993]。新しいOspAに基づくワクシノーゲン類が現在開発されており、この潜在的合併症を低下させる[Koideら、2005; Willettら、2004]一方で、OspAに基づくワクチンの実現性についてまだ問題が残っている。ひとつは、長期防御を維持するために必要なブーストの頻度という問題である。OspAはダニ中腸で発現し、ダニ摂食で急激に下方制御され、哺乳類では発現しない[Gilmore, 2001; Schwannら、1995]。OspAに基づくワクチン類の作用機構は、ダニ内部のスピロヘータ類を標的とすることおよびそれらの伝播を防止することである[de Silvaら、1999]。伝染はダニ摂食48時間以内に起こるので、有効な防御は、抗OspA抗体類の高い循環力価に依存し、頻繁なブーストを必要とする。OspAに基づくワクチン類に関連した固有の問題は、初期感染時に高レベルで発現しかつ殺菌性抗体を惹起する抗原類を使用することで回避できる。

30

40

【0004】

50

OspCは、ライム病ワクチン開発でかなりの注目を浴びてきた。それは、前記のボレリア・ブルグドルフェリ・センス・ラト(B. burgdorferi sensu lato)コンプレックスの単離物類中普遍的な26kbの環状プラスミド上にコードされている22kDaの表面露出リポタンパク質である。その発現は、ダニ摂食で誘発され、初期哺乳類感染時に維持され〔Schwan, 2004〕、それは、感染中遺伝的に安定である〔Hodzicら、2000; Stevensonら、1994〕。抗OspC抗体類は、感染に対して防御するものの、前記ワクシノーゲンと配列が近縁であるOspCを発現する株類に対してのみ防御することが明らかにされた〔Gilmoraら、1996; Bockenstedtら、1997; GilmoraおよびMbow, 1999; Mathiesenら、1998; Scheibelhoferら、2003; Jobeら、2003; Rouselleら、1998; Wallichら、2001; Mbowら、1999; Probertら、1997; Brownら、2005; ProbertおよびLeFebvre 1994〕。OspC配列類の分析で、文字命名(AからUまで)により区別した約21個のOspC系統発生的なクラスター類またはタイプ類が明らかになった〔Seinostら、1999; Wangら、1999〕。クラスター1個の内部における配列の変動は一般的に2%未満であるが、OspCタイプ類では、22%も高くなりうる〔Wangら、1999; Theisenら、1995; BrissonおよびDykhuisen, 2004〕。このようなタイプ間におけるエピトープ類の変動は、単一のOspCタイプによるワクチン接種で得られる防御範囲が限定されることを説明する可能性が非常に高い。

10

20

【0005】

DunnおよびLuft名義の米国特許6,248,562(2001年6月19日付)は、同一および/または異なるボレリア種からの対応のおよび/または非対応のタンパク質類由来の少なくとも2個のポリペプチド類から構成されるキメラボレリア(Borreliia)タンパク質類を記載している。前記キメラタンパク質類に取り込まれたこのキメラポリペプチド類は、ボレリアのいかなる株からのいかなるボレリアタンパク質にも由来し、OspA、OspB、OspC、OspD、p12、p39、p41、p66およびp93を含む。このキメラタンパク質類は、ボレリア感染に対する免疫診断試薬類としておよびワクチン免疫原として使用できる。しかし、OspCタンパク質類中に存在するループ5およびアルファ5エピトープ類についての言及はない。

30

【0006】

両者ともにLivey名義で付与された米国特許6,872,550および6,486,130(それぞれ、2005年3月29日付および2002年11月26日付)は、ライム病に対するワクチン類としての用途のための構築体類を記載しており、それらは、OspC抗原類を含有している。しかし、これらの特許においてループ5およびアルファ5エピトープ類の特性解析については、言及されていない。

【0007】

Dattwyler名義の米国特許7,008,625(2006年3月7日付)は、単一のタンパク質内部にあるさまざまなボレリア株類および/またはタンパク質類の抗原性ポリペプチド類を開示している。前記キメラボレリアタンパク質類は、外表面タンパク質OspAおよび外表面タンパク質OspCのポリペプチド断片類から構成されている。これらのタンパク質類は、ライム・ボレリオシスに対して有効であり、また免疫診断試薬類のためにも有効である。しかし、ループ5およびアルファ5エピトープ類の特性解析については、言及されていない。

40

【0008】

刊行物“リコンビナントキメリックボレリアプロテインズ・フォー・ダイアグノシス・オブ・ライムディーズ(Recombinant Chimeric Borreliia Proteins for Diagnosis of Lyme Disease)”(Maria J.C. Gomes-Soleckiら、2000。J. Clin. Microbiol., 38:2530-2535)は、前記2つの特許類に関連してい

50

る。前記著者らは、組換えキメラ類を工学的に作製し、それぞれが、*Borrelia burgdorferi* (ボレリア・ブルグドルフェリ)の重要な抗原性タンパク質類の部分であるOspA、OspB、OspC、フラゲリン (Flaまたはp41)およびタンパク質p93を含む。この刊行物は診断に関しているが、最後のパラグラフでワクシノーゲンへの適用を記載している。前記著者らは、前記重要エピトープ類の遺伝的可変性をさらに研究してより優れたキメラ類を作製できることを述べているが、OspCのループ5およびアルファ5エピトープ類については、言及していない。

【0009】

【非特許文献1】BUCKLES et al. "Analysis of antibody response in humans to the type A OspC loop 5 domain and assessment of the potential utility of the loop 5 epitope in Lyme disease vaccine development." *Clinical and Vaccine Immunology*. October 2006, Vol.13, No.10, pages 1162-1165.

10

【非特許文献2】KUMARAN et al. "Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*." *The EMBO Journal*, 2001, Vol.20, No.5, pages 971-978.

【特許文献1】WO 00/78966

【特許文献2】USP 6 872 550

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

20

前記先行技術はこれまで、ライム病の予防用および/または治療用の複数OspCタイプ類に対する広い防御を付与するワクチンを提供できなかった。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、ライム病のためのワクチンおよび診断薬としての用途のためのキメラ多価組換えタンパク質を提供する。本発明は、一部ではあるが、数種の異なるOspC系統発生群類(タイプ類)由来の新規防御性エピトープ類の発見と特性解析に基づいており、それらのそれぞれは、哺乳類(例 ヒト)ライム病感染に関係している。これらのエピトープ類の同定が、異なるOspC感染性タイプ類からの複数エピトープ類を含むキメラタンパク質またはタンパク質類の構築を可能とした。従って、このキメラ組換えタンパク質は、ワクチンとして使用すると、それらOspCタイプ類を発現し哺乳類ライム病に関連する複数のボレリア株類に対する広い防御を惹起する。さらに、前記キメラタンパク質は、前記エピトープ類に対する抗体類を有する個体を識別し、従って、ある個体がライム病の原因となる物質に暴露したかまたは感染したかどうかを決定するための診断手段として有用である。本発明のいくつかの態様において、前記エピトープ類は、B細胞エピトープ類であるかおよび/または免疫優性エピトープ類である。

30

【0012】

本発明の目的は、2種以上の外表面タンパク質C(OspC)タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域から、または両者からのエピトープ類を含むキメラ組換えタンパク質を提供することである。1態様において、前記OspCタイプ類は、Smar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szyd、PHez、PWa、B、K、NおよびCから構成される群から選択される。1態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む。別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む。さらに別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、配列番号75または配列番号249中で示される主要アミノ酸配列を有している。いくつかの態様において、前記OspCタイプ類は、侵襲性ボレリア感染と関連している。

40

【0013】

50

本発明はさらに、その必要がある個体においてボレリアに対する免疫応答を惹起する方法を提供する。前記方法は、前記個体に対して2種以上の外表面タンパク質C(OspC)タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域からのまたは両者からのエプトープ類を含むキメラ組換えタンパク質を投与する段階を含む。本発明の1態様において、前記OspCタイプ類は、Smar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szi d、PHez、PWa、B、K、NおよびCから構成される群から選択される。本発明の1態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類A、B、KおよびDからのエプトープ類を含む。別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエプトープ類を含む。さらに別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、配列番号75または配列番号249中で示される一次アミノ酸配列を有している。いくつかの態様において、前記OspCタイプ類は、侵襲性ボレリア感染と関連している。

10

20

30

40

50

【0014】

本発明はさらに、ある個体がボレリアに暴露したかまたは感染したかどうかを確認する方法を提供する。前記方法は、1)前記個体から生体サンプルを得ること；2)前記生体サンプルを少なくとも1種の組換えキメラタンパク質、すなわち2種以上の外表面タンパク質C(OspC)タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域からのまたは両者からのエプトープ類を含む少なくとも1種の組換えキメラタンパク質に暴露させること；および3)前記生体サンプル中の抗体類が前記少なくとも1種のキメラタンパク質に結合するかどうかを決定することを含み、抗体結合の検出がボレリアに対する過去の暴露または感染を表す。本発明の1態様において、前記OspCタイプ類は、Smar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szi d、PHez、PWa、B、K、NおよびCから構成される群から選択される。本発明の1態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類A、B、KおよびDからのエプトープ類を含む。本発明の別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエプトープ類を含む。本発明のさらに別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、配列番号75または配列番号249中で示される一次アミノ酸配列を有している。本発明のいくつかの態様において、前記OspCタイプ類は、侵襲性ボレリア感染と関連している。

【0015】

本発明はさらに、2種以上の外表面タンパク質C(OspC)タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域からのまたは両者からのエプトープ類を含むキメラ組換えタンパク質に対する抗体類を提供する。本発明の1態様において、前記OspCタイプ類は、Smar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szi d、PHez、PWa、B、K、NおよびCから構成される群から選択される。本発明の1態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類A、B、KおよびD由来のエプトープ類を含む。別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエプトープ類を含む。さらに本発明の別の態様において、前記キメラ組換えタンパク質は、配列番号75または配列番号249中で示される一次アミノ酸配列を有している。いくつかの態様において、前記OspCタイプ類は、侵襲性ボレリア感染と関連している。前記抗体類は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれであってもよい。本発明の1態様において、前記抗体は、ボレリアスピロヘータ類に対して殺菌性である。

【0016】

本発明は、さらにキメラ組換えタンパク質類の免疫原性カクテルを提供する。前記カクテルにおける各キメラ組換えタンパク質は、2種以上の外表面タンパク質C(OspC)

タイプ類のループ5領域またはアルファヘリックス5領域からのまたは両者からのエピトープ類を含む。

【発明の効果】

【0017】

ヒトライム病の予防手段および診断手段として使用できるキメラ組換えタンパク質を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明は、ヒトライム病感染に関連するO s p Cタイプ類の新規防御性、タイプ特異的エピトープ類の同定と特性解析に基づいている。この新規エピトープ類は、O s p Cのカルボキシル末端の半分にある2個のドメイン類(領域類)内部に局在している。いずれのドメインも、これまで、免疫原性が高いとして同定されたことはなかった。第1のドメイン(本文中で、“アルファヘリックス5領域/ドメイン”または“アルファ5領域/ドメイン”または“ヘリックス5領域/ドメイン”と称する)は、残基160と200の間に局在し、ループ6の一部、アルファヘリックス5および非構造化C末端ドメインを含む二次的構造要素類を含有している(Kumar anら、2001)。第2のドメイン(本文中で“ループ5領域/ドメイン”)は、残基131と159の間に局在し、アルファヘリックス3の一部、ループ5およびアルファヘリックス4を含む二次構造要素類を含有している(Kumar anら、2001)。これらの領域類のそれぞれは、本発明の実施で使用できる少なくとも1個のエピトープを含んでいる。これらの2個のドメイン類からのエピトープ類、またはこれらの2個の領域内部からの抗原性ペプチド類またはポリペプチド類は、本発明の実施において単独でまたは好適にはあるキメラ免疫原中の他のエピトープ類と組み合わせて使用することができる。本発明のいくつかの態様において、前記エピトープ類は、免疫優性エピトープ類である。通常は、前記エピトープ類はB細胞エピトープ類であるが、T細胞エピトープ類も排除するものではない。

10

20

【0019】

前記新規エピトープ類の発見およびこのエピトープ類の異なるO s p Cタイプ類へのマッピングにより、多数のO s p Cタイプ類からの複数の線状、タイプ特異的免疫優性エピトープ類を含む多価キメラタンパク質類の構築が可能となった。ワクチンとして使用すると、前記の多価(ポリバalent)組換えキメラタンパク質は、前記のキメラタンパク質におけるそれらに対応するO s p Cタイプ類を発現するボレリアスピロヘータ類による感染に対して、すなわち極めて感染性の高いそれらのボレリアによる感染に対して広い防御を惹起する。さらに、前記キメラタンパク質は、前記キメラタンパク質に含まれるエピトープ類に対する抗体を有する個体を同定し、かつある個体がライム病の原因物質に暴露したかおよび/または感染したかどうかを決定する診断手段として有用である。

30

【0020】

本発明の理解を容易にするため、下記の定義を示す：

【0021】

抗原：ある抗体によって結合された実体を称しかつ前記抗体の産生を誘発する実体を称するために歴史的に使用されてきた用語。さらに現在の用途では、抗原の意味を、抗体によって結合された実体に限定しており、一方単語“免疫原”は、抗体産生を誘発する実体のために用いられている。本文中で検討した実体は免疫原性でありかつ抗原性である場合、免疫原または抗原のいずれかとしてそれに言及するのは、通常は、その意図した用途に従って行われるであろう。用語“抗原”、“免疫原”および“エピトープ”は、この明細書では相互変換可能な形で用いる。

40

【0022】

B細胞エピトープ：B細胞レセプターによって認識され、分泌された抗体によって結合できる抗原上の特異的化学ドメイン。この用語は、“抗原決定基”と相互交換可能である。

【0023】

免疫優性エピトープ：主要なあるいは非常に強力な免疫応答を誘発する分子上のエピトープ

50

ブ。

【0024】

線状エピトープ：ペプチド結合によって結合されたアミノ酸類の単一の、中断されていない連続的鎖を含むエピトープで、ペプチドあるいはポリペプチドを形成する。このようなエピトープは、その一次構造によってすなわち前記鎖中のアミノ酸類の線状配列によって記述できる。

【0025】

立体構造的エピトープ：アミノ酸類の切断されていない線状配列の部分ではないが前記タンパク質の二次、三次および/または四次相互作用により前記エピトープ中において他の残基類に近接させてある少なくともいくつかのアミノ酸類で構成されるエピトープ。この
10 10
ような残基類は、一次配列に関して前記エピトープ中の他の残基類から離れて局在できるが、タンパク質折り畳みにより前記立体構造的エピトープ中で他の残基類の近くに空間的に局在できる。

【0026】

ループ5領域/ドメイン：図23に示したタイプA O s p C配列類の残基類131から159と並ぶ残基類を含むO s p Cの領域。前記領域に含まれる株B31 O s p C二次構造要素類は、アルファヘリックス3、ループ5、およびアルファヘリックス4の部分であり、K u m a r a n ら (2 0 0 1) が定義している。

【0027】

アルファヘリックス5領域/ドメイン：図23に示した株B31 (O s p CタイプA) 配列のアミノ酸類160乃至200と並ぶ残基類と図23に示さなかった前記タンパク質のC末端部分 (B 3 1 配列のアミノ酸類201 - 220) を含むO s p Cの領域。この領域
20 20
に含まれる株B31 O s p C二次構造要素類は、ループ6の部分、アルファヘリックス5、および構造化されていないC末端ドメインであり、K u m a r a n ら (2 0 0 1) が定義している。

【0028】

タンパク質：ペプチド結合によって共有結合された約100個以上のアミノ酸類の線状配列。

【0029】

ポリペプチド：ペプチド結合によって共有結合された約20個から約100個のアミノ酸
30 30
類の線状配列。

【0030】

ペプチド：ペプチド結合によって共有結合された約20個以下のアミノ酸類の線状配列。

【0031】

用語“タンパク質”、“ポリペプチド”および“ペプチド”は、本文で相互交換可能に使用してある。

【0032】

キメラタンパク質：その一次配列が、天然の単一分子でともに出現することはない複数ペ
40 40
プチド、ポリペプチド、および/またはタンパク質配列類を含む組換えタンパク質。

【0033】

キメラタンパク質の価数 (例 “多価” または “ポリバレント”) とは、前記キメラワク
シノーゲンに含まれるO s p Cタイプ特異的エピトープ保有ポリペプチド類の数を称する。たとえば、二価キメラは、タイプAのアルファヘリックス5およびタイプBのアルファヘリックス5から構成されるか、またはタイプAのアルファヘリックス5およびタイプAのループ5から構成される。各ポリペプチドエピトープ保有領域中には、複数の明確なエピトープ類があることもある。

【0034】

元々のすなわち天然すなわち野生型配列：ペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸類の天然に見られる配列。

【0035】

10

20

30

40

50

組換えペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸：クローニング、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）等のような分子生物学技術を用いて産生させたかおよび／または操作されたペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸。

【0036】

タイプ特異的：単一系統発生群に主に関連。

【0037】

侵襲性感染：OspCタンパク質は、OspCタイプを有するボレリアがヒト感染時にダニ咬み傷による当初の接種部位を取り囲む皮膚以外の位置（例 血漿、脳脊髄液等）から単離されたならば、“侵襲性感染に関連する”と言われる。

【0038】

本発明はしたがって、前記のループ5および／またはアルファヘリックス5領域類からの複数の線状エピトープ類を含む組換えキメラタンパク質類を提供し、それらのうちの少なくとも2個は侵襲性感染に関連する互いに異なるOspCタイプ類からである。好適には、約2乃至約20、および好適には約6乃至約10の互いに異なるOspCタイプ類を表わす抗原性エピトープ類が、単一のキメラタンパク質に含まれる。通常は前記エピトープ類の少なくとも2個は、一次配列が互いに異なりかつ異なるOspCタイプ類から派生しているが、あるキメラに単一タイプのエピトープの複数コピーを含むことまたは同一OspCタイプの元来の配列に基づくかあるいはそれに由来する数種の配列類を含むことも可能である。あるキメラにおける線状エピトープ類の総数はやや変動することもあるが、一般的に、その範囲は約10乃至20であろう。本発明の1態様において、免疫優性エピトープ類は、OspCタイプ類、Smar、PLi、H13、PFiM、SL10、PMit、PKi、Pbes、HT22、Pko、PLj7、VS461、DK15、HT25、A、72a、F、E、M、D、U、I、L、H、Szyd、PHez、PWa、B、K、NおよびCの2種以上から選択される。1態様において、前記キメラタンパク質は4価で、タイプ類A、B、KおよびD由来のエピトープ類を含む。別の態様において、前記キメラタンパク質は8価であり、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDからのエピトープ類を含む。しかし、当業者は、OspCタイプ類の他の組み合わせからのエピトープ類も、結果として生成したキメラが適切な免疫応答を産生しおよび／またはライム病防止においてワクチンとして有効である限りにおいて、同様に使用できることを理解するであろう。他の適切な組み合わせの例は、1) E、N、I、C、A、B、K、D；2) A、B、K、D、E、N、C；3) I、C、A、B、K、D；および4) C、A、B、K、Dを含むがそれらに限定されない。

【0039】

いくつかの態様においては、ループ5およびアルファヘリックス5領域類は両者とも含まれるであろう。例えば、“E、N、I、C、A、B、K、D”構築体は、OspCタイプ類E、N、I、C、A、B、KおよびDのそれぞれのループ5およびヘリックス5領域類を両者とも含むこともできる。しかし、これは常にそうであるとは限らない。例えば、タイプAのループ5領域とE、N、I、C、B、KおよびDのアルファヘリックス5領域類が含まれることもある；または、各OspCタイプのループ5領域のみが含まれることもある；またはアルファヘリックス5領域のみが含まれることもある；または他の組み合わせが含まれることもある（例 タイプE、N、IおよびCのループ5領域とタイプ類A、B、K、Dのアルファヘリックス5領域）。多くのこのような組み合わせを当業者は思い付くであろうし、そのような変形したものも包含することを意図している。

【0040】

さらに、あるキメラ内部のエピトープ類の直線的順序も変動し得る。一般的に、アミノからカルボキシル末端までの順序は、“ループ5領域、アルファヘリックス5領域、ループ5領域、アルファヘリックス5領域...”等であろう。例えば、E、N、I、C、A、B、K、D構築体の場合、好適な順序は、前記キメラの長さに沿って“Eタイプループ5領域、Eタイプアルファヘリックス5領域；Nタイプループ5領域、Nタイプアルファヘリックス5領域；Iタイプループ5領域、Iタイプアルファヘリックス5領域...”等であり

10

20

30

40

50

、異なるO s p Cタイプ類および/または異なるドメイン類は任意に中性リンカー配列類によって分離されている。しかし、この順序は、例えば前記キメラに含ませるために選択した要素類に応じて変えることもできる。O s p Cタイプ類およびドメイン類のいかなる順序も、結果として生成したキメラが適切な免疫応答を産生しおよび/またはライム病予防におけるワクチンとして有効であること、または診断に有効に使用できる限りにおいて、使用することができる。例示的キメラ配列類の例は、図25A-Jに示される。ボレリア数株類からのO s p Cのタンパク質およびDNAアクセス番号に対する重要なキーを図26に表形式で示した。

【0041】

前記キメラタンパク質に含まれるアミノ酸配列類は、アルファヘリックス5および/またはループ5領域類またはそれらの抗原性断片類を含むことができる。“抗原性断片”とは、感染時に認識される少なくとも1個の線状エピトープを含む一次O s p C配列のセグメントを意味する。このようなエピトープは、O s p Cの組換えタンパク質サブユニット中で発現すると、細胞表面で発現した野生型タンパク質の結合に類似した方法で感染誘発抗体類を結合する能力を保持する。それぞれの抗原性断片は、1個を超える明白なエピトープを含むことがあるであろう。当業者は、あるエピトープに対する抗体類の親和性すなわち結合力の測定がやや不正確であること、およびこの親和性/結合力は、免疫応答時に例えばアフィニティ成熟/体細胞の超変異により有意に変化しうることを理解するであろう。しかし、一般的に、前記キメラタンパク質に対する抗体類結合の親和性/結合力は、天然の未変化アルファ5またはループ5によって発揮される親和性よりも、少なくとも約50%、好適には約60%、さらに好適には約70%、はるかに好適には約80%、最も好適には約90-100%またはそれ以上の範囲にある。一般的に、前記キメラタンパク質類に含まれる抗原性配列類は、アミノ酸類約20乃至約100個、好適には約30乃至約70個を含むであろうし、前記キメラタンパク質類それ自体は、アミノ酸類を総計約160乃至約800個、好適には約240乃至約560個を含むであろう。さらに、前記の抗原性配列類は、本文で“エピトープ類”と称されることがあるが、それらが完全な“天然”エピトープを含んでも含まなくてもよく、ただし、それらが本文に記載の抗体結合特性を有する限りにおいてである。

【0042】

これとは別に、適切な抗原断片類または抗原性配列類またはエピトープ類は、あるキメラタンパク質に取り込まれた時、前記キメラタンパク質を投与した宿主における前記エピトープに対する適当な抗体産生を惹起できる能力によって識別することもできる。当業者は、抗体力価定義が変わりうることを理解するであろう。本文で、“力価”とは、試験タンパク質100ngを塗布したELISAウェル上における利用可能な結合部位の半分を結合するであろう抗血清の逆希釈度であると理解される。一般的に、適切な抗体産生は、約100乃至約100,000の範囲、好適には約10,000乃至約100,000の範囲にある抗体力価を特徴とする。これとは別に、特に診断アッセイにおいて、前記“力価”は、バックグラウンドの結合レベルの約3倍はなくてはならない。例えば、“陽性”とみなすためには、試験における反応性が未感染個体の血清中で検出された反応性を少なくとも3倍は超えていなければならない。好適には、前記抗体応答は防御性で、すなわち、ワクチン無接種の宿主に比較して、後でボレリアに暴露するワクチン接種宿主における疾患症状の発現を防止するかまたは低減する。

【0043】

本発明によるひとつの例示的キメラタンパク質のアミノ酸配列を、図9Bに示している。この例示的態様において、前記キメラは、タイプA O s p Cからのループ5領域アミノ酸配列類とO s p C タイプB、KおよびDのアルファヘリックス5領域類配列類を含む。この場合、前記のタイプA O s p C配列は、株LDP56からであり、ヌクレオチドアクセス番号はEF053513でありタンパク質アクセス番号はABK41054である；前記タイプB O s p Cは、株LDP73からであり、ヌクレオチドアクセス番号はEF053525でありかつタンパク質アクセス番号はABK41066である；タイ

10

20

30

40

50

ブK O s p Cは、株L D P 8 9からであり、ヌクレオチドアクセス番号はE F 0 5 3 5 2 3であり、タンパク質アクセス番号はA B K 4 1 0 6 4である；および前記タイプD O s p Cは株L D P 1 1 6からであり、ヌクレオチドアクセス番号はE F 0 5 3 5 2 7であり、かつタンパク質アクセス番号はA B K 4 1 0 6 8である。当業者は、多くのポレリア株類からのO s p Cが公知であるかまたは発見でき、本発明の実施に使用できることを理解するであろう。

【0044】

当業者は、本発明のいくつかの態様において、本発明のキメラタンパク質に含ませるために選択したアミノ酸配列類が、直接、O s p Cタンパク質の元来のすなわち天然の配列の一次アミノ酸配列に対応するが、それが必ずしもそうでない場合もあることを理解するであろう。本発明のキメラタンパク質に含まれるエピトープのアミノ酸配列は、少し変化させることができ、それでもなお、本発明における使用に適しているであろう。例えば、ある保存的アミノ酸置換も、エピトープの免疫応答惹起能力に有害な影響を及ぼすことなく、行うことができるであろう。当業者は、例えば陽電荷アミノ酸を別の陽電荷アミノ酸に置換すること；陰電荷アミノ酸を別の陰電荷アミノ酸と置換すること；疎水性アミノ酸を別の疎水性アミノ酸と置換することなど、このような保存的置換の性質を理解するであろう。このような置換または本発明のキメラタンパク質に含まれるエピトープの配列を変化させることは、結果として生成したエピトープが適切な免疫応答を惹起する機能を有している限りにおいて、本発明に包含されるとみなされる。さらに、本発明のキメラタンパク質に含まれるアミノ酸配列類は、全長天然エピトープまたはエピトープ含有ドメインを包含する必要はない。当業者は、エピトープであることが公知であるかまたはエピトープ類を含むことが公知であるアミノ酸配列類の切断形態も、さまざまな理由から本発明における使用に好適であることを理解するであろう。このように置換されているかまたはそうでない場合には変化させてあるアミノ酸配列類は、本文で、元来の野生型すなわち天然配列に“基づくか”あるいは“由来する”と称される。一般的に、線状エピトープを“誘導した”かまたは線状エピトープを“基づかせた”O s p Cタンパク質類は、天然に出現するO s p Cタンパク質類である。これらの天然O s p Cタンパク質類は、これとは別に、天然すなわち野生型タンパク質類と称される。

【0045】

一次配列に対するこのような変更は、さまざまな理由のいずれのためにも導入でき、例えば、プロテアーゼ切断部位の削減または導入、溶解度の上昇または低下、折り畳み、イオン性相互作用、塩ブリッジ類等のような分子内あるいは分子間相互作用を促進するかまたは低下させるなどの理由からであり、それらは、そうでない場合には、キメラの長さ方向に沿ってそれぞれのエピトープ類の提示とアクセス可能性を妨害することもある。このような変化は全て、エピトープが派生したもとのO s p Cタイプに対する防御性抗体反応を惹起するべく結果として生成したアミノ酸配列が機能する限りにおいて、本発明に包含されるとみなされる。一般的に、このような置換した配列類は、天然タンパク質中の対応配列と少なくとも約50%同一であろうし、前記野生型配列と好適には約60乃至70、さらに好適には70乃至80、または80乃至90%同一であろうし、好適には、約95乃至100%同一であろう。

【0046】

本発明のいくつかの態様において、前記キメラワクシノーゲン中のそれぞれの線状エピトープ類は、性質が幾分なりとも中性である介在配列類によって互いに分離されており、すなわち、それらは、ポレリアに対してそれ自体の中でおよびそれ自体の力で免疫応答を惹起するのではない。このような配列類は、あるキメラのエピトープ類の間に存在することもあれば存在しないこともある。もし存在するならば、それらは、例えば、前記エピトープ類の分離に役立ち、前記エピトープ類の互いからの立体的単離に寄与する。これとは別に、このような配列類は、組換え処理操作例えばクローニング操作の単なるアーティファクトであることもある。このような配列類は、典型的には、リンカーまたはスペースペプチド類として公知であり、それらの多くの例が、当業者に公知である。例えば、C r a

10

20

30

40

50

sto、C. J. および J. A. Feng. 2000. LINKER: 融合タンパク質類のためのリンカー配列類産生プログラムを参照。非構造化リンカー類を記載した参考書であるプロテインエンジニアリング (Protein Engineering) 13 (5): 309 - 312。構造化 (例 ヘリカル) 配列リンカー類は、また、例えば、その二次構造を有することが公知の既存の配列類を用いてまたは前記リンカー類設計のための基本的公知の生化学的原則類を用いても、設計できる。さらに、他の要素類も、前記キメラタンパク質類中には存在でき、例えば、リーダー配列類すなわちタンパク質の精製または検出を促進する前記タンパク質に“タグを付ける”配列類であり、その例は、ヒスチジンタグ類、検出タグ類 (例 S-タグ、または Flag-タグ)、公知の T 細胞エпитープ含有配列類のような他の抗原性アミノ酸配列類およびタンパク質安定化モチーフ類等が含まれるがそれらに限定されない。さらに、前記キメラタンパク質類は、例えば、アミド化、スルホニル化、脂質化、または当業者に公知の他の技術類によって化学的に修飾することもできる。

【0047】

本発明はさらに、本発明のキメラタンパク質類をコードする核酸配列類を提供する。このような核酸類には、DNA、RNA、およびそれらのハイブリッド類等が含まれる。さらに、本発明は、このようなコードする配列類を含むか宿しているベクター類を包含する。適切なベクター類の例には、プラスミド類、コスミド類、ウイルスに基づくベクター類、発現ベクター類等が含まれるが、それらに限定されない。好適な態様において、前記ベクターは、プラスミド発現ベクターであろう。

【0048】

本発明のキメラタンパク質類は、いかなる適切な方法でも産生させることができ、それらの多くは、当業者に公知である。例えば、前記タンパク質類は、化学的に合成できるか、または、組換え DNA 技術を (例 菌細胞中において、細胞培養物 (哺乳類、酵母または昆虫細胞) 中において、植物類または植物細胞中において、または細胞非含有原核または真核細胞に基づく発現系中において、他のインビトロ系によって、等) 用いて産生させることができる。本発明はまた、特にライム病 (ライム・ボレリオシス (Lyme borreliosis)) として出現した時においてボレリア感染を防止するかまたは処置するワクチンとして利用することもできる免疫応答惹起における使用のための組成物類を提供する。免疫応答を惹起するとは、抗原投与が特異的抗体類の合成を起こすか (上記の力価で) および/または細胞性増殖を起こすことを意味しており、それらは、³Hチミン取り込みによって測定される。“ワクチン”とは、ワクチン無接種 (例 添加物のみ) 対照生物に比較して、免疫応答を惹起し、その結果、ボレリアによるチャレンジに対して防御し、全体的にまたは部分的にボレリア感染に関連した症状 (すなわち、ライム病の症状) を防止するかまたは停止させる。前記組成物類は、本文に述べたような1種以上の実質的に精製された組換えキメラタンパク質類および薬理的に適切な担体を含む。前記組成物中の複数のキメラタンパク質類は、同一であっても異なってもよく、すなわち、前記組成物は、異なるキメラ類の“カクテル”であってもよく、または、ある組成物は、単一タイプのキメラを含む。ワクチンとしての用途のための上記組成物類の調製は、当業者に周知である。典型的には、液状溶液類または懸濁液類のいずれかとし調製されるが、錠剤、丸剤および粉末剤等のような固体形状も考慮される。投与前液体中における溶液または懸濁液に適した固体形状も同様に調製できる。前記調製物はまた、懸濁化することもできる。上記活性成分類は、薬学的に許容できかつ前記活性成分と相溶性の賦形剤類と混合することもできる。適切な賦形剤類は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、またはそれらの組み合わせである。さらに、前記組成物は、湿潤化または懸濁化剤類、pH緩衝剤類等のような少量の補助物質類を含むことができる。本発明のワクチン調製物類はさらに、アジュバントを含むことができ、その適切な例は、セピック (Seppic)、クイル (Quil) A、アルヒドロゲル (Alhydrogel) 等を含むがそれらに限定されない。もし前記組成物の経口形態を投与することを望むならば、さまざまな粘稠剤類、芳香剤類、希釈剤類、懸濁剤類、分散補助剤類または結合剤

10

20

30

40

50

等を添加できる。本発明の組成物は、前記組成物を投与に適した形状で提供するためにこのような付加的成分類のいずれも含むことができる。前記処方類における最終的なキメラタンパク質の量は、変えることができる。しかし、一般的に、前記製剤類中における量は、約 0.01 - 99 重量 / 容量 % である。

【0049】

前記方法類は、薬理的に許容できる担体中にキメラ組換えタンパク質を含む組成物を哺乳類に投与することを必要とする。本発明のワクチン調製物類は、当業者に周知の多くの適切な手段のいずれによっても投与でき、注入によって、吸入によって、経口によって、経鼻的に、前記キメラタンパク質を含有する食品摂取によって等のような手段を含むがそれらに限定されない。好適な態様において、投与様式は、皮下または筋肉内である。さらに、前記組成物類は、免疫系をブーストする物質類、化学療法剤類等のような他の治療手段類と連携させて投与することもできる。

10

【0050】

本発明は、ボレリアに対する免疫応答を惹起しかつ哺乳類においてボレリア感染に対してワクチン接種する方法類を提供する。1 態様において、前記哺乳類はヒトである。しかし、当業者は、このようなワクチン接種が同様に望ましい他の哺乳類も存在することを理解するであろうし、例えば、前記調製物類は、また、獣医学目的のために使用することもできる。例には、イヌ、ネコ等のようなコンパニオン“ペット類”；家畜、ウマ、牡牛、ヒツジ、ブタ、ヤギ等のような食料源となりかつ労働およびレクリエーション用にもなる動物類；ボレリアの貯蔵場所として作用する野生動物類（例 マウス、シカ）さえも含むがそれらに限定されない。本発明はまた、診断薬および本発明のキメラタンパク質類内部に含まれるエピトープ類に対する抗体類を有するヒトを識別するために前記診断薬を用いる方法を提供する。ボレリア暴露の疑いがあるかまたはボレリア暴露のリスクのある個体（例 ヒト、シカ、またはボレリアスピロヘータ類による感染の疑いのある他の哺乳類）から得た生体サンプルを、本発明のキメラタンパク質類に接触させる。公知の方法論を用いて、前記キメラタンパク質と前記生体サンプル中の抗体類の間における結合反応の有無を、検出する。陽性の結果（結合が起こり、したがって、抗体類が存在する）は、前記個体がボレリアに暴露したことがあるかおよび / または感染していることを示唆する。この関係からして、分析目標に応じて、O s p C タイプ類の問題のいずれのサブセットに対しても特異的なキメラ類が構築でき、すなわち、あらゆる可能な O s p C タイプ類は、前記診断薬キメラに含まれることもあるし含まれないこともある。

20

30

【0051】

さらに、本発明の診断薬の様相は、臨床的使用または家庭での使用に限定されず、例えば、ダニ類から単離されたボレリアスピロヘータ類を同定し、O s p C タイプ類の地理的分布を調べること、等、研究手段として実験室での用途に対しても貴重なものであろう。

【0052】

本発明は、本文に開示したエピトープ類および / またはキメラタンパク質類に対する抗体類も包含する。このような抗体類は、ポリクローナル、モノクローナルまたはキメラであってもよく、当業者に公知のいかなる方法でも産生させることができる。本発明の好適な態様において、前記抗体類は殺菌性であり（殺ボレリア性）、すなわち、前記抗体類に対してボレリアスピロヘータ類を暴露させて前記スピロヘータ類を死滅させる。このような抗体類は、例えば、ボレリアに対する過去の暴露を診断するための検出試薬類として、ボレリア研究のためのキット中試薬として、ボレリア感染を処置するため等、さまざまに使用できる。

40

【0053】

（実施例）

下記の実施例は、本発明のさまざまな態様を例示するために提供するが、いかなる意味でも限定するものとみなすべきではない。

【実施例 1】

【0054】

50

侵襲性ヒトライム病単離物中におけるOspCタイプ多様性の実証とOspC抗体応答の特異性を定義するこれまで特性解析されていないエピトープ類の同定
はじめに

ライム病は、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・ガリニイ (*B. garinii*) またはボレリア・アフゼリイ (*B. afzelii*) に感染したイクソデス (*Ixodes*) ダニ類による咬み傷を通じてヒトに伝染する。外表面タンパク質C (OspC) は、伝染過程に関連しかつおそらく哺乳類における初期感染の確立にも関与する重要な毒性因子と考えられている (Grimmら、2004; Parllら、2004; Schwanら、1995)。OspCは、約22kDaの表面露出性のプラスミドにコードされた可変リボタンパク質である (Fuchsら、1992; Marconiら、1993; Sadzieneら、1993)。結晶構造は、3種のOspCタンパク質類について明らかになっている (Eickenら、2001; Kumaranら、2001)。前記タンパク質は大部分がヘリカルであり、5個のアルファヘリックスが可変性のループで連結されている。前記ループは、リガンド結合ドメインを形成すると仮説を立てられてきた (Eickenら、2001; Kumaranら、2001)。証拠は、OspCがスピロヘータのダニ中腸からの転移を唾液腺中の未同定レセプター類に結合するアドヒシンとして作用することによって促進するかもしれないことを示唆している (Palら、2004)。OspCのオルソログが再燃性発熱群の数種で同定され、このOspC関連タンパク質類が他のボレリア種においても同様の役割を果たしている可能性を示唆している (Marconiら、1993; Margolisら、1994)。OspC発現は環境的に制御されており、ダニ摂食により誘発され、OspCは、哺乳類における初期感染時の主要抗原である (Alversonら、2003; Schwanら、1998; Stevensonら、1995)。転写は、RpoN/S制御ネットワークによって少なくとも部分的には制御されている (Hubnerら、2001)。伝播時および初期感染時におけるOspC発現の一時的性質の正確な詳細については、互いに矛盾する報告があることに留意せねばならない (Ohnishiら、2001; Schwanら、1995)。

【0055】

OspCは、有意な遺伝的および抗原性多様性を示す (Theisenら、1995; Theisenら、1993)。OspC系統発生群21種 (以下OspCと称する) の輪郭が述べられている (Seinostら、1999; Wangら、1999)。OspCタイプ類は、文字命名 (AからU) で区別している。前記データベース中にある数百のOspCアミノ酸配列類の分析は、OspCタイプ類での多様性が30%と高く、ひとつのタイプ内では一般的に6%未満である。Seinostらは、OspCタイプA、B、IおよびKとヒトにおける侵襲性感染との間の相関を仮説として提示している (Seinostら、1999)。Lagalらはまた、一重鎖立体構造多形分析によって明らかになった特定のospC変異体類は、侵襲性ヒト感染と相関すると報告した (Lagalら、2003)。しかし、Alghaferiおよび共同研究者らによる最近の研究では、この相関の強さを問題にしている (Alghaferiら、2005)。OspCタイプすなわち配列および宿主病原体相互作用の機能に及ぼす影響は、研究の重要かつ豊穡な領域を示している。OspCは、ライム病ワクチン開発での使用で研究されてきた (Bockenstedtら、1997; Gilmoreら、2003; Gilmoreら、1999a; Probertら、1994; Theisenら、1993; Wilskeら、1996)。しかし、OspC変異とOspCの抗原性構造についての知識が限定されていることが、こうした努力を複雑にしてきた。OspCは防御能力を有してはいるが、同一株に対してのみである (Bockenstedtら、1997; Gilmoreら、1999; Gilmoreら、1999b; ProbertおよびLeFebvre、1994; Wilskeら、1996)。このことは、前記防御性エピトープ類が、配列が極めて可変性である前記タンパク質の領域内部に属することを示唆している。

【0056】

本研究の目標は、幾重にも重なるものであった。最初に、OspCタイプと侵襲性感染の間の推定上の相関を評価することを、メリーランド州の一定の患者群から回収した侵襲性および非侵襲性単離物類のOspCタイプを決定することによって、行った。第2に、OspCに対する抗体応答をさらに理解するための試みの中で、前記応答がタイプ特異的であるかどうか決定しようとした。最後に、OspCの抗原性構造の明確化を、マウスにおいて感染時の抗体応答を惹起するエピトープ類を同定することによって、行った。本文に示したデータは、侵襲性感染に関連したOspCタイプ類の数が過去に前提していたよりも大きいことを示唆している (Seinostら、1999)。さらに、我々は、これまで特性解析されていないエピトープ類を2種同定し、OspCに対する抗体応答がタイプ特異的であるようだということを明らかにした。これらの分析は、ライム病病因論におけるOspCの役割についての我々の理解を深めかつOspCに基づくワクチンの構築を促進する重要な情報を提供する。

10

【0057】

実験操作

菌単離物類、感染血清の培養および産生

メリーランド州ヒト患者から回収したライム病単離物類を、これらの分析で使用した (表1)。患者は、本研究前にインフォームドコンセントを提出し、John Hopkins Medicine Institutional Review Boardにより承認された。スピロヘータ類は、33においてBSK-H完全培地 (Sigma) で培養し、暗視野顕微鏡法でモニタリングし、遠心分離により採取した。クローン群は、先に記載されているようにサブサーフェイスプレーティングによって一部の単離物類のために作製した (Sungら、2000)。各コロニー類のospCタイプを決定するため、(下記に述べるように) ospC遺伝子をPCR増幅させ、配列決定し、比較配列分析を行った。公知タイプのOspCタンパク質類を発現するクローン群シリーズに対する抗血清を産生させるため、スピロヘータ類 10^3 を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、C3H-HeJマウスに針を接種した (皮下、肩甲骨の間; Jackson Labs)。前記マウスの感染は、先に記載されているように (Zhangら、2005) flaB遺伝子を標的とするプライマー類を用いて接種第2または4週後に耳穿孔生検物のリアルタイムPCRによって、確認した。血液は各マウスから尾部の切断により第0、2、4および8週時点で採取し、感染血清を採取した。これらの分析で使用した付加的抗血清と感染血清は先に記載されている (McDowellら、2002)。

20

30

【0058】

【表 1】

表 1. 菌単離物類、起源情報および OspC タイプ

ボレリア・ブルグドルフェリ (B.burgdorferi)単離物	起源	OspC タイプ
B31MI	ダニ	A
5A4	B31MI 由来クローン	A
LDP56	ヒト血液	A
LDP61	ヒト血液	A
LDP60	ヒト血液	A
LDP80	ヒト血液	A
LDP76	ヒト血液	A
LDS106	ヒト皮膚	A
LDP73	ヒト血液	B
LDS79	ヒト皮膚	H
LDS101	ヒト皮膚	H
LDP84	ヒト血液	C
LDP63	ヒト血液	N
LDC83	ヒト CSF	N
LDP120	ヒト血液	N
LDP74	ヒト血液	K
LDS81	ヒト皮膚	K
LDS88	ヒト皮膚	K
LDP89	ヒト血液	K
LDP116	ヒト血液	D

10

20

【 0 0 5 9 】

DNA 単離、OspC タイピングおよびコンピュータ利用の構造解析

前記 OspC タイプを決定するため、総 DNA を先に記載されているように各株から単離し (Marconisら、2003)、OspC20 (+) LIC および OspC210 (-) LIC プライマー類による PCR のためのテンプレートとして用いた (表 2)。PCR は、下記のサイクル条件下でエクスパンドハイフィデリティ (Expand High Fidelity) ポリメラーゼ (Roche) を用いて行った: 初期変性は 94 で 2 分間; 94 で 15 秒、50 で 30 秒、68 で 60 秒を 10 サイクル; 94 で 15 秒、50 で 30 秒、68 で 60 秒に、最終 20 サイクル目のそれぞれに 5 秒追加する; 最終伸長は 68 で 7 分間。キアクイック (QiaQuick) PCR 精製キット (Qiagen) を用いて増幅物類を回収し、T4 DNA ポリメラーゼで処理し一重鎖オーバーハング類を産生させ、pET-32 Ek/LIC ベクター (Novagen) 中にアニーリングさせ大腸菌 (E. coli) NovaBlue (DE3) 細胞 (Novagen) 中に形質転換した。これらの操作類のための方法は、前記製造業者の説明に従って進めた。コロニーをアンピシリン耐性について選択し ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)、PCR によって ospC インサートをスクリーニングした。選択したコロニーを LB 培地 (Fisher) に移し、振動させながら (300 rpm) 37 で培養し、キアフィルター・ミディ・プラスミド・アイソレーション・キット類 [QiaFilter Midi Plasmid Isolation Kits (Qiagen)] を用いてプラスミドを単離した。ospC インサート類を、作業毎の料金支払いという方式で配列決定した (MWG Biotech)。決定した配列類を、デフォルトパラメータ類による ClustalX (35) を用いて、翻訳し並べた。OspC タイプを決定するため、隣接する結合ツリーを作成し、ブーツストラップ値を計算した (1000 回試行)。結果として生成した系統発生図を、N-J プロッターで見えるようにした、前記データベースで利用可能な

30

40

50

追加の *OspC* 配列類もこの分析に含めた。*OspC* の構造モデルを、NCBI 分子モデルデータベースファイル類 1GGQ、1F1M、および 1G5Z (4、15) および ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml で入手可能なソフトウェア CN3D を用いて作成した。

【0060】

【表2】

表2. 本研究で用いたポリメラーゼチェーン反応プライマー類

プライマー類	配列 ^a	配列番号
<i>ospC</i> 20(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTAATAATTCAGGGAAAGA</u> TGGG	163
<i>ospC</i> 40(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTCCTAATCTTACAGAAAT</u> AAGTAAAAAAT	165
<i>ospC</i> 60(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTAAGAGGTTGAAGCGT</u> TGCT	165
<i>ospC</i> 80(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTAATAATACACCAAATAA</u> TGGTTTG	166
<i>ospC</i> 100(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTGGAGCTTATGCAATATC</u> AAGCC	167
<i>ospC</i> 130(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTTGTTCTGAAACATTTAC</u> TAATAAATTAAG	168
<i>ospC</i> 136(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTAATAAATTAAGAAAA</u> ACACACAGATCTTG	169
<i>ospC</i> 142(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTCACACAGATCTTGGTAA</u> AGAAGG	170
<i>ospC</i> 151(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTAAGGATGCTGATGCAAA</u> AGAAG	171
<i>ospC</i> 171(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTGAAGAACTTGGAAAATT</u> ATTTGAATC	172
<i>ospC</i> 191(+) LIC	<u>GACGACGACAAGATTCCTGCTAATTCAGTTAA</u> AGAGCTTAC	173
<i>ospC</i> 130(-) LIC	<u>GACGACAAGCCCGGTTTAACATTTCTTAGCCG</u> CATCAATTTTTTC	174
<i>ospC</i> 150(-) LIC	<u>GACGACAAGCCCGGTTTAACACCTTCTTTAC</u> CAAGATCTGT	175
<i>ospC</i> 170(-) LIC	<u>GACGACAAGCCCGGTTTAAGCACCTTTAGTTT</u> TAGTACCATT	176
<i>ospC</i> 190(-) LIC	<u>GACGACAAGCCCGGTTTACATCTTTAGCTG</u> CTTTTGACA	177
<i>ospC</i> 200(-) LIC	<u>GACGACAAGCCCGGTTTAGCTTGTAAGCTCTT</u> TAACTGAATTAGC	178
<i>ospC</i> 210(-) LIC	<u>GACGACAAGCCCGGTTTAAGGTTTTTTGGAC</u> TTTCTGC	179

^a LIC テイル配列類には、下線を付した。

【0061】

組換えタンパク質類の作成

全長 *OspC* および短く切断した *OspC* を作成するため、ボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdorferi*) B31MI のタイプ A *ospC* 配列類 (Fraserら、1997) に基づき、プライマー類を設計した。前記プライマー類は、リガーゼ非

10

20

30

40

50

依存性クローニング (LIC) かつ発現ベクターである pET-32 Ek/LIC ベクター (Novagen) 中へのアニーリングを可能とするテイル配列類を有している。全ての LIC 操作類は、先に記載されているようにした (Hovissら、2004)。全構築体類の配列を確認するため、組換えプラスミド類を、QiaFilter Midi Plasmid 精製キット類 (Qiagen) を用いて大腸菌 (E. coli) Nova Blue (DE3) から精製し、その挿入物類を配列決定した (MWGBiotech)。

【0062】

SDS-PAGE およびイムノブロット分析

タンパク質類は、先に記載されているように、SDS-PAGE により 12.5% クライテリオンプレキャストゲル (Criterion Precast Gels) (BioRad) 中で分離し、かつ、PVDF 膜 (Millipore) 上でイムノブロッティングした (Robertssら、2002)。組換えタンパク質類の発現は S-Protein 西洋わさびパーオキシダーゼ (HRP) 結合物 (Novagen) を用いて確認した。この発現によって、本研究で用いた全ての組換えタンパク質類の保有 N 末端 S-タグ融合物を検出する。この HRP 結合 S-タンパク質を、希釈度 1:10,000 で用いた。イムノブロット分析のため、感染マウスから採取した血清を 1:1000 の希釈度で用いた。HRP 結合ヤギ抗マウス IgG は、二次 (Pierce) として作用し、希釈度 1:10,000 で用いた。全般的イムノブロット方法は、先に記載されている通りであった (Mettsら、2003)。

【0063】

結果

メリーランド州のヒトライム病患者から回収した単離物の ospC タイピング分析

ospC は、メリーランド州ヒトライム病患者から回収した分析単離物類のそれぞれから増幅し、成功した。各増幅物の配列を決定し、比較配列分析を行って ospC タイプを決定した (図 1)。A (n=6)、B (n=1)、C (n=1)、D (n=1)、H (n=2)、K (n=4)、および N (n=3) を含むいくつかの互いに異なる ospC タイプ類の代表的なものを同定した。ospC タイプ類 A、B、I および K のみがヒトにおける侵襲性感染に関連していると過去に報告されている (Seinostら、1999)。本研究では、血液、臓器または脳脊髄液から回収したものとして侵襲性単離物を定義し、一方、非侵襲性単離物類は、皮膚から回収されたものであるが他の体部位には見られないものであった (Seinostら、1999)。しかし、ここで、ospC タイプ類 C、D および N を発現するいくつかの単離物類が血液中から (LDP84、LDP63、LDP116 および LDP120) または脳脊髄液から (LDC83) 回収され、従って、侵襲性であることが明らかとなっている。この観察は、特定の ospC タイプ類と侵襲性感染との相関が厳密なものではないかもしれないこと、および、この相関の強さを再評価する必要があることを示唆している。

【0064】

マウス感染時における ospC に対する抗体応答のタイプ特異性の分析

感染時において ospC に対して惹起された抗体応答がタイプ特異的であるかどうかを決定するため、タイプ A、B、C、D、H、K および N 組換え ospC タンパク質類を、試験抗原としての用途のために作製した。この組換えタンパク質類をイムノブロッティングし、前記 A、B または D ospC タイプのボレリア・ブルグドルフェリ (B. burgdorferi) 単離物類に感染したマウス (上記で決定) から採取した血清でスクリーニングした (図 2)。大腸菌 (E. coli) 中における前記組換えタンパク質類の発現とタンパク質が等量負荷されていることを、N 末端融合における S-タグを認識する HRP 結合 S-タンパク質によりイムノブロットをスクリーニングすることによって確認した。感染第 2 週に採取した抗ボレリア・ブルグドルフェリ (B. burgdorferi) B31MI 抗血清 (タイプ A ospC) でスクリーニングすると、強い反応性が、このタイプ A タンパク質でのみ検出された。ospC に対する強くかつ早期の IgG 応答は

10

20

30

40

50

、これまでの報告と一致している (Theisenら、1995; Wilksら、1993)。感染第8週に採取した血清もまた、主にタイプA O s p Cと反応したが、他のO s p Cタイプ類との弱い交差免疫反応性が観察された。L D P 1 1 6およびL D P 7 3 (それぞれ、O s p CタイプDおよびD単離物類)に感染したマウスにおけるO s p Cに対するA b応答もまた、タイプ特異的であった。O s p Cに対する抗体応答にはかなりの程度のタイプ特異性があること、および、この特異性は、インビボ免疫優性エピトープ類が前記タンパク質のタイプ特異的ドメイン類に局在していることを意味していると結論できる。

【0065】

マウスにおいて感染時に抗体応答を惹起するO s p C線状エピトープ類の局在

感染時に抗体応答を惹起するタイプA O s p C線状エピトープ類を同定するため、数種の組換えO s p C断片類を産生させ、- B . b u r g d o r f e r i B 3 1 M I感染血清(第8週)によりスクリーニングした(図3)。B 3 1 M Iは、O s p CタイプA産生株である。前記組換えタンパク質類の発現は、H R P結合S-タンパク質によるイムノプロットングにより確認した。O s p Cの線状エピトープ類を局在化させるため、前記O s p C断片類のイムノプロットを感染血清でスクリーニングした。1種以上のエピトープ類を含有する2個のドメイン類を局在化し、そのうちのひとつは、アルファヘリックス5の残基168と203の間のタンパク質のC末端半分の内部にあり、もうひとつは、ヘリックス3とループ5の残基136と150の間にある(以後、それぞれ、アルファ5およびループ5エピトープ類と称する)。これらのエピトープ類は、過去に文献で特性解析されていない。

【0066】

o s p C配列分析とO s p C構造のコンピュータモデリング

前記ループ5およびアルファ5エピトープ類が空間的に前記O s p Cタンパク質のどこにあるかを決定するため、X線結晶解析により決定した座標軸(E i c k e nら、2001; K u m a r a nら、2001)を評価し、リボンおよびスペースフィルモデルを、タイプA O s p Cの単量体およびまたは2量体形状について作成した(データは示さず)。タイプIおよびE O s p Cタンパク質類の単量体形状もまた、モデル化した。これらの解析で、ループ5エピトープがタイプA、EおよびI O s p Cタンパク質類の単量体および二量体形状の両者の上で表面露出していることが明らかになった。もともとのX線結晶解析において、N-およびC末端の両者の一部は、前記組換えタンパク質の一部でないかあるいはモデル化できなかった。いずれにしても、決定した構造類は、N-およびC末端の両者ともに互いに近接し存在していることおよび細胞膜に近いことを示唆している。

【0067】

タイプ内レベルでループ5およびアルファ5エピトープ類内部における配列変動を評価するため、227個のO s p C配列類を並べた。これらの分析で、ループ5およびアルファ5エピトープ類両者ともにタイプ間レベルでは極めて可変性であるが、あるタイプの内部では非常によく保存されていることが明らかになった。図4は、(表形式で)各O s p Cタイプについてループ5およびアルファ5ドメイン配列類を示し、各特定配列が解析したO s p C配列類中に検出される頻度を示している。タイプ内レベルでのループ5の保存についての証拠として、57種のタイプAループ5エピトープ類の比較を行い、53種が残基1個または2個のみ異なる中心から離れた配列類と同一であることが明らかとなった。同様の観察が、アルファ5エピトープ類について指摘された。43種のタイプA O s p C配列類のうち、42種が残基168と203の間で同一であった。多くの場合、前記データベースで利用可能な配列類が部分的でかつ変動する量のC末端を欠いているので、より少ないアルファ5エピトープ配列類を分析したことに留意されたい。

【0068】

ループ5エピトープに対する抗体応答がマウス個体に独自のものではないことの実証

ループ5のタイプ内保存とその実質的に短い長さから考えると、ループ5エピトープは

キメラOspCループ5に基づくワクシーノゲンの開発における用途のための優れた候補であるかもしれない。ループ5エピトープに対する抗体応答が感染時に普遍的に起こり、あるマウス個体に独自のものではなかったことを確認するため、ループ5を含有する130-150断片のイムノプロットをタイプA OspC産生株類B31MI、LDP56および5A4に感染した数匹の追加マウスからの血清でスクリーニングした。全ての場合において、このエピトープを認識する抗体が検出された(図5)。ループ5に対する応答はLDP56感染マウス2からの感染血清で弱かったが、より長く暴露させると、ループ5がこの動物で抗原性であることが明確になった。このことは、これらのエピトープ類に載せられた免疫応答が動物個体に独自のものではないことを明らかに示し、さらに、ワクチン開発におけるその用途可能性についての裏づけを与える。

【0069】

考察

OspCは、ライム病病因に対する重要な寄与因子として明らかに確立されている(Grimmら、2004; Palら、2004; Schwanら、1995)。中腸から唾液腺までのライム病スピロヘータの移動時にそれが重要な役割を果たすことについて強力な証拠がある(Palら、2004)。さらに、感染初期においてそれが選択的に発現され、免疫優性抗原であり(Fingerleら、1995; Schwanら、1998; Wilskeら、1993)、また他者によってライム病単離物の伝播能力において重要な決定因子であると仮説されている(Seinostら、1999)。本研究の目標は、OspCタイプと侵襲性感染の間の潜在的相関を試験すること、OspCに対する抗体応答がタイプ特異的であるかどうかを決定すること、および感染時に提示される線状エピトープ類の局在化によってOspCの抗原性構造を明確にすることであった。

【0070】

OspCの配列分析は、21種の明白なOspCタイプ類の輪郭を叙述し(Seinostら、1999)、さらにこれらのうちの4種のみ(タイプ類A、B、IおよびK)がヒトにおける侵襲性感染に関係していると仮定された(Seinostら、1999)。しかし、最近の研究では、この推定上の相関に疑問がもたれている(Alghaferiら、2005)。これをさらに解明するため、メリーランド州ヒトライム病患者から回収した侵襲性および非侵襲性ライム病単離物のOspCタイプを決定した。これを達成するため、全長ospC遺伝子をPCRで増幅し、配列決定しかつ比較配列分析を行った。これらの分析では、この患者群における侵襲性ヒト感染に関連したOspCタイプ類にはタイプC、DおよびNが含まれることを明らかにした。タイプI OspC産生株類は侵襲性ヒト感染に関連した主要タイプであると示唆されている(Seinostら、1999)が、メリーランド州患者群で同定された侵襲性単離物のいずれもタイプI ospCを保有していなかった。同様に、Alghaferiらはまた、タイプI OspC産生株類を検出しなかった(Alghaferiら、2005)。まとめると、これらの2種の研究では、グレーターバルチモア地区において18個の侵襲性単離物類を同定し、下記の内訳を有していた：A、n=5；B、n=2；C、n=1；D、n=1；H、n=1；K、n=3およびN、n=7。従って、この地理的領域では、OspCタイプAおよびN産生侵襲性単離物が主であるらしい。これらのデータは、4種のOspCタイプ類のみがヒトにおける侵襲性感染に関連しているという仮説に異を唱えるものである。異なる地理的領域からのより大きな患者集団から回収した単離物類のさらなる分析が、OspCタイプ-侵襲性感染相関の有効性をさらに評価するために、またある定めた地理的領域における特定OspCタイプ類の優勢度に差異があるかどうかを決定するために、必要であろう。

【0071】

明白なOspCタイプ類の明示と関連させたOspCのワクチン接種により提供される防御の変動(Seinostら、1999)は、抗体応答がタイプ特異的であるかもしれない可能性を高めている。この仮説は、OspCによるワクチン接種が同一株に対してのみ防御することが分かったという事実によって裏付けられている(Bockenstadtrら、1997; Gilmoreら、1999a; ProbertおよびLeFebvre

10

20

30

40

50

e、1994)。この報告までは、感染時におけるOspCに対する抗体応答のタイプ特異性が直接評価されたことはなかった。これを解明するため、タイプA、B、C、D、H、KおよびNの全長組換えOspCタンパク質類シリーズを、公知のOspCタイプを発現するクローン群でマウス中に産生された感染血清でスクリーニングした。感染血清の使用は、インビボにおいて前記菌で特異的に提示されるエピトープ類に対する抗体応答に焦点を合わせて評価することを可能にするので、重要である。これらの分析は、OspCのNおよびC末ドメイン内部で配列保存が強いにもかかわらず、分析したOspCタイプ類に対する抗体応答がタイプ特異的であることを明らかにした。例えば、タイプAまたはD株類に感染したマウスからの血清は、他のOspCタイプ類とはほとんどまたは全く交差免疫反応性がなくタイプ特異的に免疫反応性であった。21種のOspCタイプ類全てに対する抗体応答を分析したわけではないが、上記に示したデータは、前記の保存ドメイン類は免疫優性ではないこと、および感染時に前記菌によって提示されたOspCの線状エピトープ類が前記タンパク質の可変領域類(すなわち、タイプ特異的ドメイン類)に含まれることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0072】

OspCのエピトープ類を局在化するかまたは同定することを探求した研究はこれまでわずかしか公表されていない。線状構造および立体構造のエピトープ類の両者が同定されている。GilmoreとMbowは、残基6個の短いリーダー配列を越えた独立したN末欠損と残基13個のC末切断物が、モノクローナル抗体B5の結合を完全に破壊することを明らかにした(Gilmoreら、1995a; Gilmore, 1998)。このことから、B5モノクローナル抗体が立体構造的に定義されたエピトープを認識すると結論された(Gilmoreら、1999b)。この立体構造的に明確にされたエピトープ内部の抗体認識部位を含む残基類の詳細は同定されなかった。モノクローナル抗体B5で観察されたものと対照的に、細胞結合天然OspCのポリクローナル抗体応答の解析は、OspCの最後の10個のC末残基類またはN末の伸長領域の欠損が、感染時に惹起されたIgGによるOspC認識を完全に破壊しないことを明らかにした。結果におけるこうした差異は、おそらく、ポリクローナル抗体対モノクローナル抗体上での中心点を反映しているのであろう。このデータは、立体構造エピトープ類の存在を確かに排除しないが、OspCにも同様に線状エピトープ類があることを明らかに示している。Mathiesonらは先の研究で、OspCにおける線状エピトープについて報告している(Mathiesonら、1998)。彼らは、OspCのC末残基7個が欧州での神経系ボレリア症患者から採取した血清中IgMにより認識される線状エピトープを構成することを見出した。IgM結合はこの報告で評価されていないが、OspCのC末残基10個の欠損がIgG結合を完全に破壊しなかった。感染誘発IgGにより認識されるエピトープ類は、前記タンパク質中の数箇所部位に局在するようである。しかし、このことは、C末エピトープが存在しないかあるいは感染時に惹起された抗体によって認識されないことを示唆するものではなく、むしろ、OspC中のどこかほかに局在する付加的エピトープ類があることを示唆している。

【0073】

より短いOspC断片類のイムノプロット分析により、OspCエピトープ類のより詳細な局在化が可能となった。OspCの抗原性領域は、2個の領域に局在化された。ひとつは残基136-150にわたり、もうひとつは、残基168乃至210にわたる。X線回折分析による座標を用いて作成した構造モデルでは、ループ5と命名した表面露出ループ内部に主に、残基136-150を配置している(Kumaranら、2001)。ループ5はOspCの単量体および二量体モデルの両者において表面露出しており、顕著な曲部の内部に位置している。組換えOspCが実際には二量体を形成していることが明らかになっている一方、天然のOspCがインビボで二量体またはそれより大きいオリゴマー類を形成しているかどうかはまだ決定されていない。OspCの二量体モデルは、30%を超えて前記タンパク質を含む有意な埋没した界面を示唆している。この程度に埋没した界面は、前記単量体間の緊密な相互作用を示唆しており、前記タンパク質の二量体形状

が生物学的に活性な形状であることを示唆するものであると考えられる〔Kumar an ら、2001; Eick en ら、2001; Zuck er t ら、2001〕。O s p C 二量体において、ループ5内部の残基類は、推定上の立体構造規定リガンド結合ポケットの一部であると予測され、それは、生物学的に重要であるかもしれない。この荷電ポケットは、グルタミン酸およびアスパラギン酸残基類のようなカルボニル基類を含むアミノ酸類によって内側を覆われている。結晶構造が、タイプA、I (Kumar an ら、2001) およびE (Eick en ら、2001) の3種のO s p C タンパク質類について決定されている。これらのタンパク質類の全てにおいて、この推定結合ポケットの溶媒構造は、驚くほど良好に保存されている。感染血清中において抗体に対するループ5のアクセス可能性は、このドメインが表面露出されかつ潜在的にリガンド結合に利用できるかも知れないという仮説を裏付ける。ループ5と前記推定上のリガンド結合ポケットの強いタイプ間構造保存にもかかわらず、このドメインの配列は、前記のタイプ間レベルにおいて極めて可変である。残基168乃至210にわたるアルファ5ドメインの配列もまた、このタイプ間レベルで可変であるが、ただし、最後の残基20個では極めてよく保存されており、例外とする。タイプ内レベルで十分な保存が存在するかどうかを決定し、一連のタイプ特異的エプトープ類から構成されるキメラO s p C ワクチンの構築を可能とするために、O s p C 配列類を並べ、ツリー図を作成した。これらの分析により、前記O s p C タイプは、配列227種について決定された(データを示さず)。ループ5とアルファ5エプトープ類の両者ともに、タイプ内レベルでよく保存されていることがわかった。例えば、タイプA O s p C タンパク質類のループ5エプトープは、配列57個のうちの54で同じであり、一方、アルファ5エプトープはタイプA配列43個のうちの42で保存されていた。他のO s p C タイプ類においてもこれらのドメインがかなりよく保存されていることも同様に判明し、タイプCからタイプI、M、NおよびOは、ループ5およびアルファ5エプトープ類内部で絶対的なタイプ内保存を示した。

10

20

30

40

50

【0074】

本研究は、侵襲性単離物中においてこれまで認識されていたよりもかなりO s p C 多様性があることを明らかにしている。本研究はまた、マウスにおけるO s p C に対する抗体応答が極めてタイプ特異的でありこれまで特性解析されていないループ5およびアルファ5エプトープ類によって定義されることを明らかにしている。初期の研究と本明細書に示したデータは、単一のO s p C タンパク質では多様な株類に対する防御を伝えないであろうということを示している(Bock en s t e d t ら、1997)。ひとつの可能なワクチン接種手法は、組換えキメラO s p C ワクチノーゲンの開発において本レポートで同定したエプトープ類を活用することである。ループ5エプトープまたはループ5とアルファ5エプトープ類の併用は、それらがヒトで一貫して抗原性であることが判明すれば、大きな見込みを与えるかも知れない。これらのエプトープ類は長さが比較的短く、線状でかつタイプ内レベルで高度に保存されている。これらの特徴に鑑み、極めて多様なライム病単離物類に対する防御を伝播することができるループ5-アルファ5キメラワクチノーゲンを構築することが技術的に可能であることを当然示している。

【実施例2】

【0075】

タイプA O s p C ループ5ドメインに対するヒトにおける抗体応答の分析とライム病ワクチン開発におけるループ5エプトープの潜在的用途の評価

ライム病スピロヘータ類の外表面タンパク質C (O s p C) は、ダニ摂食で発現しかつ初期感染時に発現する22kDaの免疫優性(Fuch s ら、1992)抗原である(Schwan ら、1995)。O s p C に対する強度の抗体応答が自然感染時には発動されるが、この応答は、O s p C 産生が感染確立後まもなく停止するので細菌撲滅には至らない(Schwan ら、1995)。O s p C は、重要な毒性因子としておよびライム病ワクチン開発のための強力な候補として出現した。しかし、O s p C に基づくワクチンを開発する努力は、株中でのその不均一性により妨害された(Theisen ら、1993; Wil s k e ら、1996; Wil s k e ら、1993)。O s p C によるワクチン接種

は高い防御性応答を惹起するが、多くの研究では、株特異的防御のみを報告している (Bockenstedtら、1997; Gilmoreら、1996; Mbowら、1999; Probertら、1997; Rouselleら、1998; Scheiblhoflerら、2003)。最近の分析で、OspCの抗原性構造についての理解と株特異的防御の基礎についての意義深い洞察が得られた。21種のOspCタイプ類はAからUと命名され、明らかにされた (Lagalら、2003; Seinostら、1999; Wangら、1999)。特異的OspCタイプ類を産生するボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) のクローン群でマウスを感染させることによって、初期感染時の前記抗体応答が主にOspCタイプ特異的であることが明らかになった (実施例1参照)。このことは、初期感染時に提示された主なエピトープ類がOspCのタイプ特異的ドメイン内部に存在する可能性を示唆している。初期の研究では前記21種のOspCタイプのうち4種のみが侵襲性感染と関連していると示唆している (Seinostら、1999) 一方、最近の研究では、追加のOspCタイプ類を産生する単離物類もまた侵襲性感染を確立できることを明らかにした (Alghafiriら、2005; 実施例1)。しかし、タイプA OspCは、ヒトで侵襲性感染を起こす株類中で優勢であるようである。タイプA OspCのエピトープマッピング分析により、マウスで応答を惹起する前記優性線状エピトープ類のひとつが前記ループ5ドメイン内部に存在することが、明らかになった (実施例1参照)。前記ループ5ドメインはタイプ間レベルで高度に可変であるが、ある一定のタイプの配列類内部で保存されている (実施例1参照)。我々は、本研究で、前記エピトープの位置をさらに正確にし、未変性菌類上でのその表面露出を実証し、それが殺菌性抗体を惹起することを明確にする。

【0076】

OspCの免疫優性エピトープ類を定義しようとする多くの研究が、マウスで行われている (Bockenstedtら、1997; Gilmore、1996; Mbowら、1999; Probertら、1994)。しかし、いくつかのエピトープ類に対する抗体応答は、ヒト対マウスおよび他の哺乳類で異なっていることが明らかとなった (Lovrichら、2005)。本研究の第一の目的は、OspCの前記ループ5ドメインがヒトにおいて感染時に惹起された抗体によって認識されるかどうかを決定することであった。理想的には、これらの分析は、タイプA産生株のクローン群に感染した個体から採取した血清で行われるであろう。個体が不均一または均一群に感染しているかどうかを絶対に確実に決定することはできないので、我々は、タイプA特異的配列に対して応答を示す患者血清を識別することにした。これを成し遂げるため、遊走性紅斑 (初期ライム病) 患者から採取した血清サンプルパネルを、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) によってスクリーニングした。組換えタイプ (r-タイプ) A OspCおよびr-タイプA OspCサブフラグメント含有ループ5残基類130乃至150を用いて、96ウェルプレートを塗布した (r-タンパク質250ng/ウェル; 0.1M Na₂HPO₄; 4°Cで一晩)。前記プレートをブロックし (リン酸緩衝生理食塩水、0.5% Tween 20中10%乾燥無脂乳、; 37°Cで2時間)、洗浄し、ヒトライム病患者血清 (1:400に希釈) を各ウェルに添加した (37°C; 1時間)。供給者 (Sigma) の指示に従い、西洋わさびパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトイムノグロブリンG (IgG; Sigma) (1:40, 000希釈物の50 μ l) を添加し (1時間; 37°C)、TMB基質 (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン) を添加した。450nmにおける光学密度値を、プレートリーダーを用いて決定した。さらに追加ウェルにウシ血清アルブミンを塗布し、陰性対照として使用した。アッセイは全て三重に行った。A450平均値を標準偏差とともに示した。図6に示したように、血清サンプル数個は、全長タイプA OspCとループ5断片の両者に対して強いIgG応答を有していることがわかった。血清サンプル8と44は、ループ5断片と最大強度の免疫反応性を示し、従って、さらに分析するために選択した。

【0077】

前記ループ5ドメイン内部の感染誘発抗体により認識される残基類をさらに正確に画定

するため、PepSpotアレイを患者8と44の血清でスクリーニングし、さらに、タイプA OspC産生株B31MIのクローン群に感染したマウスの血清でスクリーニングした(実施例1参照)。前記PepSpotアレイは、Whatman50セルロース膜にスポットしたタイプA OspCのループ5ドメインをカバーする12個乃至13個の残基重複ペプチド類(2個のアミノ酸段階)から構成されていた(150nmol/cm²; JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany)。前記PepSpot膜をブロックし(トリス緩衝生理食塩水-0.5% Tween20中5%乾燥無脂乳)、洗浄し、マウスおよびヒト血清サンプル(ブロック溶液でそれぞれ、1:1, 000および1:400に希釈)でスクリーニングし、種特異的抗IgG抗血清で抗体結合を検出した。免疫反応ドメインを構成する前記特異的残基類はマウスとヒトでわずかに異なるが、主要エピトープ類は、残基130乃至146内部に局在している(図7)。タイプA OspC配列類中において、この領域は、アルファヘリックス3のC末領域とループ5のN末部分を包含している。

【0078】

OspCの結晶構造は、空間的には、ループ5を前記タンパク質のある顕著な曲部に配置している(Eickentrã、2005; Kumarã、2001; 図24)。このループは、潜在的リガンド結合ポケットの部分として仮定されている(Kumarã、2001)。ループ5が細胞表面に現れておりかつインビトロで増殖中のスピロヘータ中で抗体にアクセス可能であることを決定するため、蛍光免疫アッセイ(IFA)を、抗ループ5抗血清を用いて実施した。ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi) B31MI(タイプA OspC)、ボレリア・パルケリ(B. parkeri)およびスタグR-タイプAループ5の全細胞溶解物類によるイムノプロット分析は、前記ループ5抗血清が特異的であることを実証し、IFAに対するこの抗血清の適切性を確立した。IFAにより分析した前記株類は、ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi) B31MI(タイプA OspC)およびLDP74(タイプK OspC)から構成されていた。前記スピロヘータ類を33で増殖させ、37に3日間移し、OspC発現を刺激した。IFAは、透過性を高めた細胞類(アセトン固定)、透過性を高めていない細胞類(風乾)、および先に記載(Robertsã、2002)した標準的方法類により、実施した。このスライド類を、マウスループ5抗血清、マウス前免疫血清またはウサギ-フラゲリン抗血清の1:1, 000希釈物によりスクリーニングした。検出は、Alexa Fluor 568-結合ヤギ-マウスIgGまたはAlexa Fluor 488結合ヤギ-ウサギIgG(ブロック緩衝液中10µgml⁻¹)を用いて、行った。スライドを、適切な場合にはローダミンまたはフルオレセインフィルターセットを用いてオリンパスBX51蛍光顕微鏡で、または、暗視野顕微鏡によって肉眼で見えるようにし、またオリンパスMagnafireカメラを用いて写真撮影した。IFAによって観察された標識化は極めて特異的で、イムノプロット分析と一致していた;タイプA産生単離物を表面標識し、一方、ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi) LDP74タイプK OspCは、標識しなかった(データを示さず)。さらに、高温でのOspCの上方制御と一致して、IFAが、33で増殖させた細胞よりも37で増殖したスピロヘータ類の表面標識が顕著に高いことを明らかにした。内膜にアンカーしたペリプラズムタンパク質を認識する前記のFlaB抗血清は、透過性を高めていない細胞類を標識しなかったが、アセトンで透過性を高めた細胞を容易に標識した(データを示さず)。この制御は、前記ループ5が実際には表面に露出していることおよびIFAで用いた実験条件は細胞一体性を破壊せず、それによって、前記菌の表面に天然には提示されないエピトープ類を人工的に露出することを明確にした。

【0079】

細胞表面でOspCに効率的に結合するループ5抗血清の能力は、前記相互作用が殺菌性であるかもしれない可能性を高め、そのことは、全長OspCに対する抗体についても実証されている(Bockenstedtã、1997; Ikushimãã、2000; Jobeãã、2003; Lovrichãã、2005; Rouselleãã、199

10

20

30

40

50

8)。ループ5標的抗体も同様に殺菌活性を示すかどうかを決定するため、33 または 37 に移した温度で培養したボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdorferi*) 単離物類 B31MI と LDP74 により殺アッセイを行った。前記スピロヘータ類は遠心分離によって採取し、洗浄し、500l 当たり 5×10^5 細胞に調節し (BSK-H 培地中において)、12.5 μ l を、無菌の 0.65 ml 容量のマイクロ遠心管中に入れた。次に、熱不活性化 (56 ; 30分) ループ5血清 10 μ l を、モルモット補体 (7.5 μ l ; Sigma Chemical, St. Louise, Mo.) とともにあるいはそれなしで添加し、前記成分類を 33 または 37 で 8 時間混合シインキュベーションした。総計 70 μ l の H₂O を添加し、スピロヘータ類を Live/Dead BacLight 染色 (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) で製造業者の取扱説明に従い染色した。簡単に述べると、前記細胞に 2 種の染色液 ; SYTO9 およびプロピジウムアイオダイドを添加する。これらの色素類は、生きている菌 (すなわち、未変性膜を有する) と変成を受けた膜を有する菌とを区別できる。生きている菌は SYTO9 による染色により緑色の蛍光を発し、一方、死んでいるかまたは傷害を受けた菌はプロピジウムアイオダイドによる染色によって赤色蛍光を発する。前免疫熱不活性化血清 (補体ありまたはなし) 処理で観察された膜破壊を伴う細胞の基準値は、25% であった。対照的に、前記 - ループ5 抗血清に暴露した細胞の約 70% が膜破壊を示した。殺菌活性は補体依存性であることがわかった。抗ループ5 抗体処理によりここで観察された泡状化効果は他の抗 OspC 抗体類で報告されているものと一致している (Bockenstedt ら、1997 ; Escudero ら、1997)。また、高温での OspC の上方制御と一致して、死細胞の百分率は、33 で増殖させた菌よりも 37 で増殖させたスピロヘータ中で一貫して高かった (データを示さず)。提示されたデータから、抗ループ5 抗体が殺菌性であることが明白である。

【0080】

論文数編が、ライム病ワクチン類開発を明確に強く正当化する強い理由を概括的に述べている (Hanson および Edelman, 2004 でレビューされている)。しかし、現時点では、ワクチンは全く市販されていない。防御性の広いライム病ワクチンを開発しようとして、Baxter は、14 種の互いに異なる全長 r-OspC タンパク質のワクチンカクテルを作製する戦略を追及した (Hanson および Edelman, 2004)。しかし、前記カクテルは、反応原性が容認できないとされた。この反応原性は、前記カクテル中の各 OspC タイプタンパク質の独自の防御性エピトープ類に対する十分な応答を惹起するために大量のタンパク質を必要とした結果、生じたものであるのかもしれない。複数の全長タンパク質を用いるカクテルワクチン類についての潜在的問題は、保存された、無関連の非防御性エピトープ類に対する抗体応答が間違っ出される可能性があることである。主要 OspC タイプ類のそれぞれの天然提示免疫優性線状エピトープ類から構成されたキメラ、r-ワクシノーゲンの開発を通してこの問題を克服することが可能である。この一般的概念は、異なる感染時期に発現したタンパク質由来のエピトープ類を用いてマラリアワクチン類を開発しようとする試みの中にその起源を有している (Hanson および Edelman, 2004)。同じ概念が、A 群連鎖球菌のための六価 M タンパク質ワクチンの開発に応用され (Dale, 1999)、さらに数種のそれ以外の病原体に対するワクチン類開発にも応用され、すばらしい成功を収めた (Aptara ら、2006 ; Caro-Aguilar ら、2005 ; Fan ら、2005 ; Horvath ら、2005 ; Kottloff ら、2005 ; McNeill ら、2005 ; Wang ら、2005)。OspC の物理的および抗原性構造への新たな洞察を通じて、有効な、r-多価キメラ OspC ワクチンの開発が今や可能とみられる。この新しく同定されたループ5ドメインは、このようなワクチンに取り入れるのに適しており、理想的である。

【実施例 3】

【0081】

OspC に基づく 4 価の組換えキメラワクシノーゲンの開発

ライム病は、北アメリカおよびヨーロッパで最もよく見られる節足動物伝播疾患である

。現在では、ヒトで使用するための市販のワクチンは全くない。外表面タンパク質C (OspC) は抗原性特性および発現特性を有し、そのために魅力的なワクチン候補となっている；しかし、配列不均一性がそのワクシノーゲンとしての使用を妨げてきた。配列分析を通じて、21種の明確に画定されたOspC系統発生群類すなわち“タイプ類”(AからUと命名)が同定された。本研究は、組換え4価のキメラワクシノーゲンの開発において、ヒトおよびマウス感染時に(先に同定ずみのタイプA OspC線状エプトープ類とともに)OspCタイプ類B、KおよびDにより提示された線状エプトープ類のマッピングとこれらのエプトープ類の活用を報告した。前記構築体はマウスにおいて非常に免疫原性で、誘発された抗体類は、インビトロ培養スピロヘータ類を表面標識した。ワクチン接種により、前記構築体に取り込まれたOspCタイプ類のそれぞれを発現する株類に対して補体依存性の殺菌性抗体類を誘発したことは重要である。これらの結果は、有効で防御性の広い多価OspC利用のライム病ワクチンが組換えキメラタンパク質として産生できることを示唆している。

10

【0082】

材料および方法

ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 単離物類および培養

ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 単離物類 B31MI (タイプA OspC)、LDP73 (タイプB)、LDP116 (タイプD) および LDP74 (タイプK) のクローン群〔実施例1参照〕を、先に記載されているようにサブサーフェイスプレティングによって得た〔Sungら、2000〕。それぞれのクローン類のOspCタイプは、PCR増幅 (Taq Polymerase、Promega) およびospCのDNA配列決定により決定し、系統発生的分析によりタイプを振り分けた〔実施例1参照〕。スピロヘータ類は、完全BSK-H培地 (Sigma) 中で先に述べたように33または37 で培養した。

20

【0083】

リガーゼ非依存性クローニングと組換え (r-) OspCタンパク質類の産生

全長タイプB、KおよびDのOspCと切断物および断片類シリーズとを、各単離物からの対応の遺伝子のPCR増幅によって産生させた。前記プライマー類は5´オーバーハングを有するように設計し、pET-32Ek/LICベクター中においてリガーゼ非依存性クローニング (LIC) を行った (表3)〔実施例1〕。全てのLIC方法は、基本的に製造業者 (Novagen) の説明書どおりに行った。簡単に述べると、一重鎖テイルの増幅および再生後、増幅物をpET-32 Ek/LICベクターでアニーリングし、NovaBlue (DE3) 大腸菌 (*E. coli*) 細胞中に形質転換しそこで増殖させた。前記プラスミド類を回収し、挿入物の配列類をDNA配列決定によって確認した。タンパク質精製のため、精製したプラスミド類を用いて大腸菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 細胞を形質転換し、対数増殖期に培養物にIPTG (1mM) を添加後3時間インキュベーションし、タンパク質発現を誘発した。pET-32Ek/LICベクターからの発現によって付加されたN末端融合物は、Trx-タグ、S-タグ、およびヘキサヒスチジン (His-tag) モチーフを含んでいる。His-tagを活用し、ニッケルアフィニティクロマトグラフィにより前記r-タンパク質類の精製を行った。簡単に述べると、細胞を融解させ、核酸および細胞壁ペプチドグリカンそれぞれ、ベンゾナーゼヌクレアーゼとr-リゾチームによって分解した。製造業者 (Novagen) の説明書どおり、可溶性タンパク質類を遠心分離 (16000 x gで15分間) によって透明にし、固定ニッケルカラムに流し、洗浄し、溶出させた。溶出されたタンパク質類を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.4) で10kDa分子量のカットオフ膜 (Slide-a-lyzer、Pierce) に対して十分に透析し、最終タンパク質濃度は、BCAアッセイ (Pierce) によって定量し、前記調製物の純度は、SDS-PAGEによって評価した。

30

40

【0084】

50

【表 3】

表 3. さまざまな OspC タイプ断片類産生に用いた PCR プライマー類。LIC テイルは、太字としてある。

プライマー	配列	説明	配列番号
<i>ospC</i> 20(+) LIC	GACGACGACAAGATTAATAAT TCAGGGAAAGATGGG	aa20 から <i>OspC</i> を増幅させ、LIC テイルを付加する。	180
<i>ospC</i> 210(+) LIC	GACGACAAGCCCGGTTTAAG GTTTTTTTGGACTTTCTGC	aa210 まで <i>OspC</i> を増幅させ、LIC テイルを付加する。	181
OCB110 LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATTG TGTTATTAAGTTGATATTG	aa110 までタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	182
OCB131 LIC(+)	GACGACGACAAGATCTTCTGA AGAGTTTAGTACTAAACTAAA A	aa131 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	183
OCB140 LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATTT TAGTTTAGTACTAAACTCTTC AG	aa140 までタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	184
OCB140 LIC(+)	GACGACGACAAGATAGATAAT CATGCACAGCTTGGTATACAG	aa140 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	185
OCB148 LIC(+)	GACGACGACAAGATTATACAG GGCGTTACTGATGAAAATGC	aa148 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	186
OCB153 LIC(+)	GACGACGACAAGATTGAAAAT GCAAAAAAAGCTATTTTAAAA	aa153 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	187
OCB155 LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATG CATTTTCATCAGTAACGCCCT G	aa155 までタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	188
OCB164 LIC(+)	GACGACGACAAGATTGCAGC GGGTAAGATAAGGGCGTTG AAG	aa164 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	189
OCB169 LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTACTT ATCTTTACCCGCTGC	aa169 までタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	190
OCB175 LIC(+)	GACGACGACAAGATTGAAAA GTTGTCCGGATCATTAGAAAG C	aa175 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	191
OCB180 LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATG ATCCGGACAACTTTTCAAGTT CTTC	aa180 までタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	192
OCB181 LIC(+)	GACGACGACAAGATCTTAGAA AGCTTATCGAAAGCAGCTAAA GAG	aa181 からタイプ B を増幅させ、LIC テイルを付加する。	193

10

20

30

40

OCB185LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATG ATTAAGCTTTCTAATGATCCG GAC	aa185 までタイプ Bを増幅させ、LIC テイルを付加する。	194
OCB190LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTACTC TTTAGCTGCTTTTGATAAGCT TC	aa190 までタイプ Bを増幅させ、LIC テイルを付加する。	195
OCB200LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATGT AAGCTCTTTAACTGAATTAGC AAG	aa200 までタイプ BとKを増幅させ、 LIC テイルを付加 する。	196
OCB49LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAAAT TTTTTACTTATTCTGTAAG	aa49 までタイプB とDを増幅させ、 LIC テイルを付加 する。	197
OCB80LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATTT TTTACCAATAGCTTTAGCAAG CTC	aa80 までタイプB を増幅させ、LICテ イルを付加する。	198
OCD112LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATAA TTTTTCTGTTATTAGAGCTG	aa112 までタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	199
OCD130LIC(+)	GACGACGACAAGATTAAATGCT TCTGAAAGCTTTAC	aa130 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	200
OCD135LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAAA AGCTTTCAGAAACATTTCTTA GC	aa135 までタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	201
OCD135LIC(+)	GACGACGACAAGATTACTAAA AAACTATCAGATAATCAAGCA G	aa135 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	202
OCD144LIC(+)	GACGACGACAAGATTGAGCTT GGTATAGAGAATGCTACTGAT G	aa144 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	203
OCD151LIC(+)	GACGACGACAAGATTGCTACT GATGATAATGCAAAAAGGC	aa151 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	204
OCD155LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAATT ATCATCAGTAGCATTCCTAT ACC	aa155 までタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	205
OCD166LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAAG CATTATGTGTTTAAATAG CC	aa166 までタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	206
OCD167LIC(+)	GACGACGACAAGATTAAAGAC AAGGGTGC TGAAGAACTTG	aa167 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	207
OCD180LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATG ATTCAGATAACTTTACAAGTT C	aa180 までタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	208

10

20

30

40

OCD180LIC(+)	GACGACGACAAGATTTTCAGTA GCAGGCTTATTTAAAAGCAGCT C	aa180 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	209
OCD195LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATG AATTAGCCAGTATGGCTTGAG CTGC	aa195 までタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	210
OCD195LIC(+)	GACGACGACAAGATTTTCAGTT AAAGAGCTTACAAGTCCTG	aa195 からタイプ Dを増幅させ、LIC テイルを付加する。	211
OCD80LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAATC TATTTTTTTTACCAATA	aa80 までタイプ D を増幅させ、LIC テ イルを付加する。	212
OCK110LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATTG TGTTATTAGTTTTGATATTG	aa110 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	213
OCK130LIC(+)	GATGACGACGACAAGATTTAAA TGTTCTGAAGATTTTAC	aa130 からタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	214
OCK135LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAAA AATCTTCAGAACATTTCTTAG C	aa135 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	215
OCK148LIC(+)	GATGACGACGACAAGATAATT GAAAATGTTACTGATGAGAAT GC	aa148 からタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	216
OCK150LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAATT TTCAATTCCAAGTTGCGCATG TTC	aa150 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	217
OCK160LIC(+)	GATGACGACGACAAGATTATT TTAATAACAGATGCAGCTAAA G	aa160 からタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	218
OCK166LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAAG CTGCATCTGTTATTTAAAATAG C	aa166 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	219
OCK175LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATTC AAGCTCTGCAGCGCCCTTATC	aa175 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	220
OCK180LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATG CTTTAAATAGCTTTTCAAGCT CTGC	aa180 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	221
OCK180LIC(+)	GATGACGACGACAAGATTGCA GTAGAACTTGGCAAAGCAG C	aa180 からタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	222
OCK190LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTACTC TTTAGCTGCTTTTGCCTTGTT TTC	aa190 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	223

10

20

30

40

OCK191LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTACAT CTCTTTAGCTGCTTTTGCCAA G	aa191 までタイプ Kを増幅させ、LIC テイルを付加する。	224
OCK80LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTATTT TTTACCAATAGCTTTAGTAGC	aa80 までタイプ K を増幅させ、LIC テ イルを付加する。	225

10

【0085】

イムノプロット分析：O s p CタイプB、DおよびKのエピトープマッピング

感染時関連エピトープ類のマッピングを可能とするため、C3H/HeJマウスをO s p CタイプB、KまたはDを発現するクローン群のスピロヘータ 10^4 で感染させ、血液を尾部出血によって第2週、第4週、第6週、第8週および第12週に採取した。これらの血清を用いて、実施例1に記載のように精製したO s p Cタンパク質および切断物類をスクリーニングした。r-タンパク質は、SDS-PAGEに供し、PVDFに移し、前記のタイプ特異的マウス感染血清（第6週に採取）の1:1000希釈物によってスクリーニングした。同様に、前記r-タンパク質は、O s p CタイプB、KまたはDを発現するボレリア・ブルグドルフェリ（*B. burgdorferi*）株（Allen Steere博士が親切に供与してくれた）への感染が既知である患者からの血清（1:400）でスクリーニングした。適切なIgG特異的西洋わさびパーオキシダーゼ（HRP）結合二次抗体類を用い、結果を化学発光によって視覚化した。

20

【0086】

4価のキメラワクシノーゲンの構築と発現

タイプAのループ5領域（aa131から149まで）とタイプB（aa160-201）、K（aa161-201）およびD（aa161-201）のアルファヘリックス5領域を、前記の4価試験ワクシノーゲン中に取り込ませるために選択した。各エピトープ含有領域を、上述のr-プラスミド類と表4に列挙したプライマー類からPCRで増幅した。PCR条件は標準的であり、当初の2分間は94における変性段階で、その後、94における変性を15秒間、50におけるプライマーアニーリングを30秒間、および伸長を72で60秒間を35サイクル行い、最終伸長は72で7分間とした。プライマー類は、ベクター特異的LICテイル類で設計するかまたは5'オーバーハングとしての構造化されていないプロテアーゼ耐性リンカー配列類で設計した（図9A）〔CrastoおよびFeng, 2000〕。全ての増幅物はTAE緩衝液を用いたアガロースゲル中での電気泳動で分析し、ゲル精製した（QiaQuick Gel Extraction, Qiagen）。精製した産物をそれ以後のPCRでテンプレートとして用いた。第2回目に、タイプAループ5およびタイプBアルファヘリックス5の増幅物を、テンプレートとして結合した。変性後、前記増幅物を、重複伸長を可能とするそれらの相補性リンカー配列類によりアニーリングし、その後の増幅では、前方タイプAループ5および逆タイプBアルファヘリックス5プライマー類を用いて行った。タイプKおよびDアルファヘリックス5配列類を同様に前記構築体に付加したが、最初の10サイクルの後アニーリング温度を60に高め、アニーリング特異性を高めた。最終産物を、N末ヘキサヒスチンタグ融合物をコードするpet-46ek/LIC発現ベクター（Novagen）にアニーリングし、NovaBlue（DE3）大腸菌（*E. coli*）を形質転換した。ワクシノーゲン配列は、精製したプラスミドのDNA配列決定によって確認した。タンパク質発現と精製は、上記のようにして完了した。

30

40

【0087】

【表 4】

表 4. ABKD キメラワクシノーゲン産生に用いた PCR プライマー類。LIC テイルは太字で示しており、リンカー配列類には下線を付した。

プライマー	配列	説明	配列番号
OCAL5LIC(+)	GACGACGACAAGATTTCTGAA ACATTTACTAATAAATTTAAAAG AAAAAC	aa131 からタイプ A を増幅させ、LIC テイルを付加する。	226
OCAL5L1(-)	<u>TAACATA</u> CCCATGCTACCTTCT TTACCAAGATCTGTGTG	aa149 までタイプ A を増幅させ、リンカー 1 を付加する (GSMGML; 配列番号 76)	227
OCBH5L1(+)	<u>GGTAGCATGGGTATGTTAAAA</u> GCAAATGCAGCGGG	aa160 からタイプ B を増幅させ、リンカー 1 を付加する。 (GSMGML; 配列番号 76)	228
OCBH5L2(-)	<u>TAAGTTACCGTTTGTGCTTGT</u> AAGCTCTTTAACTGAATTAG	aa201 までタイプ B を増幅させ、リンカー 2 を付加する。 (STNGNL; 配列番号 77)	229
OCKH5L2(+)	<u>AGCACAAACGGTAACTTAATA</u> ACAGATGCAGCTAAAGATAAG G	aa161 からタイプ K を増幅させ、リンカー 2 を付加する。 (STNGNL; 配列番号 77)	230
OCKH5L3(-)	<u>TAAAACGCTCATGCTACTTGT</u> AAGCTCTTTAACTGAATTAGC	aa201 までタイプ K を増幅させ、リンカー 3 を付加する。 (SSMSVL; 配列番号 78)	231
OCDH5L3(+)	<u>AGTAGCATGAGCGTTTTAAAA</u> ACACATAATGCTAAAGACAAG	aa161 からタイプ D を増幅させ、リンカー 3 を付加する (SSMSVL; 配列番号 78)。	232
OCDH5LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTTAACT TGTAAGCTCTTTAACTGAATTA G	aa201 までタイプ D を増幅させ、LIC テイルを付加する。	233

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

4 価の A B K D キメラワクシノーゲンによるマウスの免疫

6 週齢の雄性 C 3 H / H e J 系統マウス 1 2 匹を、完全フロインドアジュバント (C F A) に 1 : 1 比で懸濁した前記キメラワクシノーゲン 5 0 μ g で免疫した。このワクシノーゲンを総量 2 0 0 μ l、腹腔内および皮下デポーに分けて投与した。対照マウス 3 匹には、C F A 中 P B S の偽ワクチンを投与した。第 2 および第 4 週において、マウスにフロインドの不完全アジュバント中タンパク質 5 0 μ g をブースターした。偽免疫マウスには

50

、アジュバント中PBSを投与した。マウスは全て、第1回注入前および第6週時点で尾部に切り傷を付けて出血させた。

【0089】

ABKDキメラワクシノーゲンの免疫原性の評価

前記ワクシノーゲンの免疫原性は、イムノプロット分析とELISAによって評価した。イムノプロットは、上記のようにして生じさせスクリーニングした。各精製r-タンパク質(OspCタイプA、B、K、Dおよびキメラワクシノーゲン)の1 μ gを、イムノプロットにより分析した。ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)由来の無関連Hisタグ付きタンパク質であるr-BBN39(偽推理タンパク質ファミリー163)が、陰性対照として作用した。等量のタンパク質が負荷されたことを確認するため、1つのプロットは、抗HisタグモノクローナルAb(mAb)(1:2000; Novagen)によりスクリーニングした。ワクチン接種に対する応答を評価するため、前記マウス抗ABKD抗血清の1:500希釈物により同等のプロットをスクリーニングした。HRP結合ヤギ抗マウスIgG(1:40000希釈)は二次抗体として作用し、結合を化学発光によって視覚化した。ELISA分析は、ウェル1個当たり炭酸緩衝液(pH9.6; 4で16時間)中100ngのワクチン構築体またはr-OspC(タイプA、B、KまたはD)を塗布した96ウェルプレート(Costar3590; Corning)を用いて実施した。前記プレートをブロックし(0.2%Tween-20を有するPBS中1%BSA(PBS-T); 2時間)、PBS-Tにより3回洗浄し、系列希釈した抗ABKD抗血清(100 μ l; 1:50乃至1:109350)を二重プレートのウェルに添加した(1時間)。HRP結合ヤギ抗マウスIgG(1:20000)は二次抗体として作用し、ABTSは発色原基質として作用した。吸光度を、反応速度が直線状である間に、ELISAプレートリーダー(ELx808; Biotek)で405nmにおいて読み取った。力価は、吸光度曲線に対してパラメータ4個による対数式によるシグモイド曲線(SigmaPlot)に適合させることおよび最大吸光度プラートの50%に対応する希釈度逆数を計算することによって、計算した。

10

20

【0090】

抗ABKD抗体応答の免疫グロブリンイソタイププロファイル特性

抗ABKD抗体応答のイソタイププロファイルは、キメラ構築体100ngをウェル1個当たり二重ELISAプレートに塗布することによって評価した。前記プレートを、上記のように洗浄し、ブロックした。ワクチン接種マウス12匹から採取した抗ABKD抗血清は、二重に分析した(100 μ L; 1:10000; 1時間)。結合したワクシノーゲン特異的Igは、イソタイプ特異的ビオチン化二次抗体類とインキュベーションする(1時間; マウスイソタイプキット; Zymed)ことによって、検出した。結合したビオチン化抗体は、HRP結合ストレプトアビジン(30分)と前記発色原基質ABTSにより検出した。インキュベーションは全て室温で完了した。

30

【0091】

間接的免疫蛍光アッセイ類(IFA)

前記ABKDキメラワクシノーゲンに取り込まれたエピトープ類がインビトロ培養ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)の表面に提示されるかどうかを決定するため、IFAアッセイを実行した。OspC産生を最大にするため、タイプA、B、KまたはD OspCを産生するクローン群の培養物を33から37に温度移動させた。密度の濃い(約 $10^7 - 10^8$ 細胞 mL^{-1})培養物5mLからスピロヘータを遠心分離(7000 $\times g$ 、15分間)によって採取し、PBSで3回洗浄し、PBS5mL中に再度懸濁し、100 μ Lを、装填したスライド(Superscript Plus, Fisher Scientific)上の2 cm^2 エリアに展開した。スライド1セットを風乾し、もうひとつのセットは、アセトン固定した。前記スライド類をブロックし(1時間; PBS-T中3%BSA)、次に抗ABKD抗血清の前免疫血清の1:100希釈物またはウサギ抗フラゲリン抗血清の1:1000希釈物によりスクリーニングした(1時間)。結合した抗体をAlexafluor 568結合ヤギ抗マウスIgGまた

40

50

はAlexa fluor 488 結合ヤギ抗ウサギIgG ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ブロッキングバッファー)により検出した。スライドをPBS-T中で各段階の間に3回洗浄し、全てのインキュベーションを室温において暗所湿潤チェンバー中で1時間行った。スライドをFluoromount-G (Electron Microscopy Sciences)で据え付け、適切な場合にはローダミンまたはフルオレセインフィルターセットを用いてOlympus BX51 蛍光顕微鏡上で視覚化するかまたは暗視野顕微鏡によって視覚化し、Olympus MagnaFire デジタルカメラを用いて写真撮影した。

【0092】

殺菌活性の評価

ボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdorferi*) を死滅させる抗ABKD 抗血清の能力を、インピトロで評価した。上述のように33から37 に温度移動させたスピロヘータ類を、BSK-H培地で3回洗浄し、細胞密度を約 10^6 細胞 mL^{-1} に調整した。細胞 $8 \mu\text{L}$ を、モルモット補体 (Sigma) $8 \mu\text{L}$ と各試験血清 $4 \mu\text{L}$ (56 で熱不活性化; 30分)と混合した。対照は、補体を含まず熱不活性化抗ABKD 抗血清を含むか、補体のみを含むか、熱不活性化前免疫血清プールを補体とともに含んでいた。反応容量総計は、必要に応じてBSK-H培地を添加して $20 \mu\text{L}$ とし、サンプルを37 で18時間インキュベーションした。死滅はBacLight LIVE/DEAD アッセイ (Molecular Probes) を用いて評価し、フルオレセインおよびローダミンフィルターセットを備えたOlympus BX51 蛍光顕微鏡を用いて5つの高電力視野において生および死/傷害細胞の手動による計数を行った。

【0093】

結果

マウスおよびヒトで感染時に提示されたOspCタイプ類B、DおよびKのエピトープ類の同定

OspCタイプ類A、B、C、D、H、I、K、およびNが、侵襲性感染を有すると決定された患者から今日まで回収されてきている [Seinostら、1999; 実施例1; Alghafiriら、2005]。これらのOspCタイプ類のうち4種 (A、B、KおよびD) を選択し、多価キメラOspCワクチンの用途という概念の検証を確立した。感染時に提示された前記エピトープ類はタイプAOspCについてのみ同定されていたので、本研究での第一段階は、OspCタイプB、KおよびDの感染関連エピトープ類を同定することであった。これを成し遂げるため、各タイプの切断物および断片類のイムノプロットを、ボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdorferi*) のクローン群で感染したマウスから得た血清でスクリーニングするか (OspCタイプB、KおよびD) またはOspCタイプB、KまたはDを産生するボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdorferi*) 株類に少なくとも部分的には感染していることが決定しているヒトライム病患者からの血清でスクリーニングした (私信、Allen Steere 博士およびKathryn Jones)。第6週におけるマウス中での抗体応答は、タイプ特異的であった; しかし、ヒト血清の一部はタイプ間で交差免疫反応性を示し (データを示さず)、このことは、これらの患者が混合スピロヘータ群におそらく感染したことを示唆している。OspCタイプBについて、マウス感染血清について前記エピトープ類はアルファヘリックス5 (aa175と200の間) に局在していた。ヒト感染血清は同様に局在している断片 (aa164 - 185) と反応し、タイプBのアルファヘリックス5領域が抗原性であることを示唆している。タイプK OspCにおいて、エピトープ類は、前記マウスでaa148と160の間にマッピングされ、ヒトではアルファヘリックス5領域 (aa160と175の間) にマッピングされた。OspCタイプDエピトープ類はマウスおよびヒトでアルファヘリックス5領域 (aa167と180の間) にマッピングされたが、ヒト血清で認識される複数の追加エピトープ類もあった。これらのデータは、OspCタイプ類B、KおよびDのアルファヘリックス5領域が前記4価のABKDワクシノーゲン構築体に取り込むための適切な選択であることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0094】

4価のキメラOspCワクシノーゲンの構築、発現および精製

タイプB、KおよびDについて上に定義したアルファヘリックス5エピトープ類および先の研究〔実施例1〕で明確にしたタイプAループ5エピトープを用いて、多価キメラr-ワクシノーゲンを産生させたが、それは4種のエピトープ含有領域類から構成されている。前記エピトープ類を短く、構造化されていないプロテアーゼ耐性リンカー配列類によって結合した(図9B)。組換えワクシノーゲンは、長さがアミノ酸169個であり、分子量18.0kDaで、等電点6.49である。その構造は、主にヘリカルであること〔Gasteigerら、2005; Kneellerら、1990〕および高い安定係数を有していること〔Guruprasadら、1990〕が予測されている。PBSによる透析の後、組換えワクシノーゲンの沈降がややあった;しかし、約500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ は可溶性のままであり、この可溶性タンパク質を全実験で用いた。SDS-PAGEによる精製ワクシノーゲンタンパク質の分析で、単一バンド18kDa分子量が明らかになり、夾雑タンパク質は皆無であった。

10

【0095】

マウスにおけるABKDキメラワクシノーゲンの免疫原性

ABKDキメラワクシノーゲンおよびその個々の成分エピトープ類に対する抗体応答を評価するため、フロインドアジュバント中ワクシノーゲンをC3H/HeJマウスに投与した。血清をワクチン接種(n=12)および偽(PBS+アジュバント)免疫マウス(n=3)から採取し、ABKDキメラワクシノーゲンおよびタイプA、BおよびKの全長r-OspCタンパク質類との反応性を評価した。ウェスタンブロット分析は、抗ABKD抗血清がワクシノーゲンタンパク質およびタイプA、BおよびKのr-OspCと強く反応することを明らかにした。対比的に、前記キメラ構築体のC末OspCタイプDエピトープとの反応性は実質的により弱かった(図10)。陰性対照タンパク質(r-BBN39)との反応はいずれの血清にもなく、偽ワクチン接種マウスの血清は前記タンパク質のいずれとも反応しなかった。定量的ELISAに基づく血清反応性の力価検定は、ABKDキメラワクシノーゲンタンパク質に対して高力価のIgG応答を明らかにし、平均力価は27,800であった(図11A)。タイプ特異的エピトープ類に対する反応性の力価検定は、固定全長r-OspCタンパク質類との結合を評価することによって行った。前記それぞれのエピトープ類に対する抗体力価における有意な差が観察された(図11B)。エピトープ特異的力価が前記ワクシノーゲンのC末端に対して近くなるとともに低下することは注目に値する。

20

30

【0096】

抗ABKD抗血清の免疫グロブリンイソタイププロフィール

免疫グロブリンイソタイププロフィールは、ワクチン特異的抗体類の潜在的エフェクター機能の評価に重要である。前記ABKDキメラワクシノーゲンによって誘発された免疫グロブリン重鎖クラススイッチングを評価するため、イソタイププロフィールをELISAによって決定した。優勢なイソタイプはIgG1であり、IgG2aおよびIgG2bのレベルはわずかに低かった。前記第6週の血清は、限定されたレベルのみのIgM, IgG3またはIgAを示した(図12)。

40

【0097】

間接的免疫蛍光アッセイ

前記ABKDキメラワクシノーゲンの各エピトープに対して惹起された抗体のボレリア細胞表面でOspCに結合する能力は、間接的免疫蛍光顕微鏡法によって評価した。特異的表面標識が、タイプA、B、KおよびDのOspCを産生する細胞で観察された(データを示さず)。蛍光シグナルの強度はタイプ特異的力価と一致しており、最も強度の高い蛍光は、OspCタイプAまたはBを保有する細胞で観察された。タイプKまたはDを保有する細胞の蛍光は強度がより低く、染色はパッチ状であり、前記細胞に斑点のある外観を付与した。マッチさせた前免疫血清でプローブした細胞では、全く反応性が見られなかった。空気固定細胞に対する抗フラゲニン抗体の表面標識の欠如は、前記細胞の外表面が

50

未変性であり前記の検出されたエピトープ類が前記細胞表面で天然に提示されることを確認するために役立った。予測通り、アセトンで透過性をあげた細胞は抗フラゲニン抗体で標識された（データを示さず）。

【0098】

A B K Dキメラワクシノーゲンによるワクチン接種が殺菌性抗体を誘発することの実証

抗A B K D抗血清の殺菌活性をL I V E / D E A D B a c L i g h tアッセイを用いて評価した〔T i l l y ら、2001；L e d i n ら、2005；E l i a s ら、2000；M o n t g o m a e r y ら、2006；E l i a s ら、2002；S h i n ら、2004〕。殺菌活性は、前記キメラワクチン構築体に含めた全タイプのO s p Cを保有する株に対して検出された。抗A B K D抗血清とともにインキュベーションし、有意な細胞凝集を誘発させた。生および死細胞両者ともに前記凝集物内部に存在していた。細胞を凝集物内部で計数することはもともと難しいので、生および死細胞の百分率を、凝集していない遊離細胞のみを計数することによって、求めた。4種のO s p Cタイプ類全てのために、殺菌アッセイに用いた培養物中の死細胞のバックグランドレベルは約20 - 30%であった。死細胞のこのバックグランドレベルは、O s p C発現を上方制御するために培養物を33から37に移した後で、我々の研究室で一貫して観察された。殺菌アッセイにおいて、死滅は補体依存性に出現し、死細胞の百分率はバックグランドレベルから56乃至90%に有意に増加する。全ての場合において、死細胞の数は、前記対照のいずれかで観察された死細胞の数の少なくとも2倍であった。補体のみでは、死滅を惹起しなかった。プールした前免疫血清により惹起された殺菌活性は全くなく、前記ワクシノーゲンに対する

10

20

【0099】

考察

いくつかの研究は、ライム病スピロヘータ類のO s p Cの潜在的ワクシノーゲンとしての潜在的用途を探求している。O s p Cによるワクチン接種は防御性の抗体応答を惹起したが、防御は、主に株特異的であると報告されている〔G i l m o r e ら、1996；S c h e i b l h o f e r ら、2003；W a l l i c h ら、2001；B r o w n ら、2005；P r o b e r t およびL e F e b v r e、1994；G i l m o r e ら、2003〕。複数のO s p Cタンパク質のカクテルを用いてより広い防御を惹起しようとする試みは成功しなかった。B a x t e r は、14種の互いに異なる全長O s p C変異体から構成されるO s p Cカクテルを試験した；しかし、それらは、各変異体の独自ドメインに対して十分な抗体力価を惹起できなかった - もし広い防御を伝達しようとするならばこれは必須である。さらに、容認できない反応原性も報告されていた〔H a n s o n ら、2004〕。カクテルワクチン類についての一般的問題は、感染時に天然には提示されずかつ防御性抗体を惹起しないエピトープ類に対する抗体応答が潜在的に誤って指示されることである。キメラワクチン類の産生は、r - タンパク質の単純カクテルを用いて遭遇する問題を回避できる別の手法を提供する。一連の免疫優性エピトープ類から構成されるキメラワクチン類は、マラリア〔H a n s o n ら、2004；C a r o - A g u i l a r ら、2005；〕、A群連鎖球菌〔M c N e i l ら、2005；D a l e ら、2005；H u ら、2002；D a l e、1999；K o t l o f f ら、2005；H o r v a t h ら、2005〕および数種のウイルス類〔A p t ら、2006；F a n およびM e i、2005；W a n g ら、2005；B o u c h e ら、2005〕に対するワクチンの開発で探求されてきた。もし多価O s p Cワクチンが広く防御性であらねばならないとするならば、前記ワクシノーゲン中に十分なアレイのエピトープ類を取り込ませて多様な株類に対しての防御性応答を惹起させることが必要であろう。このようなワクシノーゲンの構築により前進する能力が、AからUと命名した21種の明確なO s p Cタイプ類を明確にした系統発生分析によって非常に高められ〔S e i n o s t ら、1999〕、そのうちサブセット1個のみがヒトにおける侵襲性感染と相関していた〔S e i n o s t ら、1999；実施例1；A l g h a f e r i ら、n 2005〕。

30

40

【0100】

50

OspCのエピトープ構造の詳細な理解がキメラワクシノーゲンの開発には必要である。OspCエピトープ位置についてはいくつか過去に報告されている〔Gilmoreら、1996; Jobeら、2003; Lovrichら、2005〕。2件の研究では、殺菌性抗体類惹起に關与しているエピトープがOspCのC末ドメイン内部に存在することを報告している〔Jobeら、2003; Lovrichら、2005〕;しかし、このドメインは実質的に保存されているので、前記C末に対する抗体類が広く防御性でない理由は明確ではない。Matheisenらは、また、前記C末端が前記抗体応答の主な標的であると示唆し、欧州における神経ボレリア症患者の血清と全長OspCとの反応性が、アミノ酸10個のC末切断形との反応性よりも高いことを記載している〔Matheisenら、1998〕。このことから、彼らは、C末エピトープ類があるに違いないと結論する一方、前記試験抗原は未知のタイプの単一OspC変異体で構成されていたので、前記C末端がより広い範囲を認識することは、このドメインがより高く保存されているからにちががなく、このC末端が免疫優性であることを必ずしも示唆していないと結論した。Gilmoreらは変性させたものではなく非変性のr-OspCによりマウスを免疫すると、相同性単離物によるチャレンジに対して防御を付与することを明らかにし〔Gilmoreら、1996; GilmoreおよびMbow, 1999〕、防御性エピトープ類が立体構造的に明確にできるかもしれないことを示唆している。別の分析で、Gilmoreらは、単一OspCタイプ(タイプA)由来の限られた数のOspC切断物類の受動免疫を付与する抗OspCモノクローナル抗体との免疫反応性を分析した〔GilmoreおよびMbow, 1999〕。N末端またはC末端のいずれかの欠損は、mAbによる前記r-タンパク質類の検出を排除し、さらに立体構造的または不連続エピトープの存在を示唆している。mAbにより認識されるエピトープが免疫優性で自然感染時に關連しているかどうかまたは前記の異なるOspCタイプ類間で保存されているかどうかは、明らかでない。タイプA OspCの線状免疫優性エピトープ類が最近マッピングされループ5およびアルファヘリックス5領域内部に存在していることがわかった〔実施例1〕。前記タイプAループ5エピトープを含むr-タンパク質は、マウスで殺菌性抗体類を惹起し、それぞれのタイプ特異的エピトープ類がワクチン開発で活用できる可能性がでてきた〔実施例2参照〕。この報告では、初期感染時に提示されるOspCタイプB、KおよびDのエピトープ類をマッピングし、これらのエピトープ類に基づく4価のキメラワクシノーゲンを構築した。このABKDキメラワクシノーゲンは、マウスで非常に免疫原性があり、細胞表面でOspCを結合し補体依存性にタイプA、B、KおよびD OspCを産生する株を有効に死滅させる抗体類を惹起した。

【0101】

4価のキメラ試験ワクシノーゲンを開発しようとする我々の努力の第一段階は、マウスおよびヒトにおいて感染時に提示されるOspCタイプB、KおよびDの線状エピトープ類を同定することであった。これらの分析は、基本的に、タイプA OspCのループ5およびアルファヘリックス5エピトープ類を同定した実施例1に記載のようにして行った。簡単に述べると、タイプB、KおよびD OspC切断物および断片類の大きなパネルをクローン単離物に感染したマウスからおよび対応するOspCタイプを発現する株に少なくとも部分的に感染したヒトからの血清によりスクリーニングした。詳細なエピトープマッピングは、実験的に感染したマウスからの血清を用いて可能であった;しかし、自然感染ヒトにおいて、抗体応答は、より広いエピトープアレイに対してであった。これは驚くべきことではなく、おそらく、初期感染時に菌細胞表面に正常では提示されないOspCエピトープ類に対する抗体応答が拡大したことを反映している。新しいエピトープ類のいくつかはOspCの保存ドメイン類(例 アルファヘリックス1)に由来しているであろうが、この新しいエピトープ類は菌細胞死と膜からのOspC放出によりアクセス可能となるのであろう。このことは、エピトープマッピングにおいてヒト血清サンプルの使用を必要とする但し書き;すなわち、感染の正確な期間は通常わからず感染群のクローン性が疑わしいという但し書きを示している〔Wangら、1999; Ruzic-Sabljićら、2006; Hofmeisterら、1999; Guttmanら、1996

10

20

30

40

50

；R i j p k e m aら、1997〕。いずれにしても、前記ヒト血清サンプルの分析から、アルファヘリックス5領域内部のエピトープ類が感染時、O s p CタイプA、B、KまたはDを産生する株類によって認識されることは明白である。さらに、いくつかの異なるO s p Cタイプ産生株中でアルファヘリックス5に対する応答が一貫していることは、このO s p Cドメインの機能的関連性を示唆するものであろう。

【0102】

アルファヘリックス5およびループ5領域配列類はO s p Cタイプ間で可変であるものの、これらの領域は各タイプ内部で非常によく保存されている〔実施例1参照〕。このことは、キメラワクチンという文脈で、限られた数のO s p Cエピトープ類のみが広い防御を実行するために必要なのであろうということを示唆している。広く防御性のあるワクシ
10
ノーゲンの開発における第一段階として、タイプAループ5エピトープおよびO s p CタイプB、KおよびDからのアルファヘリックス5エピトープ類を、試験ワクシノーゲンの開発に用いた。これらのエピトープ類を含む領域を、リンカー配列をコードするように設計したプライマー類によりPCRで増幅した。このことにより前記キメラ構築体の創生においてPCR重複伸長の使用が可能となり、短くて構造化されておらずプロテアーゼ耐性のアミノ酸配列類により前記エピトープ類を分離する手段を提供した〔C r a s t oおよびF e n g , 2000〕。実験的O s p Cに基づく4価のA B K Dキメラワクシノーゲンを本研究で開発し、それは、試験マウス全てで一定した高力価のI g G抗体応答を惹起した(n = 12)。さらに、前記ワクシノーゲンは、各取り込みエピトープに対して抗体を惹起した。前記エピトープ特異的力価は前記構築体内部におけるエピトープ位置により影
20
響を受けるようであることは関心の集まる場所である。N末エピトープ(タイプAのループ5)からC末エピトープ(タイプDのアルファヘリックス5)まで力価が漸次低下していった。C末端エピトープ類に対して力価の低下という現象はまた、溶連菌M - タンパク質に基づくキメラワクチンの初期研究で報告された〔D a l e r a , 1993 ; D a l e r a , 1996〕。力価に対する位置特異的効果の土台は明白ではないが、C末端構造のインビボ分解または変化によるのかも知れない〔D a l e r a , 1999〕。

【0103】

ボレリア感染に対する防御のために必要なThサイトカイン応答と関連するイムノグロブリンイソタイプパターンは完全に解明されたわけではないが〔K r a i c z y r a , 2000 ; W i d h e r a , 2004 ; K e a n e - M y e r s r a , 1995 ; K e a n e - M
30
y e r s r a , 1996 ; K e a n e - M y e r s およびN i c k e l l , 1995〕、このパターンを決定することは、ワクシノーゲン開発において重要な段階であり前記ワクシノーゲンのさまざまな構築物類の潜在的防御能力に関する重要な情報が提供できるであろう。前記応答のイソタイププロファイルは、ELISAによって決定し、混合Th1およびTh2サイトカイン応答に関連した重鎖I g イソタイプ類が観察された。本研究で注目したクラススイッチングは、前記ワクシノーゲンに取り込ませた限定したT細胞エピトープが存在しなくても、適切なT細胞ヘルプを意味している。マウス(H2Ak/H2Ek)およびヒト(HLA-DRB1)タイプII MHCサブセットのための予想ペプチド結合アルゴリズムを用いたワクシノーゲン配列分析は、全ての利用可能な対立遺伝子類に結合すると予測された前記ワクシノーゲン中の潜在的T細胞エピトープ類を暴露した〔R
40
a m m e n s e e r a , 1999 ; Z h a n g r a , 2005〕。前記予測された結合ペプチド類のひとつはL A N S V K E L Tで、それは、前記構築体内部で3回繰り返されており、この繰り返しが、Th応答惹起に際し重要であるのかもしれない〔J i a n g r a , 1999 ; A h l b o r g r a , 1998 ; K j e r r u l f r a , 1997 ; T h e i s e n r a , 2000〕。潜在的T細胞エピトープ類の分析は網羅的ではなかったが、前記予測は、前記キメラワクシノーゲンがマウスにおいてTリンパ球ヘルプを惹起できることを示唆する我々のデータの裏づけとなる。さらに、そのことは、この構築体が乱雑なT細胞エピトープ配列を取り込む必要がなくヒトにおいてそうする可能性があるかもしれないことを意味している。このイソタイププロファイルの産生においてフロインドアジュバントの重要性は公知ではないが、前記応答類とイソタイププロファイル類は、ヒトでの使用に適し
50

たミョウバンまたは他のアジュバント類の文脈において評価する必要があるであろう〔t en Hagenら、1993；Lindblad、2004；PetrovskyおよびAguilar、2004；Brewerら、1999；McNeelaおよびMills、2001〕。さらに、前記キメラワクシノーゲンのエピトープ順序または構造の改変により、免疫応答を追跡してインビボ防御を最大にする機構が提供できるであろう〔Tongrenら、2005；Cairら、n2004〕。

【0104】

ワクチン開発の観点から前記ワクシノーゲンに対する前記応答が生産的であるためには、惹起された抗体が未変化のボレリア・ブルグドルフェリ（*B. burgdorferi*）細胞の表面に結合でき菌死滅を起こすことができなければならない。IFA分析は、OspCタイプA、B、KおよびDを産生する株類の細胞表面が強く標識されることを明らかにした。タイプDエピトープに対する抗体力価はより多くのN末エピトープ類に対して惹起された力価よりも確かに有意に低いというものの、タイプDを産生する株類の表面標識は簡単に明らかになった。OspCタイプ培養物類のそれぞれにおける細胞サブセットは、抗ABKD抗血清で標識されないことが観察され、そのことは、それらの細胞がOspCを発現していなかったことを意味している。しかし、インビボにおいて、全てとはいわないまでもほとんどの細胞がダニから哺乳類への伝染時および初期哺乳類感染時にOspCを発現していることが実証されている〔Gilmoreら、2001；Zhongら、1997〕。殺細胞を行う抗ABKD抗体の能力も、評価した。ワクチン接種マウス由来血清は、補体依存性にタイプA、B、KおよびD OspCタンパク質類を発現するスピロヘータ類を効率的に死滅させた。前記OspCタイプ類の全てで100%未満の死滅であったが、このことは、ある群の細胞におけるインビボOspC発現の不均一性の関数であるようで、それは、インビボで十分に説明されてきた現象である〔Schwanら、1995；SchwanおよびPiesman、2000；Huら、1996〕。

【0105】

この実施例では、新規r-キメラ多価OspCに基づくライム病ワクシノーゲンの構築と概念の検証を記載している。エピトープに基づくr-キメラタンパク質の使用により、同一構築体中で複数のOspCタイプ類を網羅できるようになり、関連のないタンパク質ドメインに対して間違っ誘導された免疫応答という潜在的問題を回避する。活発な感染時に認識される線状エピトープ類のマッピングは、キメラワクチン開発の重大な要件であり、このことは、ヒトにおける侵襲性感染に関連した4種のOspCタイプ類について完了し、成功した。前記ワクシノーゲンに含ませたエピトープ類は、ボレリア細胞表面でOspCを結合できかつ補体媒介菌死滅を行うタイプ特異的IgG抗体類を惹起した。

【実施例4】

【0106】

キメラ多価ライム病ワクチンの免疫原性向上を意図した変異体類に対する免疫応答

本研究で我々は、前記構築体の溶解度を向上させ、エピトープ配置、エピトープ反復および推定C末安定化タグ類を含ませることの免疫応答に及ぼす潜在的インパクトを評価することを旨とした。これらの分析では、防御性の広いOspCワクチンのためおよび一般的キメラワクチン類の構築のためのデザイン戦略について新しい洞察を示す。

【0107】

材料および方法

組換えOspCの発現と精製

タイプA、B、KおよびDの組換え全長OspCタンパク質を、先に記載したようにして作製した〔実施例1および2を参照〕。簡単に述べると、ボレリア・ブルグドルフェリ（*B. burgdorferi*）単離物類B31MI（タイプA OspC）、LDP73（タイプB）、LDP74（タイプK）およびLDP116（タイプD）のクローン群からのospC遺伝子を、5´オーバーハングを有するプライマー類を用いてPCRで増幅させ、pET-32 Ek/LICベクター（Novagen）中でリガーゼ非依存性クローニング（LIC）を行った〔実施例1〕。一重鎖テイルの増幅と再生の後、増幅物

10

20

30

40

50

を pET-32 Ek/LIC ベクターにアニーリングし、それを NovaBlue (DE3) 大腸菌 (E. coli) 細胞に形質転換し増殖させた。挿入配列を DNA 配列決定 (MWG-Biotech) により確認した後、タンパク質発現を IPTG (1 mM) により誘発させた。タンパク質類は、pET-32 Ek/LIC 発現タグでコードされたヘキサヒスチジンモチーフを用いてニッケルアフィニティクロマトグラフィにより精製した (Novagen)。イミダゾール溶出タンパク質類を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) により 10 kDa 分子量カットオフ膜 (Slide-a-lyzer, Pierce) に対して十分に透析し、タンパク質濃度を BCA アッセイ (Pierce) により定量し、SDS-PAGE により前記調製物の純度を評価した。

【0108】

ABKD ワクチン変異体類の構築、発現および精製

前記ワクチン構築体での特異的エピトープ類に対する IgG 力価低下の潜在的メカニズムを探求しその解決策を調べるため、原ワクチンの複数変異体類を構築した。ワクチン変異体類は全て、先に記載の ABKD ワクシノーゲン〔実施例 3〕の配列に基づいており、同一エピトープ含有配列類を含んでいる。これらには、タイプ A のループ 5 領域 (アミノ酸 (aa) 131 から 149 まで) およびタイプ B (aa 160 - 201)、K (aa 161 - 201) および D (aa 161 - 201) のアルファヘリックス 5 領域類を含んでいた (図 13 挿入図)。この ABKDppa および ABKDgg は、それぞれ、原 ABKD 構築体の C 末端に Pro-Pro Ala または Gly Gly モチーフを付加した。これらの構築体類の両者はともに、前記元来の ABKD 構築体を、前記の適切なアミノ酸類をコードする 5' オーバーハングにより前記モチーフを付加する逆プライマー類 (表 5) を用いて増幅させることによって作製した (図 13 A)。他のワクチン変異体類は、元来の ABKD ワクシノーゲン構築に使用したそれらと類似の重複アニーリングと伸長技術によって作製した〔実施例 3〕。前記 ABKDD 構築体は、非構造化プロテアーゼ耐性リンカーをコードする 3' テイル配列を有する逆プライマー類を用いて前記 ABKD 構築体を再度増幅させることによって、作製した。これによって、PCR 産物を、5' 末端の相補性リンカーをコードする配列により増幅させておいたタイプ D Os pC エピトープ含有配列にアニーリングさせ、その後アニーリングした構築体の重複伸長と増幅を行うことができた (図 13 B)。この ADBK 構築体は、別々に増幅させたタイプ A および D エピトープを含有する領域を互いにアニーリングさせ、次に、原 ABKD 構築体から増幅させたタイプ B および K ヘリックス 5 エピトープ領域類で増幅させ、作製した (図 13 C)。ADBKD 構築体は、ABKD および ADBK 配列類からの増幅物をアニーリングさせることによって作製した (図 13 D)。全ての場合において、前記 PCR 増幅は、94、2 分間の最初の変性段階の後 94 15 秒の変性、50 30 秒のプライマーアニーリングおよび 72 60 秒の伸長を 35 サイクル、最後に 72 における伸長を 7 分間用いる GoTag Green (Promega) により完了した。これらのワクシノーゲン類構築に使用したプライマー類全てを、表 5 に示した。全ての PCR 産物類は、その後の PCR 反応においてテンプレートとして使用する前にゲル精製した (Qiagen)。最終増幅物類は、リガーゼ非依存性クローニングによって前記の pET-46 Ek/LIC ベクターにアニーリングし、NovaBlue (DE3) 大腸菌 (E. coli) 細胞に形質転換した。コロニーは、T7 プライマー類を用いて挿入物をスクリーニングし、プラスミドを回収し (Qiafilter Midi, Qiagen)、DNA 配列決定により前記挿入物を確認した。組換えタンパク質が発現し上記のようにして精製した。精製後、ワクチンタンパク質を、PBS (pH 7.4) または 100 mM リン酸塩、100 mM NaCl、50 mM アルギニン、50 mM グルタミン酸を含有する pH 8 の緩衝液 (Arg/Glu 緩衝液) を 3 回交換しながら 10 kDa 分子量カットオフ膜 (Slide-a-Lyzer, Pierce) に対して透析した〔Golovanovら、2004〕。前記構築体類の純度は、SDS-PAGE によって評価した。

【0109】

10

20

30

40

【表 5】

表 5. 前記キメラワクシノーゲン類構築に用いたプライマー類。LIC テイルは太字で示してあり、リンカー配列には下線を付した。

プライマー	配列	説明	配列番号
OCAL5LIC(+)	GACGACGACAAGATTTCT GAAACATTTACTAATAAA TTAAAAGAAAAAC	aa131 からタイプ A を 増幅し、LIC テイルを 付加する。	234
OCAL5L5(-)	<u>TAAAGCTGACATAGCACC</u> TTCTTTACCAAGATCTGT GTG	aa149 までタイプ A を 増幅させ、リンカー 5(GAMSAL ; 配列番号 80)を付加する。	235
OCBH5L1(+)	<u>GGTAGCATGGGTATGTT</u> <u>AAAAGCAAATGCAGCGG</u> G	aa160 からタイプ B を 増幅させ、リンカー 1(GSMGML ; 配列番号 76)を付加する。	236
OCKH5L3(-)	<u>TAAAACGCTCATGCTACT</u> TGTAAGCTCTTTAACTGA ATTAGC	aa201 までタイプ K を 増幅させ、リンカー 3(SSMSVL ; 配列番号 78)を付加する。	237
OCKH5LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTT AACTTGTAAGCTCTTTAA CTGAATTAGC	aa201 までタイプ K を 増幅させ、LIC テイル を付加する。	238
OCDH5LIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTT AACTTGTAAGCTCTTTAA CTGAATTAG	aa201 までタイプ D を 増幅させ、LIC テイル を付加する。	239
OCDH5ppaLIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTT ATGCAGGAGGACTTGTA AGCTCTTTAACTGAATTA G	aa201 までタイプ D を 増幅させ、“PPA” お よび LIC テイルを付加 する。	240
OCDH5ggLIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGTTT ATCCTCCACTTGTAAGCT CTTTAACTGAATTAG	aa201 までタイプ D を 増幅させ、“GG” お よび LIC テイルを付加 する。	241
OCDH5L1(-)	<u>TAACATACCCATGCTACC</u> ACTTGTAAGCTCTTTAAC TGAATTAG	aa201 までタイプ D を 増幅させ、リンカー 1(GSMGML ; 配列番号 76)を付加する。	242
OCDH5L4(+)	<u>AGTTCAAGCCAAGGCTTA</u> AAAACACATAATGCTAAA GACAAG	aa161 からタイプ D を 増幅させ、リンカー 4(SSSQGL ; 配列番号 79)を付加する。	243
OCDH5L4(-)	<u>TAAGCCTTGGCTTGA</u> ACT TGTAAGCTCTTTAACTGA ATTAGC	aa201 までタイプ D を 増幅させ、リンカー 4(SSSQGL ; 配列番号 79)を付加する。	244

10

20

30

40

OCDH5L5(+)	<u>GGTGCTATGTCAGCTTTA</u> AAAACACATAATGCTAAA GACAAG	aa161 からタイプ D を 増幅させ、リンカー 5(GAMSAL ; 配列番号 80)を付加する。	245
3=REVLIC(-)	GAGGAGAAGCCCGGT	3' LIC テイルまで増 幅する。	246
pET46 T7(+)	CGAAATTAATACGACTCA CTATAGGGG	pET46、クローニング 部位上流 123 塩基類か ら増幅する。	247
pET46 T7(-)	GCTAGTTATTGCTCAGCG G	pET46、クローニング 部位下流 117 塩基類ま で増幅する。	248

10

【 0 1 1 0 】

ワクチン変異体類によるマウスの免疫

6 週齢の雄性 C 3 H / H e J マウスを前記 6 種のワクシノーゲン変異体類のそれぞれで免疫した (マウス 3 匹 / 構築体) 。前記変異体類の免疫原性は互いに匹敵するものであったので、前記タンパク質をモルベースで投与し、ワクシノーゲンマス 1 単位当たりのエプトーブ類の数の差を補償するのが望ましかった。各マウスに対して、免疫 1 回当たり約 2 . 8 ナノモルのタンパク質を投与したが、それは、構築体類 A B K D , A B K D p p a , A B K D g g および A D B K の 5 0 μ g または構築体類 A B K D D および A D B K D の 6 2 . 5 μ g となる。マウスは、完全フロインドアジュバント中ワクチンで免疫し、次に、第 2 週および第 4 週においてフロインドの不完全アジュバントをブーストした。第 1 回免疫の前および第 6 週において、尾部切傷により全マウスから血清を採取した。総計およびエプトーブ特異的抗体力価に及ぼすアジュバントの効果を決定するため、またイソタイププロフィールに及ぼすアジュバントの効果を決定するため、マウス (6 匹 / アジュバント) を、上記のようにフロインドアジュバント中に懸濁したかまたはミョウバン (I m j e c t A l u m , P i e r c e) 上に吸着させた A B K D ワクシノーゲンにより免疫し、血清を第 6 週に尾部切傷によって採取した。

20

30

【 0 1 1 1 】

ワクチン変異体類によって誘発されたエプトーブ特異的 I g G 力価の評価

各ワクシノーゲンの免疫原性はウェスタンブロットおよび E L I S A の両者によって評価した。ウェスタンブロットのため、タイプ A、B、K、D の r - O s p C を還元性サンプル緩衝液中 1 レーン当たり 5 0 0 n g で載せ、1 2 . 5 % S D S P A G E ゲル (C r i t e r i o n , B i o r a d) 中で電気泳動し、P V D F (I m m o b i l o n - P , M i l l i p o r e) にエレクトロブロットした。このブロットを、0 . 2 % T w e e n - 2 0 を有するリン酸緩衝生理食塩水 (P B S - T) 中 1 % B S A でブロックした。前記ブロットを、P B S - T 中各抗血清の 1 : 2 5 0 0 希釈物で 1 時間ブローブし、次に 3 回洗浄した。等量のタンパク質が確実に載せられたことを確認するため、ブロット 1 個は、抗 H i s タグモノクローナル抗体 (1 : 2 0 0 0 ; N o v a g e n) によりスクリーニングした。二次検出は、パーオキシダーゼ結合ヤギ - 抗マウス I g G の 1 : 4 0 0 0 0 希釈物および化学発光 (S u p e r S i g n a l P i c o , P i e r c e) によって行った。定量的分析のため、O s p C タイプ特異的 I g G 力価は、E L I S A 分析によって決定した。タイプ A、B、K、または D の r - O s p C を、9 6 ウェルプレート (C o s t a r 3 5 9 0 ; C o r n i n g) 上に炭酸緩衝液中 (p H 9 . 6) 1 0 0 n g / ウェルで 4 において 1 6 時間塗布しておいた。前記プレートをブロックし (0 . 2 % T w e e n - 2 0 を有する P B S (P B S - T) 中 1 % B S A ; 2 時間) 、P B S - T で 3 回洗浄し、系列希釈した抗ワクシノーゲン抗血清 (1 0 0 μ L) を二重プレートのウェルに添加し

40

50

た(1時間)。HRP結合ヤギ-抗マウスIgG(1:20000)は、二次抗体として作用し、ABTSは、発色原基質として作用した。吸光度を、反応速度が直線状である間にELISAプレートリーダー(ELx808; Biotek)により405nmで読み取り、力価は、パラメータ4個の対数式により吸光度曲線にシグモイド曲線を合わせて計算した(SigmaPlot)。力価は、最大吸光度プラトローの50%に対応する希釈度の逆数として報告する。

【0112】

エピトープ特異的イムノグロブリンイソタイププロフィールの決定

ABKD、ABKDD、およびADBKDワクチン変異体構築体類に対する抗体応答のイソタイププロフィールは、ELISAによって評価した。96ウェルプレートに、タイプA、B、KおよびDのr-OspCを100ng/ウェルで塗布した。このプレートを上記のようにしてブロックし洗浄した。抗ワクシノーゲン抗血清を前記プレートに添加し、二重に分析した(100μL; 1:10000; 1時間)。結合したエピトープ特異的Igを、イソタイプ特異的ビオチン化二次抗体類とインキュベーションして、検出した(1時間; マウスイソタイプキット; Zymed)。前記の二次抗体類は、パーオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(30分)と発色原基質ABTSにより検出した。インキュベーションは全て、室温で完了した。

10

【0113】

ワクチン特異的Tリンパ球によるIFN- およびIL-4産生の決定

免疫マウス由来の脾臓細胞のサイトカイン応答を、Abuodehら[1999]の方法を変形したものをを用いてワクシノーゲンによりインビトロで再刺激し評価した。ワクチン接種マウスは、CO₂麻酔によって安楽死させ、脾臓を無菌的に取り出しRPMI培地(Sigma)に入れた。各ワクチン構築体により免疫したマウス3匹からの脾臓をまとめ、ゲージNo. 22の針を用いて脾臓カプセル中にRPMIを繰り返し注入することで細胞を採取した。細胞懸濁液を50mLの遠心管に移し、細胞を200×gで5分間採取した。赤血球は、8.3mg/mL塩化アンモニウム(R-7757、Sigma)3mLに1分間暴露させ融解させた。次に、この塩化アンモニウムをRPMI(Sigma)20mLで希釈し、細胞を遠心分離し3回洗浄した。細胞を10%FCS, 100μg mL⁻¹ストレプトマイシン、100U mL⁻¹ペニシリン、2.5μg mL⁻¹アンホテリシンBを含むRPMI10mL中に再懸濁した。細胞をトリパンブルーで染色し生存を評価し、血球計で計数し、細胞懸濁液全てを10⁷細胞mL⁻¹に調整した。細胞を10⁷細胞/ウェルで24ウェルプレート(Costar3526)中にアリコットとして入れた(12ウェル/ワクシノーゲンタイプ)。3重ウェルを5または10μg mL⁻¹の免疫ワクシノーゲンで刺激した。対照は、無関連タンパク質であるウシ血清アルブミン10μg mL⁻¹で刺激した3重ウェルと無刺激ウェル(タンパク質なし)を含んでいた。全プレートを37、5%CO₂で96時間インキュベーションし、次に、上清を採取し-80で凍結し、サイトカイン類のELISA定量を待った。

20

30

【0114】

Th1/Th2サイトカイン類IFN- およびIL-4のレベルを定量するため、ELISAに基づくアッセイ(ELISA-Max; Biolegend)を製造業者の説明に従い用いた。簡単に述べると、捕捉抗体を96ウェルELISAプレートに塗布し、プレートをブロックし、各培養上清100μLを二重に、前記プレート中で2時間インキュベーションした。IL-4検出のため、未希釈培養上清を用い、一方IFN- のため、前記上清を希釈せずおよびPBSで1:20に希釈して試験した。標準曲線は、公知濃度の各サイトカインを含むサンプルを用いて、作成した。結合サイトカイン類の検出は、ビオチン化二次抗体と次にHRP結合ストレプトアビジンにより行い、比色検出は、TMB基質を用いて行った。

40

【0115】

結果

変異体ワクチン構築体類の構築、発現および精製

50

5´オーバーハングを有するプライマー類ならびに重複アニーリングおよび伸長PCR技術を用いて、元来のABKDワクチンの変異体類5種を作製した(図13)。前記構築体類の全てのDNA配列類を確認した。前記ワクシノーゲン類の選択した物理化学的性質を表6に示した〔Gasteigerら、2005〕。ニッケルクロマトグラフィによる組換えワクシノーゲン類の精製後、PBS透析中に有意な割合のr-タンパク質が沈降することがわかった。このことは、ABKDワクシノーゲンの最初の報告でも注目されていた〔実施例3〕。分子量の大きい構築体類ABKDDおよびADBKDはPBS中溶解度が高いが、r-タンパク質沈降は、さらに有意であった。そうした理由のため、改良透析緩衝液(Arg/Glu緩衝液)をGolovanovらの研究〔2004〕に基づき開発した。前記緩衝液のpHは、PBSのそれ(pH7.4)からpH8.0まで高め、緩衝液pHとr-タンパク質のpIとの間の差異を高めた(pI 6.49または6.85)。さらに、塩濃度は、150mMから100mMまで低下させ、50mMアルギニンと50mMグルタミン酸を添加した。この緩衝液を用いると、前記r-タンパク質のいずれの沈降も全く見られず、可溶性タンパク質濃度の顕著な上昇があった。SDS-PAGEによって視覚化されたように、前記r-タンパク質は純粋で、分解産物を全く含んでいなかった(図14)。

10

【0116】

【表6】

表6. 前記ワクシノーゲン類の物理化学的性質

20

構築体	アミノ酸類	分子量(Da)	等電点	不安定性係数
ABKD	169	18014.4	6.49	10.14
ABKDppa	172	18279.7	6.49	14.93
ABKDgg	171	18128.5	6.49	10.86
ABKDD	214	22632.7	6.85	15.49
ADBK	170	18027.4	6.49	8.51
ADBKD	215	22645.7	6.85	14.18

【0117】

ワクチン変異体類の免疫原性

30

ABKDワクチン変異体類の相対的免疫原性を評価するため、マウスをフロインドアジュバント中前記変異体類のそれぞれで免疫した。前記血清のエピトープ特異的反応性はウェスタンブロットにより評価した。このウェスタンブロットでは、前記血清を用いて前記4種のタイプのそれぞれのPVDf-固定r-OspCをプローブした。前記タンパク質が前記ブロット上に等量ずつ載せられたことを、タグ特異的マウス-a-Hisタグモノクローナル抗体との反応性によって評価し、確認した。免疫マウスからの血清は、r-OspCタンパク質類のそれぞれとの反応性レベルにおいてワクシノーゲン依存性差異を明確にした(図15A)。ABKDppaおよびABKDgg変異体類によりワクチン接種したマウスにおいてタイプDヘリックス5エピトープとの反応性低下があり、ADBK変異体との反応性低下が最も顕著であった。定量的にこうした変動を評価するため、前記構築体中に含まれるOspCタイプ特異的エピトープ類のそれぞれとのIgG反応性の力価検定は、ELISAによって、再度固定化抗原類として前記4種のタイプのそれぞれの全長r-OspCを用いて行った。前記力価は、主に、定性的ウェスタンブロット知見によく類似しており、それぞれのエピトープ類に対する免疫血清の反応性にワクチン特異的差異があることを実証した(図15B)。最も顕著な差異は、タイプDエピトープとの反応性で見られ、特に低い力価は、ABKDppa, ABKDggおよびADBK変異体類について観察された。

40

【0118】

ワクチン変異体特異的イムノグロブリン類のイソタイププロフィール

変異体ワクシノーゲン類により誘発された免疫応答をより詳細に理解するため、エピト

50

ープ特異的力価によって決定された最大ワクチン強度の前記3種の変異体類(A B K D、A B K D D、A D B K D)についてエピートープ特異的イムノグロブリンイソタイププロフィールを完成した。一般的に、前記抗原特異的イムノグロブリン類中にI g G 1、少量のI g G 2 aおよびI g G 2 b、および非常に少量のI g G 3またはI g Mが優勢であったが、このパターンは先に記載されている〔実施例3〕(図16)。全てのエピートープ類および全てのワクチン変異体類について、I g イソタイプのパターンは類似であるが、ただひとつ例外がある。A B K DまたはA D B K D変異体で免疫したマウスよりもA B K D Dで免疫したマウスにおいて、タイプKおよびDエピートープ特異的I g G 2 aおよびI g G 2 bのより強い反応性があった。

【0119】

ワクチン特異的Tリンパ球によるTh1/Th2サイトカイン産生

A B K Dワクシノーゲン中における変異によって誘発されたサイトカイン環境およびTh1/Th2バランスの潜在的インパクトを評価するため、マウス脾臓細胞をインビトロで、マウスを免疫した前記ワクシノーゲンで再刺激した。IFN- γ の誘発レベルにおいて、異なる免疫をしたマウス間で顕著な差が観察された。全てのワクチン変異体類は、培養上清中におけるIFN- γ のレベル上昇と関連していた。ただし、A D B KおよびA D B K Dは、他のワクシノーゲン類によって誘発されたものよりも2乃至3倍高いレベルであった(図17)。全ての場合において、両者は抗原誘発IFN- γ の $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ および $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 濃度で、レベルは0.5乃至 8.6 ng/mL の範囲であった。無刺激脾臓細胞またはウシ血清アルブミンで刺激した脾臓細胞からの細胞培養上清は、全て、このアッセイの検出限界である 15.6 pg/mL 未満のIFN- γ を有していた。ワクチン刺激または対照培養上清のいずれにおいても、IL-4は検出されず、この濃度が本アッセイの検出限界 2.0 pg/mL 未満であることを示唆している。

【0120】

抗体力価およびイソタイププロフィールに及ぼすアジュバントタイプの効果

前記ワクシノーゲンに対する応答に及ぼすアジュバントタイプの効果を決定するため、マウスを、フロインドアジュバント類に懸濁したかまたはアルミニウムに吸着させたA B K Dタンパク質で免疫した。ワクシノーゲン全体に対するI g G力価および各成分エピートープに対するI g G力価は、アルミニウムアジュバントで免疫したマウスでわずかに低かったが、前記応答の全般的パターンは前記2種のアジュバント類と同様であった(図18A)。I g G 1のレベルが類似していたにもかかわらず、ミョウバンで免疫したマウスは、ワクシノーゲン特異的I g G 3, I g G 2 aおよびI g G 2 bで低下していた(図18B)。エピートープ特異的イソタイププロフィール類は、ワクシノーゲン全体を用いて見られたプロフィールと非常に類似していた(データを示さず)。

【0121】

考察

複数B細胞エピートープ類を含有するキメラタンパク質の使用は、ワクチン開発において、全タンパク質多価ワクシノーゲン類およびペプチド結合物類に対して大きな利点を有している。防御性エピートープ配列類のみを含ませると、親分子中またはペプチド担体上の無関連エピートープ類に対する応答が間違っ誘導される可能性を低下させる。このことは、O s p Cによるのと同様に、前記組換えワクシノーゲン中で免疫優性である大きな保存ドメイン類があるが、感染時に前記菌によって提示されないならば、重要である〔実施例1; K u m a r a nら、2001; E i c k e nら、2001〕。このようなエピートープ類は、防御性免疫応答の産生に関連していない。しかし、新規タンパク質の創生には、エピートープ類を妨害するかまたはタンパク質安定性と溶解度に影響を及ぼすことができる分子間および分子内相互作用を考慮することが必要である。この実施例において、我々は、O s p Cに基づく組換え、多価キメラライム病ワクシノーゲンの研究を拡大した。原A B K Dワクチンはマウスで極めて免疫原性であり、誘発されたI g Gは、菌細胞表面で天然のO s p Cを結合し補体依存性死滅を惹起した〔実施例3〕。こうした成功にもかかわらず、前記A B K D構築体は、改良を要する2つの要因を有しており、それは、r-タンパク

10

20

30

40

50

質産生を妨害し保存安定性に影響を及ぼしうるPBS中における溶解度不良と、前記タンパク質中におけるそれぞれのエピトープ類に対するIgG力価における差異である。具体的には、前記エピトープと前記ワクチンC末端との近さに関連して、力価は減少した。本研究の目標は、ワクシノーゲン溶解度を高めること、かつ、エピトープ配置、エピトープ繰り返しおよび全体としておよびエピトープ特異的免疫応答を高めるための安定化モチーフの含有の点で異なっている改良ワクシノーゲン類を使用することであった。

【0122】

先の研究では、PBS透析後の組換えワクシノーゲンの有意な沈降が注目された〔実施例3〕。この溶解度不良はワクシノーゲン産生を限定したばかりでなくワクチン免疫原性にも影響を及ぼしたであろう。PBS透析後のABKD構築体の最大濃度は0.5mg/mLであり、はるかに小さいことが多かった。OspC結晶構造は、ヘリックス5エピトープ領域が天然OspCタンパク質類中の単体内4-ヘリカルバンドルに關与していることを示唆している〔Kumaranら、2001; Eickenら、2001〕。このことは、ワクシノーゲンタンパク質類内部およびその間で露出した疎水性ヘリカル面で相互作用があることにつながり、それが、次に沈降につながっているのかもしれない。透析緩衝液に対してArgとGluを添加することが、前記組換えワクシノーゲンタンパク質類の全ての溶解度を4乃至100倍だけ高めることがわかった(表7)。この溶解度上昇の基になったのは、ArgとGluが、ArgとGluの側鎖の脂肪族部分と相互作用することによって、露出した対立荷電の残基類および疎水性残基類の両者と相互作用するからであろう〔Golovanovら、2004〕。Arg/Glu緩衝液中で透析したABKD構築体で免疫したマウスは、PBSに対して透析したABKDワクシノーゲンで免疫したそれらよりも顕著に高い力価を有していた〔実施例3〕。Arg/Glu緩衝液は、より有効な折り畳みパターンを起こすかあるいは分子間または分子内相互作用をより低下させるかし、それによって、B細胞レセプター類に対してエピトープ類の接近を良好とするであろう。r-タンパク質へArgまたはGluが吸着されても、エピトープ認識を阻害しなかった。前記Arg/Glu緩衝液は、インビトロでプロテアーゼ類の活性に対して保護することが報告されている〔Golovanovら、2004〕。PBSまたはArg/Glu透析サンプルのいずれでもタンパク質分解性の明確な分解はないが、タンパク質分解性切断に対するインビボ保護を、排除できない。ArgおよびGluを含む緩衝液に対する透析は、有意な分子間相互作用を有する他の新規キメラタンパク質類に適用できる有用な手段であるのかも知れない。

【0123】

【表7】

表7. PBSまたはArg/Glu緩衝液に対して透析したワクシノーゲン類について可溶性タンパク質の濃度

構築体	タンパク質濃度(mgmL ⁻¹)	
	PBS	Arg/Glu 緩衝液
ABKD	0.15	3.04
ABKDppa	0.20	3.78
ABKDgg	0.22	5.99
ABKDD	0.80	4.66
ADBK	0.04	4.37
ADBKD	1.12	4.66

【0124】

免疫応答不良とC末エピトープ位置との関連は、先に、キメラ溶連菌Mタンパク質ワクシノーゲン中で報告されており、おそらく、前記C末端と関連した構造的問題によりまた

はカルボキシペプチダーゼ類によるタンパク質加水分解酵素による分解によるのかも知れない〔Daleら、1993；Daleら、1996；Daleら、1999〕。数多くの方法が、プロテアーゼ活性からペプチド類および組換えタンパク質類を保護するために提案されており、C末端のアミド化またはPEG化、前記アミノ(N)末端のアセチル化、および保護製アミノ酸モチーフの添加などが含まれる〔Brickerhoffら、1999；Powellら、1992；Leeら、2005；Alvarezら、2004；Kawarasakiら、2003；Walkerら、2003〕。アミノ酸モチーフ類は、カルボキシペプチダーゼの作用を阻害することによってタンパク質のC末端を安定化させることも報告されている；しかし、保護するそれらの能力は、数種のタンパク質でしか評価されていない。2種の安定化モチーフ類が、ABKDワクシノーゲンに対する抗体応答を増強するそれらの能力について評価されている。2個の中性、親水性Gly残基類の添加は、それぞれ疎水性および塩基性C末アミノ酸類に対して特異性を有するカルボキシペプチダーゼCおよびDの活性を低下させることができる〔Alvarezら、2004；Kawarasakiら、2003；Remingtonおよびbredam、1994〕。Pro-Pro-Alaモチーフの添加は、近接した、大きなプロリン残基類を介してのカルボキシペプチダーゼ進行を立体的に阻害できるかもしれない〔Walkerら、2003〕。

【0125】

ABKDキメラワクシノーゲンに対する抗体応答に及ぼすこれらのモチーフ類の添加のインパクトを評価するため、マウスをABKDggまたはABKDppa構築体類によって免疫した。いずれの場合も、前記血清は、無修飾ABKD構築体により免疫したものに比較して、1種以上のエピトープ類に対して小さな平均IgG力価を有していた。ABKDppa構築体は、タイプD特異的IgGの力価低下を示したが、ただし、このことは主に通常の分布から外れたものがひとつあったことに起因していた。前記ABKDgg構築体は、タイプKおよびDエピトープ類に対して力価低下を示した。IgG力価に基づき、これらのモチーフ類のいずれの使用にも全く利点がなかった。プロテアーゼ保護によるいかなる利点もArg/Glu緩衝液によって付与された類似の保護によって隠蔽された可能性もあるが、C末エピトープ類に対する力価の低下は、これらのモチーフ類が当然耐性を付与するはずのカルボキシペプチダーゼ類の作用に媒介されていないようである〔Golovanovら、2004〕。

【0126】

C末エピトープに対する免疫応答不良に関与する可能性のある構造因子を調べるため、数種の追加構築体類を新たに作製した。前記のキメラ溶連菌ワクチンにおいて、C末端でN末エピトープを反復させると、前者のC末エピトープを“保護”したが、そのメカニズムは不明である〔Daleら、1999；Daleら、2005；Huら、2002；McNeilら、2005〕。その成功に基づき、ABKDワクシノーゲンの類似変異体類を開発した。ABKDD構築体を作製し、タイプDエピトープに対する応答が第2のC末タイプDエピトープによって保護できるかどうかを評価した。前記力価低下が主にC末エピトープ位置によるのかどうかを評価するため、タイプDエピトープをN末に2番目に近い位置(ADBK)に移動させた。最後に、ADBKD構築体を用いて、反復C末エピトープによる保護を評価し、ABKDDにより、特異的免疫応答に及ぼす繰り返しエピトープの効果を評価した。ABKDDワクシノーゲンにおけるエピトープ反復は、タイプD特異的IgG力価を倍増したが、同時に、隣接するタイプKエピトープに対する力価低下を起こした。タイプDエピトープをADBK構築体中でよりN末寄りの位置に配置した時、タイプD特異的IgG力価が有意に減少した。さらに、ADBK構築体中におけるC末タイプKエピトープに対する反応性はABKD中におけるそれをしのぎ、向上した。C末タイプDエピトープ(ADBKD)を添加しても、このタイプK特異的力価は向上しなかった；しかし、それは、タイプDエピトープに対する力価の倍増というわけではないが有意な向上をもたらした。これらの結果は、タイプDエピトープのC末位置が内部位置よりも好適であること、および、追加の“保護性”C末エピトープによるC末エピトープの明白

10

20

30

40

50

な保護はないことを示唆している。このワクシノーゲン中におけるエピトープ特異的力価の一次決定因子は、C末端にそれが近接していることではなく、前記キメラタンパク質の3次構造による可能性が高い。

【0127】

ワクシノーゲン誘発Igイソタイプ類は、インビボ保護有効性に因果関係を有しているのかもしれない。前記エピトープ類またはそれらの順序を改変させることによって、イソタイププロフィールを改変し〔Tongrenら、2005〕、従って抗体エフェクター機能を改変することも可能である。エピトープ特異的イソタイププロフィールを測定するため、最も見込みのあるワクシノーゲン類(ABKD、ABKDD、ADBKD)に対する抗血清をタイプA、B、KまたはDの固定r-OspCに結合させ、この結合した抗体をイソタイプ特異的抗血清で検出した。ABKDワクシノーゲンについて先に報告しているように〔実施例3〕、有力なイソタイプはIgG1であり、前記構築体に応じてややより低いレベルのIgG2aおよびIgG2bがあり、IgMおよびIgG3は低レベルであった。前記エピトープ特異的Igイソタイププロフィールは、ABKDおよびADBKD抗血清で類似しており、IgG2aおよびIgG2bレベルがN末からC末エピトープに向かって低下しており、総IgG力価を模倣していた。前記のABKDDは、タイプK特異的総IgG力価はより低いにもかかわらず、前記エピトープ類全てで一定レベルのIgG2aおよびIgG2bを有していた。

10

【0128】

ABKDワクシノーゲンは、補体依存性殺菌性抗体類を惹起する〔実施例3〕。マウスにおいて、IgG1は補体を活性化せず〔Danglら、1988; MileticおよびFrank、1995〕、前記主要な誘発イソタイプが保護性でないかもしれないことを示唆している。OspA特異的IgG1は補体非依存性メカニズムによって殺ボレリア性であると報告されている〔Munsonら、2000〕が、ABKDワクシノーゲン誘発抗体類による菌死滅は補体依存性である〔実施例3〕。惹起されたイソタイププロフィールは、ライム病研究のための標準的動物モデルであるC3H/HeJマウスの使用により影響を受けることもある。C3H/HeJ系統マウスとBALB/c系統マウスの間の体液性免疫の差が、ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)感染時に注目されており、特に総IgGレベルにおいて、また特にIgG2aレベルにおいて注目されてきており、両者ともにC3H/HeJマウスでより高い〔Yangら、1992; Keane-MyersおよびNickell、1995〕。さらに、C3H/HeJ系統マウスはTLR-4を欠失しており、ボレリアがりポ多糖を産生しないので、このことはワクチン接種によるかまたは感染時におけるライム病防御にとって重大であるとは予測されていない〔Takayamaら、1987; Bartholdら、1990〕。

20

30

【0129】

一般的に体液性ボレリア殺菌活性が補体依存性であるので、Th1サイトカイン応答の惹起は、多くの細菌疾患でそうであるように、有効であるかもしれない(〔SpellbergおよびEdwards、2001〕でレビュー)。活発な感染時、Thサイトカイン類は、ライム病およびその続発症の発生と消散に密接に関わっている。いくつかの研究では、IL-4はボレリア殺菌抗体応答の発生に重大なサイトカインではないとしており〔Munsonら、2000; Potterら、2000; Christieら、2000; Satoskarら、2000-64〕、Th1タイプ応答が防御に関連しているかもしれないことを暗示している。さらに、IFN- γ 分泌Th1細胞がライム病関連心臓炎の消散を促進する〔Bockenstedtら、2001; Kelleherら、1998〕。それとは逆に、関節炎の重篤度と皮膚スピロヘータの量が感染時r-IL-4の投与により低下し、r-IL-4抗体投与により増加する〔Keane-MyersおよびNickell、1995; Keane-Myersら、1996〕。IFN- γ の産生は、自然感染時において慢性ライム病の発生に関連しており〔Widheら、2004〕、さらに、ライム関節炎において関節腫脹の程度にも関連している〔Grossら、1998〕。IFN- γ はまた、インビトロリンパ節培養物から誘発された殺ボレリア性の

40

50

抗OspA抗体類の産生阻害にも関連していた〔Munsonら、2002〕。ワクチン接種により誘発されたThサイトカイン環境を調べるため、マウス脾臓細胞をインビトロでワクシノーゲンにより再刺激し、Th1 (IFN- γ) およびTh2 (IL-4) サイトカイン類をELISAにより定量した。IFN- γ は、ワクシノーゲンで再刺激した細胞の上清で検出されたが、構築体に応じて濃度は異なっていた。対比的に、IL-4は、脾臓細胞上清のいずれでも検出されなかった。ABKD、ABKDppaおよびABKDD構築体類はすべて、同様のIFN- γ 濃度を有していた。ADBKDは、およそ2倍のIFN- γ 濃度を有し、ADBKははるかに高いレベルを有していた。再刺激細胞上清中IFN- γ レベルと総エトープ特異的血清IgG力価またはイソタイププロフィールには明白な相関はなかった。

10

【0130】

サイトカインおよび関連するIgイソタイププロフィール類は、免疫アジュバントの選択により変化させることができた。フロインドの完全アジュバントは、Th1サイトカイン応答と関連づけられており〔Cribbsら、2003; ShibakiおよびKatz、2002〕、IgG2aレベルを高めるかもしれない。ヒト用に現在唯一容認されているアジュバントは、ミョウバンで、それは、Th2サイトカイン類の分泌を高めることが既知である〔Cribbsら、2003; Brewerら、1999; Lindblad, 2004; PetrovskyおよびAguilari, 2004〕。ミョウバンで免疫したマウスにおいて、前記ワクシノーゲンとその成分エトープ類に対するIgG力価の予測された通りの中程度の低下が、フロインドのアジュバントと比較して注目された。さらに、IgG1に比較してIgG3、IgG2a、およびIgG2bイソタイプ類が比例して大きく減少した。このことは、このアジュバントによりTh1サイトカイン応答が低下するものと予測されたことと一致している。しかし、前記ワクシノーゲンは、補体固定の可能な抗体類を実際に惹起し続け、前記構築体に対するかなりの変化またはアジュバントの修飾が有効応答に必要なでないかもしれないことを示唆している。

20

【0131】

我々はこの実施例で、潜在的キメラ多価ライム病ワクシノーゲンに対する改変を検討したが、それらは、誘発された体液性免疫応答を最適化することを意図していた。前記構築体の免疫原性の有意な改善は、Arg/Glu緩衝液に対しての透析によりその溶解度を高めることによって、行った。このことは、タンパク質相互作用を低下させ、インビボでのエトープ露出を高くした〔Theisenら、2000〕。プロテアーゼ防御性のC末モチーフの添加あるいは“防御性”C末エトープ類の添加はいずれも、前記ワクシノーゲンに対する免疫応答を改善しなかった。エトープ類を再度並べ替えることにより、移動させたエトープに対する免疫応答が実質的に低下することになった。このワクチン構築体中の成分エトープ類に対する免疫応答の差異は、前記タンパク質のプロテアーゼ消化に対する耐性よりもむしろ、前記タンパク質の構造に主に依存しているようである。さらに、あるワクシノーゲンによって惹起されたThサイトカイン類およびIgGイソタイプ類はキメラ構築体の構造によっておよびアジュバント製剤によって改変できることについて証拠がある。本研究では、キメラワクシノーゲン類に対する次善の免疫応答の基盤およびそれらの応答を改善できる方法に関しての重要な情報をもたらす。

30

40

【実施例5】

【0132】

利用可能なOspC配列類の分析による防御性の広い多価キメラライム病ワクチンの可能性の実証

防御性の広いキメラ構築体のさらなる開発を促進するため、我々はデータベースで利用可能なOspC配列類の系統発生的分析を行った。分析したOspCのセグメントは、残基20から200 (B31MI配列のための番号付けを使用) までにわたっていた。前記データベースにおけるより短い配列はこれらの分析から除外し、ボレリア株の280種からの配列類を残し、分析に使用した。各配列のOspCタイプ命名は、アラインメント (PAM40スコアリングマトリックス) およびペア規模での同一性マトリックス分析によ

50

り決定した。先の研究と同じく、95%以上の配列同一性を示す配列類は、同じOspCタイプに属するとみなした(Attieら、2006; Wangら、1999)(図19)。配列比較物の明白な二項分布が観察され、互いに異なるOspCタイプ配列類の間での平均配列同一性は65%で、タイプ内では>97%同一であった。Wangら(1999)によって記述された21のタイプの他に、さらにクラスター17種も明らかになった。我々は、3配列未満しか含まないクラスター類にはOspCタイプ命名を割り当てなかった。新しいOspCタイプの命名に際して、我々は既存のOspCタイプ命名AからU(Wangら、1999)までを維持することを選択し、追加のタイプは各クラスター内部に含まれるプロトタイプ株に基づいて命名した。分析した配列280のうち、202はOspCタイプ類に振り分けられ、それらの全てがライム病の原因となっている種由来であった。OspCタイプに振り分けなかった配列78種は、ライム病の原因となっているスピロヘータ類(51単離物)および他のボレリア種(27種)の両者を含んでいた。各OspC配列を得た単離物の地理的および生物学的起源を、表の形式で図20に示した。ボレリア・ブルグドルフェリ(*B. burgdorferi*)単離物類の大半は北アメリカ由来であり(80%)、ヨーロッパ(16%)およびアジア(4%)由来のもの数は少なかった。ボレリア・ブルグドルフェリ(*B. burgdorferi*)OspC配列類の53%、ボレリア・アフゼリ(*B. afzelii*)OspC配列類の48%およびボレリア・ガリニイ(*B. garinii*)OspC配列類の79%は、ヒトから採取した単離物類に起源を有していた。ヒト単離物由来のボレリア・ガリニイ(*B. garinii*)OspC配列類が主に脳脊髄液(CFS)由来(68%)であり、一方、ボレリア・アフゼリ(*B. afzelii*)単離物類は主に皮膚由来(83%)であった。対比的に、ボレリア・ブルグドルフェリ(*B. burgdorferi*)由来のOspC配列類は、ヒト皮膚(51%)、血漿(30%)およびCFS(19%)から回収した単離物由来であった。これらの知見は、これらの生物が原因の疾病の公知パターンと一致し、本報告で評価したOspC配列類のサンプルが、ライム病スピロヘータ類の真の集団を表すことを示唆している。

【0133】

さらに系統発生分析を進めるため、分析した配列セットを、同一配列を排除して74にまで減らした。次に、これらの配列を並べて、ブーツストラッピング付きのPhyIip(v.3.66)系統発生パッケージを用いて分析した(n=1000)。距離は、Dayhoff PAMマトリックスを用いて20から200、20から130および131から200にわたる領域について計算し、隣接部結合によってツリーを新たに作製した。ボレリア・ヘルムシイ(*B. hermsii*)OspCオーソログ(Vmp33)配列は、外集団として作用した(Margolisら、1994)。コンセンサスツリーを、多数決原理によって作成した(グループに含めるため、カットオフを50%とした)。Dayhoff PAMモデルによる最尤法によって、このコンセンサスツリーについて距離を再計算した(図21)。

【0134】

OspCの20-200aaセグメントで作製したコンセンサスツリーは、末端節部で十分にサポートされており、決定した全てのOspCタイプ類は予想通りのクラスタリングであった。より奥深くの分枝のいくつかについてはこのブーツストラップ分析でサポートが十分ではなかったが(図21A)、前記配列での伸長同一領域類がそれらの系統発生分化をわずかにしているため、このことは予測されないことではない。OspCの20-200および20-130アミノ酸セグメントを用いて作製したコンセンサスツリーは、主に種同一性に基づき類似の系統発生クラスタリングを示した(図21A, 21B)。しかし、アミノ酸類131-200を用いて作製したコンセンサスツリー(図21C)は、ブーツストラップ分析でのサポートが十分でなく有意に異なるクラスタリングパターンをもたらした。この観察は、ospC遺伝子の短いセグメント間での組換えが、異なるOspCタイプ類の株で起こったという仮説と一致している。OspCタイプ類の間でのOspCの短いセグメントの組換えの証拠は、具体的配列で見ることができる。例えば、ボレ

リア・アフゼリ (B. afzeli) O s p Cタイプ P L j 7の配列は、P k iクラスターを形成するボレリア・ガリニイ (B. garini) O s p C配列で見られたものと同じ領域を、アミノ酸20 - 130ドメイン内部に有している。P L j 7の131 - 200領域では、超可変ループ5およびループ6領域が、ボレリア・ブルグドルフェリ (B. burgdorferi) O s p Cタイプ類のそれぞれFおよびMに見られるものと同じモチーフ類を有している。組換えについての上記以外の証拠は、S i m p l o t (v . 3 . 5 . 1)を用いたブーツスキニングから生じていた (L o l e r , 1999)。ブーツスキニングにおいて、潜在的組換えを、スライディングウィンドウ (ベースウィンドウ40、ベースステップインターバル10)内部の配列セグメントの系統発生ツリーを作製する (K i m u r aモデル、T s / T v比 = 2 . 0、隣接部結合) ことによって評価する。ツリーをブーツストラップさせ (n = 100)、そのウィンドウ内部での配列分類をサポートする順序変更ずみのツリーの数と報告する。組換えの証拠は、通常は、順序変更ずみのツリーの > 70%が一つのウィンドウ内部に配列をまとめてクラスタリングするとき根拠ありとみなす。上記タイプにおいて (図22) もそれ以外の多数のO s p Cタイプ類 (データを示さず) においても、組換え可能性の証拠が見出された。

10

【0135】

O s p C可変性が超変異によるよりはむしろ既存のO s p Cタイプ類相間での交換によって起こることの証拠は、防御性の広いワクシノーゲンに取り入れるために必要なO s p Cタイプ特異的エピトープ類の絶対数に限りがあることの証拠である。現在マッピングされている線状エピトープ類は全てO s p CのC末領域 (aa 131 - 200) 内に含まれるので、キメラワクシノーゲンに必要なエピトープ類の理論数を明確にすることが可能である。この領域を前記の74種の代表的配列類中で調べることによって、独自のエピトープ含有領域の数を、同一であるかまたはアミノ酸1つだけの変化を含む配列の排除により、34に減らすことができる (図22)。いくつかのエピトープ類は2種以上のO s p Cタイプに対して防御を伝達できるかもしれないので、この数はさらにエピトープマッピングによって限定することができる。必要エピトープ数をさらに少なくすることは、ヒト疾患、さらに具体的には侵襲性ヒト疾患に関連したO s p Cタイプ類のみを考慮することによってもできるであろう (実施例1参照)。O s p Cエピトープ類サブセットに対するワクチン接種の理論的問題は、前記ワクシノーゲンに含まれないタイプに対する選択を誘導する潜在的可能性で、それらの稀な対立遺伝子類を保有する群の分画を増大させることになることである。しかし、ヒトは偶然の宿主であるに過ぎないので、ワクチン接種がダニベクターまたは哺乳類保菌者中において特異的O s p Cタイプ類を発現する株の群分布を有意に変える可能性はないであろう。

20

30

【0136】

要約すると、広範囲にわたるO s p Cデータベースの性質のために徹底した分析が実施でき、新規O s p Cタイプを明確にしかつそれらの単離頻度とヒト疾患との関連に関する情報を提供できた。上記データは、防御性の広いキメラワクシノーゲンに取り込ませるために必要なO s p Cエピトープ含有配列の数が限定されていることおよびキメラワクシノーゲンの開発が可能であることを示唆している。

40

【実施例6】

【0137】

8価のキメラの構築

8価の構築体E N I C A B K Dを下記に示し、この構築体のいくつかの性質を、P R O T P A R A Mプログラムによって計算し示した。“L #”と命名したセグメントは、リンカー配列である。“R S”は、前記構築体作製に使用した制限部位の位置を示している。

【0138】

【化 1】

```

<----TAG---->RS<-----Type E-----
1  AHHHHHHVDDDDKIITGLKSEHAVLGLDNLITDDNAQRAILKXHANKDKGAAELEKLPKAVE

-----<L9>-----Type N-----<L
61  NLSKAAQDTLKNAPGVGATTDEEAKKAILRTNAIKDKGADELEKLPKSVESLAKAAQDAT

6><-----Type I-----><L7><-----
121  QMLKTNNDKTKGADELEKLPESVKNLSKAAKEMLTNSVKELTSTEPSEFTKCLKKHTD

-----Type C-----><L8RS<-----Type A-----<
181  LGKDATDVHAKBAILKTNGTKDKGAABLEKLPESGEDVSETFTNKLKEKHTDLGKEGSM

L1><-----Type B-----><L2><-----
241  GMLKANAAGKDKGVEELEKLSGSLESLSKAAKEMLANSVKELTSTNGNLIITDAAKDKGAA

-----Type K-----><L3><-----Type D-----
301  ELEKLPKAVENLAKAAKEMLANSVKELTSSMSVLKTHNAKDKGAEEVLKLSVAGLLKA

----->
361  AQAILANSVKELTSPVVAESP KKP (SEQ ID NO: 249)

```

10

20

アミノ酸の数：384
分子量：41263.7
理論的等電点：6.52

【0139】

アミノ酸組成：

Ala (A)	51	13.3%
Arg (R)	2	0.5%
Asn (N)	20	5.2%
Asp (D)	25	6.5%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	5	1.3%
Glu (E)	42	10.9%
Gly (G)	21	5.5%
His (H)	12	3.1%
Ile (I)	7	1.8%
Leu (L)	46	12.0%
Lys (K)	62	16.1%
Met (M)	7	1.8%
Phe (F)	7	1.8%
Pro (P)	5	1.3%
Ser (S)	27	7.0%
Thr (T)	26	6.8%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	19	4.9%

30

40

陰電荷残基類 (Asp + Glu) の総数：67

陽電荷残基類 (Arg + Lys) の総数：64

原子組成：

炭素 C 1787

50

水素 H 2 9 8 3
窒素 N 5 0 1
酸素 O 5 9 7
イオウ S 7

式：C 1 7 8 7 H 2 9 8 3 N 5 0 1 O 5 9 7 S 7

総原子数：5 8 7 5

推定半減期：

検討した配列のN末端は、A (A l a) である。

推定半減期：4 . 4 時間 (インビトロでの哺乳類赤血球) 。

> 2 0 時間 (インビボでの酵母) 。

> 1 0 時間 (インビボでの大腸菌) 。

不安定性係数：

不安定性係数 (I I) はコンピュータ計算で1 2 . 5 8 である。

このことは、前記タンパク質を安定として分類する。

脂肪族係数：8 1 . 4 6

ヒドロパティのグランドアベレッジ (G R A V Y) : - 0 . 6 6 8

【 0 1 4 0 】

試験哺乳類に投与すると、このキメラタンパク質構築体は、顕著な免疫応答を惹起することが判明し、ライム病発生から保護する。

【 0 1 4 1 】

本発明をその好適な態様の観点から記載してきたが、当業者は本発明が付属の請求の範囲の真意と範囲内で変更し実行できることを理解するであろう。したがって、本発明は、上記に述べたような態様類に限定されず、本文に示した明細書の真意と範囲内の全ての変更とその均等物も含むべきである。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 4 2 】

ヒトライム病の予防用ワクチンおよび診断薬に対する永年にわたる需要を満たすことができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 3 】

【 図 1 】メリーランド州ヒト患者由来の O s p C 配列類の進化上の関連：O s p C タイプ識別。O s p C 遺伝子類を P C R 増幅し、配列決定し、系統発生図を構築した。前記の o s p C タイプ類 2 2 種を示すデータベース配列を前記分析に含めた (アクセス番号を示している) 。各系統発生群に付与したタイプ命名 (大文字) は、各分枝上の大文字で示した。群識別に重要な各分節上に、ブーツストラップ値 (1 0 0 0 回試行) を示した。

【 図 2 】感染中における O s p C に対する抗体応答は、主に O s p C タイプ特異的であることを示す。数種の O s p C タイプ類の組換え O s p C タンパク質類 (図に示した) が産生され、S D S - P A G E によって分離し、イムノプロットし、H R P 結合 S タンパク質または示したような公知の O s p C タイプのクローン単離物に感染したマウスから採取した血清によりスクリーニングした。

【 図 3 】タイプ A O s p C の免疫優性エピトープ類の局在。タイプ A O s p C を短く切断したものを、S - T a g 融合たんぱく質類として産生させ、大腸菌 (E . c o l i) 中で発現させた。パネル A は、O s p C 切断物を図示している。番号は、ボレリア・ブルグドルフェリ (B . b u r g d o r f e r i) B 3 1 M I O s p C の残基番号を反映している。パネル A において、各切断タンパク質の感染抗体を結合する能力は、(+) または (-) により右側に示されている。左の番号は、各切断物を含むアミノ酸残基を示唆している。パネル B と C において、前記組換えタンパク質類のイムノプロット物は、H R P 結合 S タンパク質によりスクリーニングし、発現と負荷を確認し、または、タイプ A O s p C 産生株であるボレリア・ブルグドルフェリ (B . b u r g d o r f e r i) B 3 1 M I 感染マウス由来血清 (- B 3 1 M I 感染血清) でスクリーニングした。参考として

10

20

30

40

50

、パネル b および c における矢印は、 - B 3 1 M I 感染血清に免疫反応しなかった組み換え体の移動位置を示している。分子量マーカーは、各イムノプロットの右側に示している。

【図 4】ループ 5 およびアルファ 5 エピトープ類のセグメント類のタイプ間およびタイプ内レベルでの比較分析を表の形式で示した。

【図 5】タイプ A O s p C を産生する異なる株類に感染した複数動物類におけるループ 5 抗体応答の明示。1) 全長タイプ A O s p C または 2) アミノ酸 1 3 0 - 1 5 0 (ループ 5 を含む) を含有する断片のいずれかのイムノプロットを、感染血清でスクリーニングした。感染血清を生じさせるために用いた株と血清を採取した具体的マウス (m) は、各パネルの上に示した。血清を採取した感染時の時点も、同様に示した。それぞれについて等量のタンパク質をイムノプロットし、時間的に同じだけフィルムに露出させた。

【図 6】E L I S A 類：タイプ A O s p C 標的抗体を保有する血清サンプルの同定。r - タイプ A 全長 O s p C、r - タイプ A ループ 5、およびウシ血清アルブミンを用いて、E L I S A プレートのウェルを被覆した。このウェルをヒトライム病患者の血清でスクリーニングした。全てのアッセイは 3 重に行い、その平均を、標準偏差とともに示した。方法は全て、本文に記載した通りである。ボレリア・ブルグドルフェリ (B . b u r g d o r f e r i) B 3 1 M I に対する抗体に対して I g G 陰性と決定した患者 1 5 由来の血清は、陰性対照として使用した。

【図 7 A】タイプ A O s p C ループ 5 エピトープ類を含む特定残基類の P e p S p o t 分析による同定。ループ 5 ドメインにまたがる重複ペプチド類を産生させ、ニトロセルロースにスポットした。次に、タイプ A O s p C 産生株 (B 3 1 M I) のクローン群に感染させたマウス由来血清またはヒトライム病患者由来血清でスクリーニングした (示した通り)。ループ 5 ドメインのイムノプロット結果。

【図 7 B】タイプ A O s p C ループ 5 エピトープ類を含む特定残基類の P e p S p o t 分析による同定。ループ 5 ドメインにまたがる重複ペプチド類を産生させ、ニトロセルロースにスポットした。次に、タイプ A O s p C 産生株 (B 3 1 M I) のクローン群に感染させたマウス由来血清またはヒトライム病患者由来血清でスクリーニングした (示した通り)。ペプチド配列類。

【図 8】ループ 5 が表面露出され、ループ 5 に対する抗体が殺菌性であることを示す。I F A s および殺菌アッセイは、タイプ A ループ 5 に対して作製した抗血清で行った。(A) 結果は、抗ループ 5 抗血清の特異性を示している。ボレリア・ブルグドルフェリ (B . b u r g d o r f e r i) B 3 1 M I、ボレリア・パルケリ (B . p a r k e r i)、および r - タイプ A ループ 5 断片の全細胞溶解物類をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、イムノプロットし、抗タイプ A ループ 5 抗血清 (1 : 1, 0 0 0) でスクリーニングした。タンパク質マーカー類の分子量は、図右側に示した。

【図 9 A】4 価のキメラ O s p C 試験構築体の作製。4 価の A B K D キメラワクシノーゲン構築体の作製についてのフローチャートをパネル A に示した。A B K D キメラワクシノーゲンで使用したタイプ特異的 O s p C エピトープ類は、棒グラフの濃淡を変えて示した。O s p C タイプ A のループ 5 エピトープとタイプ B、K および D のアルファヘリックス 5 エピトープは、第 1 回 P C R で増幅させ、ゲルで精製した。これらの最初の増幅物類をそれ以後の回の P C R で結合させ、全長キメラ構築体を作製した。前記増幅物類の末端 (リンカー配列類) は相補性であるので、変性させた後、それらをアニーリングし重複伸長させ、その後 P C R 増幅を行うことができる。最終増幅物を p E T 4 6 E k / L I C ベクターにアニーリングした。

【図 9 B】4 価のキメラ O s p C 試験構築体の作製。パネル B において、A B K D キメラワクシノーゲン構築体の最終タンパク質配列を、構成エピトープ含有領域類および示したリンカー配列とともに示した。

【図 1 0】抗 A B K D 抗血清の A B K D キメラワクシノーゲンと全長 O s p C との免疫反応性を示したウェスタンプロット。免疫原性は、A B K D キメラワクシノーゲン、タイプ

10

20

30

40

50

A、B、KおよびD（示した）の全長 r - O s p C タンパク質類および r B B N 3 9（陰性対照）をイムノプロットして評価した。このプロットを、抗 H i s t a g m A b でスクリーニングして、およそ等しい負荷を明らかにし、あるいは、代表的抗 A B K D 抗血清でスクリーニングした（下記に示した）。分子量は、右側に示した。A、BおよびK（しかしDではない）に対する強い I g G 応答が観察された。

【図 1 1 A】A B K D キメラワクシノーゲンにより免疫したマウス由来の血清の反応性についての E L I S A 力価検定。A B K D キメラワクシノーゲンをワクチン接種したマウス（n = 1 2）または P B S / アジュバント（n = 3）で免疫した偽動物由来の血清の、A B K D キメラワクシノーゲンまたはタイプ A、B、K および D の r O s p C タンパク質との反応性を調べた。パネル A は、A B K D キメラワクシノーゲン構築体に対する全ての血清の免疫反応性の力価を示している（実線では、各マウスで違う記号を用いた）。偽ワクチン接種マウスでは、A b 応答は全く観察されなかった（ダッシュを付けた線）。

【図 1 1 B】A B K D キメラワクシノーゲンにより免疫したマウス由来の血清の反応性についての E L I S A 力価検定。各 O s p C タイプの特異的応答の力価検定を同様に完了し（曲線を示さず）、1 / 2 マックス O D _{4 0 5} で求めた力価を、パネル B に示した（各マウスについて 1 点、平均力価で水平線）。対照マウスは、力価を有しておらず、したがってプロットしなかった。

【図 1 2】抗 A B K D 抗血清のイムノグロブリンイソタイププロフィール。E L I S A ウェルを A B K D キメラワクシノーゲン構築体で被覆し（1 0 0 n g / ウェル）、抗 A B K D 抗血清で二重にプローブした（1 : 1 0 0 0 0 ; n = 1 2）。結合した I g をビオチン

化イソタイプ特異的二次 A b（マウスイソタイプングキット；Z y m e d L a b o r a t o r i e s）と H R P 結合ストレプトアビジンで検出した。反応性は、A B T S 基質の H R P 媒介変換によって生じた着色産物を測定することで、定量した。

【図 1 3 A】A B K D ワクチン変異体類の構築を概略図示した。A B K D p p a（パネル A）は、5´オーバーハングを有する逆プライマーを用いて元来の構築体を増幅させ、C 末端アミノ酸類を付加した。A B K D g g（示さず）は、同様の方法で作製したが、ただし、O C D H 5 g g L I C プライマーを用いて行った。A B K D D（パネル B）、A D B K（パネル C）および A D B K D（パネル D）は、全て、リンカー配列類をコードするテイルを付加するプライマー類を用いて構成要素配列類を P C R 増幅することによって、作製した。結果として生じた P C R 産物類をゲル精製し、重複アニーリングと伸長によって結合させた。最終産物類は、p E T - 4 6 E k / L I C ベクター中にクローニングした。O s p C タイプ特異的エピトープを含む領域を文字で示し、リンカー配列類は数で示した（コードされたアミノ酸配列類については、差込を参照）。矢印は、プライマー類を示し、5´オーバーハングした L I C テイルすなわちリンカー配列類は、各プライマー矢印のテイルに示した。

【図 1 3 B】A B K D ワクチン変異体類の構築を概略図示した。A B K D p p a（パネル A）は、5´オーバーハングを有する逆プライマーを用いて元来の構築体を増幅させ、C 末端アミノ酸類を付加した。A B K D g g（示さず）は、同様の方法で作製したが、ただし、O C D H 5 g g L I C プライマーを用いて行った。A B K D D（パネル B）、A D B K（パネル C）および A D B K D（パネル D）は、全て、リンカー配列類をコードするテイルを付加するプライマー類を用いて構成要素配列類を P C R 増幅することによって、作製した。結果として生じた P C R 産物類をゲル精製し、重複アニーリングと伸長によって結合させた。最終産物類は、p E T - 4 6 E k / L I C ベクター中にクローニングした。O s p C タイプ特異的エピトープを含む領域を文字で示し、リンカー配列類は数で示した（コードされたアミノ酸配列類については、差込を参照）。矢印は、プライマー類を示し、5´オーバーハングした L I C テイルすなわちリンカー配列類は、各プライマー矢印のテイルに示した。

【図 1 3 C】A B K D ワクチン変異体類の構築を概略図示した。A B K D p p a（パネル A）は、5´オーバーハングを有する逆プライマーを用いて元来の構築体を増幅させ、C 末端アミノ酸類を付加した。A B K D g g（示さず）は、同様の方法で作製したが、ただ

10

20

30

40

50

し、O C D H 5 g g L I C プライマーを用いて行った。A B K D D (パネルB)、A D B K (パネルC) および A D B K D (パネルD) は、全て、リンカー配列類をコードするテイルを付加するプライマー類を用いて構成要素配列類をPCR増幅することによって、作製した。結果として生じたPCR産物類をゲル精製し、重複アニーリングと伸長によって結合させた。最終産物類は、p E T - 4 6 E k / L I C ベクター中にクローニングした。O s p C タイプ特異的エピトープを含む領域を文字で示し、リンカー配列類は数で示した(コードされたアミノ酸配列類については、差込を参照)。矢印は、プライマー類を示し、5'オーバーハングしたL I C テイルすなわちリンカー配列類は、各プライマー矢印のテイルに示した。

【図13D】A B K D ワクチン変異体類の構築を概略図示した。A B K D p p a (パネルA) は、5'オーバーハングを有する逆プライマーを用いて元来の構築体を増幅させ、C末端アミノ酸類を付加した。A B K D g g (示さず) は、同様の方法で作製したが、ただし、O C D H 5 g g L I C プライマーを用いて行った。A B K D D (パネルB)、A D B K (パネルC) および A D B K D (パネルD) は、全て、リンカー配列類をコードするテイルを付加するプライマー類を用いて構成要素配列類をPCR増幅することによって、作製した。結果として生じたPCR産物類をゲル精製し、重複アニーリングと伸長によって結合させた。最終産物類は、p E T - 4 6 E k / L I C ベクター中にクローニングした。O s p C タイプ特異的エピトープを含む領域を文字で示し、リンカー配列類は数で示した(コードされたアミノ酸配列類については、差込を参照)。矢印は、プライマー類を示し、5'オーバーハングしたL I C テイルすなわちリンカー配列類は、各プライマー矢印のテイルに示した。

【図13E】A B K D ワクチン変異体類の構築を概略図示した。A B K D p p a (パネルA) は、5'オーバーハングを有する逆プライマーを用いて元来の構築体を増幅させ、C末端アミノ酸類を付加した。A B K D g g (示さず) は、同様の方法で作製したが、ただし、O C D H 5 g g L I C プライマーを用いて行った。A B K D D (パネルB)、A D B K (パネルC) および A D B K D (パネルD) は、全て、リンカー配列類をコードするテイルを付加するプライマー類を用いて構成要素配列類をPCR増幅することによって、作製した。結果として生じたPCR産物類をゲル精製し、重複アニーリングと伸長によって結合させた。最終産物類は、p E T - 4 6 E k / L I C ベクター中にクローニングした。O s p C タイプ特異的エピトープを含む領域を文字で示し、リンカー配列類は数で示した(コードされたアミノ酸配列類については、差込を参照)。矢印は、プライマー類を示し、5'オーバーハングしたL I C テイルすなわちリンカー配列類は、各プライマー矢印のテイルに示した。

【図14】キメラワクシノーゲン試験構築体類のクーマシー着色SDS-PAGEゲル。ワクシノーゲンr-タンパク質類が、大腸菌(E. coli)中で発現し、ニッケルクロマトグラフィでアフィニティ精製し、BCA法で定量した。精製したタンパク質類2μgを、15%SDS-PAGEゲル(Criterion; Biorad)で電気泳動し、クーマシーG-250で着色した。夾雑タンパク質は全く観察されず、組換えタンパク質類の分解は最小かまたは全くなかった。

【図15A】全長r-O s p Cのマウスワクチン血清認識の評価。パネルAにおいて、タイプA、B、KおよびDのr-O s p Cを電気泳動し、PVDFにプロットし(タイプは、上部に示した; 500ng/レーン)、変異体構築物類のそれぞれをワクチン接種したマウス由来の代表的血清の1:2500希釈物でプローブした(左に示した)。二次検出は、パーオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(1:40000)と化学発光により行った。分子量を右側に示した。パネルBにおいて、全長r-O s p Cとのマウスワクチン血清反応性の定量的ELISA力価検定の結果を示した。各ワクチン構築物に対して生じた血清(下部に記載)を、タイプA、B、KおよびDの固定した全長r-O s p Cに対して力価検定した。また、PBSに対して透析したA B K D構築体(A B K D*)の力価も含めた[17]。棒グラフは、O s p Cタイプ類A(黒)、B(灰色)、K(白)およびD(ハッチ付け線)に対する平均力価を示している。それぞれのマウス由来の力価は、白の

10

20

30

40

50

三角で図示している。平均力価数値ならびにPBSに対して透析したABKD構築体(ABKD*)またはArg/Glu緩衝液に対して透析したABKD構築体(ABKD)の対応する力価に対して割り出した力価を、下部に示した。

【図15B】全長r-OspCのマウスワクチン血清認識の評価。パネルAにおいて、タイプA、B、KおよびDのr-OspCを電気泳動し、PVDFにプロットし(タイプは、上部に示した; 500ng/レーン)、変異体構築物類のそれぞれをワクチン接種したマウス由来の代表的血清の1:2500希釈物でプローブした(左に示した)。二次検出は、パーオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(1:40000)と化学発光により行った。分子量を右側に示した。パネルBにおいて、全長r-OspCとのマウスワクチン血清反応性の定量的ELISA力価検定の結果を示した。各ワクチン構築物に対して生じた血清(下部に記載)を、タイプA、B、KおよびDの固定した全長r-OspCに対して力価検定した。また、PBSに対して透析したABKD構築体(ABKD*)の力価も含めた〔17〕。棒グラフは、OspCタイプ類A(黒)、B(灰色)、K(白)およびD(ハッチ付け線)に対する平均力価を示している。それぞれのマウス由来の力価は、白の三角で図示している。平均力価数値ならびにPBSに対して透析したABKD構築体(ABKD*)またはArg/Glu緩衝液に対して透析したABKD構築体(ABKD)の対応する力価に対して割り出した力価を、下部に示した。

10

【図16A】3種のワクチン構築物類に対するエピトープ特異的イソタイプ応答。OspCタイプ類A、B、KおよびDをELISAプレート上に固定し、ABKD、ABKDDまたはADBKD構築物類でワクチンしたマウス由来の免疫血清で二重にプローブした。結合Igイソタイプは、ビオチン化イソタイプ特異的二次抗体類およびパーオキシダーゼ結合ストレプトアビジンにより検出した。

20

【図16B】3種のワクチン構築物類に対するエピトープ特異的イソタイプ応答。OspCタイプ類A、B、KおよびDをELISAプレート上に固定し、ABKD、ABKDDまたはADBKD構築物類でワクチンしたマウス由来の免疫血清で二重にプローブした。結合Igイソタイプは、ビオチン化イソタイプ特異的二次抗体類およびパーオキシダーゼ結合ストレプトアビジンにより検出した。

【図16C】3種のワクチン構築物類に対するエピトープ特異的イソタイプ応答。OspCタイプ類A、B、KおよびDをELISAプレート上に固定し、ABKD、ABKDDまたはADBKD構築物類でワクチンしたマウス由来の免疫血清で二重にプローブした。結合Igイソタイプは、ビオチン化イソタイプ特異的二次抗体類およびパーオキシダーゼ結合ストレプトアビジンにより検出した。

30

【図17】免疫マウス由来脾臓細胞の免疫性抗原によるインビトロ再刺激に対するIFN- γ 応答。前記6種のワクチン構築物類のそれぞれで免疫した3匹のマウスから赤血球を含まない脾臓細胞を採取し、プールし、元来の免疫性抗原で3重に再刺激した(24ウェルプレート中 10^7 細胞 mL^{-1} 、抗原は10または $5\mu g mL^{-1}$)。3重対照ウェルには、 $10mg mL^{-1}$ BSAを入れるかまたはタンパク質は全く入れなかった。96時間インキュベーション(37 $^{\circ}C$ 、5%CO $_2$)した後、細胞非含有上清を採取し、ELISAによりIFN- γ 濃度を求めた。全ての場合において、BSAおよびタンパク質を含まないウェル中におけるIFN- γ 濃度は、本アッセイの検出限界を下回っていた。

40

【図18A】フロインドアジュバントまたはアルミニウム中に入れたABKDワクシノーゲンに対する抗体応答の評価。フロインドアジュバントに懸濁したか(実線棒グラフ)またはアルミニウムに吸着させた(ハッチ付け棒グラフ)ABKDワクチンに対して生じたマウス血清中のIgGを定量的にELISAで検定した結果を示している。血清は、固定ABKDワクシノーゲンまたはタイプA、B、KおよびDの全長r-OspCに対して力価検定した。

【図18B】フロインドアジュバントまたはアルミニウム中に入れたABKDワクシノーゲンに対する抗体応答の評価。固定ABKDワクシノーゲンに結合した血清のイソタイププロフィールを示した。結合したIgイソタイプは、ビオチン化イソタイプ特異的二次抗体類およびパーオキシダーゼ結合ストレプトアビジンにより検出した。

50

【図19】OspCタンパク質配列同一性のペア規模での比較分布。ボレリア単離物280個由来のOspCタンパク質配列類を、PAM40スコアリングマトリックスを用いてクラスタル(Clustal)アラインメントを行い、ペア規模での同一性百分率を計算した。ヒストグラム間隔は1%であり、50%未満の百分率の同一性はなかった。

【図20】振り分けたOspCタイプ類の種、地理的および生物学的単離データ。

【図21A】代表的OspCタンパク質配列類のコンセンサス系統発生ツリー。OspC配列類にはアミノ酸類20-200(A)、20-130(B)および131-200(C)を含め、ブーツストラップ(n=1000)し、距離を計算し、隣接する結合ツリーを作成し、コンセンサスツリーに調和させた。ボレリア・ヘルムシイ(B. hermsii)のVmp33配列を、外集団として用いた。ラベルは、ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)(Bb)、ボレリア・ガリニイ(B. garinii)(Bg)またはボレリア・アフゼリ(B. afzelii)(Ba)としての種を示し、単離株命名、振り分けたOspCタイプ(太字)、およびこの単一配列によって表される他の株類由来の同一OspC配列類の数(括弧内)を示している。ブーツストラップによるサポートは、OspCタイプ類間を差別化する全ての分節で示している。

10

【図21B】代表的OspCタンパク質配列類のコンセンサス系統発生ツリー。OspC配列類にはアミノ酸類20-200(A)、20-130(B)および131-200(C)を含め、ブーツストラップ(n=1000)し、距離を計算し、隣接する結合ツリーを作成し、コンセンサスツリーに調和させた。ボレリア・ヘルムシイ(B. hermsii)のVmp33配列を、外集団として用いた。ラベルは、ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)(Bb)、ボレリア・ガリニイ(B. garinii)(Bg)またはボレリア・アフゼリ(B. afzelii)(Ba)としての種を示し、単離株命名、振り分けたOspCタイプ(太字)、およびこの単一配列によって表される他の株類由来の同一OspC配列類の数(括弧内)を示している。ブーツストラップによるサポートは、OspCタイプ類間を差別化する全ての分節で示している。

20

【図21C】代表的OspCタンパク質配列類のコンセンサス系統発生ツリー。OspC配列類にはアミノ酸類20-200(A)、20-130(B)および131-200(C)を含め、ブーツストラップ(n=1000)し、距離を計算し、隣接する結合ツリーを作成し、コンセンサスツリーに調和させた。ボレリア・ヘルムシイ(B. hermsii)のVmp33配列を、外集団として用いた。ラベルは、ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)(Bb)、ボレリア・ガリニイ(B. garinii)(Bg)またはボレリア・アフゼリ(B. afzelii)(Ba)としての種を示し、単離株命名、振り分けたOspCタイプ(太字)、およびこの単一配列によって表される他の株類由来の同一OspC配列類の数(括弧内)を示している。ブーツストラップによるサポートは、OspCタイプ類間を差別化する全ての分節で示している。

30

【図22】OspCタイプ類Pki(ボレリア・ガリニイ(B. garinii); 黒実線)、F(ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi); 灰色実線)、およびM(ボレリア・ブルグドルフェリ(B. burgdorferi); ダッシュ付け黒線)と比較したOspCタイプPLj7(ボレリア・アフゼリ(B. afzelii))ospC配列のブーツキャン分析。ブーツキャンウィンドウは塩基40個とし、塩基10個ずつの段階とした。比較は、100個のブーツストラップ複製物類による絶対コンセンサスにより行った。グラフは、順序を入れ替えたツリーの百分率が50%を超えるピークのみを示して簡略化し、組換え可能を示すと考えられる70%レベルを示した。

40

【図23】本研究で明示した全てのOspCタイプ類由来のOspCタンパク質配列類のエピトープ含有領域のアラインメント。1個を超えるアミノ酸が異なるOspCタイプ類内部の全配列を、代表的配列によって示した。濃淡付けのための同一性閾値は、80%である。二次構造アルファヘリックス類およびループ類(B31構造に対応)は、このアラインメントの下に示した(Kumaranら、2001)。

【図24】ABKDキメラワクシノーゲンの構築に用いた親OspC配列類のクラスタルXアラインメントおよびこのワクシノーゲンに含まれるエピトープ含有領域類の物理的局

50

在。O s p CタイプA（ループ5領域、明るい灰色四角）およびタイプB、KおよびD（アルファヘリックス5領域）黒灰色四角）のエピトープ含有領域の位置を、親配列類のクラスタルXアラインメント内部で目立たせた。

【図25A】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25B】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25C】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25D】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25E】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25F】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25G】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25H】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25I】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図25J】本発明の例示的キメラワクシノーゲン類。構築体タイトルは、この構築体に取り込んだO s p Cタイプ特異的ループ5およびヘリックス5エピトープ類とならびにそれらの順序を示唆している。太字のXは、任意のリンカー配列類位置を示している。

【図26】ボレリア数株由来のO s p Cのタンパク質およびDNAアクセス番号。

【符号の説明】

【0144】

（各図中の用語の対応訳）

[図2]

HRP-S-Protein	H R P - S タンパク質
2 wks	第2週
8 wks	第8週
6 wks	第6週

[図3B][図3C]

HRP-S-Protein	H R P - S タンパク質
?-B31M1 infection serum	? - B 3 1 M I 感染血清

[図4A][図4B]

Loop 5 epitope	ループ5エピトープ
Alpha 5 epitope(s)	アルファ5エピトープ(類)

10

20

30

40

50

OspC type	O s p C タイプ	
Sequences aa136-150	配列類 a a 1 3 6 - 1 5 0	
# of sequences	配列類の #	
SEQ ID NO	配列番号	
[図 5]		
Full length	全長	
Loop 5	ループ 5	
wk 4	(第 4 週)	
wk 6	(第 6 週)	10
wk 8	(第 8 週)	
[図 6]		
Patient Serum Number	患者血清番号	
[図 7 A]		
Mouse- -B31MI infection serum		
#1	マウス B 3 1 M I 感染血清 # 1	
Human early serum #8	ヒト初期血清 # 8	20
[図 8]		
r-type loop 5	r - タイプ A ループ 5	
B. parkeri	ボレリア・パルケリ	
B. burgdorferi	ボレリア・ブルグドルフェリ	
[図 9 A]		
Plasmid	プラスミド	
Template	テンプレート	
Primers	プライマー類	
Product	生成物	30
round 1	第 1 回	
round 2	第 2 回	
round 3	第 3 回	
round 4	第 4 回	
Type A loop 5 (19aa)	タイプ A ループ 5 (1 9 a a)	
link	リンク 1	
Type B helix 5 (42aa)	タイプ B ヘリックス 5 (4 2 a a)	
Type K helix 5 (41aa)	タイプ K ヘリックス 5 (4 1 a a)	40
[図 9 B]		
HIS tag/EI site	H I S t a g / E I 部位	
[図 1 0]		
rBBn39 (control)	r B B n 3 9 (対 照)	
ABKD chimeric	A B K D キメラ	
Mouse-anti-His tag mAb	マウス抗 H i s t a g m A b	
Mouse 3A 6wk serum	マウス 3 A 第 6 週血清	
Mouse 6B 6wk serum	マウス 6 B 第 6 週血清	50

[図 1 1 A]			
1/Dilution	1 / 希釈度		
[図 1 1 B]			
Log(titer)	対数 (力価)		
ABKD chimeric	A B K D キメラ		
Coating antigen	塗布抗原		
[図 1 2]			10
OD405 (mean ± SD)	OD 4 0 5 (平均 ± S D)		
Antibody Isotype	抗体イソタイプ		
[図 1 3 E]			
Type A Loop 5	タイプ A ループ 5		
Type B Helix 5	タイプ B ヘリックス 5		
Type K Helix 5	タイプ K ヘリックス 5		
Type D Helix 5	タイプ D ヘリックス 5		
[図 1 5 B]			20
Titer	力価		
vs ABKD *	対 A B K D *		
vs ABKD	対 A B K D		
[図 1 7]			
Vaccine	ワクチン		
[図 1 8 A]			
Antigen	抗原		
Titer (mean ± SEM)	力価 (平均 ± S E M)		30
[図 1 8 B]			
Isotype	イソタイプ		
OD (4 0 5) (mean ± SD)	OD (4 0 5) (平均 ± S D)		
[図 1 9]			
Sequence Identity (%)	配列同一性 (%)		
Pairwise Comparisons (% of total)	対規模の比較 (総計に対する%)		
[図 2 0 A]			40
OspC Type	O s p C タイプ		
Borrelia species	ボレリア種		
Assigned	振り分け		
B. burgdorferi	ボレリア・ブルグドルフェリ		
B. garinii	ボレリア・ガリニイ		
B. afzlii	ボレリア・アフゼリ		
other species	他の種		
Unassigned	非振り分け		
Totals	総計		
* For letter-assigned OspC types, an			50

example strain is given in parentheses.

* 文字命名 O s p C タイプについて、例示株を括弧に示した

。	
B. bissettii	ボレリア・ビセチイ
B. japonica	ボレリア・ジャボニカ
B. andersonii	ボレリア・アンデルソニイ
B. tanukii	ボレリア・タヌキイ
B. valaisiana	ボレリア・バライシアナ
B. species	ボレリア種

10

[図 2 0 B]

Geographic Region	地理領域
OspC Type	O s p C タイプ
North America	北アメリカ
Europe	ヨーロッパ
Russia	ロシア
Asia	アジア
Not provided	提供ナシ
Assigned	振り分け
Unassigned	非振り分け
Totals	総計

20

* For letter-assigned OspC types, an example strain is given in parentheses.

* 文字命名 O s p C タイプについて、例示株を括弧に示した

。

[図 2 0 C]

OspC Type	O s p C タイプ
Isolated from	単離起源
Human Skin	ヒト皮膚
Human Blood	ヒト血液
Human CSF	ヒト C S F
Other animal	他の動物
Tick	ダニ
Not provided	提供されず
Assigned	振り分け
Unassigned	非振り分け
Totals	総計

30

* For letter-assigned OspC types, an example strain is given in parentheses.

* 文字命名 O s p C タイプについて、例示株を括弧に示した

。

[図 2 2]

Nucleotide Position	ヌクレオチド位置
Permuted trees	順序を入れ替えたツリー

[図 2 3]

SEQ ID NO	配列番号
Sp	種

50

Strain 株
 OspC type O s p C タイプ
 Epitope Region Sequence エピトープ領域配列

[図 2 5 A] ~ [図 2 5 J]
 Construct 構築体

[図 2 6]
 Strain 株
 Protein accession # タンパク質アクセス番号
 DNA accession # D N A アクセス番号

10

[REFERENCES (参考文献)]

- Abuodeh RO, Shubitz LF, Siegel E, Snyder S, Peng T, Orsborn KI, et al. Resistance to *Coccidioides immitis* in mice after immunization with recombinant protein or a DNA vaccine of a proline rich antigen. *Infect Immun* 1999 Jun;67(6):2935-40.
- Ahlborg N, Nardin EH, Perlmann P, Berzins K, Andersson R. Immunogenicity of chimeric multiple antigen peptides based on *Plasmodium falciparum* antigens: impact of epitope orientation. *Vaccine* 1998;16(1):38-44. 20
- Alghaferi, M. Y., J. M. Anderson, J. Park, P. G. Auwaerter, J. N. Aucott, D. E. Norris, and J. S. Dumler. 2005. *Borrelia burgdorferi* ospC heterogeneity among human and murine isolates from a defined region of Northern Maryland and Southern Pennsylvania: Lack of correlation with invasive and non invasive genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 43:1879-1884.
- Alvarez P, Buscaglia CA, Campetella O. Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences. *J Biol Chem* 2004 Jan 30;279(5):3375-81. 30
- Alverson, J., S. F. Bundle, C. D. Sohaskey, M. C. Lybecker, and D. S. Samuels. 2003. Transcriptional regulation of the ospAB and ospC promoters from *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 48:1665-1677.
- Apta, D., K. Raviprakashb, A. Brinkman, A. Semyonov, S. Yang, C. Skinnera, L. Diehl, R. Lyons, K. Porter, and J. Punnonen. 2006. Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. *Vaccine* 24:335B344.
- Asch ES, Bujak DI, Weiss M, Peterson MG, Weinstein A. Lyme disease: an infectious and postinfectious syndrome. *J Rheumatol* 1994;21(3):454-61. 40
- Attie, O., J. F. Bruno, Y. Xu, D. Qiu, B. J. Luft, and W. G. Qiu. 2006. Co evolution of the outer surface protein C gene (ospC) and intraspecific lineages of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in the northeastern United States. *Infect Genet Evol E pub.*
- Barthold SW, Beck DS, Hansen GM, Terwilliger GA, Moody KD. Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J Infect Dis* 1990 Jul;162(1):133-8. 50

- Barthold SW, Persing DH, Armstrong AL, Peeples RA.
Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am J Pathol* 1991;139(2):263-73.
- Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Bast TF, Habicht GS, et al. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med* 1983;308:740-2.
- Bockenstedt, L. K., E. Hodzic, S. Feng, K. W. Bourrel, A. de Silva, R. R. Montgomery, E. Fikrig, J. D. Radolf, and S. W. Barthold. 1997. *Borrelia burgdorferi* strain specific OspC mediated immunity in mice. *Infect. Immun.* 65:4661-4667. 10
- Bockenstedt LK, Kang I, Chang C, Persing D, Hayday A, Barthold SW. CD4+ T helper 1 cells facilitate regression of murine Lyme carditis. *Infect Immun* 2001 Sep;69(9):5264-9.
- Bouche FB, Steinmetz A, Yanagi Y, Muller CP. Induction of broadly neutralizing antibodies against measles virus mutants using a polyepitope vaccine strategy. *Vaccine* 2005;23(17-18):2074-7.
- Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol* 1999;163(12):6448-54. 20
- Brinckerhoff LH, Kalashnikov VV, Thompson LW, Yamshchikov GV, Pierce RA, Galavotti HS, et al. Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines. *Int J Cancer* 1999 Oct 29;83(3):326-34.
- Brisson D, Dykhuizen DE. ospC diversity in *Borrelia burgdorferi*: Different hosts are different niches. *Genetics* 2004;168:713-22.
- Brown EL, Kim JH, Reisenbichler ES, Hook M. Multicomponent Lyme vaccine: three is not a crowd. *Vaccine* 2005;23(28):3687-96. 30
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982;216:1317-9.
- Cai QL, Wei F, Lin YH, Shao DD, Wang H. Immunogenicity of polyepitope libraries assembled by epitope shuffling: an approach to the development of chimeric gene vaccination against malaria. *Vaccine* 2004;23(2):267-77.
- Caro Aguilar, I., S. Lapp, J. Pohl, M. R. Galinski, and A. Moreno. 2005. Chimeric epitopes delivered by polymeric synthetic linear peptides induce protective immunity to malaria. *Microbes Infect.* 7:1324B1337. 40
- Christe M, Rutti B, Brossard M. Cytokines (IL-4 and IFN-gamma) and antibodies (IgE and IgG2a) produced in mice infected with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto via nymphs of *Ixodes ricinus* ticks or syringe inoculations. *Parasitol Res* 2000 Jun;86(6):491-6.
- Coyle PK, Schutzer SE. Neurologic aspects of Lyme disease. *Med Clin North Am* 2002;86(2):261-84.
- Crasto CJ, Feng JA. LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins. *Protein Eng* 2000;13(5):309-12. 50

- Cribbs DH, Ghochikyan A, Vasilevko V, Tran M, Petrushina I, Sadzikava N, et al. Adjuvant dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta amyloid. *Int Immunol* 2003 Apr;15(4):505-14.
- Dale JB, Simmons M, Chiang EC, Chiang EY. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. *Vaccine* 1996;14(10):944-8.
- Dale JB, Penfound T, Chiang EY, Long V, Shulman ST, Beall B. Multivalent group A streptococcal vaccine elicits bactericidal antibodies against variant M subtypes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(7):833-6. 10
- Dale JB, Chiang EY, Lederer JW. Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine. *J Immunol* 1993;151(4):2188-94.
- Dale, J. B. 1999. Multivalent group A streptococcal vaccine designed to optimize the immunogenicity of six tandem M protein fragments. *Vaccine* 17:193B200.
- de Silva AM, Zeidner NS, Zhang Y, Dolan MC, Piesman J, Fikrig E. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect Immun* 1999;67(1):30-5. 20
- Dangl JL, Wensel TG, Morrison SL, Stryer L, Herzenberg LA, Oi VT. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J* 1988 Jul;7(7):1989-94.
- Eicken, C., C. Sharma, T. Klabunde, R. T. Owens, D. S. Pikas, M. Hook, and J. C. Sacchettini. 2001. Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276:10010B10015.
- Eiffert H, Karsten A, Thomssen R, Christen H J. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. *Scand J Infect Dis* 1998;24:437-9. 30
- Elias AF, Stewart PE, Grimm D, Caimano MJ, Eggers CH, Tilly K, et al. Clonal polymorphism of *Borrelia burgdorferi* strain B31 MI: implications for mutagenesis in an infectious strain background. *Infect Immun* 2002;70(4):2139-50.
- Elias AF, Bono JL, Carroll JA, Stewart P, Tilly K, Rosa P. Altered stationary phase response in a *Borrelia burgdorferi* rpoS mutant. *J Bacteriol* 2000;182(10):2909-18.
- Escudero, R., M. Halluska, P. Backenson, J. Coleman, and J. Benach. 1997. Characterization of the physiological requirements for the bactericidal effects of a monoclonal antibody to OspB of *Borrelia burgdorferi* by confocal microscopy. *Infect. Immun.* 65:1908B1915. 40
- Fahrer H, van der Linden SM, Sauvian MJ, Gern L, Zhioua E, Aeschlimann A. The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* 1991;163:305-10.
- Fan, C. F., and X. G. Mei. 2005. Co immunization of BALB/c mice with recombinant immunogens containing G protein fragment and chimeric CTL epitope of respiratory syncytial virus induces enhanced cellular immunity and high level of antibody response. *Vaccine* 50

23:4453B4461.

Fingerle, V., U. Hauser, G. Liegl, B.

Petko, V. Preac Mursic, and B. Wilske. 1995. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J. Clin. Microbiol.* 33:1867-1869.

Fraser, C., S. Casjens, W. M. Huang, G. G.

Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischman, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L.

10

McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fujii, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390:580-586.

Fuchs, R., S. Jauris, F. Lottspeich, V.

Preac Mursic, B. Wilske, and E. Soutschek. 1992. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6:503B509.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud

S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy

20

Server. In: Walker JM, editor. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press,

2005: 571-608.

Gilmore, R. D., and M. L. Mbow. 1999.

Conformational nature of the *Borrelia burgdorferi* B31 outer surface protein C protective epitope. *Infect. Immun.* 67:5463-5469.

Gilmore RD, Jr., Mbow ML, Stevenson B.

Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microbes Infect* 2001;3(10):799-808.

Gilmore, R. D., R. M. Bacon, A. M. Carpio,

30

J. Piesman, M. C. Dolan, and M. L. Mbow. 2003. Inability of outer surface protein C (OspC) primed mice to elicit a protective anamnestic immune response to a tick transmitted challenge of *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Microbiol.* 52:551-556.

Gilmore, R. D. J. 1998. A monoclonal

antibody generated by antigen inoculation via tick bite is reactive to the *Borrelia burgdorferi* Rev protein, a member of the 2.9 gene family locus. *Infect. Immun.* 66:980-986.

Gilmore, R. D., K. J. Kappel, M. C. Dolan,

T. R. Burkot, and B. J. B. Johnson. 1996. Outer surface protein C (OspC) but not P39 is a protective immunogen against a tick transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infect. Immun.* 64:2234B2239.

40

Golovanov AP, Hautbergue GM, Wilson SA,

Lian LY. A simple method for improving protein solubility and long term stability. *J Am Chem Soc* 2004 Jul 28;126(29):8933-9.

Grimm, D., K. Tilly, R. Byram, S. P. E, J.

G. Krum, D. M. Bueschel, T. G. Schwan, P. F. Policastro, A. F. Elias, and P. A. Rosa. 2004. Outer surface protein C of the Lyme disease spirochetes: A protein induced in ticks for infection in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3142

50

3147.

Gross DM, Steere AC, Huber BT. T helper 1 response is dominant and localized to the synovial fluid in patients with Lyme arthritis. *J Immunol* 1998 Jan 15;160(2):1022 8.

Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW.

Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng* 1990;4(2):155 61.

Guttman DS, Wang PW, Wang IN, Bosler EM,

Luft BJ, Dykhuizen DE. Multiple infections of *Ixodes scapularis* ticks by *Borrelia burgdorferi* as revealed by single strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):652 6. 10

Hanson, M. S., and R. Edelman. 2004. Vaccines

against Lyme disease, p. 487B498. In M. Levine, J. B. Kaper, R. Rappuoli, M. A. Liu, and M. F. Good (ed.), *New generation vaccines*, vol. 3. Marcel Dekker AG, New York, N.Y.

Hodzic E, Feng S, Barthold SW. Stability of

Borrelia burgdorferi outer surface protein C under immune selection pressure. *J Infect Dis* 2000;181(2):750 3. 20

Hofmeister EK, Glass GE, Childs JE, Persing

DH. Population dynamics of a naturally occurring heterogeneous mixture of *Borrelia burgdorferi* clones. *Infect Immun* 1999;67(11):5709 16.

Horvath, A., L. Karpati, H. K. Sun, M.

Good, and I. Toth. 2005. Toward the development of a synthetic group A streptococcal vaccine of high purity and broad protective coverage. *J. Med. Chem.* 47:4100B4104.

Hovis, K., J. V. McDowell, L. Griffin, and

R. T. Marconi. 2004. Identification and characterization of a linear plasmid encoded factor H binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete, *Borrelia hermsii*. *J. Bacteriol.* 186:2612 2618. 30

Hu CM, Simon M, Kramer MD, Gern L. Tick

factors and in vitro cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *Borrelia garinii* isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. *Infection* 1996;24(3):251 7.

Hu MC, Walls MA, Stroop SD, Reddish MA,

Beall B, Dale JB. Immunogenicity of a 26 valent group A streptococcal vaccine. *Infect Immun* 2002;70(4):2171 7.

Hubner, A., X. Yang, D. M. Nolen, T. G.

Popova, F. C. Cabello, and M. V. Norgard. 2001. Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN RpoS regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12724 12729. 40

Ikushima, M., K. Matsui, F. Yamada, S.

Kawahashi, and A. Nishikawa. 2000. Specific immune response to a synthetic peptide derived from outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* predicts protective borreliacidal antibodies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29:15B21.

Jiang Y, Lin C, Yin B, He X, Mao Y, Dong M,

et al. Effects of the configuration of a multi epitope chimeric malaria DNA vaccine on its antigenicity to mice. *Chin Med J (Engl)* 1999;112(8):686 90.

Jobe, D. A., S. D. Lovrich, R. F. Schell,

50

- and S. M. Callister. 2003. C terminal region of outer surface protein C binds borreliacidal antibodies in sera from patients with Lyme disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:573B578.
- Kalish RA, Leong JM, Steere AC. Association of treatment resistant chronic Lyme arthritis with HLA DR4 and antibody reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1993;61:2774 9.
- Kawarasaki Y, Yamada Y, Ichimori M, Shinbata T, Kohda K, Nakano H, et al. Stabilization of affinity tagged recombinant protein during/after its production in a cell free system using wheat germ extract. *J Biosci Bioeng* 2003;95(3):209 14. 10
- Keane Myers A, Maliszewski CR, Finkelman FD, Nickell SP. Recombinant IL 4 treatment augments resistance to *Borrelia burgdorferi* infections in both normal susceptible and antibody deficient susceptible mice. *J Immunol* 1996;156(7):2488 94.
- Keane Myers A, Nickell SP. T cell subset dependent modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol* 1995;154(4):1770 6. 20
- Keane Myers A, Nickell SP. Role of IL 4 and IFN gamma in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol* 1995;155(4):2020 8. 20
- Kelleher Doyle M, Telford SR, 3rd, Criscione L, Lin SR, Spielman A, Gravalles EM. Cytokines in murine Lyme carditis: Th1 cytokine expression follows expression of proinflammatory cytokines in a susceptible mouse strain. *J Infect Dis* 1998 Jan;177(1):242 6.
- Kjerrulf M, Lowenadler B, Svanholm C, Lycke N. Tandem repeats of T helper epitopes enhance immunogenicity of fusion proteins by promoting processing and presentation. *Mol Immunol* 1997;34(8 9):599 608. 30
- Kneller DG, Cohen FE, Langridge R. Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. *J Mol Biol* 1990;214(1):171 82.
- Koide S, Yang X, Huang X, Dunn JJ, Luft BJ. Structure based design of a second generation Lyme disease vaccine based on a C terminal fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. *J Mol Biol* 2005;350(2):290 9.
- Kotloff, K. L., M. Coretti, K. Palmer, J. D. Campbell, M. A. Reddish, M. C. Hu, S. S. Wasserman, and J. B. Dale. 2005. Safety and immunogenicity of a recombinant multivalent group A streptococcal vaccine in healthy adults: phase 1 trial. *JAMA* 292:738B739. 40
- Kraiczy P, Hunfeld KP, Peters S, Wurzner R, Ackert G, Wilske B, et al. Borreliacidal activity of early Lyme disease sera against complement resistant *Borrelia afzelii* FEM1 wild type and an OspC lacking FEM1 variant. *J Med Microbiol* 2000;49(10):917 28.
- Kumaran, D., S. Eswaramoorthy, B. J. Luft, S. Koide, J. J. Dunn, C. L. Lawson, and S. Swaminathan. 2001. Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *EMBO J.* 20:971B978.
- Lagal, V., D. Postic, E. Ruzic Sabljic, and G. Baranton. 2003. Genetic diversity among *Borrelia* strains determine by single 50

- stranded conformation polymorphism analysis of the ospC gene and its association with invasiveness. *J. Clin. Microbiol.* 41:5059B5065.
- Ledin KE, Zeidner NS, Ribeiro JM, Biggerstaff BJ, Dolan MC, Dietrich G, et al. Borreliacidal activity of saliva of the tick *Amblyomma americanum*. *Med Vet Entomol* 2005;19(1):90 5.
- Lee EN, Kim YM, Lee HJ, Park SW, Jung HY, Lee JM, et al. Stabilizing peptide fusion for solving the stability and solubility problems of therapeutic proteins. *Pharm Res* 2005 Oct;22(10):1735 46.
- Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* 2004;82(5):497 505. 10
- Lole, K. S., R. C. Bollinger, R. S. Paranjape, D. Gadkari, S. S. Kulkarni, N. G. Novak, R. Ingersoll, H. W. Sheppard, and S. C. Ray. 1999. Full length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73:152 160.
- Lovrich, S. D., D. A. Jobe, R. F. Schell, and S. M. Callister. 2005. Borreliacidal OspC antibodies specific for a highly conserved epitope are immunodominant in human Lyme disease and do not occur in mice or hamsters. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12:746B751.
- Marconi RT, Samuels DS, Garon CF. 20
Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J Bacteriol* 1993;175:926 32.
- Marconi, R. T., D. S. Samuels, T. G. Schwan, and C. F. Garon. 1993. Identification of a protein in several *Borrelia* species which is related to OspC of the Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* 31:2577 2583.
- Marconi, R. T., D. S. Samuels, and C. F. Garon. 1993. Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J. Bacteriol.* 175:926 932. 30
- Margolis, N., D. Hogan, W. J. Cieplak, T. G. Schwan, and P. A. Rosa. 1994. Homology between *Borrelia burgdorferi* OspC and members of the family of *Borrelia hermsii* variable major proteins. *Gene* 143:105 110.
- Mathiesen, M. J., A. Holm, M. Christiansen, J. Blom, K. Hansen, S. Ostergard, and M. Theisen. 1998. The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface exposed conserved structural motif. *Infect. Immun.* 66:4073 4079.
- Mbow, M. L., R. D. Gilmore, Jr., and R. G. Titus. 1999. An OspC specific monoclonal antibody passively protects mice from tick transmitted infection by *Borrelia burgdorferi* B31. *Infect. Immun.* 67:5470B5472. 40
- McDowell, J. V., S. Y. Sung, L. T. Hu, and R. T. Marconi. 2002. Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with the Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 70:4196 4203.
- McNeela EA, Mills KH. Manipulating the immune system: humoral versus cell mediated immunity. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51(1 3):43 54. 50

- McNeil, S. A., S. A. Halperin, J. M. Langley, B. Smith, A. Warren, G. P. Sharratt, D. M. Baxendale, M. A. Reddish, M. C. Hu, S. D. Stroop, J. Linden, L. F. Fries, P. E. Vink, and J. B. Dale. 2005. Safety and immunogenicity of 26 valent group a streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin. Infect. Dis.* 41:1114B1122.
- Meltzer MI, Dennis DT, Orloski KA. The cost effectiveness of vaccinating against Lyme disease. *Emerg Infect Dis* 1999;5:321 8.
- Metts, S., J. V. McDowell, M. Theisen, P. R. Hansen, and R. T. Marconi. 2003. Analysis of the OspE determinants involved in the binding of factor H and OspE targeting antibodies elicited during infection in mice. *Infect. Immun.* 71:3587 3596. 10
- Miletic VD, Frank MM. Complement immunoglobulin interactions. *Curr Opin Immunol* 1995 Feb;7(1):41 7.
- Montgomery RR, Schreck K, Wang X, Malawista SE. Human neutrophil calprotectin reduces the susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to penicillin. *Infect Immun* 2006;74(4):2468 72.
- Munson EL, Du Chateau BK, Jobe DA, Lovrich SD, Callister SM, Schell RF. Production of borreliacidal antibody to outer surface protein A in vitro and modulation by interleukin 4. *Infect Immun* 2000 Oct;68(10):5496 501. 20
- Munson EL, Du Chateau BK, Jensen JR, Callister SM, DeCoster DJ, Schell RF. Gamma interferon inhibits production of Anti OspA borreliacidal antibody in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Sep;9(5):1095 101.
- Nachman SA, Pontrelli L. Central nervous system Lyme disease. *Semin Pediatr Infect Dis* 2003;14(2):123 30.
- Nagi KS, Joshi R, Thakur RK. Cardiac manifestations of Lyme disease: a review. *Can J Cardiol* 1996;12(5):503 6. 30
- Ohnishi, J., J. Piesman, and A. M. de Silva. 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:670 675.
- Pal, U., X. Yang, M. Chen, L. K. Bockenstedt, J. F. Anderson, R. A. Flavell, M. V. Norgard, and E. Fikrig. 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *The Journal of Clinical Investigation* 113:220 230.
- Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004;82(5):488 96. 40
- Potter MR, Noben Trauth N, Weis JH, Teuscher C, Weis JJ. Interleukin 4 (IL 4) and IL 13 signaling pathways do not regulate *Borrelia burgdorferi* induced arthritis in mice: IgG1 is not required for host control of tissue spirochetes. *Infect Immun* 2000 Oct;68(10):5603 9.
- Powell MF, Grey H, Gaeta F, Sette A, Colon S. Peptide stability in drug development: a comparison of peptide reactivity in different biological media. *J Pharm Sci* 1992 Aug;81(8):731 5.
- Probert, W. S., M. Crawford, R. B. Cadiz, and R. B. LeFebvre. 1997. Immunization with outer surface protein (Osp) A but not OspC provides crossprotection of mice challenged with North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 175:400B405. 50

- Probert, W. S., and R. B. LeFebvre. 1994.
Protection of C3H/HeN mice from challenge with *Borrelia burgdorferi* through active immunization with OspA, OspB, or OspC but not with OspD or the 83 kilodalton antigen. *Infect. Immun.* 62:1920B1926.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999;50(3 4):213 9.
- Remington SJ, Breddam K. Carboxypeptidases C and D. *Methods Enzymol* 1994;244:231 48.
- Rijkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, et al. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 1997;3(1):109 16.
- Roberts, D., M. Caimano, J. McDowell, M. Theisen, A. Holm, E. Orff, D. Nelson, S. Wikel, J. Radolf, and R. Marconi. 2002. Environmental regulation and differential expression of members of the Bdr protein family of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 70:7033B7041.
- Rousselle, J. C., S. M. Callister, R. F. Schell, S. D. Lovrich, D. A. Jobe, J. A. Marks, and C. A. Wienke. 1998. Borreliacidal antibody production against outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 178:733B741.
- Ruzic Sabljic E, Lotric Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Logar M, Jurca T, et al. Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in MKP and BSK II medium. *Int J Med Microbiol* 2006;296(Suppl 40):267 73.
- Sadziene, A., B. Wilske, M. S. Ferdows, and A. G. Barbour. 1993. The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61:2192 2195.
- Satoskar AR, Elizondo J, Monteforte GM, Stamm LM, Bluethmann H, Katavolos P, et al. Interleukin 4 deficient BALB/c mice develop an enhanced Th1 like response but control cardiac inflammation following *Borrelia burgdorferi* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2000 Feb 15;183(2):319 25.
- Scheiblhofer, S., R. Weiss, H. Durnberger, S. Mostböck, M. Breitenbach, I. Livey, and J. Thalhamer. 2003. A DNA vaccine encoding the outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi* is able to induce protective immune responses. *Microbes Infect.* 5:939B946.
- Schwan, T. G., and B. J. Hinnebusch. 1998. Bloodstream versus tick associated variants of a Relapsing fever bacterium. *Science* 280:1938 1940.
- Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):382 8.
- Schwan TG. Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 1):108 12.
- Schwan, T. G., J. Piesman, W. T. Golde, M.

- C. Dolan, and P. A. Rosa. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2909-2913.
- Seinost, G., D. E. Dykhuizen, R. J. Dattwyler, W. T. Golde, J. J. Dunn, N. Wang, G. P. Wormser, M. E. Schriefer, and B. J. Luft. 1999. Four clones of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* cause invasive infection in humans. *Infect. Immun.* 67:3518-3524.
- Shadick NA, Liang MH, Phillips CB, Fossel K, Kuntz K. The cost effectiveness of vaccination against Lyme disease. *Arch Intern Med* 2001;161:554-61. 10
- Shibaki A, Katz SI. Induction of skewed Th1/Th2 T cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 2002 Apr;11(2):126-34.
- Shin JJ, Bryksin AV, Godfrey HP, Cabello FC. Localization of BmpA on the exposed outer membrane of *Borrelia burgdorferi* by monospecific anti recombinant BmpA rabbit antibodies. *Infect Immun* 2004;72(4):2280-7.
- Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001 Jan;32(1):76-102. 20
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, et al. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 1977b;20:7-17.
- Steere AC, Glickstein L. Elucidation of Lyme arthritis. *Nat Rev Immunol* 2004;4(2):143-52.
- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 1977a;86:685-98.
- Stevenson, B., T. G. Schwan, and P. Rosa. 1995. Temperature related differential expression of antigens in the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63:4535-4539. 30
- Stevenson B, Bockenstedt LK, Barthold SW. Expression and gene sequence of outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* reisolated from chronically infected mice. *Infect Immun* 1994;62(8):3568-71.
- Sung, S. Y., J. McDowell, J. A. Carlyon, and R. T. Marconi. 2000. Mutation and recombination in the upstream homology box flanked ospE related genes of the Lyme disease spirochetes results in the development of new antigenic variants during infection. *Infect. Immun.* 68:1319-1327. 40
- Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1987 Sep;55(9):2311-3.
- ten Hagen TL, Sulzer AJ, Kidd MR, Lal AA, Hunter RL. Role of adjuvants in the modulation of antibody isotype, specificity, and induction of protection by whole blood stage *Plasmodium yoelii* vaccines. *J Immunol* 1993;151(12):7077-85.
- Theisen DM, Bouche FB, El Kasmī KC, von der Ahe I, Ammerlaan W, Demotz S, et al. Differential antigenicity of recombinant polypeptide antigens based on loop 50

- and helix forming B and T cell epitopes. *J Immunol Methods* 2000;242(12):145-57.
- Theisen, M., M. Borre, M. J. Mathiesen, B. Mikkelsen, A. M. Lebech, and K. Hansen. 1995. Evolution of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein OspC. *J. Bacteriol.* 177:3036-3044.
- Theisen, M., B. Frederiksen, A. M. Lebech, J. Vuust, and K. Hansen. 1993. Polymorphism in ospC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. *J. Clin. Microbiol.* 31:2570B2576. 10
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Tilly K, Elias AF, Errett J, Fischer E, Iyer R, Schwartz I, et al. Genetics and regulation of chitobiose utilization in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 2001;183(19):5544-53.
- Tongren JE, Corran PH, Jarra W, Langhorne J, Riley EM. Epitope specific regulation of immunoglobulin class switching in mice immunized with malarial merozoite surface proteins. *Infect Immun* 2005;73(12):8119-29. 20
- Walker JR, Altman RK, Warren JW, Altman E. Using protein based motifs to stabilize peptides. *J Pept Res* 2003 Nov;62(5):214-26.
- Wallich R, Siebers A, Jahraus O, Brenner C, Stehle T, Simon MM. DNA vaccines expressing a fusion product of outer surface proteins A and C from *Borrelia burgdorferi* induce protective antibodies suitable for prophylaxis but not for resolution of Lyme disease. *Infect Immun* 2001;69(4):2130-6. 30
- Wang, I. N., D. E. Dykhuizen, W. Qiu, J. J. Dunn, E. M. Bosler, and B. J. Luft. 1999. Genetic diversity of ospC in a local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics* 151:15-30.
- Wang, X. N., G. P. Zhang, J. Y. Zhou, C. H. Feng, Y. Y. Yang, Q. M. Li, J. Q. Guo, H. X. Qiao, J. Xi, D. Zhao, G. X. Xing, Z. L. Wang, S. H. Wang, Z. J. Xiao, X. W. Li, and R. G. Deng. 2005. Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping. *Viral Immunol.* 18:549B557.
- Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C, Vrethem M, Bergstrom S, Forsberg P, et al. *Borrelia* specific interferon gamma and interleukin 4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *J Infect Dis* 2004;189(10):1881-91. 40
- Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C, Vrethem M, Bergstrom S, Forsberg P, et al. *Borrelia* specific interferon gamma and interleukin 4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *J Infect Dis* 2004 May 15;189(10):1881-91.
- Willett TA, Meyer AL, Brown EL, 50

Huber BT. An effective second generation outer surface protein A derived Lyme vaccine that eliminates a potentially autoreactive T cell epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(5):1303-8.

Wilske, B., U. Busch, V. Fingerle, S.

Jauris Heipke, V. Preac Mursic, D. Robler, and G. Will. 1996. Immunological and molecular variability of OspA and OspC: implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 24:208B-212.

Wilske, B., V. Preac Mursic, S. Jauris, A.

Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner. 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:2182-2191.

10

Yang L, Ma Y, Schoenfeld R, Griffiths M,

Eichwald E, Araneo B, et al. Evidence for B lymphocyte mitogen activity in *Borrelia burgdorferi* infected mice. *Infect Immun* 1992 Aug;60(8):3033-41.

Zhang GL, Khan AM, Srinivasan KN, August

JT, Brusic V. MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides. *Nucleic Acids Res* 2005;33(W):172-9.

Zhang, H., A. Raji, M. Theisen, P. R.

Hansen, and R. T. Marconi. 2005. bdrF2 of the Lyme disease spirochetes is coexpressed with a series of cytoplasmic proteins and is produced specifically during early infection. *J. Bacteriol.* 187:175-184.

20

Zhong W, Stehle T, Museteanu C, Siebers A,

Gern L, Kramer M, et al. Therapeutic passive vaccination against chronic Lyme disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(23):12533-8.

Zuckert WR, Kerentseva TA, Lawson CL,

Barbour AG. Structural conservation of neurotropism associated VspA within the variable *Borrelia* Vsp/OspC lipoprotein family. *J Biol Chem* 2001;276(1):457-63.

【 図 1 】

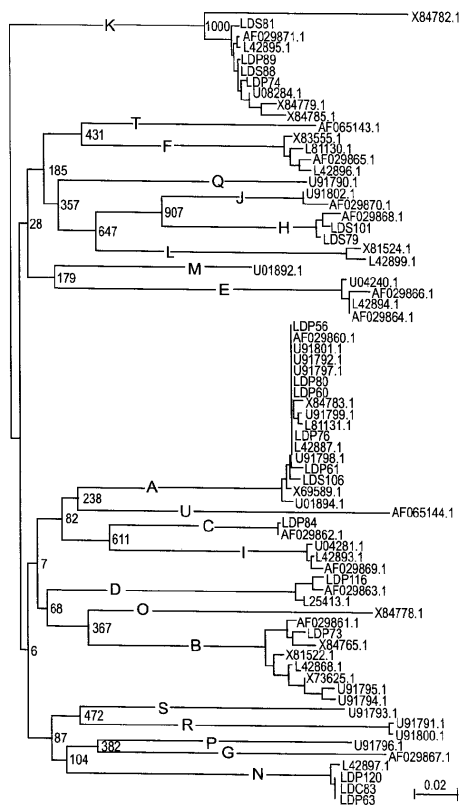


Figure 1

【 図 2 】

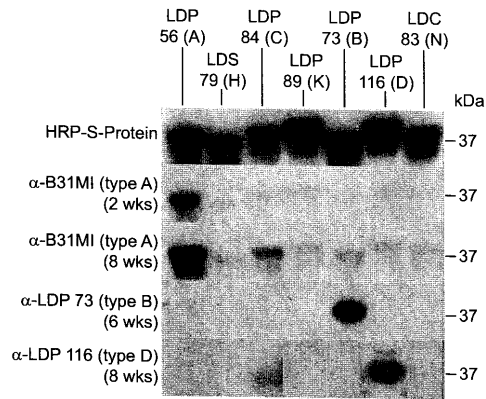


Figure 2

【 図 3 A 】

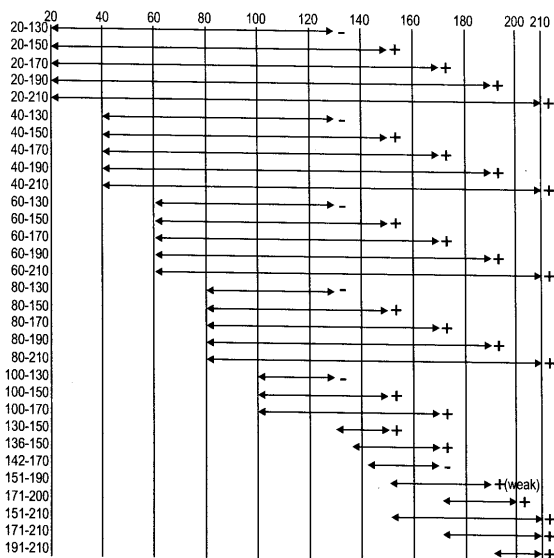


Figure 3A

【 図 3 B 】

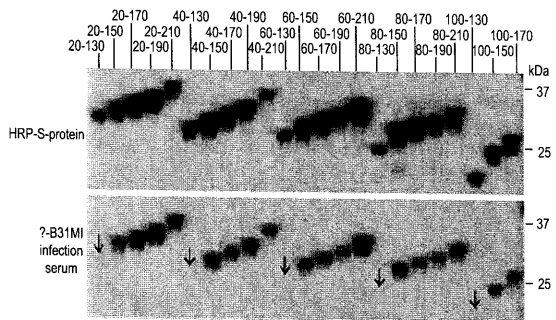


Figure 3B

【 図 3 C 】

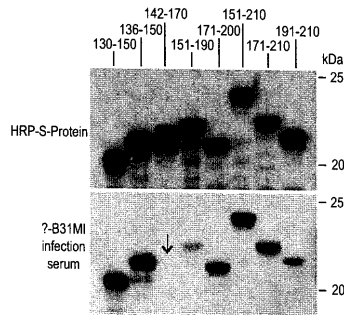


Figure 3C

【 4 A 】

Loop 5 epitope		Alpha 5 epitope(s)		# of Sequences	SRQ ID Sequences (aa166-203)	SRQ ID Sequences NO.	# of Sequences
OspC Type	Sequences (aa116-150)	Sequences (aa116-150)	Sequences NO.				
A	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....R.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVVN.....	1	42	33	34	
B	TKLKNHAQLG-IQG--VQ.R.....	KGVELEKLGSLKESLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	1	17	35		
C	KKLKRHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	36			
D	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	5	37			
E	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	13	38			
F	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	9	39			
G	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	40			
H	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	41			
I	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	42			
J	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	43			
K	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	20	44			
L	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	45			
M	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	7	46			
N	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	2	47			
O	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	48			
P	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	1	49			
Q	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	4	50			

Figure 4A

【 4 B 】

Loop 5 epitope		Alpha 5 epitope(s)		# of Sequences	SRQ ID Sequences (aa166-203)	SRQ ID Sequences NO.
OspC Type	Sequences (aa116-150)	Sequences (aa116-150)	Sequences NO.			
R	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGVELEKLGSLKESLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	4	57		
S	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	2	58		
T	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	5	59		
U	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	3	60		
V	NKLRKHTD-LCKEG-VS.F.....	KGAEELGKLFESVETLSKAAKEMLANSVKELTSPVV	1	61		

Figure 4B

【 5 】

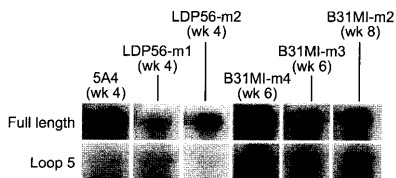


Figure 5

【 6 】

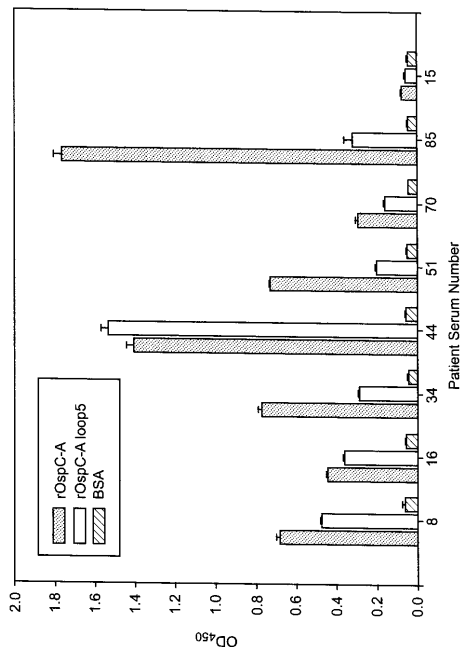


Figure 6

【 10 】

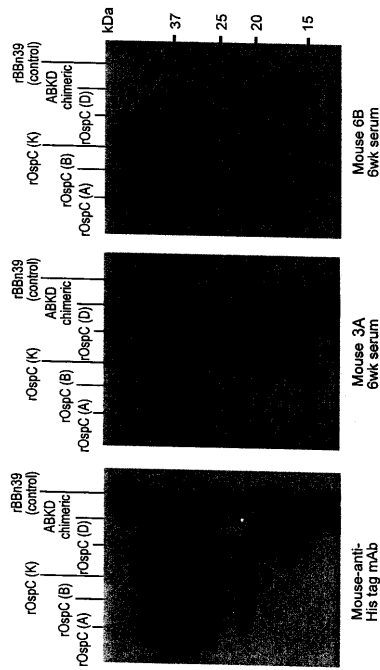


Figure 10

【 1 1 A 】

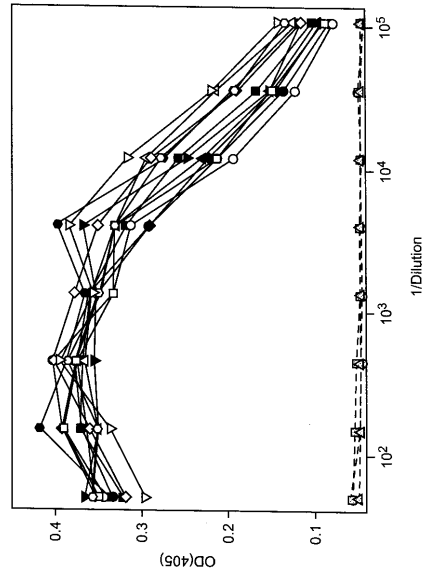


Figure 11A

【 1 1 B 】

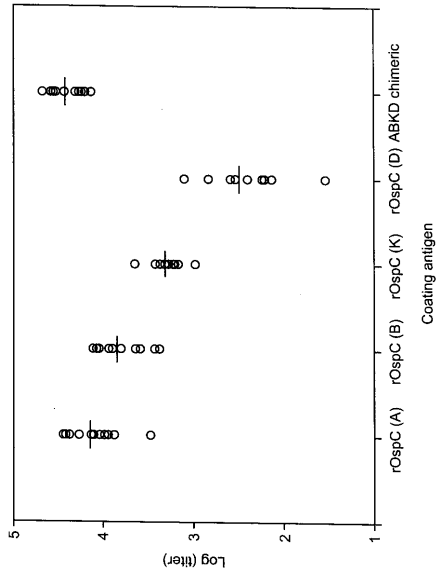


Figure 11B

【 1 2 】

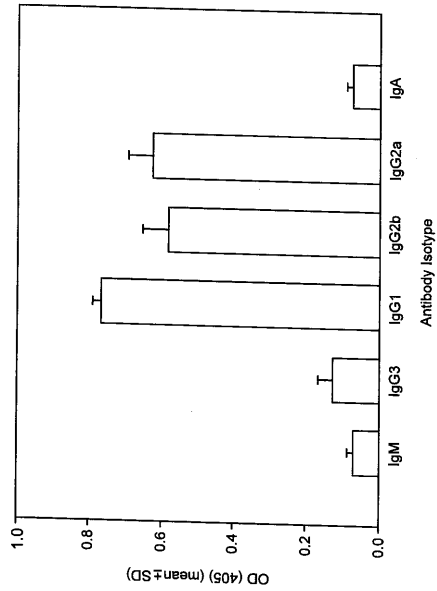


Figure 12

【 13 A 】

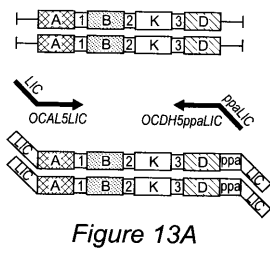


Figure 13A

【 13 B 】

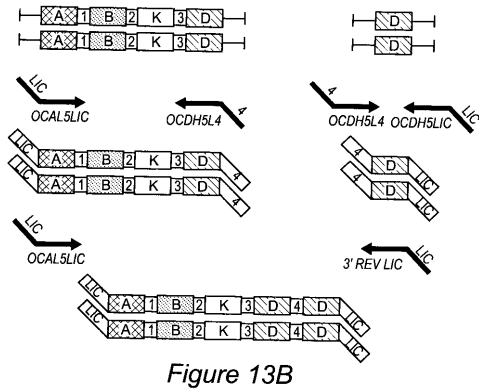


Figure 13B

【 13 C 】

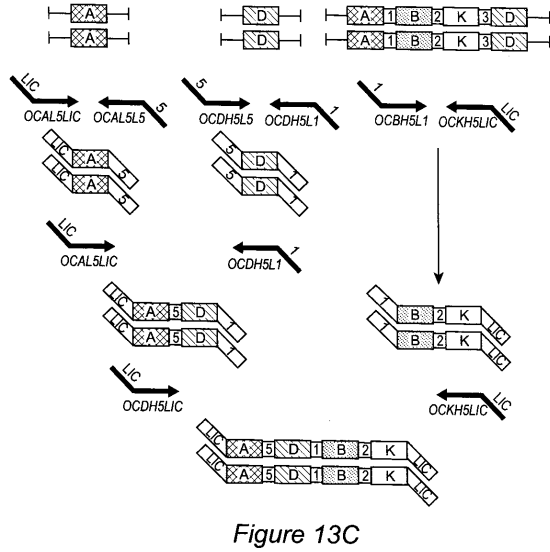


Figure 13C

【 13 D 】

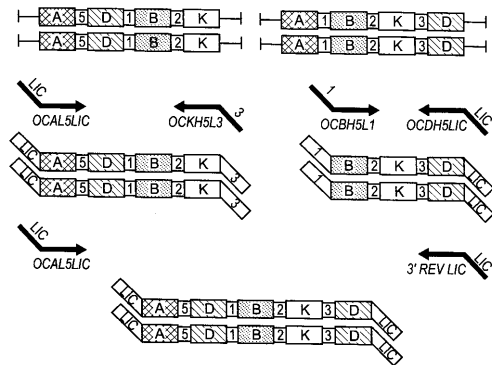


Figure 13D

【 14 】

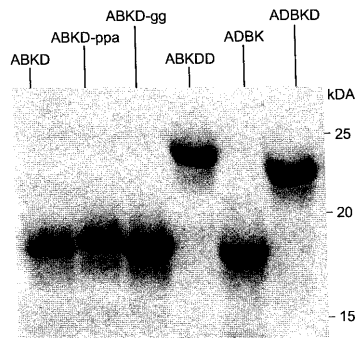


Figure 14

【 13 E 】

- 1 GSMGML (SEQ ID NO: 76)
- 2 STNGNL (SEQ ID NO: 77)
- 3 SMSVVL (SEQ ID NO: 78)
- 4 SSSQGL (SEQ ID NO: 79)
- 5 GRMSAL (SEQ ID NO: 80)
- Type A Loop 5 SETFTNKLKEKHTDLGKEG (SEQ ID NO: 81)
- Type B Helix 5 LKANAAGKDKGVVELEKLSGSLESLSKAAKEMLANSVKELTS (SEQ ID NO: 82)
- Type K Helix 5 LITDAAKDKGAAELEKLFKAVENLAKAAKEMLANSVKELTS (SEQ ID NO: 83)
- Type D Helix 5 LKTHNAKDKGAEELVKLSSEVAGLAKAAQILANSVKELTS (SEQ ID NO: 84)

Figure 13E

【 15 A 】

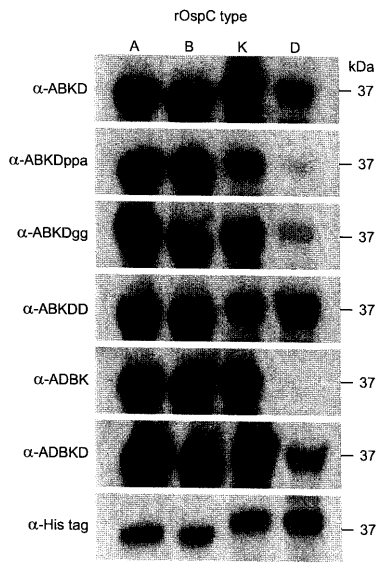


Figure 15A

【 15 B 】

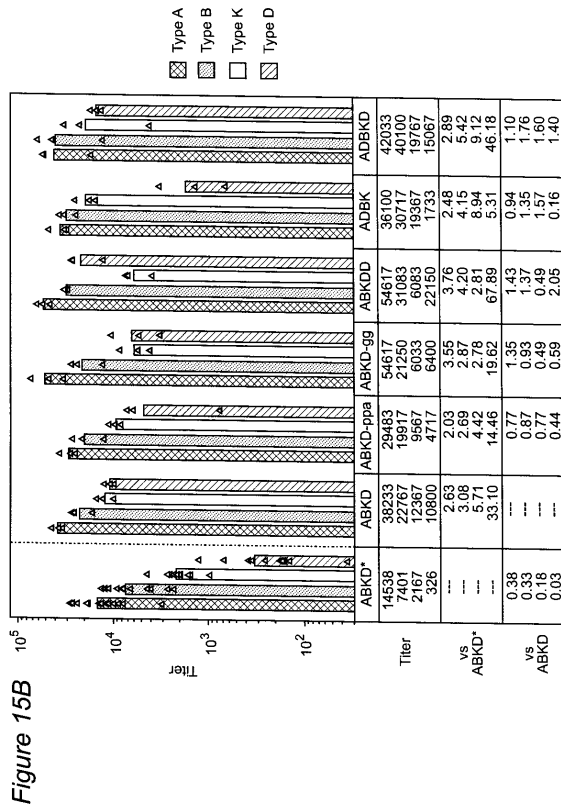
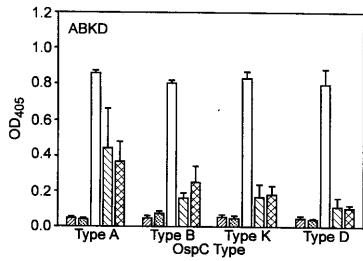
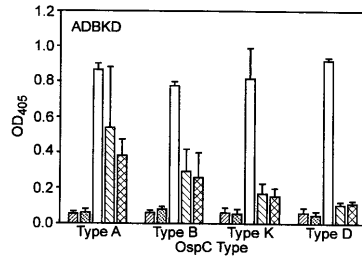


Figure 15B

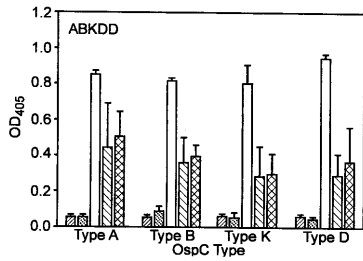
【 16 A 】



【 16 C 】



【 16 B 】



【 17 】

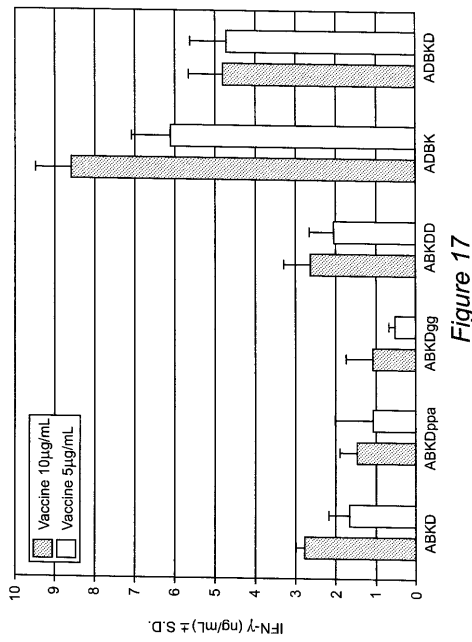


Figure 17

【 18 A 】

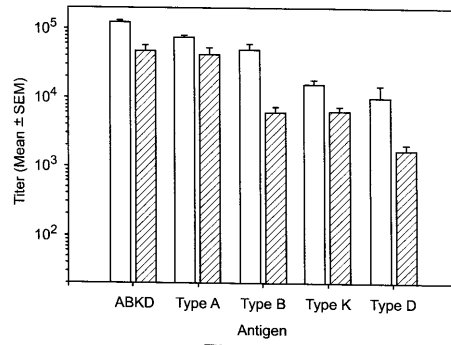


Figure 18A

【 18 B 】

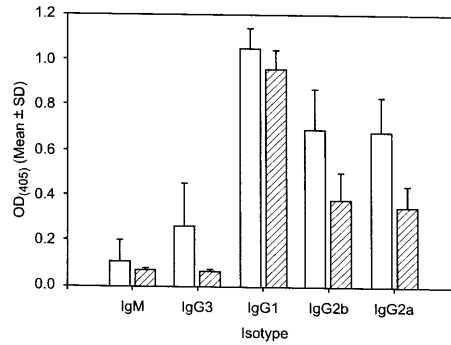


Figure 18B

【 19 】

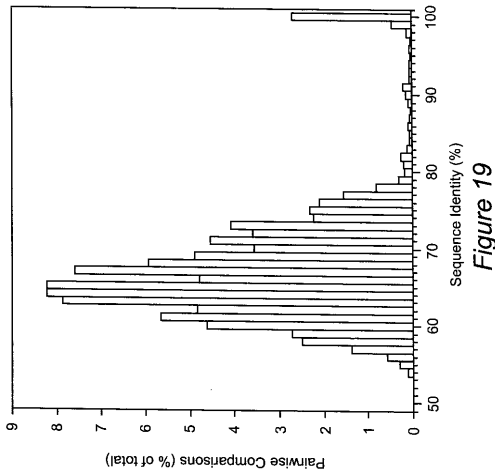


Figure 19

【 20 A 】

OspC Type	Borrelia species			
	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	Other species
Assigned				
A (B31)*	38			
B (LDP73)	13			
D (LDP116)	3			
E (N40)	7			
F (PA4)	4			
H (LDS101)	3			
I (HB19)	7			
K (LDP74)	11			
L (SI1)	6			
M (B356)	3			
N (LDP63)	7			
U (148)	3			
OspCt-Smar		4		
OspCt-PLi		9		
OspCt-H13		3		
OspCt-PFIM		6		
OspCt-PMit		3		
OspCt-PKi		5		
OspCt-PBes		7		
OspCt-HT22		4		
OspCt-Pko			11	
OspCt-PLj7			6	
OspCt-VS461			3	
OspCt-DK15			3	
OspCt-HT25			4	
OspCt-72a	4			
OspCt-Szid	3			
OspCt-PHez		5		
OspCt-PWa		17		
Unassigned				
<i>B. burgdorferi</i>	8			
<i>B. garinii</i>		22		
<i>B. afzelii</i>			21	
<i>B. bissettii</i>				8
<i>B. japonica</i>				1
<i>B. andersonii</i>				6
<i>B. tanukii</i>				1
<i>B. valaisiana</i>				8
<i>B. species</i>				3
Totals	120	85	48	27

* - For letter-assigned OspC types, an example strain is given in parentheses.

Figure 20A

【 図 2 0 B 】

OspC Type	Geographic Region				
	North America	Europe	Russia	Asia	Not provided
Assigned					
A (B31)*	25	9		4	
B (LDP73)	6	5			2
D (LDP116)	3				
E (N40)	7				
F (PAd)	4				
H (LDS101)	3				
I (HB19)	7				
K (LDP74)	11				
L (SI1)	5	1			
M (B356)	3				
N (LDP63)	7				
U (148)	3				
OspCt-Smar		4			
OspCt-PLI		9			
OspCt-H13		3			
OspCt-PFIM		6			
OspCt-PMit		3			
OspCt-PKI		5			
OspCt-PBes		6		1	
OspCt-HT22			3	1	
OspCt-Pko		7		4	
OspCt-PLJ7		5			1
OspCt-VS461		2			1
OspCt-DK15		1		2	
OspCt-HT25			1	3	
OspCt-72a	4				
OspCt-Szid		3			
OspCt-PHez		5			
OspCt-PWa		17			
Unassigned					
<i>B. burgdorferi</i>	6	1	1		
<i>B. garinii</i>		7	4	10	1
<i>B. afzelii</i>		10	9	1	1
<i>B. bissetii</i>	8				
<i>B. japonica</i>				1	
<i>B. andersonii</i>	6				
<i>B. tanukii</i>				1	
<i>B. valaisiana</i>		4		4	
<i>B. species</i>	3				
Totals	111	113	18	32	6

* - For letter-assigned OspC types, an example strain is given in parentheses.

Figure 20B

【 図 2 0 C 】

OspC Type	Isolated from					
	Human Skin	Human Blood	Human CSF	Other animal	Tick	Not provided
Assigned						
A (B31)*	7	9	6	6	7	3
B (LDP73)	5	1	1		4	2
D (LDP116)		1			2	
E (N40)	3				4	
F (PAd)	1				3	
H (LDS101)	2				1	
I (HB19)	3	2	1		1	
K (LDP74)	3	2	1		5	
L (SI1)				5	1	
M (B356)	1			2		
N (LDP63)	1	2	1	1	2	
U (148)	1				2	
OspCt-Smar			1		3	
OspCt-PLI	5	1	3			
OspCt-H13	1		1		1	
OspCt-PFIM	1		3		2	
OspCt-PMit	1		1		1	
OspCt-PKI	3		2			
OspCt-PBes	3		3		1	
OspCt-HT22					4	
OspCt-Pko	5		1	2	3	
OspCt-PLJ7	3	1			1	1
OspCt-VS461	1				1	1
OspCt-DK15	1				2	
OspCt-HT25					4	
OspCt-72a	1			1	2	
OspCt-Szid	1		1		1	
OspCt-PHez			4		1	
OspCt-PWa	1		1			
Unassigned						
<i>B. burgdorferi</i>	1	1		1	5	
<i>B. garinii</i>	4		2		15	1
<i>B. afzelii</i>	7			3	10	1
<i>B. bissetii</i>				6	2	
<i>B. japonica</i>						1
<i>B. andersonii</i>					1	5
<i>B. tanukii</i>					1	
<i>B. valaisiana</i>				3	5	
<i>B. species</i>				1	2	
Totals	66	20	48	33	103	10

* - For letter-assigned OspC types, an example strain is given in parentheses.

Figure 20C

【 図 2 1 A 】

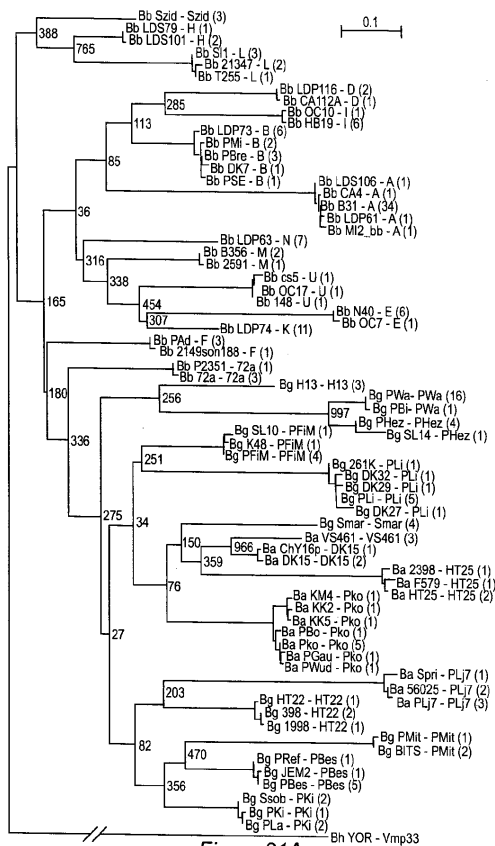


Figure 21A

【 図 2 1 B 】

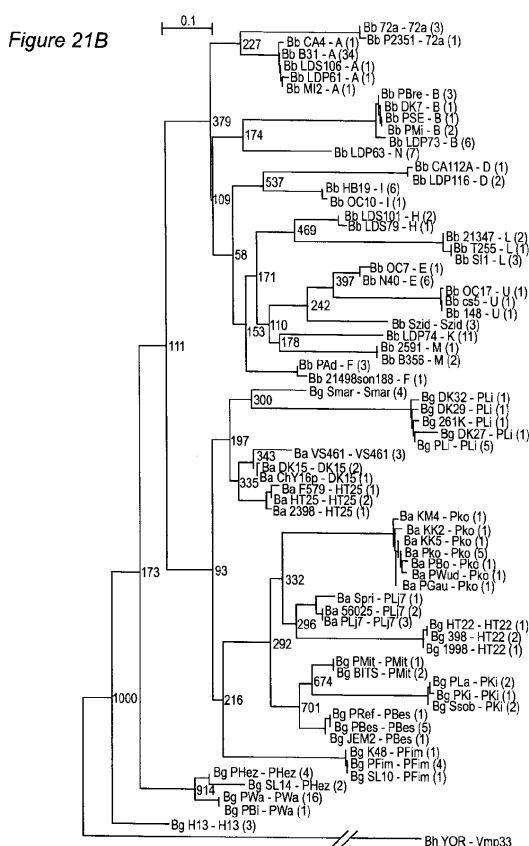


Figure 21B

【 2 5 E 】

Construct 17: C-A-B-K-D
SEEFTKKLEKHTDLGKKAATDVHAKAAILKTNGTDKDGAABELEKLFESVESLAKAAKEMLS
NSVKELTSXSSEFTFNKLSKHTDLGKEGVTDDAKAAILKTNGTGKGAELGKLFESVSVL
SKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTFKLKNHAGLQGVQVTDANAKAAILKANAAGKDKGVEEL
EKLSGSELSKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTFKLEGGHQAQLGIVNVTDNAKAAILITDA
AKDGGAELEKLFKAVENLAKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTFKLSDNQAELGIENATDDNA
KKAILKTHNAKDKGAELVKLESVAGLAKAAQAILANSVKELTSXVAESPKP
(SEQ ID No: 139)

Construct 18: I-E-N-M-L
SEEFKAKLGEHTDLGKEGVTDDNKAAILKTNNDKTKGADELEKLFESVKNLSKAAKEMLT
NSVKELTSXSSEFTFNKLSKHTDLGKKAATDVHAKAAILKTHANKDKGAAELEKLFKAVENL
SKAAQDTLKNVAVKELTSXSDDFTKLQSSHAQLGVAGGATDDEAKKAILRTNAIKDKGADE
LEKLFKSVESLAKAAQDALANSVNELT SXNKAFTDKLKS SHAELGIANGAATDANAKAAILK
TNGTGKGAELKLFESVKNLSKAAQETLNSVKELTSXSSEFTDKLKSSENAALGKQDASD
DDAKKAILKTHNDITKGADELEKLFESVETLLKAAKEMLANSVKELTS
(SEQ ID No: 140)

Construct 19: F-H-U-72a-Szid
SEFTNKLKNGNAQLGLAAATDDNKAAILKTNNGTKGAKELKDLSDSVESLVKAAQVMLT
NSVKELTSXSSEFKAGKLNKSHASLGKQDATTDDAKKAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESL
VKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTFKLQSSHAQLGVAGGATDDEAKKAILRTNAIKDKGADE
LEKLFKSVESLAKAAQDALANSVNELT SXNKAFTDKLKS SHAELGIANGAATDANAKAAILK
TNGTGKGAELKLFESVKNLSKAAQETLNSVKELTSXSSEFTDKLKSSENAALGKQDASD
DDAKKAILKTHNDITKGADELEKLFESVETLLKAAKEMLANSVKELTS
(SEQ ID No: 141)

Construct 20: PFiM-DK15-SL10-PBes-PLi
SEFTNRLKGSQAQLGVAATDDHAKAAILKSNPKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAAL
NSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTDATDKGAKELKDLSDSVESL
SKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTNRLTGSQAQLGVAATDDHAKAAILKSNPKDKGAKELK
DLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNRLTGSQAQLGVAATDDHAKAAILKTD
ATDKGATELGELEKLFESVKNLSKAAQEAASANSVKELTSXSSEFTKLLQDSHAQLGVAAGG
INDRAKAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTS
(SEQ ID No: 142)

Construct 21: Smar-VS461-PWa-HT25-HT22
SEFTNKLKSHAEGLVNGGDTDDNKAAILKTHPTKDKGVDELEKLFESVKSLLKAAQAA
LSNSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTNKTKGAKELKDLSDSVESL
SKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTHGNTDKGAKEL
LEKLFKSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDANAKAAILKTN
GDKTGADEFKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTKLLQDGHVLDGKTDVTDN
AKEAILKTNPTKGADELEKLFESVGLVKAKEASANSVKELTS
(SEQ ID No: 143)

Construct 22: H13-Pmit-PKi-Pko-Plj7-Phez
SEFTFKLLKDNNAQLGQVQVDEAKKAILKTNKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQAAAL
NSVQELTNXSEFTNKLKKTQELVAAGAATDIDAKKAILKTNRDKDLGADERGKLFKSVES
LSKAAQEAASANSVKELTSXSSEFTKLLKSSNAQLGVANGAATDDAKKAILKTNTPNDKGA
KELKLFESVESLAKAAQAAALVNSVQELTNXSEFTNKLKSGHADLQGDATDDHAKAAILK
THATTDKGADEFKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAAT
ENAKKAILKTNKTKDGADELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTKLLRDSHA
ELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQAAALANSVQELTS
(SEQ ID No: 144)

Figure 25E

【 2 5 G 】

Construct 26: E-N-Smar-PBes-DK15-72a
STEFNKLKSEHAVLGLDNLTDNNAQRAILKTHANKDKGAAELEKLFKAVENLSKAAQDT
LKNVAVKELTSXSDDFTKLQSSHAQLGVAGGATDDEAKKAILRTNAIKDKGADELEKLF
KSVESLAKAAQDALANSVNELT SXNKAFTDKLKS SHAELGIANGAATDANAKAAILKTHGNK
DKGAKELKELSESLEKLSKAAQEAALANSVQELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDDHAK
AAILKTNKTKDGADELEKLFKSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAE
LGLAAATDANAKAAILKTNKTKDGADELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTK
LLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVQELTS
(SEQ ID No: 149)

Construct 27: HT22-M-Phez-PFiM-Plj7-Szid
SAAFTKLLQDGHVLDGKTDVTDNKAAILKTNPTKGADELEKLFKSVESGLVKAKEA
SANSVKELTSXNKAFTDKLKS SHAELGIANGAATDANAKAAILKTNKTKDGADELEKLF
ESVKNLSKAAQETIANSVKELTSXSSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNK
DKGAKELKELSESLEKLSKAAQEAALANSVQELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDDHAK
AAILKSNPTKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAE
LGLAAATDANAKAAILKTNKTKDGADELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTK
LLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANS
SVKELTS (SEQ ID No: 149)

Construct 28: PL1-Pmit-VS461-H-HT25-F
SDKFTKLLTDSHAQLGAVGGAINDRAKAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQ
AALANSVKELTSXSSEFTNKLKKTQELVAAGAATDIDAKKAILKTNRDKDLGADERGK
LFKSVESLAKAAQEAASANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTN
TKGAKELKELLESKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILK
THGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAAT
DANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGH
AEGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKELTSXS
EDFTNKLKNGNAQLGLAAATDDNKAAILKTNNGTKGAKELKDLSDSVESLVKAAQVML
TNSVKELTS (SEQ ID No: 150)

Construct 29: H13-SL10-PKi-Pko-U-L-PWa
SEFTFKLLKDNNAQLGQVQVDEAKKAILKTNKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQAA
LANSVQELTNXSEFTNRLTGSQAQLGVAATDDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVKELTNXSEFTKLLKSSNAQLGVANGAATDDAKKAILKTNTPN
DKGAKELKELLESKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDANAKAAILK
THGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAAT
DANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTKLLRDSHA
ELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVQELTSXS
SEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANS
SVKELTSXSSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESL
LSKAAQEAALANSVKELTN (SEQ ID No: 151)

Figure 25G

【 2 5 F 】

Construct 23: Smar-PLi-H13-PFiM-SL10-Pmit-PKi-PBes
SEFTNKLKSHAEGLVNGGDTDDNKAAILKTHPTKDKGVDELEKLFESVKSLLKAAQ
AALNSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTNKTKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTHGNT
DKGAKELKELLESKAAKEMLANSVKELTNXSEFTNRLKGSQAQLGVAATDDHAKAAILK
SNPTKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTNXSEFTNRLTGSQAQLGVAAT
DDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTNXSEFTNRLTGS
QAQLGVAATDDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTNX
EAFTNKLKKTQELVAAGAATDIDAKKAILKTNRDKDLGADERGKLFKSVESLAKAAQEA
ASANSVKELTSXSSEFTKLLKSSNAQLGVANGAATDDAKKAILKTNTPNDKGADELEK
LFESVESLAKAAQEAALANSVQELTNXSEFTKLLKSSNAQLGMQNGAATDANAKAAILKTD
ATDKGATELGELEKLFKSVESLAKAAQEAASANSVKELTS (SEQ ID No: 145)

Construct 24: HT22-Pko-Plj7-VS461-DK15-HT25-72a-F
SAAFTKLLQDGHVLDGKTDVTDNKAAILKTNPTKGADELEKLFKSVESGLVKAKEA
SANSVKELTSXSSEFTNKLKSGHADLQGDATDDHAKAAILKTHATTDKGADELEKLFES
VEGLLKAAQVALTNSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLAAATDANAKAAILKTNKTKD
GAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAIL
KTNKTKGAKELKELLESKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAK
KAILKTDATDKGAKELKELLESKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDAT
DADAKKAILKTNKTKGAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTKLLQDSNADL
KGGHAEGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKEL
TNXSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEA
LANSVQELTSXSSEFTNKLKNGNAQLGLAAATDDNKAAILKTNKTKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVQELTNXSEFTNKLKNGNAQLGLAAATDDNKAAILKTNKTKGAK
ELKDLSDSVESLVKAAQVMLTNSVKELTS (SEQ ID No: 146)

Construct 25: M-U-L-H-Szid-Phez-PWa
NKAFDKLKS SHAELGIANGAATDANAKAAILKTNKTKDGADELEKLFESVKNLSKAAQ
ETLNSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTNKTKGAELEKLFES
VKNLSKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTHNDI
TKGAKELKELSESLEKLSKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAK
KAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLVKAAKEMLANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADL
KGGHAEGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKEL
TNXSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEA
LANSVQELTSXSSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVKELTN (SEQ ID No: 147)

Figure 25F

【 2 5 H 】

Construct 30: PLi-72a-VS461-Smar-SL10-DK15-PBes-H
SDKFTKLLTDSHAQLGAVGGAINDRAKAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQ
AALANSVKELTSXSSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVQELTSXSSEFTKLLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTNTPNDKGA
KELKLFESVESLAKAAQAAALVNSVQELTNXSEFTNKLKSGHADLQGDATDDHAKAAILK
THATTDKGADEFKLFKSVESGLLKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAAT
ENAKKAILKTNKTKDGADELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTKLLRDSHA
ELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVQELTS
(SEQ ID No: 149)

Construct 31: HT25-M-F-PWa-Plj7-Pmit-Phez-PFiM
SQDFNKLKGGHAEGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESGLLKAAQEA
LANSVKELTSXSSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVQELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDANAKAAILKTNKTKD
GAELEKLFKSVESLAKAAQEAALANSVQELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDANAKAAIL
KTNKTKDGADELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTKLLRDSHAELGQVQVDD
NAKAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTNXSEFTNKLKGGHAE
LGLAAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNXSEFTK
LLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVQEL
TNXSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEA
ASANSVKELTSXSSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDS
VEKLSKAAQEAALANSVQELTSXSSEFTNKLKGGHAEGLVAATDDHAKAAILKSNPTKDKG
AKELKDLSDSVESLAKAAQEAALANSVKELTN (SEQ ID No: 153)

Construct 32: L-H13-Pko-Szid-PKi-HT22-U
SEKFTDKLKSSENAALGKQDASDDAKKAILKTHNDITKGADELEKLFESVKNLSKAAQ
LANSVKELTSXSSEFTKLLKDNNAQLGQVQVDEAKKAILKTNKTKGAKELKDLSDS
VESLAKAAQEAALANSVQELTNXSEFTNKLKSGHADLQGDATDDHAKAAILKTHATTDK
GAELEKLFKSVESGLLKAAQVALTNSVKELTSXSSEFTKLLKSSNAQLGVANGAATDDAK
KAILKTNTPNDKGADELEKLFKSVESLAKAAQEAALANSVKELTSXSSEFTKLLQDSNADL
KGGHAEGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVKELTNX
SEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLAKAAQEAAL
ANSVQELTNXSEFTKLLRDSHAELGQVQVDDNKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESL
LSKAAKEMLANSVKDLQV (SEQ ID No: 154)

Figure 25H

【 25 I 】

Construct 33: E-N-PLi-72a-VS461-Smar
STFEFTNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKHKANKKGAEELEKLFKAVENLSKAAQDT
LKNVAVKELTSSXSDDFTKKLQSSHAQLGVAGGATDDEAKKAILRTNATKDKGADLEKLF
KSVESLAKAAQDALANSVNELTSSXSKFTTKLSDSHQAGVAVGAINDDRAKKAAILKTHG
TNDKGAKELEKELSESVESLAKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLADSNADLGVAAAGNAT
DDNAKRAILKTHGHEDKGGKELKELSEAVKSLKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLQD
SNADLKGHNATDADSKAAILKTNKTKGAKLELELSEVSLSKAAKEALSNSVVELTSS
XSAFTNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKHKANKKGAEELEKLFKAVENLSKAAQDT
QAALSNSVVELTSS (SEQ ID No: 155)

Construct 34: SL10-DK15-PBes-H-HT25-M
SEAFNRLTGSQAQVAAATDDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSESVESLAKAAQEA
LANSVVELTSSXSAFTTKLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTDATKDKGAKLELELSE
VESLAKAAKEALSNSVVELTSSXSAFTTKLQDSNADLGMONGAATDAHAKAAILKTDATK
DKGATELGELFKSVESLAKAAQEAASNSVVELTSSXSEKFAKLNKNEHASLGGKDATDDA
KKAAILKTHGNTDKGAKELKDLSDSVESLVKAAKEMLTNSVVELTSSXQDFINKLKGHAE
LGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAEFEKLFKSVESLAKAAQEAALANSVVELTSSXNKA
FTDLKSSHAELGIANGAATDANAKAAILKTNKTKGAELEKLFESVKNLSKAAQETL
NNSVVELTSS (SEQ ID No: 156)

Construct 35: F-PWa-PLj7-Pmit-Phez-PFiM-L
SEDFTNKLNKNGAQLGLAAATDDNAKAAAILKTNKTKGAKELKDLSDSVESLVKAAQVM
LNSVVELTSSXSEFTTKLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTHGNTDKGAKLELELSE
VESLAKAAQALANSVVELTSSXSEFTNKLKGGHAEGLAAATDENAKAAILKTNKTKDK
GAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVVELTSSXSAFTNKLKKEKTQELAVAAAGATDIDA
KKAAILKTNKTKDLGADERKGLFKSVESLAKAAQEAASNSVVELTSSXSEKFTTKLQDSHAE
LGIQNVQDDNAKRAILKTHGNTDKGAKELKELSELEKLSKAAQALANSVVELTSSXSEA
FTNRLKGSQAQVAAATDDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSESVESLAKAAQEAALAN
SVKELTNSXSEFTTKLQDSNADLGMONGAATDADAKKAILKTHNDITKGAKELEKELSEVET
LLKAAKEMLANSVVELTSS (SEQ ID No: 157)

Construct 36: H13-Pko-Szid-Fki-HT22-U
SEAFNRLTGSQAQVAAATDDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSESVESLVKAAQVM
LNSVVELTSSXSEFTTKLQDSNADLKGHDATDADAKKAILKTHGNTDKGAKLELELSE
VESLAKAAQALANSVVELTSSXSEFTNKLKGGHAEGLAAATDENAKAAILKTNKTKDK
GAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVVELTSSXSAFTNKLKKEKTQELAVAAAGATDIDA
KKAAILKTNKTKDLGADERKGLFKSVESLAKAAQEAASNSVVELTSSXSEKFTTKLQDSHAE
LGIQNVQDDNAKRAILKTHGNTDKGAKELKELSELEKLSKAAQALANSVVELTSSXSEA
FTNRLKGSQAQVAAATDDHAKAAILKSNPTKDKGAKELKDLSESVESLAKAAQEAALAN
SVKELTNSXSEFTTKLQDSNADLGMONGAATDADAKKAILKTHNDITKGAKELEKELSEVET
LLKAAKEMLANSVVELTSS (SEQ ID No: 158)

Figure 25I

【 25 J 】

Construct 37: Smar-PLi-H13-PFiM-SL10-Pmit-Pki-PBes
SEAFNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKHKANKKGAEELEKLFKAVENLSKAAQDT
AALSNSVVELTSSXSDDFTKKLQSSHAQLGVAGGAINDDRAKKAAILKTHGNTDKGAKELKE
LSESVESLAKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLQDSNADLGMONGAATDAHAKAAILKTHG
TNDKGAKELEKELSESVESLAKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLADSNADLGVAAAGNAT
DDNAKRAILKTHGHEDKGGKELKELSEAVKSLKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLQD
SNADLKGHNATDADSKAAILKTNKTKGAKLELELSEVSLSKAAKEALSNSVVELTSS
XSAFTNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKHKANKKGAEELEKLFKAVENLSKAAQDT
ATKDKGATELGELFKSVESLAKAAQEAASNSVVELTSS (SEQ ID No: 159)

Construct 38: HT22-Pko-PLj7-VS461-DK15-HT25-A-D
SAAFTTKLQDGHVLDGKTDVTDNNAKAAAILKTNPTKRGATELEELFKSVESLAKAAQEA
SANSVVELTSSXSEFTNKLKSGHADLQKQDADDDHAKAAILKTHATTDKGAKEFKDLFES
VEGLLAKAAQVALANSVVELTSSXSEFTNKLKGGHAEGLAAATDENAKAAILKTNKTKDK
GAELEKLFKSVESLAKAAKESLNSVVELTSSXSAFTNKLKKEKTQELAVAAAGATDIDA
KKAAILKTNKTKGAELELSEVSLSKAAKEALSNSVVELTSSXSEFTTKLQDSNADLGM
ONGAATDADAKKAILKTDATKDKGAKLELELSEVSLSKAAKEALSNSVVELTSSXQDFI
NKLKGGHAEGLVAATDANAKAAILKTNKTKGAEFEKLFKSVESLAKAAQEAALANSV
VELTSSXSEFTNKLKKEKHTDLGKGVTDADAKAAILKTNKTKGAELEKLFESVEVLS
KAAKEMLANSVVELTSSXSEFTTKLQDSNADLGMONGAATDAHAKAAILKTHNDITKGA
EELFKSVESLAKAAQEAALANSVVELTSSXVVAESPKPK (SEQ ID No: 160)

Construct 39: 72a-F-E-M-U-I-L-H
SAAFTTKLQDGHVLDGKTDVTDNNAKAAAILKTHGHEDKGGKELKELSEAVKSLKAAQ
AALSNSVVELTSSXSEFTNKLKNGNAQLGLAAATDDNAKAAAILKTNKTKDKGAKELKDL
SDSVESLVKAAQVMLTNSVVELTSSXSEFTNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKTHGNT
DKGAELEKLFKAVENLSKAAQDTLKNVAVKELTSSXNKAFTDKLSSHAELGIANGAATDA
NKAAILKTNKTKDKGAELEKLFESVKNLSKAAQEAALANSVVELTSSXSEKFTTKLSESH
ADIGIQAATDANAKRAILKTNPTKGAEELEKLFKAVENLSKAAKEMLANSVVELTSSX
EFTAKLKGHEHTDLGKGVTDADAKKAILKTNNDKTKGAELEKLFESVKNLSKAAKEML
TNSVVELTSSXSEFTTKLQDSNADLGMONGAATDADAKKAILKTHNDITKGAKELESEV
ETLLKAAKEMLANSVVELTSSXSEKFAKLNKNEHASLGGKDATDADAKKAILKTHGNTDKG
AKELKDLSDSVESLVKAAKEMLANSVVELTSS (SEQ ID No: 161)

Construct 40: Szid-Phez-PWa-B-K-N-C
SEAFNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKHKANKKGAEELEKLFKAVENLSKAAQDT
AALSNSVVELTSSXSDDFTKKLQSSHAQLGVAGGAINDDRAKKAAILKTHGNTDKGAKELKE
LSESVESLAKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLQDSNADLGMONGAATDAHAKAAILKTHG
TNDKGAKELEKELSESVESLAKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLADSNADLGVAAAGNAT
DDNAKRAILKTHGHEDKGGKELKELSEAVKSLKAAQALANSVVELTSSXSAFTTKLQD
SNADLKGHNATDADSKAAILKTNKTKGAKLELELSEVSLSKAAKEALSNSVVELTSS
XSAFTNKLKSEHVLGLDNLTDNNAQRAILKHKANKKGAEELEKLFKAVENLSKAAQDT
ATKDKGATELGELFKSVESLAKAAQEAASNSVVELTSS (SEQ ID No: 162)

Figure 25J

【 26 】

Table with 3 columns: Strain, Protein accession #, DNA accession #. Lists various strains like Smar, Pli, H13, PFim, SL10, Pmit, Pki, PBes, HT22, Pko, KK5, PLj7, VS461, DK15, HT25, 2398, B31, 72a, PAD, N40, B356, LDP116, cs5, 148, HB19, SI1, LDS101, Szid, Phez, PWa, LDP73, DK7, LDP74, LDP63 and their corresponding accession numbers.

Figure 26

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/61327
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 14/195(2006.01),A61K 39/02 USPC: 530/300,424/234.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/300, 424/234.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BUCKLES et al. Analysis of antibody response in humans to the type A OspC loop 5 domain and assessment of the potential utility of the loop 5 epitope in lyme disease vaccine development. Clinical and Vaccine Immunology. October 2006, Vol 13. No. 10, pages 1162-1165; especially page 1165.	1-28
X --- Y	WO0078966 (DATTWYLER et al.) 28 December 2000 (28.12.2000), see the entire document, especially Table VI, page 40.	1-4, 6-10, 12-16, 18, 28 ----- 5, 11, 17, 19-27
Y	US 6,872,550 BI(LIVEY et al.) 29 March 2005 (29.03.2005); see the entire document, especially column 9, lines 47-56.	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 06 August 2007 (06.08.2007)		Date of mailing of the international search report 12 DEC 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Maury Audet Telephone No. 571-272-1600 <i>Janeie Ford for</i>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/61327

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EARNHART et al. Demonstration of OspC type diversity in invasive human Lyme disease isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. December 2005, Vol. 72, No. 12, pages 7869-7877, especially page 7876.	1-28
Y	KUMARAN et al. Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, <i>Borrelia burgdorferi</i> . <i>The EMBO Journal</i> , 2001, Vol. 20, No. 5, pages 971-978, especially page 975, second paragraph.	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/61327

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, MEDLINE, STNEasy
Search terms: ospC, polyvalent, vaccine

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	39/116 (2006.01)	A 6 1 K	39/116	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	F
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N	33/577	B
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

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

(72) 発明者 アーンハート, クリストファー

アメリカ合衆国 ヴァージニア州 2 3 1 8 5 ウィリアムズバーグ, ハービン コート 1 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 BA63 CA01 CA09 CA11 CA20 DA06
 EA04 GA11 HA01 HA11
 4B064 AG20 AG26 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13
 4C085 AA03 BA46 BB11 CC08 CC21 CC32 DD62 EE01 EE03
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20
 EA50 FA74

专利名称(译)	多价嵌合OSPC牛痘和诊断抗原		
公开(公告)号	JP2009519244A	公开(公告)日	2009-05-14
申请号	JP2008543571	申请日	2006-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚联邦大学		
申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚联邦ユニバー花旗		
[标]发明人	マーコーニリチャードトーマス アーンハートクリストファー		
发明人	マーコーニ,リチャードトーマス アーンハート,クリストファー		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/09 C07K14/705 C07K16/28 A61K39/02 A61K39/116 A61P31/04 A61P37/04 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 C07K14/20 C07K2319/40 G01N2333/20 Y02A50/401 A61K39/0225		
FI分类号	C07K19/00.ZNA C12N15/00.A C07K14/705 C07K16/28 A61K39/02 A61K39/116 A61P31/04 A61P37/04 G01N33/53.N G01N33/569.F G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/BA46 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/740272 2005-11-29 US 60/789588 2006-04-06 US 60/790530 2006-04-10 US		
其他公开文献	JP5390189B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为莱姆病创建疫苗和诊断剂。 解决方案：提供嵌合的多价重组蛋白，其用作莱姆病的疫苗和作为诊断剂。该嵌合蛋白含有来自外表面蛋白C (OspC) 类型的环5区和/或α螺旋5区的表位。这种OspC类型可能与哺乳动物的疏螺旋体感染有关。(图9A)

薬を創
、また
を提供
質C (はアル
、この
づけら

