



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324089**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/20 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19975619	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.06.05 PCT/IB96/00633
(22)	Inng.dag	1997.12.04	(85)	Videreføringssdag	1997.12.04
(24)	Løpedag	1996.06.05	(30)	Prioritet	1995.06.07, US, 475781 1995.06.07, US, 486373
(41)	Alm.tilgj	1998.01.30			
(45)	Meddelt	2007.08.13			
(83)	Biol.mat. dep	ATCC 69750			
(73)	Innehaver	Connaught Laboratories Inc, P.O. Box 187, PA18370-0187 SWIFTWATER, US			
(72)	Oppfinner	Lorne Franklin Erdile, 1318 Dreher Avenue, RR5, Box 5017, PA18360 STROUDSBURG, US Robert S Becker, RR1, 545 A Sylvan Cascades, PA18332 HENRYVILLE, US Robert C. Huebner, Stroudsburg, PA, US Donald J. Warakomski, Tannersville, PA, US Maryann B. Gray, Bartonsville, PA, US Derek L. Pyle, East Stroudsburg, PA, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Hybrid nukleinsyremolekyl for fremstilling av lipiderte rekombinante proteiner fra Borrelia-arter.			
(56)	Anførte publikasjoner	R. L. Ferrero, Infection and Immunity, vol. 62, 1994, s. 4981-4989 W. S. Probert et al., Infection and Immunity, vol. 62, 1994, s. 1920-1926 WO 9214488, WO 9308306, WO 9414318			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet og krevd heterologe lipiderte proteiner som er fremstilt ved rekombinante fremgangsmåter.

Ekspresjonssystemet kan være E. coli. Det heterologe lipiderte protein har en ledersekvens som ikke naturlig forekommer med proteindelen av det lipiderte protein. Det lipiderte protein kan ha ledersekvensen for Borrelia-OspA. Proteindelen kan være OspC, PspA, UreA, UreB eller et fragment derav. Fremgangsmåte og sammensetninger for fremstilling av og anvendelse av proteinene er også beskrevet og krevd.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et hybrid nukleinsyre-
molekyl omfattende en første nukleinsyresekvens som koder
for en signalsekvens av et OspA lipoprotein av en *Borrelia*-
art og en andre nukleinsyresekvens som koder for et OspC
5 modent protein av en *Borrelia*-art, eller fragment derav,
hvilken første nukleinsyresekvens er tilstøtende med den
andre nukleinsyresekvens når det modne protein er naturlig
lipidert, eller de første og andre nukleinsyresekvenser er
separert ved et kodon som koder for en aminosyre når det
10 modne protein ikke er naturlig lipidert hvor nevnte første
nukleinsyresekvens og nevnte andre nukleinsyresekvens er
koblet i et translasjonelt åpent leserammeforhold.

Oppfinnelsen vedrører også rekombinante lipiderte proteiner
uttrykt ved anvendelse av slike nukleinsyresekvenser som
15 angitt i krav 16 og som koder for OspA-ledersekvens, samt
fremgangsmåter ved fremstilling av rekombinant lipoprotein
ifølge krav 11 og fremgangsmåte for å fremme et proteins
immunogenisitet som angitt i krav 19.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

20 Lymesykdommen er en av de mest utbredte flått-forårsakede
sykdommer i USA, samt en av de viktigste flått-forårsakede
infeksiøse sykdommer på verdensbasis. Spiroketen *Borrelia*
burgdorferi er organismen som forårsaker Lymesykdom.
Infeksjon med *B. burgdorferi* gir lokale og systemiske mani-
25 festasjoner. Lokale symptomer som opptrer raskt etter
infeksjon er hudlesjon ved flåttbittet, såkalt *erythema*
migrans. Uker og opptil måneder etter infeksjon opptrer
systemiske manifestasjoner som innbefatter revmatiske,
kardiale og neurologiske symptomer. Den tidlige lokale fase
30 av *B. burgdorferi*-infeksjon kan enkelt behandles med
antibiotika. Imidlertid har de senere systemiske fasene
vist seg å være mer gjenstridige mot antibiotika.

Vesentlig innsats har blitt rettet mot å utvikle en vaksine mot Lymesykdommen. To distinkte fremgangsmåter har blitt anvendt ved vaksineutvikling. En tilnærmedes måte er å anvende en vaksine sammensatt av hele inaktiverede spiroketer, som beskrevet av Johnson i US Patent nr. 4.721.617. En hel inaktivert vaksine har vist seg å beskytte hamstere mot angrep og har blitt lisensiert for anvendelse i hunder.

På grunn av bekymringer omkring kryss-reaktive antigen ved helcellepreparasjon, har human vaksineforskning fokusert på identifikasjon og utvikling av ikke-kryss-reaktive beskyttende antigen uttrykt av *B. burgdorferi*. Flere kandidat-antigen har blitt identifisert. Mye av denne innsatsen har blitt fokusert på det mest forekommende ytteroverflateprotein for *B. burgdorferi*, nemlig ytteroverflateprotein A (OspA), som beskrevet i utgitt PCT-patentsøknad WO 92/14488. Flere versjoner av dette proteinet har vist seg å indusere beskyttende immunitet i mus-, hamster- eller hundeangrepsstudier. Kliniske forsøk i mennesker har vist at formuleringene av OspA er sikre og immunogene i mennesker [Keller et al.; JAMA (1994) 271:1764-1768]. Faktisk undergår nå en formulering inneholdende rekombinant lipidert OspA som beskrevet i tidligere nevnte WO 92/14488 nå Fase III sikkerhets/effektivitetsforsøk i mennesker.

Selv om OspA er uttrykt i en stor andel av kliniske isolater av *B. burgdorferi* fra Nord-Amerika, har undersøkelse av de kliniske *Borrelia*-isolatene i Europa gitt et annet bilde. I Europa forårsakes Lymesykdom av tre genoarter av *Borrelia*, nemlig *B. burgdorferi*, *B. garinii* og *B. afzelli*. I omlag halvparten av de europeiske isolatene er ikke OspA det mest forekommede ytteroverflateprotein. Et annet ytteroverflateprotein C (OspC) er det viktigste overflateantigen funnet på disse spiroketene. Faktisk har det blitt identifisert en rekke europeiske kliniske

isolater som ikke uttrykker OspA. Immunisering av ørkenrotter og mus med rensset rekombinant OspC produserer beskyttende immunitet for *B. burgdorferi*-stammer som uttrykker det homologe OspC-protein [V. Preac-Mursic et al., INFECTION (1992) 20:342-349, W.S. Probert et al., INFECTION AND IMMUNITY (1994) 62:1920-1926]. OspC-proteinet antas i øyeblikket å være en mulig komponent for en andre-generasjons Lymevaksineformulering.

Rekombinante proteiner er lovende kandidater for vaksine- eller immunogene sammensetninger, fordi de kan produseres med høyt utbytte og renhet og manipuleres til å maksimere ønskelige aktiviteter og minimere ikke-ønskede sådanne. Da disse kan være lite immunogene, kan imidlertid fremgangsmåter for å fremme immunresponsen for rekombinante proteiner være viktige i utviklingen av vaksiner eller immunogene sammensetninger.

En svært lovende immunstimulator er lipidgruppen N-palmitoyl-S-(2RS)-2,3-bis-(palmitoyloksy)propylcystein, forkortet Pam₃Cys. Denne gruppen finnes ved aminoterminalen for de bakterielle lipoproteiner som syntetiseres med en signalsekvens som spesifiserer lipidforbindelse og kløyving med signalpeptidase II. Syntetiske peptider som i seg selv er immunogene, induserer en sterk antistoffrespons når den koples kovalent til Pam₃Cys [Bessler et al., Research Immunology (1992) 143:548-552].

I tillegg til en antistoffrespons må en ofte indusere en cellulær immunrespons, spesielt cytotoxiske T-lymfocytter (CTLer). Pam₃Cys-koplede syntetiske peptider er ekstremt potente induserer av CTLer, men ingen har foreløpig rapportert CTL-induksjon ved store, rekombinante lipoproteiner.

Nukleinsyresekvensen og den kodede aminosyresekvensen for OspA er kjent for flere kliniske isolater av *B. burgdorferi*

og er beskrevet, for eksempel i utgitt PCT-søknad WO 90/04411 (Symbicom AB) for B31-stamme av *B. burgdorferi* og i Johnson et al., Infect. Immun. 60:1845-1853 for en sammenligning av ospA-operonene av tre *B. burgdorferi*-isoalter og ulike geografiske opprinnelser, nemlig B31, ACA1 og Ip90.

Som beskrevet i WO 90/04411, viser en analyse av DNA-sekvensen for B31-stammen at OspAet kodes for av en åpen leseramme av 819 nukleotider som starter i posisjon 151 av DNA-sekvensen og terminerer i posisjon 970 i DNA-sekvensen (Se Figur 1 deri). De første seksten aminosyreresiduer av OspA konstitutterer en hydrofob signalsekvens av OspA. Det primære translasjonsprodukt av fullengde *B. burgdorferi*-genet inneholder en hydrofob N-terminal signalsekvens som er et substrat for feste av en diacylglyserol til sulfhydrylsidekjeden i det tilstøtende cysteinresidu. Etter dette feste inntreffer kløyving av signalpeptidase II og feste av en tredje fettsyre til N-terminalen. Den fullstendige lipidgruppe benevnes Pam₃Cys. Det har blitt vist at lipidering av OspA er nødvendig for immunogenisering, da OspA-lipoprotein med en N-terminal Pam₃Cys-gruppe stimulerte en sterk antistoffrespons, mens OspA som mangler det festede lipid, ikke induserer noen detekterbare antistoffer [Erdile et al., Infect. Immun., (1993), 61:81-90].

Utgitt internasjonal patentsøknad WO 91/09879 (Mikrogen Molekularbiologische Entwicklungs-GmbH) beskriver DNA-sekvensen av ospC-genet for *B. burgdorferi*-stammen Pko og OspC(benevnt pC i denne referansen)-proteinet kodet for derved med en molekylvekt på 22 kDa. Denne sekvensen avslører at OspC er et lipoprotein som anvender en signalsekvens som ligner den anvendt for OspA. Basert på funnene i forbindelse med OspA kan en forvente at lipidering av rekombinant OspC ville være nyttig for å fremme dets immunogenisitet, men, som diskutert under,

hadde søker vanskeligheter med å erholde detekterbar ekspresjon av rekombinant OspC.

US Patent nr. 4.624.926 for Inouye vedrører plasmidklonende vektorer, innbefattende en DNA-sekvens som koder for et ønsket polypeptid forbundet med en eller flere funksjonelle fragmenter avledet fra et ytre membranlipoproteingen fra en gramnegativ bakterie. Polypeptidet uttrykt ved de transformerte *E. coli*-vertsceller omfatter signalpeptidet for lipoproteinet, etterfulgt av de første åtte aminosyre-residuer av lipoproteinet, som igjen følges av aminosyresekvensen for det ønskede protein. Signalpeptidet kan deretter translokere naturlig over cytoplasmamembranen, og de første åtte aminosyrene i lipoproteinet kan behandles ytterligere og innsettes i den ytre membranen av cellene på en måte som er analog med normal innsetting av de uttrykte proteinene som ikke er vist. Ytterligere beheftet Inouye seg overhodet ikke med rekombinant lipidering, spesielt ikke det å fremme immunogenisitet.

Utgitt internasjonal patentsøknad WO 91/09952 beskriver plasmider for å uttrykke lipiderte proteiner. Slike plasmider omfatter en DNA-sekvens som koder for et lipoprotein-signalpeptid forbundet med kodonene for en av b-vridde tetrapeptidene QANY eller IEGR, som igjen er forbundet med DNA-sekvensen som koder for det ønskede protein. Igjen ble ikke immunogenisiteten av de uttrykte proteiner vist.

Streptococcus pneumoniae forårsaker flere fatale infeksjoner på verdensbasis enn nesten noe annet patogen. I USA konkurrerer død forårsaket av *S. pneumoniae* i antall med de som dør av AIDS. De fleste pneumokokkale infeksjoner i USA inntreffer hos individer eldre enn 65 år, for hvilke *S. pneumoniae* er den hyppigste årsak til samfunnsvervet pneumonia. I den utviklede verden inntreffer de fleste pneumokokkale dødsfall hos eldre, eller i immunosvekkede

pasienter innbefattende de med sigdcellesykdom. I de mindre utviklede områder i verden, er pneumokokkale infeksjoner en av de viktigste dødsårsaker blant barn under 5 år. Økningen i grad av multippel antibiotikaresistens i fattige land gjør i øyeblikket utsiktene til å kontrollere pneumokokkal sykdom problematiske.

Pneumokokkreservoaret som infiserer mennesket, opprettholdes i hovedsak via nasofaryngeal human baring. Mennesker erverver pneumokokker først gjennom aerosoler eller ved direkte kontakt. Pneumokokker koloniserer først de øvre luftveier og kan forbli i nasale mukosa i uker eller måneder. Så mange som 50% eller flere av unge barn og eldre er kolonisert. I de fleste tilfeller resulterer ikke kolonisering i en åpenbar infeksjon. I noen individer kan imidlertid organsimen som bæres i nasofarynksen, gi opphav til symptomatisk sinusitt av mellomøreinfeksjon. Dersom pneumokokkene aspirere inn i lungene, spesielt med matpartikler eller mukus, kan dette forårsake pneumonia. Infeksjoner på disse stedene sprer generelt noen pneumokokker inn i blodet hvor de kan medføre sepsis, spesielt dersom de fortsetter å spres i stort antall fra det originale infeksjonsfokus. Pneumokokker i blodet kan nå hjernen hvor de kan forårsake meningitt. Selv om pneumokokkal meningitt er mindre vanlig enn andre infeksjoner forårsaket av disse bakteriene, er den spesielt ødeleggende, idet om lag 10% av pasientene dør og mer enn 50% av de gjenværende har livsvarige neurologiske sekveler.

I eldre voksne er den foreliggende 23-valente kapsulære polysakkaridvaksine om lag 60 % effektiv mot invasiv pneumokokkal sykdom med stammer av de kapsulære typene innbefattet i vaksinen. Den 23-valente vaksinen er ikke effektiv i barn mindre enn 2 år på grunn av deres manglende evne til å lage adekvate responser mot de fleste polysakkarider. Forbedrete vaksiner som kan beskytte barn og voksne mot invasive infeksjoner med pneumokokker ville

hjelpe til med å redusere noen av de meste skadelige aspekter ved denne sykdommen.

S. pneumoniae-celleoverflateproteinet PspA har blitt vist å være en virulensfaktor og et beskyttende antigen. I den
5 utgitte internasjonale patentsøknad WO 92/14488 er det beskrevet DNA-sekvensene for *pspA*-genet fra *S. pneumoniae*-
Rx1, produksjonen av en trunkert form av PspA ved genetisk
manipulering og bevis for at en slik trunkert form av PspA
gir beskyttelse i mus som utsettes for levende pneumo-
10 kokker.

I et forsøk på å utvikle en vaksine- eller immunogen sammensetning basert på PspA har PspA blitt rekombinant uttrykt i *E. coli*. Det har blitt funnet at for å effektivt uttrykke PspA er det nyttig å trunkere det modne PspA-
15 molekylet av Rx1-stammen fra dets normale lengde på 589 aminosyrer til 314 aminosyrer omfattende aminosyrer 1 til 314. Denne del av PspA-molekylet inneholder de fleste, om ikke alle, de beskyttende epitoper av PspA. Imidlertid har immunogenisits- og beskyttelsesstudier i mus vist at den
20 trunkerte rekombinante form av PspA ikke er immunogen i naive mus. Det vil således være nyttig å forbedre immunogenisiteten av rekombinant PspA og fragmenter derav.

Mange bakterielle og virale patogen, så som *S. pneumoniae* og *Helicobacter pylori*, og HIV, herpes og papillomavirus
25 trenger inn gjennom de mukosale overflater. Den prinsipale determinant for spesifikk immunitet ved mukosale overflater er sekretorisk IgA (S-IgA) som er fysiologisk og funksjonelt separert fra komponentene i det sirkulatoriske immunsystem. Mukosale S-IgA-responser genereres i hovedsak
30 av det alminnelige mukosale immunsystem (CMIS) [Mestecky, J. Clin. Immunol. (1987), 7:265-276], hvori immunogenene taes opp ved spesialiserte lymfoepiteliale strukturer kollektivt referert til som mukosa-assosiert lymfoidvev (MALT). Benevnelsen felles mukosalt immunsystem refererer

til det faktum at immunisering ved ethvert mukosalt sete kan elisitere en immunrespons i alle andre mukosale seter. Således kan immunisering i tarmsystemet fremskaffe mukosal immunitet i de øvre luftveier og vica versa. Ytterligere er
5 det viktig å bemerke at oral immunisering kan indusere en antigen-spesifikk IgG-respons i den systemiske avdeling i tillegg til mukosale IgA-antistoffer [McGhee, J.R. et al., (1993); Infect. Agents and Disease 2:55-73].

De fleste løselige og ikke-repliserende antigen er dårlige
10 mukosale immunogen, spesielt ved den perorale rute, sannsynligvis fordi de nedbrytes av fordøyelsesenzymer og har liten eller ingen tropisme for tarmsystemassosiert lymfoid vev (GALT). Følgelig ville det være ønskelig med en fremgangsmåte for å produsere effektive mukosale immunogen
15 og vaksine- og immunogene sammensetninger inneholdende dem.

Av spesiell interesse er *H. pylori*, den spirale bakterie som selektivt koloniserer humane gastriske mucinsekreterende celler og er årsaksagenten i de fleste tilfeller av ikke-tærende gastritt i mennesker. Nylig forskning indikerer at
20 *H. pylori*, som har en høy urease-aktivitet, er ansvarlig for de fleste peptiske sår, samt mange gastriske cancere. Mange studier har foreslått at urease, et kompleks av produktene av *ureA*- og *ureB*-genene, kan være et beskyttende antigen. Det har imidlertid fram til nå ikke vært kjent
25 hvordan en produserer en tilstrekkelig mukosal immunrespons på urease.

Antigen, så som *OspC*, *PspA*, *UreA*, *UreB* eller immunogene fragmenter derav, stimulerer en immunrespons når de administreres til verten. Slike antigener kan, spesielt når
30 de produseres rekombinant, gi en sterkere respons når den administreres i konjunksjon med en adjuvant. Per i dag er alun den eneste adjuvant lisensiert for bruk på mennesker, selv om flere hundre eksperimentelle adjuvanter, så som koleratoksin B ikke har blitt testet. Imidlertid har disse

adjuvantene sine mangler. Selv om koleratoksin B ikke er toksisk på den måte at det forårsaker kolera, er det for eksempel generelt forbundet med ubehag å administrere et toksin assosiert med en sykdom så alvorlig som kolera, spesielt dersom det finnes en ørliten sjanse for små urenheter.

Det vil følgelig være ønskelig å fremme antigenenes immunogenisitet ved andre fremgangsmåter enn anvendelsen av en adjuvant, spesielt i monovalente preparater, og i multivalente preparater, for å kunne anvende slike midler for fremmet immunogenisitet med en adjuvant for å oppnå en enda større immunologisk respons.

Når det gjelder ekspresjon av rekombinante proteiner, er det forventet at fagmannen er kjent med en rekke vektor-systemer tilgjengelig for slik ekspresjon, f.eks. bakterier så som *E. coli* og lignende.

Det er innen faget ikke tidligere vist eller indikert: ekspresjon av et rekombinant lipoprotein hvori lipidering derav er fra ekspresjon av en første nukleinsyresekvens, og den første og andre sekvens, som ikke forekommer naturlig, er tilstøtende, spesielt et slikt lipoprotein hvori den første sekvens koder for en ledersekvens for et *Borrelia*-lipoprotein, fortrinnsvis en ledersekvens for OspA, og enda mer foretrukket hvori den første sekvens koder for en ledersekvens for OspA, og den andre sekvens koder for OspC, eller et immunogent fragment derav, eller gener inneholdende slike sekvenser, eller vektorer inneholdende slike sekvenser, eller fremgangsmåter for slik ekspresjon, eller slike rekombinante lipoproteiner, eller sammensetninger inneholdende slike rekombinante lipoproteiner, eller fremgangsmåter for å fremme immunogenisitet av et protein ved lipidering fra en nukleinsyresekvens som ikke naturlig forekommer med nukleinsyresekvenser som koder for protein-delen av et lipoprotein.

Formål og oppsummering av oppfinnelsen

Det er et formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et rekombinant lipoprotein hvori lipidering derav er fra ekspresjon av en første nukleinsyresekvens og proteinandelen derav er fra ekspresjon av en annen nukleinsyresekvens, og den første og andre sekvens ikke naturlig forekommer sammen; spesielt et slikt lipoprotein hvori den første sekvens koder for en ledersekvens for OspA og hvori den andre sekvens koder for en proteinandel hvori den andre sekvens koder for en proteinandel omfattende OspC, eller et immunogent fragment derav.

Det er et annet formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe ekspresjon av gener og/eller sekvenser som koder for et slikt rekombinant lipoprotein, vektorer derfor og fremgangsmåter for å utføre slik ekspresjon.

Det er et ytterligere formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe immunogene sammensetninger, innbefattende vaksiner, inneholdende de rekombinante lipoproteiner og/eller vektorer for ekspresjon derav.

Fra WO 9308306 er det kjent et hybrid nukleinsyremolekyl omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for en signalsekvens av lipoproteinet OspA og en andre nukleinsyresekvens som koder for et modent protein OspA eller OspB fra *B.burgdorferi*.

WO 9414318 beskriver et hybrid nukleinsyremolekyl som består av en første nukleinsyresekvens som koder for en signalsekvens av et lipoprotein og en andre nukleinsyresekvens som koder for OspA fra *S. pneumoniae*.

I en artikkel av W. S. Probert et. al. "Infection and Immunity", vol 62, 1994, s. 1920-1926 er det beskrevet en studie av flere *Borrelia burgdorferi* antigener for å

undertrykket deres evne til å sette i gang en antistoffrespons i C3H/HeW-mus.

WO 9214488 beskriver mutanter av *S. pneumoniae* som skiller ut en immunogenisk trunkert form av Psp A. proteinet.

- 5 I en artikkel av R.L. Ferrero, "Infection and Immunity", vol. 62, 1994, s. 4981-4989 er det rapportert kloning av genene for UreA og UreB fra *Helicobacter pylori* og felis i en ekspresjonsvektor og som er uttrykt i *E. coli* som translasjonelle fusjonsproteinet.
- 10 Det har overraskende blitt funnet at et immunogent rekombinant lipidert protein, fortrinnsvis OspC eller en del derav, kan uttrykkes i et vektorsystem, fortrinnsvis *E. coli*, uten den toksisitet for vektorsystemet som åpenbares når den native lipoprotein-signalsekvens som koder for
- 15 regionen, foreligger. Dette resultatet har blitt oppnådd ved å erstatte nukleotidsekvensen som koder for den native leder- eller signalsekvens for et lipoprotein med
- 20 nukleotidsekvensen som koder for en leder eller signal av et *Borrelia*-lipoprotein, og mer foretrukket OspA-lederen eller signalsekvensen. Disse rekombinante lipiderte proteiner har vist seg å fremskaffe en immunrespons, innbefattende en mukosal immunrespons.

Det er overraskende at det å sammenkople DNA som koder for en ledersekvens for lipoprotein direkte til DNA som koder

25 for protein uten noen mellomliggende nukleotidsekvenser, kan medføre ekspresjon av et immunogent rekombinant lipoprotein i signifikante mengder uten toksisiteten som foreligger med den native ledersekvens, da tidligere forsøk på å uttrykke rekombinante lipiderte proteiner har vist seg

30 å være lite vellykket. For eksempel rapporterte Fuchs et al. at rekombinant dannet OspC (referert til som pC i denne referansen) med dets native lederprotein kun ble svakt uttrykt i *E. coli* [Mol. Microbiology (1992) 6(4):503-509].

Andre søkere i tillegg til Fuchs forsøkte å erholde lipidert rekombinant OspC ved ekspresjon av den OspC-kodende sekvens i *E. coli* ved anvendelse av pET-vektorsystemet beskrevet i den tidligere omtalte WO 92/14488 for ekspresjon av OspA og anvendelse av de beskrevne pDS12-plasmidsystemene. Imidlertid var OspC knapt detekterbar ved immunoblotting av celleekstrakter ved anvendelse av disse systemene for å uttrykke OspC.

Videre, som diskutert *supra*, var det antatt at en ytterligere nukleotidsekvens, fortrinnsvis en som koder for en peptidsekvens som danner en β -vridning, var nødvendig for ekspresjon av rekombinante lipoproteiner, og immunogenisitet av rekombinante lipoproteiner som tidligere har vært uttrykt, har ikke vært vist.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse som angitt i krav 11, gjør det følgelig mulig å erholde store mengder av rene rekombinante, immunogene lipiderte proteiner, f.eks. OspC, PspA, UreA, UreB og deler derav, hvilket foreløpig ikke har vært mulig.

Den foreliggende oppfinnelse representerer således det første tilfelle av effektiv ekspresjon av et heterologt lipidert protein ved anvendelse av en ikke-nativ, ledersekvens for fortrinnsvis *Borrelia* og mer foretrukket OspA. Oppfinnelsen innbefatter således anvendelse av en ikke-nativ ledersekvens for fortrinnsvis *Borrelia* og mer foretrukket OspA for å uttrykke proteiner som er heterologe med ledersekvensen.

Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen i en utførelsesform et isolert hybrid nukleinsyremolekyl, fortrinnsvis DNA, omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for signalsekvensen fortrinnsvis for et OspA-protein av en *Borrelia*-art, koplet i et åpen translasjonmessig leserammeforhold med en andre nukleinsyresekvens som koder for et modent

heterologt med signalsekvensen, OspC-protein. Mer foretrukket er den første og andre sekvens tilstøtende når det modne protein er naturlig lipidert og separert ved ethvert kodon som koder for en aminosyre, fortrinnsvis cystein, når det modne protein ikke er naturlig lipidert.

Den modne protein kodet for av den andre nukleinsyresekvensen er generelt et lipoprotein, fortrinnsvis et antigen lipoprotein, og mer foretrukket er det modne OspC-lipoprotein av en *Borrelia*-art, fortrinnsvis en stamme av *B. burgdorferi*, mer foretrukket en stamme av *B. burgdorferi* valgt fra OspC undertypefamilier.

Signalsekvensen for OspA-proteinet av en *Borrelia*-stamme kodet for av den første nukleinsyresekvens er fortrinnsvis den av en stamme *B. burgdorferi*, mer foretrukket en stamme *B. burgdorferi* valgt fra B31-, ACA1- og Ip90-familier av stammer.

Hybridgenet tilveiebrakt heri kan i henhold til et ytterligere aspekt av oppfinnelsen settes inn i en ekspresjonsvektor, fortrinnsvis under kontroll av en egnet promoter for ekspresjon av det modne lipoprotein, hvilken ekspresjonsvektor i en egnet vertsorganisme, så som *E. coli*, forårsaker initiell translasjon av et chimerisk molekyl omfattende ledersekvensen og det ønskede heterologe protein i lipidert form, etterfulgt av kløyving av det kimere molekyl med signalpeptidase II og festing av lipidgrupper til den nye terminus for proteinet, hvorved det modne lipoprotein uttrykkes i vertsorganismen.

I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveiebringer det et hybrid nukleinsyremolekyl omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for et lipoprotein, fortrinnsvis et OspC-lipoprotein av en *Borrelia*-art, mer foretrukket en stamme av *B. burgdorferi*, enda mer foretrukket en stamme av *B. burgdorferi* valgt fra OspC-underr-

type familier, eller immunogent fragment derav, og en annen nukleinsyresekvens som koder for en signalsekvens av et uttrykt protein heterologt med proteinet kodet for av den første nukleinsyresekvens og koplet i translasjonsmessig
5 åpent leseramme-forhold med den første nukleinsyresekvens, og som koder for signalsekvensen for et OspA-protein av en *Borrelia*-art.

Som beskrevet over, kan hybridgenet settes inn i en ekspresjonsvektor i lipoproteinet, hvilken ekspresjons-
10 vektor i en egnet vertsorganisme, så som *E. coli*, forårsaker ekspresjon av lipoproteinet fra vertsorganismen.

Det er også overraskende funnet at økt immunogenisitet kan beholdes ved et rekombinant lipoprotein når lipoproteinet uttrykkes ved et hybrid eller chimerisk gen omfattende en
15 første nukleinsyresekvens som koder for en leder- eller signalsekvens og en andre nukleinsyresekvens som koder for proteindelen av et lipoprotein, hvori den første og andre sekvens ikke forekommer naturlig sammen.

Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse også
20 et rekombinant lipoprotein uttrykt ved et hybrid eller chimerisk gen omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for en leder- eller signalsekvens som tilstøter en andre nukleinsyresekvens som koder for proteindelen av lipoproteinet, og den første og andre sekvens forekommer
25 ikke naturlig sammen. Den første og andre sekvens er fortrinnsvis koplet i et åpen translasjonsmessig leseramme-forhold. Den første sekvens kan kode for en senere ledersekvens for et *Borrelia*-lipoprotein, fortrinnsvis ledersekvensen for OspA, og den andre sekvens kan kode for et
30 protein omfattende et antigen, fortrinnsvis OspC, PspA, UreA, UreB og et immunogent fragment derav. Den første og andre sekvens kan foreligge i et gen, og genet og/eller den første og andre sekvens kan være i en vektor egnet for ekspresjon.

Vektoren kan være en nukleinsyre i form av f.eks. plasmider, bakteriofager og integrert DNA, i en bakterie, fortrinnsvis en anvendt for ekspresjon, f.eks. *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, etc., eller en anvendt som en levende vektor, f.eks. *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, etc. Når en ekspresjonsvert anvendes, kan det rekombinante lipoprotein erholdes ved å høste produktet uttrykt *in vitro*, f.eks. ved å isolere det rekombinante lipoprotein fra et bakterielt ekstrakt. Genet kan fortrinnsvis være under kontroll av og derfor være operabelt forbundet til en egnet promoter, og promoteren kan enten være endogen til vektoren, eller være satt inn i vektoren med genet.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer vektorer inneholdende nukleinsyre som koder for det rekombinante lipoprotein og fremgangsmåter for å erholde de rekombinante lipoproteiner og fremgangsmåter for å fremstille vektoren.

Som nevnt, kan det rekombinante lipoprotein ha øket immunogenisitet. Således tilveiebringer ytterligere utførelsesformer av oppfinnelsen immunogene eller vaksinesammensetninger for å indusere en immunologisk respons, omfattende det rekombinante lipoprotein, eller en egnet vektor for *in vivo*-ekspresjon derav, eller begge, og en egnet bærer som angitt i krav 18.

Dokumenter nevnt i denne beskrivelsen, innbefattende de ovenfor nevnte søknader, tilveiebringer typisk ytterligere ingredienser for slike sammensetninger, slik at utilbørlig eksperimentering ikke er nødvendig for at fagmannen skal kunne formulere en sammensetning ut ifra denne beskrivelsen. Slike sammensetninger bør fortrinnsvis inneholde en mengde av det rekombinante lipoprotein eller vektor som uttrykker en tilstrekkelig evne til å fremskaffe en egnet respons. En slik mengde rekombinant lipoprotein eller

- vektor kan være basert på kjente mengder av administrert antigen. Dersom det er en kjent mengde for administrering av et antigen korresponderende til den andre sekvensen uttrykt for det inventive rekombinante lipoprotein, kan for eksempel mengden rekombinant lipoprotein skaleres til om lag den kjente mengde, og mengden vektor kan baseres på mengder av antigen administrert til dyr i eksemplene under og i dokumentene sitert heri uten utilbørlig eksperimentering.
- 10 Den foreliggende oppfinnelse innbefatter også, i andre aspekt, fremgangsmåter for fremstilling av et rekombinant lipoprotein som angitt i krav 11, ved montering av en ekspresjonsvektor, ekspresjon av lipoproteinet fra en vertsansorganisme inneholdende ekspresjonsvektoren, og alternativt isolere og/eller rense det uttrykte lipoprotein. Det isolerende/rensende middel kan være slik at det erholdes rekombinant lipoprotein fritt for urenheter så som lipopolysakkarider og andre bakterielle proteiner. Den foreliggende oppfinnelse innbefatter ytterligere immunogene sammensetninger, så som vaksiner, inneholdende det rekombinante lipoprotein.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

I den følgende detaljerte beskrivelse refereres det til de vedhengte tegninger, hvori:

- 25 Figur 1 er en skjematisk representasjon av en fremgangsmåte for innsetting av plasmid pLF100;

Figur 2 er en skjematisk representasjon av en fremgangsmåte for innsetting av plasmide vektorer pPko9a (stamme Pko) og pB319a (stamme B31);

- 30 Figur 3 er en skjematisk representasjon av fremgangsmåten anvendt for isolering og rensing av lipidert OspC;

Figur 4 er en skjematisk representasjon av fremgangsmåten anvendt for isolering og rensing av ikke-lipidert OspC for sammenligningsformål;

5 Figur 5 viser en SDS-PAGE-analyse av lipidert OspC produsert heri ved ulike trinn av renseprosessen illustrert skjematisk i Figur 3;

Figur 6 viser en SDS-PAGE-analyse av ikke-lipidert OspC produsert heri ved ulike trinn av renseprosedyren som beskrevet i WO 91/09870;

10 Figur 7 er en grafisk representasjon av immunresponsen for mus immunisert med OspC-formuleringer inneholdende antigen fra to OspC-undertyper som målt i anti-OspC ELISA-assay;

15 Figur 8 er en grafisk representasjon av immunresponsen i mus immunisert med en to-undertype OspC-formulering som inneholder alunadjuvant som målt i et anti-OspC ELISA-assay;

Figur 9 er en skjematisk representasjon av en fremgangsmåte for innsetting av plasmidvektor pPA321-L;

20 Figur 10 er en skjematisk representasjon av en fremgangsmåte for innsetting av plasmidvektor pPA321-NL;

Figur 11 er en skjematisk representasjon av fremgangsmåten anvendt ved isolering og rensing av lipidert PspA;

25 Figur 12 er en skjematisk representasjon av fremgangsmåten anvendt ved isolering og rensing av ikke-lipidert PspA for sammenligningsformål;

Figur 13 viser en SDS-PAGE-analyse av lipidert PspA fremstilt heri ved ulike trinn av ekspresjonen og

vertscellefraksjoneringsfremgangsmåte illustrert skjematisk i Figur 11;

Figur 14 viser en SDS-PAGE-analyse for ikke-lipidert PspA fremstilt heri ved ulike trinn av ekspresjonen og
5 vertscellefraksjoneringsprosedyren illustrert skjematisk i Figur 12; og

Figur 15 viser en SDS-PAGE-analyse av PspA-kolonne-kromatografiresultater illustrert skjematisk i Figur 11 og 12.

10

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Som gitt over, vedrører den foreliggende oppfinnelse nukleinsyresekvens som koder for OspA-signalsekvens som kan uttrykke lipiderte proteiner heterologe med OspA-protein, fortrinnsvis et OspC-protein av en *Borrelia*-art, eller et
15 fragment derav, og anvendelsen av nukleinsyresekvensen som koder for signalsekvensen av et protein heterologt med proteinet som skal uttrykkes eller å uttrykke det lipiderte OspC-protein av en *Borrelia*-art for å fremstille et rekombinant lipoprotein.

20 Den ledende aminosyresekvens og kodende DNA-sekvens for ACA-stammen av *B. burgdorferi* er som følger:

N K K Y L L G I G L I L A L I A C (Sek. Id. Nr.: 1)

25 ATG AAA AAA TAT TTA TTG GGA ATA GGT CTA ATA TTA GCC TTA ATA
GCA TGC (Sekv. Id. Nr.: 2)

De korresponderende aminosyreledersekvenser og kodende DNA-sekvenser for OspA og andre stammer av *B. burgdorferi* er kjent innen faget og kan ut ifra denne beskrivelse anvendes

i foreliggende oppfinnelsen uten utilbørlig eksperimentering.

Det settes sammen et hybrid genmolekyl omfattende kodende OspA-ledersekvens og genet som koder for det heterologe protein som skal uttrykkes, fortrinnsvis *ospC*- eller *pspA*-genet, arrangert i et translasjonsmessig leserammeforhold med *ospA*-genfragmentet.

For fremstilling av det lipiderte protein kan det egnete hybridgenmolekyl inkorporeres i en egnet ekspresjonsvektor og det resulterende plasmid inkorporeres i en ekspresjonsstamme av *E. coli* eller annen egnet vertsorgansime. Vektoren kan også være en bakteriofag eller integrert DNA.

Det lipiderte protein uttrykkes av cellene under vertsorgansimens vekst. Det lipiderte protein kan gjenvinnes fra vertsorganismen i rensert form ved enhver heniktsmessig fremgangsmåte som separerer det lipiderte protein i ikke-denaturert form. Et skjema for en fremgangsmåte ifølge dette aspekt av oppfinnelsen er gitt i Figur 3.

Etter cellevekst og induksjon av protein underkastes cellene fryse-tinings-lysering og DNase I-behandling. Lysatet behandles med en detergent som er selektiv for oppløsning av det rekombinante, lipiderte protein fremfor andre bakterielle proteiner i lysatet. Selv om den foreliggende oppfinnelse fortrinnsvis anvender polyetylglykol-tert-oktylfenyleter med formelen $t\text{-Okt-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$ hvori $X=7-8$ som detergenten (kommersielt tilgjengelig som, og heretter referert til som, TRITON™ X-114), men det kan anvendes andre materialer som utviser en lignende selektiv løselighet for det lipiderte protein samt faseparasjonsegenskapen under milde betingelser, som diskutert under.

Etter tilsats av TRITON™ X-114 varmes blandingen til en mild temperaturheving på fortrinnsvis 35-40°C, hvorved løsningen blir tåkete når faseparasjon inntreffer. Renseprosedyren for slik faseparasjon bør inntreffe under

5 betingelser for å unngå vesentlig denaturering eller annen vesentlig svekkelse av de immunologiske egenskaper for det rekombinante lipoprotein.

Sentrifugering av den tåkete blandingen resulterer i separasjon av blandingen i tre faser, nemlig en detergent-

10 fase inneholdende om lag 50% eller mer av det rekombinante lipidate protein og en liten mengde (om lag 5 vekt%) av andre proteiner, en vandig fase inneholdende resten av de andre proteiner og en faststoffpellet av celleresidu. Detergentfasen separeres fra den vandige fase og faststoff-

15 pelleten for ytterligere behandling.

Endelig rensing av proteinet utføres fortrinnsvis ved å prosessere detergentfasen for å tilveiebringe et rekombinant lipidert protein med en renhet på minst om lag 80 vekt%, og som er i hovedsak fri for andre forurensninger så

20 som bakterielle proteiner, og lipopolysakkarider (LPS), og som har endotoksinnivåer kompatible med human administrering.

Slik rensing utføres hensiktsmessig ved kolonnekromatografi. Slik kromatografisk rensing kan innbefatte en første

25 kromatografisk rensing ved anvendelse av en første kromatografisk kolonne med pH, ionestyrke og hydrofobisitet for å binde bakterielle proteiner, men ikke det rekombinante lipiderte protein.

Slik første kromatografisk rensing kan utføres ved å sette

30 den detergente fase på en første kromatografisk kolonne, og eluatet, som inneholder det rensede lipiderte protein, samles opp. Den bundne fraksjon inneholder i hovedsak alle bakterielle urenheter fra detergentfasen. Det kromato-

grafiske medium for slik første renseoperasjon kan være DEAE-Sephacel- eller DEAE-Sepharose-kolonne.

Den eluerte væske fra den første kromatografiske renseoperasjon kan underkastes ytterligere rensing på en andre kromatografiske kolonne. Den eluerte væske settes på en kolonne med pH, ionestyrke og hydrofobisitet som vil selektivt binde det rekombinante lipiderte protein til den andre kromatografiske kolonne, mens bakterielle kontaminanter og LPS passerer gjennom kolonnen. Det kromatografiske medium for den andre kromatografiske kolonne kan være S-Sepharose.

Fortrinnsvis renses det rekombinante lipoprotein til 80% renhet eller til mer enn 80% renhet, f.eks. 85-90%, sogar 90-95% eller mer enn 95% renhet. Det lipiderte proteinholdige materiale kan deretter formuleres til immunogene sammensetninger, fortrinnsvis vaksiner.

Den vaksine- eller immunogene sammensetning fremskaffer immunrespons i et vertsindivid som produserer en immunologisk respons, så som antistoffer som kan være opsonerende eller baktericidale. Dersom et individ immunisert med et rekombinant lipoprotein ifølge oppfinnelsen skulle bli angrepet, kan en slik immunologisk respons inaktivere den angripende organisme. Ytterligere kan opsonerende eller baktericidale antistoffer tilveiebringe beskyttelse ved alternative mekanismer.

Immunogene sammensetninger innbefattende vaksiner kan fremstilles som injiserbare medikamenter, flytende løsninger eller emulsjoner eller formuleringer for oral, nasal eller annen hulromsadministrasjon, f.eks. vaginal, rektal, etc. Orale formuleringer kan være flytende løsninger, emulsjoner og lignende, f.eks. eliksirer, eller faste preparat, f.eks. tabletter, småkapsler, kapsler, piller, væskefylte kapsler, gelatin og lignende. Nasale

preparat kan være flytende og kan administreres via aerosol, klemmespray- eller pumpespray-dispensere. Dokumenter sitert heri tilveiebringer eksempler på formuleringstyper og ingredienser derfor, innbefattende søknadene sitert over.

Immunogener kan blandes med farmasøytisk akseptable eksipienter som er kompatible med immunogenene. Slike eksipienter kan innbefatte vann, saltoppløsning, dekstrose, glyserol, etanol og kombinasjoner derav. De immunogene sammensetninger og vaksiner kan ytterligere inneholde hjelpesubstanser, så som fuktgivende midler eller emulgatorer, pH-bufrende midler eller adjuvanter for å fremme deres effektivitet. Immunogene sammensetninger og vaksiner kan administreres parenteralt, ved injeksjon subkutant eller intramuskulært. De immunogene preparat og vaksiner administreres på et vis som er kompatibelt med doseringsformuleringene, og i slike mengder at de er terapeutisk effektive, immunogene eller beskyttende. Mengden som skal administreres, avhenger av individet som skal behandles, innbefattende, for eksempel kapasiteten individets immunsystem har til å syntetisere antistoffer, og, dersom nødvendig, å produsere en celle-mediert immunrespons. Nøyaktige mengder aktiv ingrediens som er nødvendig for administrering, avhenger av legens vurdering på bakgrunn av faktorer som alder, vekt, kjønn, tilstand for vert eller pasient som skal administreres. Imidlertid bestemmes egnede doseringsintervall lett av fagmannen og kan være i størrelsesorden mikrogram immunogen. Egnede kurer for initell administrering og forsterkningsdoser varierer også, men kan innbefatte en initell administrering etterfulgt av påfølgende administreringer. Doseringer kan også avhenge av administreringsrute og vil variere ut ifra vertens størrelse.

Konsentrasjon av immunogen i en immunogen sammensetning ifølge oppfinnelsen er generelt i området 1-95%. En vaksine

eller immunogen sammensetning som inneholder antigen materiale fra kun ett patogen er en monovalent vaksine. Vaksiner eller immunogene sammensetninger som er multivalente eller som inneholder antigen materiale fra flere
5 patogener (også kjent som kombinerte vaksiner eller kombinerte immunogene sammensetninger) tilhører også oppfinnelsen. Slike kombinerte vaksiner eller immunogene sammensetninger inneholder, for eksempel, materiale fra en rekke patogener eller fra en rekke stammer av det samme patogen,
10 eller fra kombinasjoner av en rekke patogener.

Immunostimulatoriske midler eller adjuvanter har blitt anvendt i mange år for å forbedre vertens immunrespons mot for eksempel vaksiner eller immunogene sammensetninger. Intrinsiske adjuvanter, så som lipopolysakkarider, er
15 normalt komponenter av drepte eller svekkede bakterier anvendt som vaksiner eller immunogene sammensetninger. Ekstrinsiske adjuvanter er immunomodulatorer som er typisk ikke-kovalent forbundet til antigen og er formulert for å fremme vertens immunrespons. Noen av disse adjuvanter er
20 imidlertid toksiske og kan forårsake uønskede bivirkninger, hvilket gjør dem uegnet for bruk på mennesker og mange dyr. Faktisk anvendes kun alun som en adjuvant i humane og veterinære vaksiner.

I lys av de vanskeligheter som er assosiert med anvendelsen
25 av adjuvanter, er det en fordel ved foreliggende oppfinnelse at det rekombinante lipiderte proteiner er de mest immunogene former og evner å fremskaffe immunresponser både uten enhver adjuvant og med alun.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen beskrevet i
30 denne beskrivelsen.

EKSEMPLER**EKSEMPEL 1****Konstruksjon av en vektor inneholdende et gen som koder for
ledersekvensen for *OspA***

5 Plasmid pBluescript KS+ (Stratagene) ble fordøyd med *Xba*I
og *Bam*HI og ligert med et 900 bp *Xba*I-*Bam*HI-DNA-fragment
inneholdende den fullstendige kodende region for *B. burg-*
dorferi-stamme ACA1 *ospA*-gen for å danne en lipoprotein-
fusjonsvektor pLF199. Denne prosedyren er vist skjematisk i
10 Figur 1.

Vektoren, pLF100, har blitt deponert hos the American Type
Culture Collection i Rockville, Maryland den 2. februar,
1995 under tiltredelsesnr. 69750. Denne deponeringen ble
gjort i henhold til betingelsene i Budapestavtalen.

15 **EKSEMPEL 2****Kontruksjon av en pET9a-ekspresjonsvektor inneholdende et
hybrid *ospA-ospC*-gen**

Spesifikt utformede oligonukleotidprimere ble anvendt i en
polymerase-kjedereaksjon (PCR) for å amplifisere andelen av
20 *ospC*-genet nedstrøms for det cysteinkodende kodon som
terminerer den signalpeptid-gjenkjenningskodende sekvens
for den C-terminale ende av den kodende region fra Pko- og
B31-stammene for *B. burgdorferi*.

5'-ende primeren hadde henholdsvis nukleotidsekvensene for
25 Pko- og B31-stammene:

5'-GGC GCG CAT GCA ATA ATT CAG GGA AAG G-3' (Pko) (Sekv.
Id. Nr.: 3)

5'-GGC GCG CAT GCA ATA ATT CAG GGA AAG A-3' (B31) (Sekv. Id. Nr.: 4)

mens 3'-ende primeren hadde nukleotidsekvensen:

5'-CGC GGA TCC TTA AGG TTT TTT TGG-3' (B31 & Pko) (Sekv. Id. Nr.: 5).

PCR-amplifikasjonen ble utført i en DNA "Thermal Cycler" (Perkin-Elmer Cetus) i 25 syklere med denaturering i 30 s ved 94°C, "annealing" ved 37°C i 1 min og forlengelse ved 72°C i 1 min. En endelig forlengelse ble utført ved 72°C i 5 min ved avslutning av syklene. Produktet ble rensed ved anvendelse av Gene Clean II kit (B10 101), og det rensede materiale ble fordøyd med SphI og BamHI. Denne prosedyren innførte en stum mutasjon i Pko *ospC*-genet, hvilken mutasjon endret kodonet for aminosyre 60 i det modne protein fra ATT til ATA.

Materialene produsert for Pko- og B31-*B. burgdorferi*-stammer ble håndtert identisk fra og med dette punkt, og følgelig er kun den ytterligere behandling av Pko-stamme-*OspC*-materialet beskrevet.

Plasmid pLF100 (Eksempel 1) ble fordøyd med SphI og BamHI, og den amplifiserte Pko-sekvens ble ligert inn i plasmidet for å danne plasmid pPko 100 (pB31 100 for B31-stammen) inneholdende et hybrid *ospA/ospC*-gen. Hybridgenet ble fjernet fra plasmid pPko 100 ved fordøying med NdeI og BamHI og klonet inn i NdeI- og BamHI-setene i plasmidvektoren pET9 for å plassere *ospA/ospC*-hybridgenet under kontroll av en T7-promoter og effektive translasjonsinitieringssignaler fra bakteriofag T7, som angitt i Figur 2. Det resulterende plasmid er betegnet pPko9a (pB319a for B31-stammen).

EKSEMPEL 3**Ekspresjon og rensing av lipidert OspC**

- Plasmid pPko9a, fremstilt som beskrevet i Eksempel 2, ble anvendt for å transformere *E. coli*-stammer BL21 (DE3) (pLysS) og HMS174(DE3) (pLysS). Det transformerte *E. coli* ble inokulert i LB-media med 30 µg/ml kanamycinsulfat og 25 µg/ml kloramfenikol med en hastighet på 12 ml kultur for hver liter som ble preppet. Kulturen ble dyrket over natten i en flaskeryster ved 37°C.
- 10 Den neste morgenen ble 10 ml av dyrkningsmediet fra dagen før overført til 1 l LB-medium inneholdende 30 µg/ml kanamycinsulfat, og kulturen ble dyrket i en flaskeryster ved om lag 37°C til et nivå på $OD_{600}=0,6-1,0$ (selv om vekst opptil $OD_{600}=1,5$ kan fremkalles), i om lag 3-5 t.
- 15 Dyrkningsmediet ble tilsatt isopropylgalaktosid (IPTG) til en endelig konsentrasjon på 0,5 mM, og dyrkningsmediet ble dyrket 2 t ved om lag 30°C. Kulturen ble høstet og prøver analysert på Coomassie-fargede SDS-PAGE geler (Figur 5). Kulturmediet ble avkjølt til om lag 4°C og sentrifugert ved
- 20 10.000 × G i 10 min. Supernatanten ble kastet mens cellepelleten ble oppsamlet. Renset lipidert OspC ble gjenvunnet fra pelleten ved å utføre prosedyren vist skjematisk i Figur 3 og beskrevet under.
- Cellepelleten ble først resuspendert i PBS i 1/10 av
- 25 volumet. Cellesuspensjonen ble frosset og lagret ved -20°C eller under, dersom ønskelig. Etter frysing av celleduspensjonen, ble cellene tint til romtemperatur (om lag 20-25°C) hvilket forårsaker at cellene lyserer. DNase I ble satt til det tinede materiale til en konsentrasjon på 1
- 30 µg/ml, og blandingen ble inkubert i 30 min ved romtemperatur, hvilket resulterte i en reduksjon i materialets viskositet.

Det inkuberte materiale ble avkjølt på is til en temperatur under 10°C, og Triton™ X-114 ble satt til i form av en 10 vekt% stammeløsning til en endelig konsentrasjon på 0,3-1 vekt%. Blandingen ble holdt på is i 20 min. Den avkjølte
5 blanding ble deretter oppvarmet til om lag 37°C og holdt ved denne temperaturen i 10 min.

Løsningen ble svært tåkete ettersom fase-separasjon inntraff. Den tåkete blanding ble deretter sentrifugert ved om lag 20°C i 10 min ved 12.000 × G, hvilket forårsaket
10 separasjon av blandingen til en nedre detergentfase og en øvre klar vandig fase og en fast pellet.

Analyse av fasene fraksjonert ved SDS-PAGE (Figur 5) avslørte at OspC i detergentfasen forelå i sin lipiderte form. Detergentfasen ble separert fra de andre to fasene og
15 avkjølt til 4°C uten røre opp pelleten.

Buffer A, nemlig 50 mM Tris pH 7,5, 2 mM DETA og 10 mM NaCl og 0,3% polyetylglykol-tert-oktylfenyleter med formelen $t\text{-okt-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$ hvori $x=9\text{-}20$ som detergenten (kommersielt tilgjengelig som, og referert til heretter
20 som, Triton™ X-100), ble satt til den avkjølte detergentfase for å rekonstituere tilbake til 1/3 av det originale volum. Den resulterende løsning kan fryses og lagres for senere behandling som beskrevet under, eller den kan umiddelbart underkastes en slik behandling.

25 En DEAE-Sepharose CL-6B kolonne ble fremstilt i et volum på 1 ml/10 ml av detergentfasen og ble vasket med 2 volumer Buffer C, nemlig 50 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,3 vekt% Triton™ X-100, og deretter med 4 volum Buffer B, nemlig 50 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,3 vekt% Triton™ X-
30 100.

Detergentfasen ble deretter satt på kolonnen, og den gjennomstrømmende væske inneholdende OspC ble oppsamlet.

Kolonnen ble vasket med 2 volum Buffer B, og den eluerte væske ble samlet opp. Den kombinerte eluerte væske var en vandig løsning av renset OspC som kan fryses eller lagres.

5 Kolonnen kan frigjøres for bakterielle proteiner for gjenbruk ved å eluere med 4 volum Buffer C.

Ytterligere og endelig rensing av den eluerte væske fra DEAE-Sepharose-kolonnen ble utført ved kromatografi på S-Sepharose Fast Flow. Den eluerte væske fra DEAE-Sepharose-kolonnen ble først surgjort til pH 4,3 ved tilsats av 1 M sitronsyre, og det surgjorte materiale ble satt på S-Sepharosekolonnen. S-Sepharose Fast Flow-kolonnen hadde vært vasket med 3 kolonnevolum av Buffer A og deretter med 5 kolonnevolum av Buffer A laget opptil pH 4,3. OspC binder til kolonnen. Den påsatte kolonne ble vasket med 4 15 kolonnevolum med pH 4,3 Buffer A etterfulgt av 4 kolonnevolum av pH 5,5 Buffer A.

Høy-renset OspC ble eluert fra kolonnen ved anvendelse av Buffer A, justert til pH 6,0 med 1 N HCl. Et skjema for renseprosessen beskrevet i dette eksemplet er gitt i Figur 20 3.

Den vandige løsning av høy-renset lipidert OspC erholdt ved de kromatografiske fremgangsmåter ble analysert ved Coomassie-fargete geler (Figur 5) og bekreftet å være OspC i høy-renset form ved immunoblottanalyse ved anvendelse av 25 anti-OspC-polyklonalt antiserum fra kanin. Produktets renhet ble estimert å være større enn 80%.

Ved denne fremgangsmåten ble om lag 2-4 mg rent OspC gjenvunnet fra 1 liter kultur av BL21-verten, og om lag 1-2 mg ren OspC ble gjenvunnet fra 1 liter kultur av HMS 174- 30 verten.

EKSEMPEL 4**Ekspresjon og rensing av ikke-lipidert OspC**

E. coli JM 109-transformanter inneholdende plasmidvektor med kromosomalt genfragment som koder for ikke-lipidert
5 OspC ble fremstilt og dyrket som beskrevet i WO 91/09870. Kulturene ble høstet, dyrkningsmediet sentrifugert ved 10.000 × G i 10 min ved 4°C, supernatanten kastet og pelletene samlet opp.

10 Cellepelleten ble først resuspendert i lyseringsbuffer A, nemlig 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 5% glyserol og 0,4 mg/ml lysozym, og suspensjonen ble rørt i 20 min ved romtemperatur. TRITON™ X-100 ble deretter satt til cellesuspensjonen til en konsentrasjon på 1 vekt%,
15 DNase I ble satt til til en konsentrasjon på 1 µg/ml, og suspensjonen ble rørt ved romtemperatur i ytterligere 20 min for å utføre cellelysering. Natriumklorid ble deretter satt til cellesuspensjonen til en konsentrasjon på 1 mM, og suspensjonen ble igjen rørt ved 4°C i ytterligere 20 min.
20 Suspensjonen ble deretter sentrifugert ved 20.000 × G i 30 min, og den resulterende supernatant ble separert fra pelleten og pelleten ble kastet.

Den separerte supernatant ble dialysert mot en buffer inneholdende 50 mM Tris pH 2, 2 mM EDTA. Supernatanten ble deretter satt på en DEAE-Sepharose-CL-6B-kolonne, og det
25 ikke-lipiderte OspC ble samlet i den væsken som strømmet gjennom kolonnen. Den eluerte væske ble dialysert mot en 0,1 M fosfatbuffer, pH 6,0.

Det dialyserte eluat ble deretter bundet til en S-Sepharose fast flow-kolonne ekvilibrert med 0,1 M fosfatbuffer, pH
30 6,0. Renset ikke-lipidert OspC ble deretter eluert fra S-Sepharosekolonnen ved anvendelse av dialyseringsbuffer med

0,15 M NaCl tilsatt. Et skjema for renseprosessen er gitt i Figur 4.

Den vandige løsning av høyrenset ikke-lipidert OspC ble analysert på Coomassie-fargede geler (Figur 6). Produktets renhet ble estimert til å være større enn 80%.

EKSEMPEL 5

Immunogenitet for rekombinant lipidert OspC

Renset, rekombinant lipidert OspC, fremstilt som beskrevet i Eksempel 3, ble undersøkt med hensyn på immunogenisitet i mus og sammenlignet med det fra ikke-lipidert OspC fremstilt som beskrevet i Eksempel 4. For dette forsøket ble 4 til 8 uker gamle C3H/He hunnmus immunisert døgn 0 og forsterket døgn 21 og 42. Alle dyr ble gitt 1 µg hver av OspC uttrykt fra B31- og Pko-gener per dose. Både lipiderte og ikke-lipiderte former av antigenet ble undersøkt. Formuleringer ble undersøkt med og uten alun som en adjuvant.

Det ble tatt blodprøver av representative dyr døgn 21, 42, 63 og 91. ELISA-testing ble utført på disse sera ved anvendelse av renset ikke-lipidert OspC som belegningsantigenet.

Testresultatene fra mus immunisert med ikke-adjuventert antigen (Figur 7) viser at kun mus immunisert med det lipiderte antigen gir en detekterbar ELISA-respons. Imidlertid viser immunresponsen for dyr immunisert med antigen formulert på alun (Figur 8) at to typer antigen gir sammenlignbare ELISA-responser, og disse responsene utvikles raskere.

EKSEMPEL 6**Konstruksjon av en pET9a-ekspressjonsvektor inneholdende et hybrid *ospA/pspA*-gen**

Spesifikt utformede oligonukleotidprimere ble anvendt i en
5 PCR-reaksjon for å amplifisere den interessante del av
pspA-genet (i dette tilfellet aminosyre 1-321) fra *S.*
pneumoniae-stammen RX1.

5'-ende primerene hadde nukleotidsekvensen:

5'-GGG ACA GCA TGC GAA GAA TCT CCC GTA GCC AGT-3' (PspN1)
10 (Sekv. Id. nr.: 6).

3'-ende primeren hadde nukleotidsekvensen:

5'-GAT GGA TCC TTT TGG TGC AGG AGC TGG TTT-3' (PspC370)
(Sekv. Id. nr.: 7).

PCR-reaksjonen var som følger: 94°C i 30 s for å denaturere
15 DNA, 42°C i 1 min for å "anneal" DNA, og 72°C i 1 min for
forlengelse av DNA. Dette ble utført i 25 syklar,
etterfulgt av en 5 min forlengelse ved 72°C. Denne
fremgangsmåten innførte et stopp-kodon ved aminosyre 315.
PCR-produktet ble rensert ved anvendelse av "Gene Clean II
20 method (Bio101)" og fordøyd med SphI og BamHI.

Plasmidet pLF100 (Eksempel 1) ble fordøyd med SphI og
BamHI, og det amplifiserte gen ble ligert til dette
plasmidet for å danne plasmidet pLF 321, som inneholdt det
hybride *ospA-pspA*-genet. Hybridgenet ble slått ut av pLF321
25 ved fordøyelse med NdeI og BamHI og klonet inn i NdeI- og
BamHI-setene i plasmidvektoren pET9a for å sette *ospA-pspA*-
hybridgenet under kontroll av en T7-rpomoter. Det resulter-
ende plasmid kalles pPA321-L. Denne fremgangsmåten er vist
skjematisk i Figur 9.

EKSEMPEL 7**Konstruksjon av en pET9a-ekspressjonsvektor inneholdende pspA-genet**

Spesifikt utformede oligonukleotidprimere ble anvendt i en
5 PCR-reaksjon for å amplifisere den interessante del av
pspA-genet (i dette tilfelle aminosyre 1-321) fra *S.*
pneumoniae-stammen RX1 ved anvendelse av plasmid pPA321-L
ifølge Eksempel 6.

5'-ende primeren hadde nukleotidsekvensen:

10 5'-GCT CCT GCA TAT GGA AGA ATC TCC CGT AGC C-3') (PspNL-2)
(Sekv. Id. nr.: 8)

3'-endeprimeren hadde nukleotidsekvensen:

5'-GAT GGA TCC TTT TGG TGC AGG AGC TTT-3' (PspC370) (Sekv.
Id. nr.: 7).

15 PCR-reaksjonen var som følger: 94°C i 30 s for å denaturere
DNA; og 72°C i 1 min for "annealing" og forlengelse av DNA.
Dette ble utført i 25 syklene, hvilket ble etterfulgt av en
5 min forlengelse ved 72°C. Denne prosedyren innførte et
stopp-kodon ved aminosyre 315. PCR-produktet ble rensert ved
20 anvendelse av "Gene Clean II method (Bio 101)" og fordøyd
med NdeI og BamHI. Det fordøyde PCR-produkt ble klonet inn
i NdeI- og BamHI-setene i plasmidvektoren pET9a for å sette
pspA-genet under kontroll av en T7-promoter. Det resulterende
plasmid kalles pPA321-NL. Denne prosessen er gitt
25 skjematisk i Figur 10.

EKSEMPEL 8**Ekspressjon og rensing av lipidert PspA**

Plasmid pPA321-L ble anvendt for å transformere *E. coli*-
stamme BL21(DE3)pLyS. Det transformerte *E. coli* ble

inokulert i LB-media inneholdene 30 µg/ml kanamycinsulfat og 25 µg/ml kloramfenikol. Kulturen ble dyrket over natten i en flaskeryster ved 37°C.

5 Morgenen etter ble 50 ml av kulturen fra dagen før overført til 1 l LB-medium inneholdende 30 µg/ml kanamycinsulfat, og kulturen ble dyrket i en flaskeryster ved 37°C til et nivå på $OD_{600} = 0,6-1,0$ i om lag 3-5 t. Dyrkningsmediet ble tilsatt IPTG til en endelig konsentrasjon på 0,5 mM, og kulturen ble dyrket i ytterligere 2 t ved 30°C. Kulturene 10 ble høstet ved sentrifugering ved 4°C ved 10.000 × G, og cellepelleten ble samlet opp. Lipidert PspA ble gjenvunnet fra cellepelleten.

15 Cellepelleten ble resuspendert i PBS ved 30 g våt cellepasta per liter PBS. Cellesuspensjonen ble fryst og lagret ved -20°C. Cellene ble tint til romtemperatur for å utføre lysering. DNase I ble satt til det tinte materiale til en endelig konsentrasjon på 1 µg/ml, og blandingen ble inkubert i 30 min ved romtemperatur, hvilket resulterte i en reduksjon i materialets viskositet.

20 Materialet ble avkjølt på et isbad til under om lag 10°C, og Triton™ X-114 ble satt til i form av en stammeløsning til en endelig konsentrasjon på 0,3-1%. Blandingen ble holdt på is i 20 min. Den avkjølte blanding ble deretter oppvarmet til 37°C og holdt ved denne temperaturen i 10 25 min. Dette førte til at løsningen ble svært tåkete ettersom fase-separasjon inntraff. Blandingen ble deretter sentrifugert ved om lag 20°C i 10 min ved 12.000 × G, hvilket medførte en separasjon av blandingen i en nedre detergent-fase, en øvre klar vandig fase og en pellet. Det lipiderte 30 PspA ble skilt ut i detergentfasen. Detergentfasen ble separert fra to andre faser, fortynnet 1:10 med buffer omfattende 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl pH 7,5 og lagret ved -20°C.

En Q-Sepharose-kolonne ble fremstilt i et volum på 1 ml per 5 ml fortynnet detergentfase. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum buffer omfattende 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3% Triton™ X-100, 1 M NaCl pH 4,0 og deretter ekvilibrert med 5-10 kolonnevolum 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3% Triton™ X-100, 10 mM NaCl pH 4,0. pH i det fortynnete fasematerial ble justert til 4,0, hvorved presipitasjon inntraff. Dette materialet ble ført gjennom en 0,2 µM celluloseacetats-filtreringsenhet for å fjerne det presipiterte material.

Den filtrerte fortynnete detergentfase ble satt på Q-Sepharose-kolonnen og den eluerte væske (inneholdende PA321-L) ble samlet opp. SDS-PAGE-analyse for dette trinnet er vist i Figur 15. Kolonnen ble vasket med 1-2 kolonnevolum av 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3% Triton™ X-100, 10 mM NaCl pH 4,0, og den eluerte væske ble slått sammen med den tidligere eluerte fraksjon. pH i de sammenslåtte eluerte væsker ble justert til 7,5. Det bundne materiale, kontaminerende *E. coli*-proteiner, ble eluert fra Q-Sepharose med 2 kolonnevolum 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3% Triton™ X-100, 1 M NaCl pH 4,0. En skisse for renseprosessen beskrevet i dette eksemplet er gitt i Figur 11.

EKSEMPEL 9

Ekspresjon og rensing av ikke-lipidert PspA

Plasmid pPA321-NL ble anvendt for å transformere *E. coli*-stammen BL21(DE3)pLyS. Det transformerte *E. coli* ble inokulert i LB-medium inneholdende 30 µg/ml kanamycinsulfat og 25 µg/ml kloramfenikol. Kulturen ble dyrket over natten i en flaskeryster ved 37°C.

Morgenen etter ble 50 ml av kulturen fra dagen før overført til 1 l LB-medium inneholdende 30 µg/ml kanamycinsulfat, og kulturen ble dyrket i en flaskeryster ved 37°C til et nivå på OD₆₀₀ = 0,6-1,0 i om lag 3-5 t. Dyrkningsmediet ble tilsatt IPTG til en endelig konsentrasjon på 0,5 mM, og

kulturen ble dyrket i ytterligere 2 t ved 30°C. Kulturene ble høstet ved sentrifugering ved 4°C ved 10.000 × G, og cellepelleten ble samlet opp. Lipidert PspA ble gjenvunnet fra cellepelleten.

5 Cellepelleten ble resuspendert i PBS ved 30 g våt cellepasta per liter PBS. Cellesuspensjonen ble fryst og lagret ved -20°C. Cellene ble tint til romtemperatur for å utføre lysering. DNase I ble satt til det tinte materiale til en endelig konsentrasjon på 1 µg/ml, og blandingen ble
10 inkubert i 30 min ved romtemperatur, hvilket resulterte i en reduksjon i materialets viskositet. Blandingen ble sentrifugert ved 4°C ved 10.000 × G, og cellesupernatanten som inneholdt ikke-lipidert PspA ble tatt vare på. Pelleten ble vasket med PBS, sentrifugert ved 4°C ved 10.000 × G, og
15 cellesupernatanten ble slått sammen med tidligere cellesupernatant.

En MonoQ-kolonne (Pharmacia) ble fremstilt i et volum på 1 ml per 2 ml cellesupernatant. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum av en buffer omfattende 50 mM Tris, 2 mM EDTA,
20 1 M NaCl pH 7,5 og deretter ekvibrert med 5-10 kolonnevolum av en buffer omfattende 50 mM Tris, 2mM EDTA, 10 mM NaCl pH 7,5. Cellesupernatant-poolen ble satt på Q-Sepharose-kolonnen, og den eluerte væske ble samlet opp. Kolonnen ble vasket med 2-5 kolonnevolum av 50 mM Tris, 2
25 mM EDTA, 10 mM NaCl pH 7,5, og den eluerte væske ble slått sammen med den tidligere eluerte væske.

Elueringen av bundne proteiner begynte med det første trinn av en 5-10 kolonnevolums vask med 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl pH 7,5. Det andre elueringstrinn var en 5-10
30 kolonnevolums vask med 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl pH 7,5. Det ikke-lipiderte PspA var inneholdt i denne fraksjonen. SDS-PAGE-analyse av dette trinnet er gitt i Figur 15. De gjenværende bundne kontaminerende proteiner

ble fjernet med 50 mM Tris og 2 mM EDTA pH 7,5 med 300 mM-1 M NaCl.

Et skjema for renseprosessen beskrevet i dette eksemplet er gitt i Figur 12.

5 EKSEMPEL 10

Immunogenisitet for rekombinant lipidert PspA

Renset rekombinant lipidert PspA, fremstilt som beskrevet i Eksempel 8, ble undersøkt med hensyn på immunogenisitet i mus og sammenlignet med det fra ikke-lipidert PspA fremtilt som beskrevet i Eksempel 9. I dette forsøket ble CBA/N-mus immunisert subkutant bak i nakken med 0,5 ml av de følgende formuleringer av de indikerte PspA-antigenkonsentrasjoner.

Formulering	PspA-antigen-konsentrasjon [ng/ml]
Nativt PspA-molekyl av RX1-stammen (nativt RX1)	200
Ikke-lipidert rekombinant PspA (pPA-321-NL) Alene i PBS*	200 og 1000
Ikke-lipidert rekombinant PspA (pPA-321-NL) Adsorbent til alun	200 og 1000
Lipidert rekombinant PspA (pPA-321-L) Alene i PBS	200 og 1000
Lipidert rekombinant PspA (pPA0321-NL) Adsorbent til alun*	200 og 1000
Alun*	0
PBS	0

*Alun var hydrogel med en konsentrasjon på 200 µg/ml

15 Fire mus ble immunisert dogn 0 og 21 for hver dose av formuleringene. Det ble deretter tatt blodprøver fra musene på dogn 35, og de ble påfølgende tilført *S. pneumoniae* av A66-stammen. Overlevelsesdøgnene for mus etter tilførsel

- ble notert, og det ble tatt blodprøver fra overlevende mus dogn 36, 37, 42 og 46. Blodet fra disse etterfølgende blodprøvene ble undersøkt med hensyn på antall kolonidannende enheter (CFU) *S. pneumoniae*/ml. Sera tatt dogn 35 ble
- 5 undersøkt med hensyn på antistoffer mot PspA ved anvendelse av ELISA. Dødsdøgnet for angrepne mus er gitt i den følgende tabell.

Overlevelse for immune og ikke-immune CBA/N-mus							
Gruppe	Immunisering			Effektivitet			
	Antigen	dose i µg	Alun	Dager til død	p-verdi til død	Levende :Død	p-verdi Overlevelse
#1A	pPA-321-L	1,0	-	4x>14	0,01	4:0	0,01
#1B	pPA-321-L	0,2	-	4x>14	0,01	4:0	0,01
#2A	pPA-321-L	1,0	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#2B	pPA-321-L	0,2	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#3A	pPA-321-NL	1,0	-	1,1,2,2	n.s.	0:4	n.s.
#3B	pPA-321-NL	0,2	-	1,1,2,>15	n.s.	1:3	n.s.
#4A	pPA-321-NL	1,0	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#4B	pPA-321-NL	0,2	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#5	FL-Rx1	0,2	-	4x>14	0,01	4:0	0,01
#6	intet	0,0	+	1,1,3,6	n.s.	0:4	n.s.
#7	intet	0,0	-	1,1,1,>15	n.s.	1:3	n.s.
	sammenslått intet	0,0		5x1,3,6,≥ 15	--	1:7	

- 10 Bemerk: * indikerer mot sammenslåtte kontroller; tid før død, ved "one tailed two sample rank test"; overlevelse, ved "one tailed Fisher Exact test". Beregninger har blitt gjort ved anvendelse av "one tail" da det aldri er blitt observert at anti-PspA-immunitet konsekvent forårsaker susceptibilitet.
- 15 Antall CFU i museblodet er gitt i tabellen under.

Bakteremi i immune og ikke-immune CBA/N-mus						
Immunisering			Cog ₁₀ CFU			
Gruppe	Antigen	dose i µg Alun	1 døgn	2 døgn	6 døgn	7 døgn
#1A	ppA-321-L	1,0	≤1,6, 1,9, 2,1, 2,5	4x≤1,6	4x≤1,6	n.d.
#1B	ppA-321-L	0,2	3x≤1,6, 1,7	4x≤1,6	4x≤1,6	n.d.
#2A	ppA-321-L	1,0	2x≤1,6, 1,7, 2,9	3x≤1,6, 1,7	4x≤1,6	n.d.
#2B	ppA-321-L	0,2	2x≤1,6, 1,7, 1,7	4x≤1,6	4x≤1,6	n.d.
#3A	ppA-321-NL	1,0	≤1,6, 1,7, d, d	d,d,d,d	d,d,d,d	d,d,d,d
#3B	ppA-321-NL	0,2	2x>7, d, d	≤1,6, d,d,d	≤1,6,d,d,d	n.d.,d,d,d
#4A	ppA-321-NL	1,0	2x≤1,6, 6,7, >7	3x≤1,6, 1,7	4x≤1,6	n.d.
#4B	ppA-321-NL	0,2	≤1,6, 1,7, 2,1, 2,4	4x≤1,6	4x≤1,6	n.d.
#5	FL-Rx1	0,2	2x≤1,6, 2,6, 2,7	4x≤1,6	4x≤1,6	n.d.
#6	intet	0,0	≤1,6, 4,1, >7,d	≤1,6, 5,1,d,d	6,1,d,d,d	d,d,d,d
#7	intet	0,0	1,7, >7, >7,d	≤1,6, d,d,d	≤1,6,d,d,d	n.d.,d,d,d
	sammenslått	0,0	≤1,6, 4,1, >7,>7,d	2x≤1,6, 5,1,d,d,d	≤1,6, 6,1,d,d	n.d,d,d,d,d,d
	intet			d,d	d,d,d,d	

Bemerk: 1 koloni ved den høyeste blodkonsentrasjonen ble beregnet til å være 47 CFU eller Log 1,7. Således indikerer "≤1,6" ingen talte kolonier. >10⁷ indikerer at musen var i live, men antall kolonier ved den høyeste fortyngningen var for høy til å bli talt. "d" indikerer at musene døde før undersøkelsen.

Disse resultatene indikerer at det rekombinante protein ikke var beskyttende når det ble injisert alene. Det rekombinante antigen adjuventert med alun og/eller PAM₃cys-lipidering var immunogent og beskyttende. Det native
5 fullengde PspA-antigen behøvde ikke en adjuvant for å være beskyttende. CFU-resultatene indikerer at mus beskyttet ved immunisering fikk fjernet de angripende *S. pneumoniae* fra blodet i løpet av to døgn.

ELISA-analyser av sera uttatt døgn 35 indikerte at det var
10 en god korrelasjon mellom beskyttelse av mus mot *S. pneumoniae*-angrep og induksjon av målbare antistoff-responser. Ingen detekterbare antistoff-responser ble observert i sera fra mus immunisert med det ikke-lipiderte antigen (pPA-321-NL) i salin eller de negative kontroller
15 som ikke inneholdt PspA-antigen (som gitt i tabellen under). Gode antistoff-responser ble detektert for det native RX1-antigen og det rekombinante PspA når det ble lipidert med PAM₃cys og/eller adsorbent til alun.

ELISA-analyse av musesera dogn 35

PPA-antigen	Alun-adsorpsjon	PPA-dose (µg/mus)	Resulterende OD ved indikert fortykning av Antisera							
			600	1.200	2.400	4.800	9.600	19.200		
ppa-321-L	Nei	0,1	0,855 (0,082)	0,497 (0,043)	0,271 (0,025)	0,146 (0,017)	0,075 (0,012)	0,039 (0,009)		
ppa-321-L	Nei	0,5	1,857 (0,060)	1,437 (0,137)	1,108 (0,150)	0,750 (0,139)	0,459 (0,092)	0,284 (0,057)		
ppa-321-L	Ja	0,1	1,373 (0,325)	1,048 (0,376)	0,745 (0,362)	0,490 (0,304)	0,288 (0,197)	0,171 (0,147)		
ppa-321-L	Ja	0,5	1,202 (0,162)	0,787 (0,184)	0,472 (0,187)	0,296 (0,102)	0,162 (0,061)	0,087 (0,035)		
ppa-321-NL	Nei	0,1	0,022 (0,035)	0,030 (0,060)	0,014 (0,024)	0,007 (0,018)	0,006 (0,005)	0,001 (0,001)		
ppa-321-NL	Nei	0,5	0,029 (0,035)	0,014 (0,014)	0,008 (0,007)	0,003 (0,004)	0,002 (0,002)	0,002 (0,002)		
ppa-321-NL	Ja	0,1	0,822 (0,181)	0,481 (0,166)	0,278 (0,085)	0,154 (0,051)	0,082 (0,029)	0,042 (0,015)		
ppa-321-NL	Ja	0,5	1,017 (0,139)	0,079 (0,128)	0,447 (0,101)	0,253 (0,057)	0,141 (0,034)	0,075 (0,020)		
Nativt RK1	Nei	0,1	1,367 (0,084)	1,207 (0,060)	0,922 (0,070)	0,608 (0,007)	0,375 (0,048)	0,209 (0,209)		
Intet	Nei	0	0,018 (0,003)	0,012 (0,008)	0,009 (0,003)	0,005 (0,002)	0,005 (0,002)	0,005 (0,002)		
Intet	Ja	0	0,013 (0,006)	0,009 (0,008)	0,004 (0,004)	0,004 (0,003)	0,001 (0,001)	0,000 (0,000)		

* OD er middel av resultatet av de fire testede dyrene, og standardavviket er i parentes.

For å bestemme om beskyttelse var i det minste delvis mediert av anti-PspA antistoffresponser, ble det utført et passivt eksperiment. BALB/c-mus ble immunisert med 0,5 µg rekombinant lipidert PspA alene eller absorbert til alun, eller med rekombinant ikke-lipidert PspA adsorbert til alun 5 døgn 0 og 21, og det ble tatt ut blodprøver døgn 35. Anti-sera ble fortynnet 1:3 eller 1:15 i salin, og 0,1 ml av fortynningen ble injisert i.p. til to mus for hver fortynning. En 1/3-fortynning av normalt BALB/c-museserum 10 ble anvendt som negativ kontroll. En time etter passiv immunisering ble dyrene tilført i.v. WU2-stammen av *S. pneumoniae* (15.000 CFU). Mus passivt immunisert med anti-PspA-sera ble beskyttet sammenlignet med de musene som mottok fortynninger av normal musesera som gitt i den 15 følgende tabell.

Passiv beskyttelse av BALB/c mot WU2

Immunisering PspA-antigen	Formulering Alun	PspA-dose (µg/dyr)	Fortynning av serum	Døgn til død etter angrep
pPA-321-L	Nei	0,5	3	4, >7
			15	2, 4
pPA-321-L	Ja	0,5	3	>7, >7
			15	4, >7
pPA-321-NL	Ja	0,5	3	2, 4
			15	>7, >7
Intet	Nei	0	3	2, 2

P a t e n t k r a v

1. Hybrid nukleinsyremolekyl omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for en signalsekvens av et OspA lipoprotein av en *Borrelia*-art og en andre nukleinsyresekvens som koder for et OspC modent protein av en *Borrelia*-art, eller fragment derav, hvilken første nukleinsyresekvens er tilstøtende med den andre nukleinsyresekvens når det modne protein er naturlig lipidert, eller de første og andre nukleinsyresekvenser er separert ved et kodon som koder for en aminosyre når det modne protein ikke er naturlig lipidert hvor nevnte første nukleinsyresekvens og nevnte andre nukleinsyresekvens er koblet i et translasjonelt åpent leserammeforhold.
5
2. Hybrid molekyl ifølge krav 1, hvori nevnte OspC modne protein eller fragment derav er fra en stamme av *B. burgdorferi*.
15
3. Hybrid molekyl ifølge krav 2 hvori nevnte stamme av *B. burgdorferi* er valgt fra OspC subtype-familier.
4. Hybrid molekyl ifølge krav 2, hvor nevnte OSpA-protein er det fra en stamme av *b. burgdorferi*.
20
5. Hybrid molekyl ifølge krav 4, hvori stammen av *B. burgdorferi* velges fra B31-, ACA1- og Ip90-familiene av stammer.
6. Hybrid molekyl ifølge krav 1, hvori nevnte OspA-lipoprotein er det av en stamme av *B. burgdorferi*.
25
7. Hybrid molekyl ifølge krav 6, hvori stammen av *B. burgdorferi* velges fra B31-, ACA1- og Ip90-familiene av stammer.

8. Ekspresjonsvektor inneholdende hybrid nukleinsyre-molekyl ifølge krav 1 under kontroll av en promoter for ekspresjon av det modne protein.

5 9. Fremgangsmåte for å danne et rekombinant protein, hvilken fremgangsmåte omfatter:

å inkorporere ekspresjonsvektoren ifølge krav 8 i en vertssorgansime; og

å utføre ekspresjon av nevnte rekombinante protein fra vertssorganismen.

10 10. Fremgangsmåte ifølge krav 9 hvori vertssorganismen er *E. coli*.

11. Fremgangsmåte ved fremstilling av et rekombinant lipoprotein, hvilken fremgangsmåte omfatter:

15 å konstruere et hybrid nukleinsyremolekyl omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for en signalsekvens av et OspA-lipoprotein av en *Borrelia*-art, og en andre nukleinsyresekvens som koder for et modent OspC-protein eller et fragment derav av en *Borrelia*-art, hvor den andre nukleinsyresekvens er tilstøtende med den første sekvensen,
20 hvor nevnte første nukleinsyresekvens og nevnte andre nukleinsyresekvens er koblet i en translasjonelt åpent leserammeforhold;

25 å danne en ekspresjonsvektor inneholdende det hybride nukleinsyremolekyl under kontroll av en promoter for ekspresjon av det rekombinante lipoprotein;

å inkorporere ekspresjonsvektoren i en vertssorgansime;
å utføre ekspresjon av det rekombinante lipoprotein ved vertssorganismen;

30 å lysere cellene i vertssorganismen;
å behandle de lyserte cellene med en surfaktant som selektivt oppløser det rekombinante lipoprotein til fordel for bakterielle og andre proteiner, og som evner å utføre

- faseseparasjon av en detergentfase under milde betingelser;
å utføre faseseparasjon av en detergentfase inneholdende
oppløst rekombinant lipoprotein, en vandig fase inne-
holdende bakterielle og andre proteiner og en fast fase
5 inneholdende celleresidu;
å separere og gjenvinne detergentfasen fra den faste fase
og den vandige fase;
å bringe detergentfasen i kontakt med en første kromato-
grafisk kolonne under betingelser som resulterer i en
10 binding av andre proteiner enn det rekombinante lipoprotein
til kolonnen for å tilveiebringe gjennomstrømming fra den
første kromatografiske kolonne inneholdende det rekombinante
lipoprotein og gjenvinne den gjennomstrømte væske
fra den første kromatografiske kolonne;
15 å bringe den gjennomstrømte væske fra den første kromato-
grafiske kolonne med en andre kromatografisk kolonne under
betingelser som resulterer i binding av det rekombinante
lipoprotein til den andre kromatografiske kolonne til
fordel for kontaminantproteiner og lipopolysakkarider som
20 passerer gjennom den andre kromatografiske kolonne;
å eluere det rekombinante lipoprotein fra den andre
kromatografiske kolonne for å tilveiebringe en eluant
inneholdende det rekombinante lipoprotein i hovedsak fri
for lipopolysakkarider og kontaminantproteiner, og
25 å gjenvinne eluanten.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11 hvori surfaktanten er TRITON™ X-114.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 11 hvori behandlingen av de
lyserte cellene utføres ved en temperatur ved om lag 0 til
30 om lag 10 °C, og den resulterende blanding behandles ved en
mildt elevert temperatur ved om lag 35 °C til om lag 40 °C
for å utføre separasjon av detergentfasen, og detergent-
fasen separeres fra den vandige fase og den faste fase ved
sentrifugering.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvori den første kromatografiske kolonnen ytterligere bringes i kontakt med et buffermedium ved en pH for å tilveiebringe væske inneholdende det rekombinante OspC-lipoprotein fra den første kromatografiske kolonne mens de andre proteinene holdes tilbake på den første kromatografiske kolonne, og den gjennomstrømmende væske fra den ytterligere kontakten oppsamles og kombineres med den fra det første kontakttrinn på den første kromatografiske kolonne, og den kombinerte gjennomstrømte væske bringes i kontakt med den andre kromatografiske kolonne.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 11 hvori lysering av verts-organismen utføres ved å fryse og tine verts-organismen.

16. Rekombinant fremstilt, isolert og rensset lipoprotein fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11.

17. Lipoprotein-fusjonsvektor PLF100 med ATCC tiltredelsesnr. 69750.

18. Sammensetning for å indusere en immunologisk respons, hvilken sammensetning omfatter lipoproteinet ifølge krav 16.

19. Fremgangsmåte for å fremme et proteins immunogenisitet, hvilken fremgangsmåte omfatter trinnene:

å danne et hybrid nukleinsyremolekyl omfattende en første nukleinsyresekvens som koder for en signalsekvens av et OspA-lipoprotein av en *Borrelia*-art, og en andre nukleinsyresekvens som koder for et modent OspC-protein, eller fragment derav av en *Borrelia*-art, hvor den første nukleinsyresekvens er tilstøtende med den andre nukleinsyresekvensen, hvor nevnte første nukleinsyresekvens og nevnte andre nukleinsyresekvens er koblet i et translasjonelt åpent leserammeforhold; å inkorporere det hybride nukleinsyremolekyl i en eks-

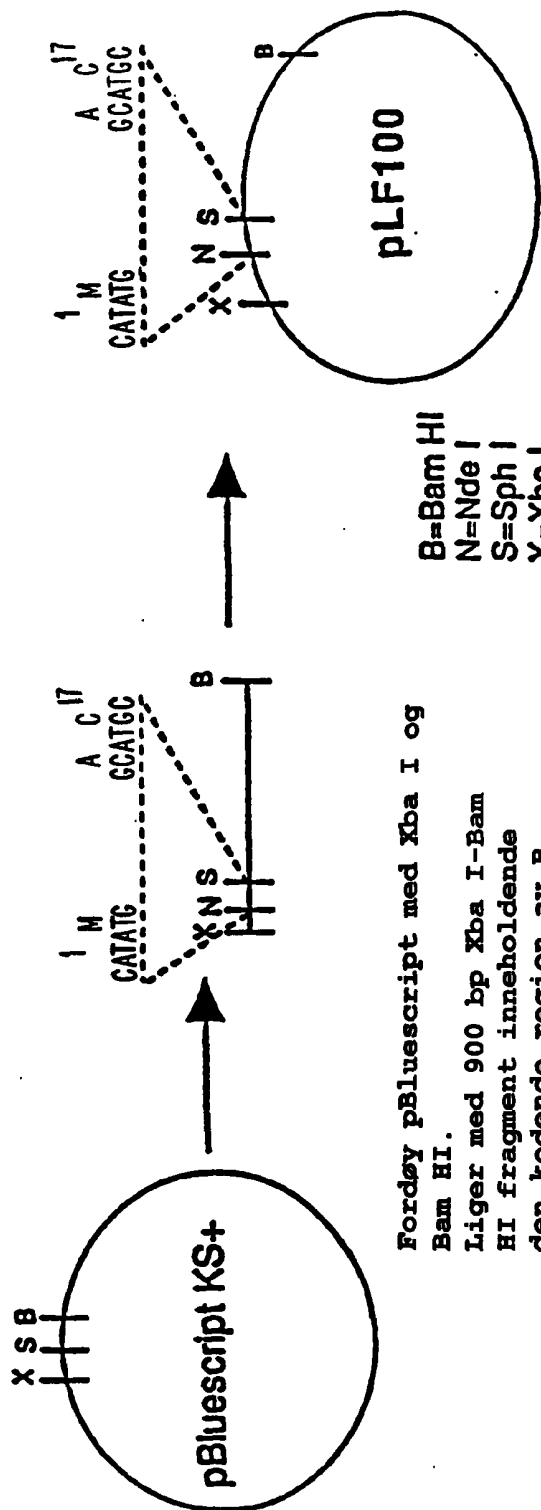
presjonsvektor;

å inkorporere ekspresjonsvektoren i en vertsorganisme;

å utføre ekspresjon av det modne protein fra vertsorganismen.

FIG. 1

Konstruksjon av Lipoprotein-fusjonsvektor pLF100

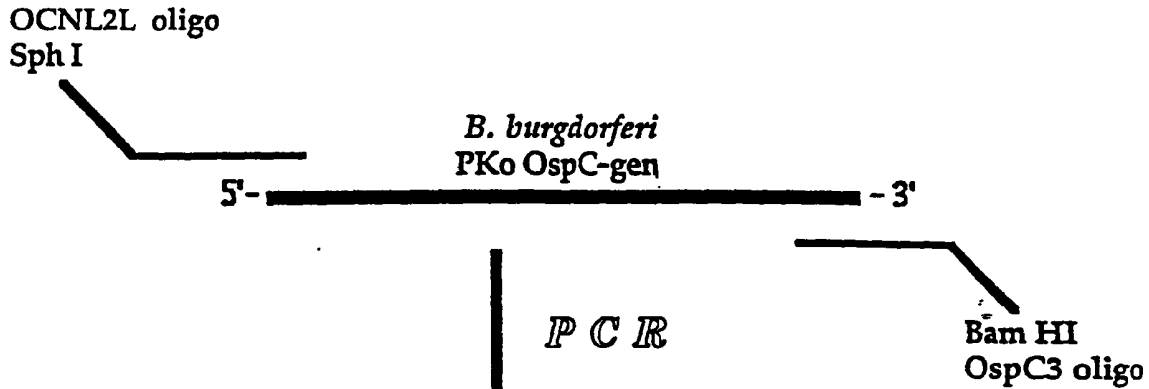


Forløy pBluescript med Xba I og Bam HI.

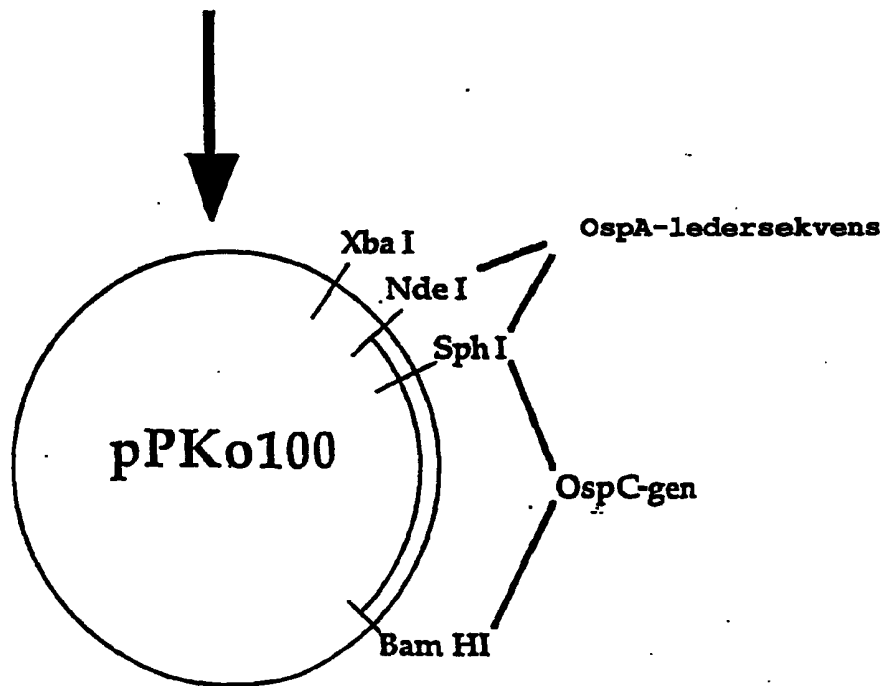
Liger med 900 bp Xba I-Bam HI fragment inneholdende den kodende region av B. burgdorferi-stamme ACAI Ospa-gen.

B=Bam HI
N=Nde I
S=Sph I
X=Xba I

2 / 15
FIG. 2



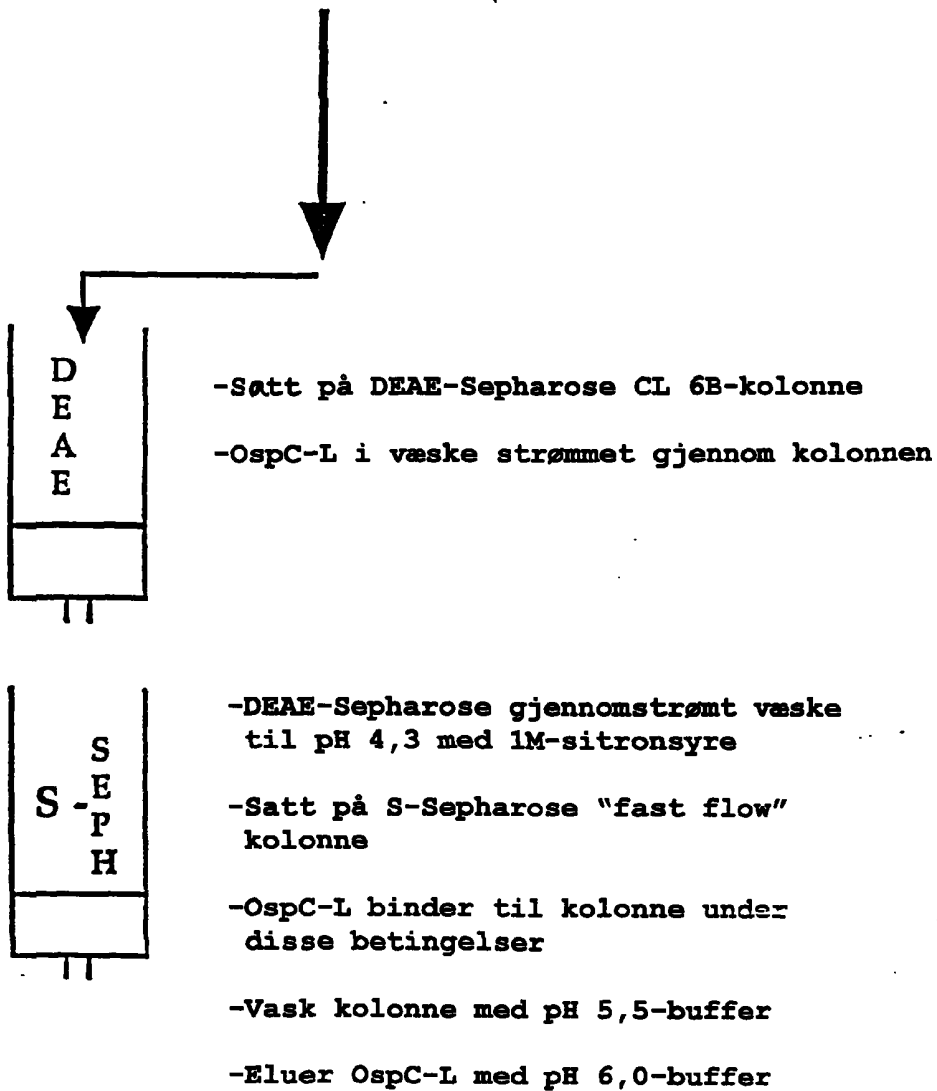
- Fordøy PCR med Sph I og Bam HI
- Fordøy pLF100 med Sph I og Bam HI
- Innsett OspC PCR i pLF100 ved Sph I-sete i 3'enden av OspA-signalsekvens



- Fordøy pPKo100 med Nde I og Bam HI og isoler fragment inneholdende OspA-ledersekvens koplet til OspC-gen
- Sett inn i pET9a fordøyd med Nde I og Bam HI for å lage pPKo9a

FIG. 3

- Suspend celler i PBS
- Frys/tin for å utføre cellelysering
- OspC-L ekstrahert med 0,3% Triton X-114



4 / 15

FIG. 4

- Suspender celler i lyseringsbuffer



rør 20 min R.T.

- Sett til Triton X-100 til 1% for å utføre cellelysering



rør 20 min R.T.

- Sett til NaCl til 1M endelig konsentrasjon



rør 20 min R.T.

- Sentrifuger ved 20,000 x g, 30 min

- Dialyser supernatant vs. 50mM TRIS, pH 8 2mM EDTA

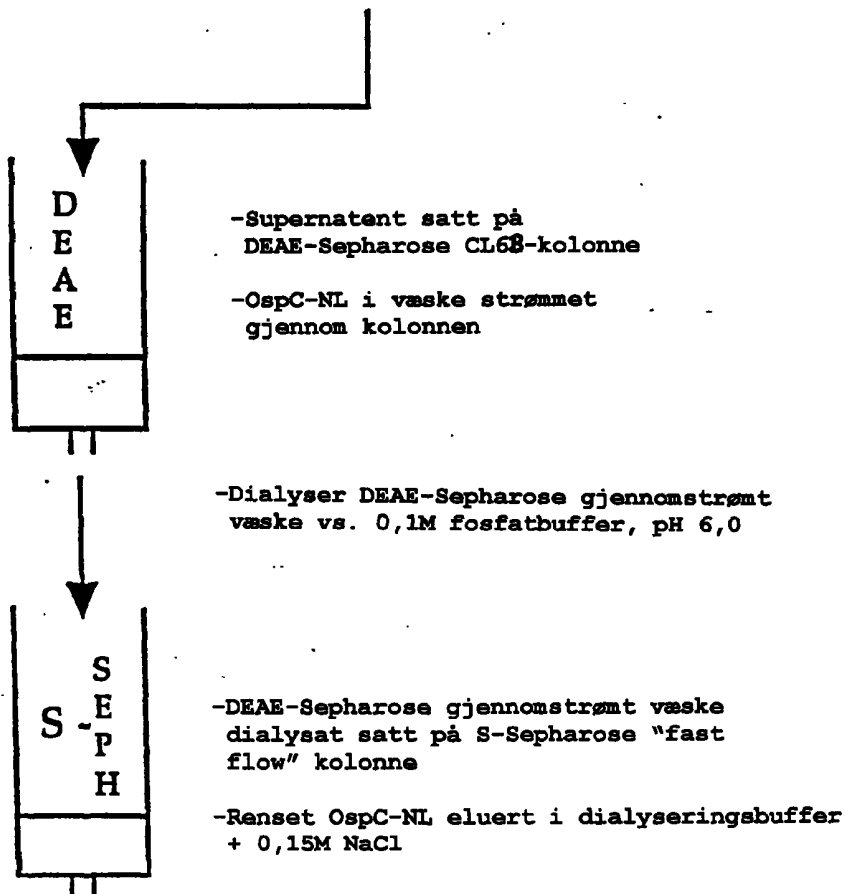
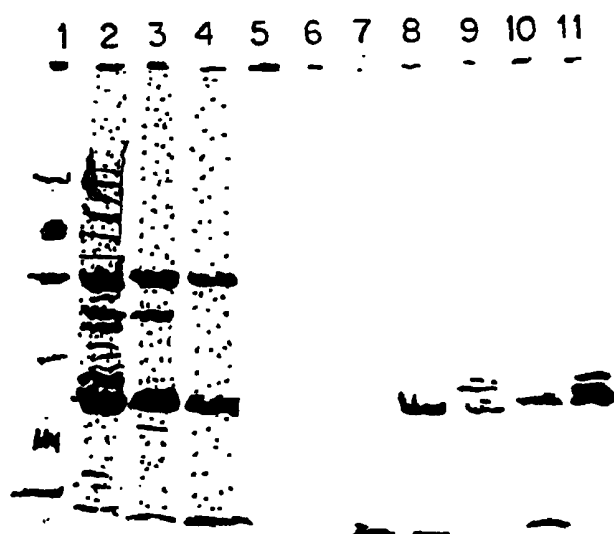
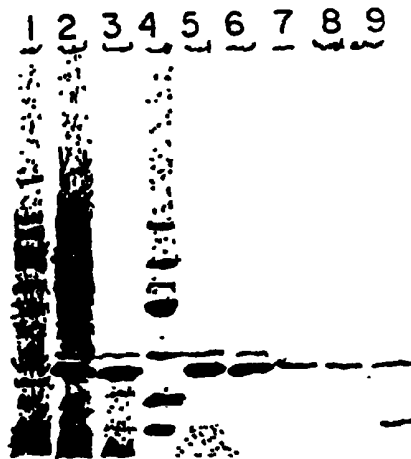


FIG. 5



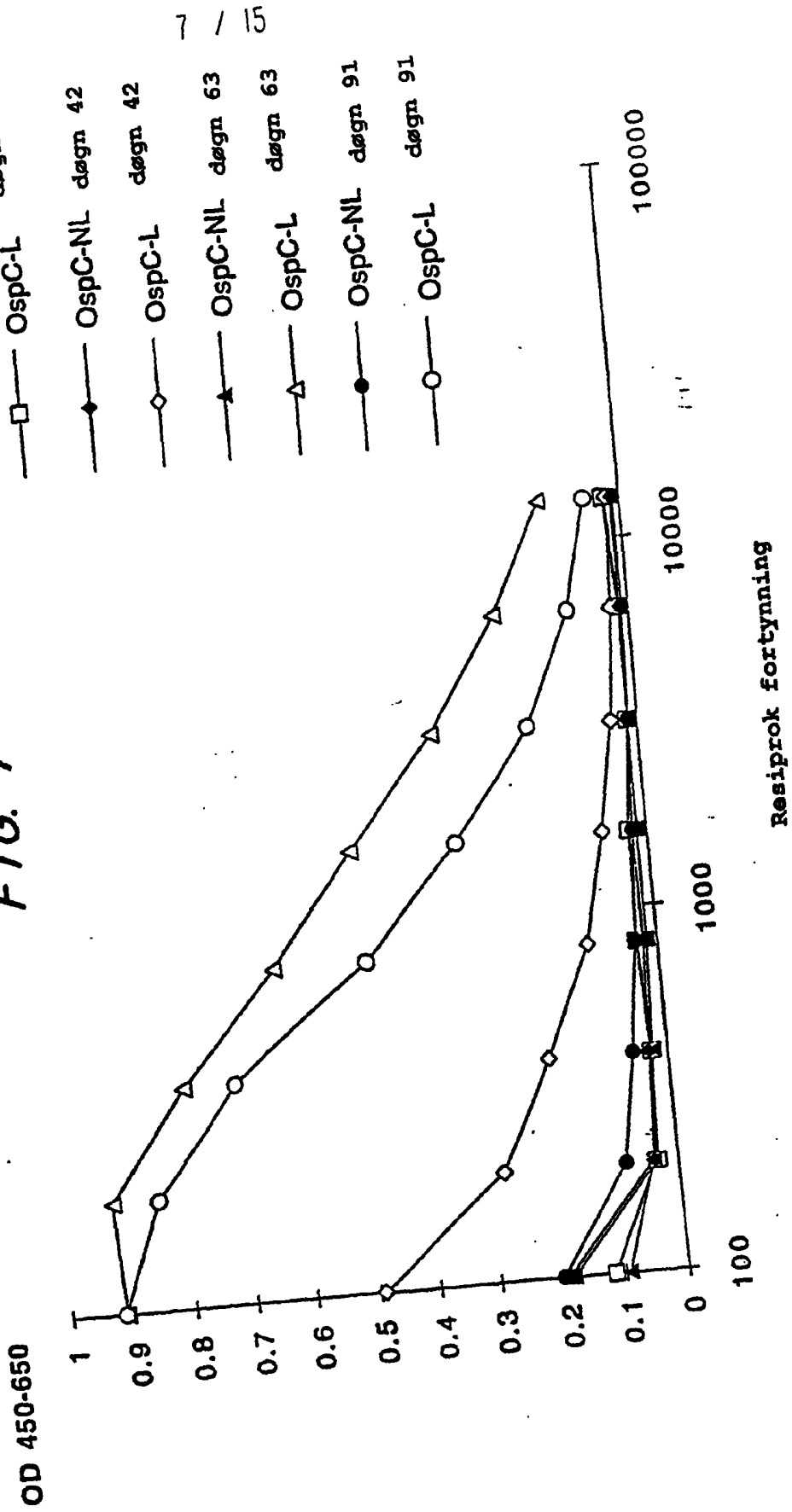
- 1 - Lavmolekylvekts-standarder
- 2 - OspC-L/BL21 lysat
- 3 - OspC-L/BL21 detergentfase
- 4 - OspC-L/BL21 DEAE gjennomstrømt vask/vaskepool
- 5 - OspC-L/BL21 S-Sepharose gjennomstrømt
- 6 - OspC-L/BL21 S-Sepharose vask
- 7 - OspC-L/BL21 S-Sepharose elutant pH 5,5
- 8 - OspC-L/BL21 S-Sepharose elutant pH 6,0
- 9 - OspC-L/BL21 S-Sepharose elutant pH 7,5
- 10 - OspC-L/BL21 S-Sepharose elutant pH 5,7
- 11 - OspC-L/BL21 S-Sepharose elutant pH 7,5

FIG. 6



- 1 - OspC-NL/JM109 T=0
- 2 - OspC-NL/JM109 T= 3 timer
- 3 - OspC-NL/JM109 gjennomstrømt væske/vaskepool
- 4 - Lavmolekylvekts-standarder
- 5 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose påsatt
- 6 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose gjennomstrømt væske
- 7 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose vask
- 8 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose elutant 150 mM NaCl
- 9 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose elutant 500 mM NaCl

FIG. 7



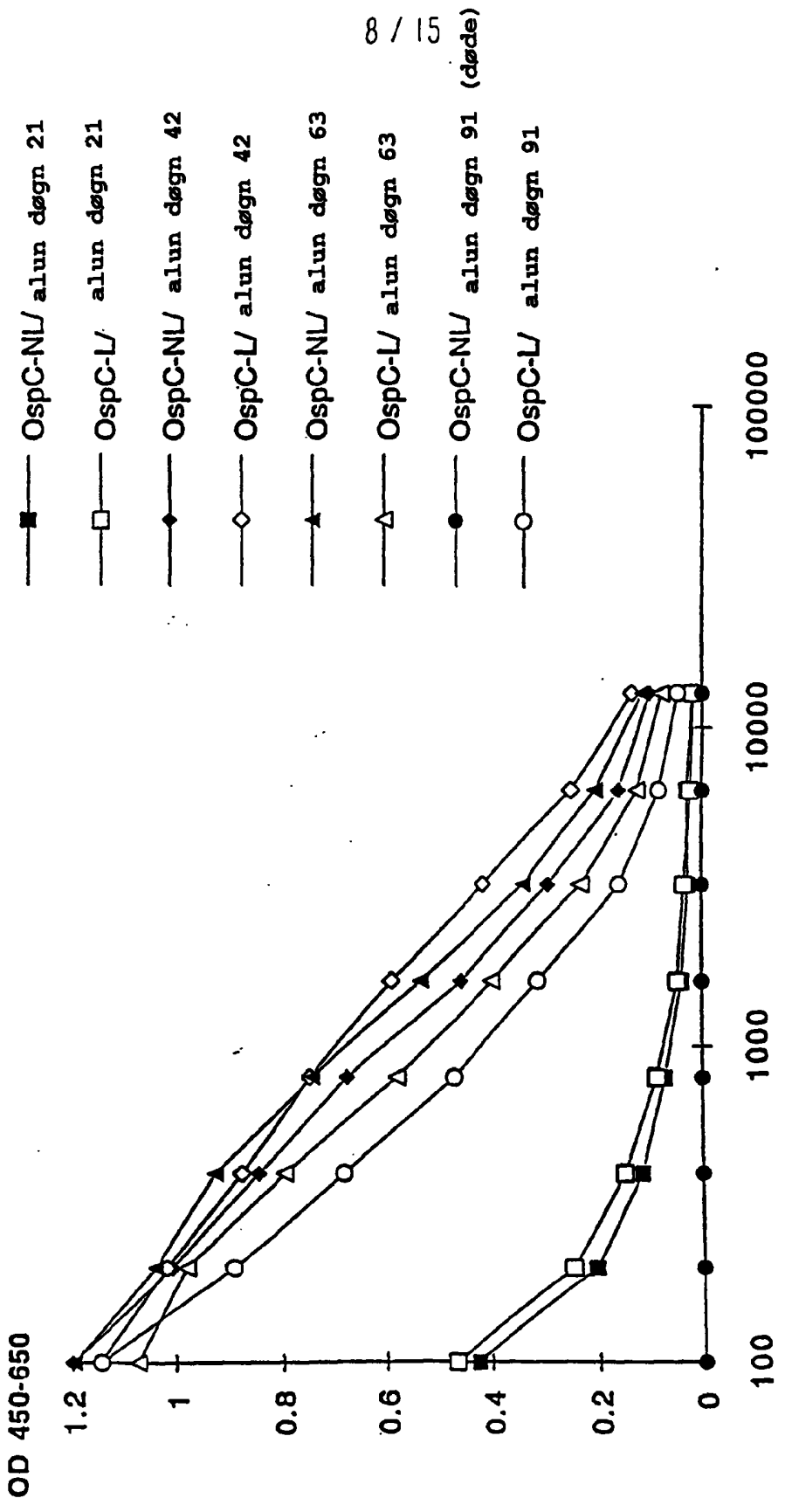
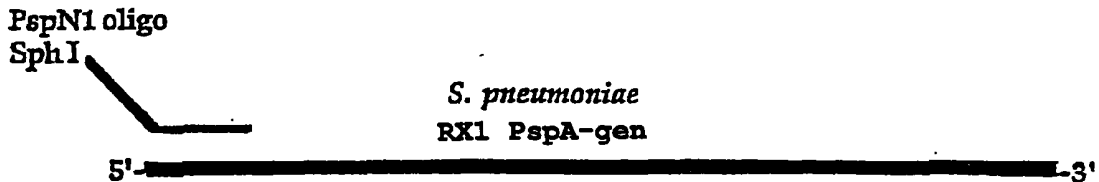


FIG. 8

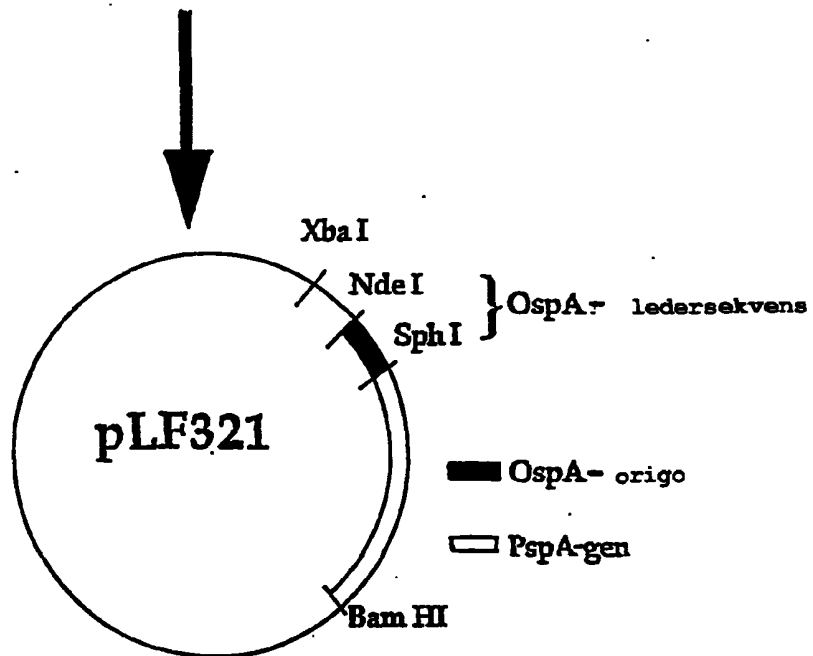
Resiprok fortynning

9 / 15
FIG. 9



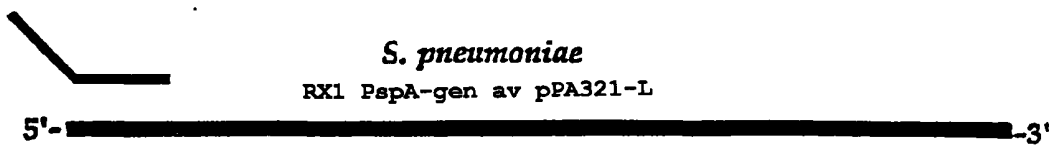
PCR

- Fordøy PCR med Sph I og Bam HI
- Fordøy pLF100 med Sph I og Bam HI
- Innsett PspA PCR i pLF100 ved Sph I-sete i 3'enden av OspA-signalsekvens



- Fordøy pLF321 med Nde I og Bam HI og isoler fragment inneholdende OspA-ledersekvens koplet til PspA-gen
- Sett inn i pET9a fordøyd med Nde I og Bam HI for å lage pPA321-L

PspNL-2 oligo
Nde I



PCR

Bam HI
PspC370 oligo

- Forðøy PCR med Nde I og Bam HI
- Forðøy pET9a med Nde I og Bam HI
- Innsett PspA PCR i pET9a ved Nde I-Bam HI-sete

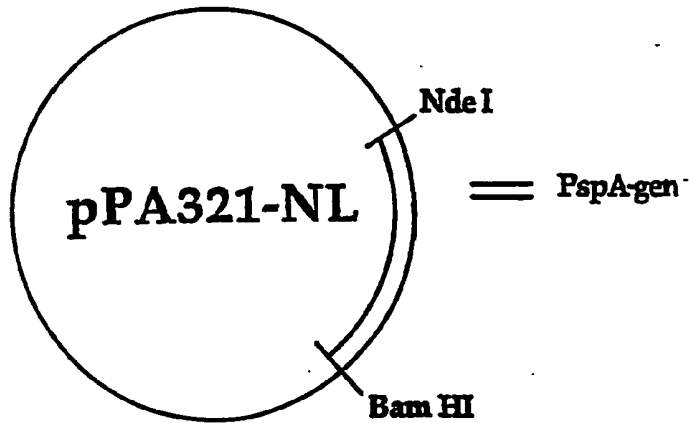


FIG. 10

11 / 15

RENSING AV PA321-L

- Suspende celler i PBS
- Frys/tin for å utføre cellelysering
- OspC-L ekstrahert med 0,3%-1% Triton X-114
- pH er justert til 4,0

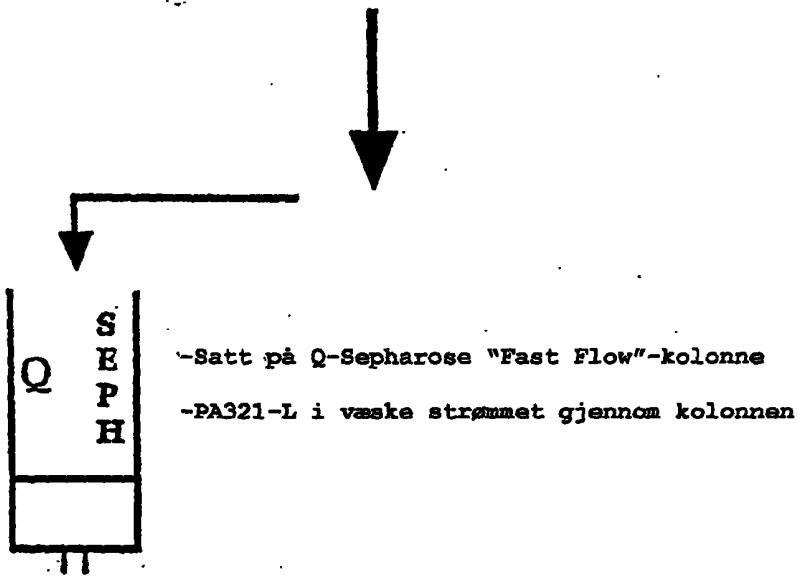
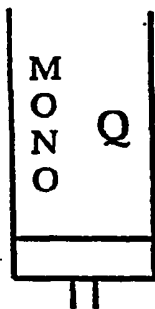
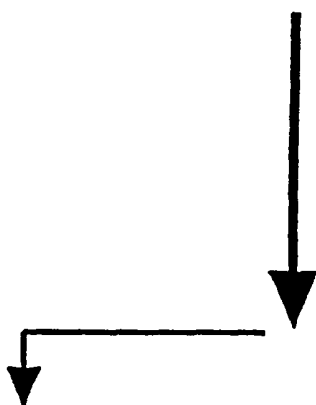


FIG. 11

12 / 15

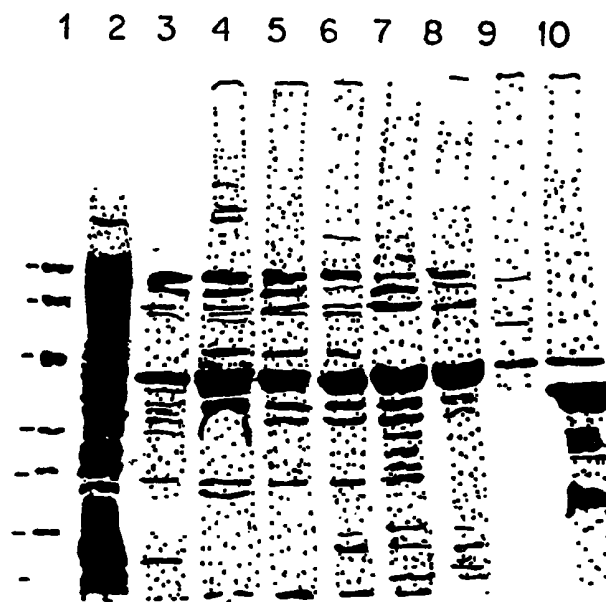
- Suspend celler i PBS
- Frys/tin for å utføre cellelysering
- Cellelysat sentrifugeres; cellesupernatant spares



- Satt på en MonoQ-kolonne ved pH 7,5
- Kolonne er vasket med tilføringsbuffer (50mM Tris 2mM EDTA 10mM NaCl pH 7,5)
- Kolonne er vasket med tilføringsbuffer inneholdende 100mM NaCl
- PA321-NL er eluert med tilføringsbuffer inneholdende 200mM NaCl
- Gjenstående kontaminanter fjernes med tilføringsbuffer inneholdende 1M NaCl

RENSING AV PA321-NL

FIG. 12

*FIG. 13***PA321-L Rensefraksjoner**

1. Forfargede lavmolekylvekts-standarder (106, 80, 49,5, 32,5, 27,5 og 18,5 kDa)
2. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T=0
3. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 1 time etter IPTG-tilsats
4. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 2 timer etter IPTG-tilsats
5. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 3 timer etter IPTG-tilsats
6. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 4 timer etter IPTG-tilsats
7. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; cellelysat
8. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; vandig fase
9. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; detergent fase
10. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; pellet

14 / 15

FIG. 14

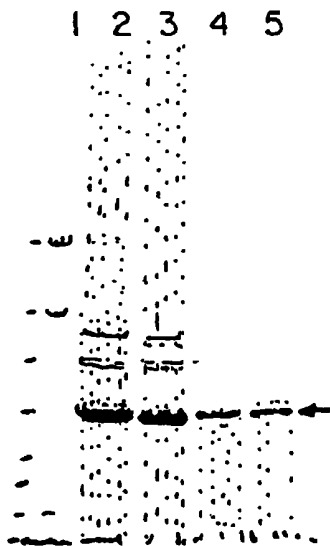


PA321-NL Rensefraksjoner

1. Forfargede bredmolekylvekts-standarder (200,118, 78, 47,1, 31,4, 25,5, 18,8 og 8,3 kDa)
2. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T=0
3. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 1 time etter IPTG-tilsats
4. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 2 timer etter IPTG-tilsats
5. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; T= 3 timer etter IPTG-tilsats
6. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; cellelysat
7. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; cellesupernatant og pellet- vaskepool
8. PA321-L/BL21 (DE3)pLysS; pellet

15 / 15

FIG. 15



PA321-NL OG PA321-L Renseprøver

1. Forfargede bredmolekylvekts-standarder (200,118, 78, 47,1, 31,4, 25,5, 18,8 og 8,3 kDa)
2. PA321-NL MonoQ 0,2M NaCl eluent, partnr.#354A-146
3. PA321-NL MonoQ 0,2M NaCl eluent, partnr.#354A-147
4. PA321-L Q-sepharose pH 4,0 gjennomstrømt væske, partnr.#354A-148
5. PA321-L Q-sepharose pH 4,0 gjennomstrømt væske, partnr.#354A-150