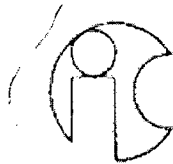




Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

BT



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-44585

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: VACUNA PARA LA ENFERMEDAD DE LYME CANINA

SOLICITANTE: SCHERING-PLOUGH LTD.

DIRECCIÓN: Weystrasse 20, P.O. Box, CH-6000 Lucerne 6, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 04 de Mayo de 2009

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-044585-00000-0000
Fecha: 2009-05-04 16:34:29 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 134

PETITORIO - FORMULARIO Ú PATENTE P ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000076

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: SCHERING-PLOUGH LTD.

Dirección: Weystrasse 20, P.O. Box, CH-6000
Lucerne 6

Nacionalidad o Domicilio: Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center, Torre A, Calle
100 No. 8A-37 Piso 10.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1) Steven M. CALLISTER, 2) Rhonda LAFLEUR,
3) Terri L. WASMOEN

Dirección: 1) 2050 Grandview Boulevard, On-alaska, WI 54650 E.U.A.,
2) 17164 Clark Street, Omaha, NE 68118 E.U.A, 3) 14009 Meredith Circle, Omaha,
NE 68164 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/023101

Fecha

Noviembre 1, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/057396

Fecha

Mayo 15, 2008

6

Título (54) VACUNA PARA LA ENFERMEDAD DE LYME CANINA

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Noviembre 3, 2006

(31) Número de Solicitud

60/864,258

9

Comprobante de pago No. 09-

Fecha Mayo 4 de 2009

10

ANEXOS

☒ x

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒ x

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒ x

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-008.018

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒ x

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒ x

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒ x

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

☐

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800178089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-044585- -00000-0000

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 32,678
FECHA : MAYO 4 DE 2009

Fecha: 2009-05-04 16:34:29 Dep. 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 134

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	082754387	110378995	04/05/2009	2,560,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
TOTAL :			5 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°. _____

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
SCHERING- PLOUGH LTD.**

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento Público
2. ha sido firmado por Marguerite La Corte
3. Quien ejerce funciones de Notario público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello de Marguerite La Corte Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 29 de agosto 2003
7. Por John E. McCormac Contador Publico- Tesorero de Nueva Jersey
8. No. A 180348
9. Gran Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma legible de John MacCormac

PODER DE REPRESENTACIÓN

Bilingüe inglés- español otorgado en Kenilworth, Nueva Jersey, Estados Unidos,
el 7 de agosto de 2003 y firmado por Edward H. Mazer - Representante Autorizado

CERTIFICADO NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, fechado el 7 de agosto, 2003 certificando las funciones
de Edward H. Mazer -Representante autorizado de Schering - Plough Ltd.

Las certificaciones anteriores se basan en la Resolución de Junta Directiva de
Schering- Plough Ltd. fechada el 7 noviembre de 2002.

Sello: Marguerite La Corte- Notario público,

Estado de Nueva Jersey
Su comisión vence el 7 de octubre de 2003.

Sello en alto relieve del Notario Público

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 5
septiembre, 2003.

Marlen Neira C
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

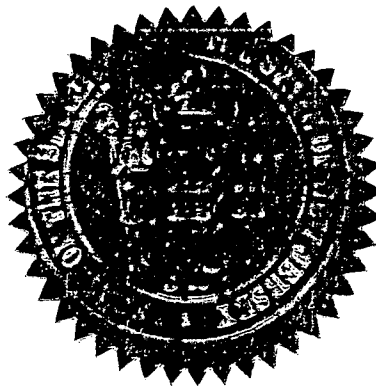
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARGUERITE LA CORTE
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARGUERITE LA CORTE, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 29TH DAY OF AUGUST 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A180348
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

Schering-Plough Ltd.

domiciled in

Toepferstrasse 5, CH 6004 Lucerne, Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

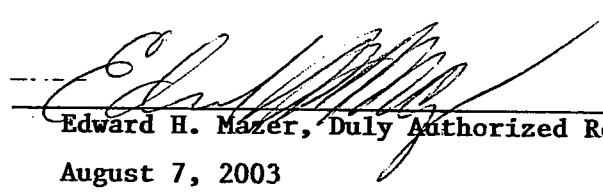
El suscrito,

domiciliado en

Switzerland

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:


Edward H. Mazer, Duly Authorized Representative

Date/Fecha:

August 7, 2003

City/Country/Ciudad, País: Kenilworth, New Jersey, U.S.A.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date, **August 7, 2003**

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That **Edward H. Mazer**

1. Que

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

119 Greenwood Drive, Millburn, New Jersey 07041, U.S.A.

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **Duly Authorized Representative** of **Schering-Plough Ltd.**

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
de

3. That **Schering-Plough Ltd.**

4. Que

having its principal place of business located in

con sede principal ubicada en

Toepferstrasse 5, CH 6004 Lucerne, Switzerland

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

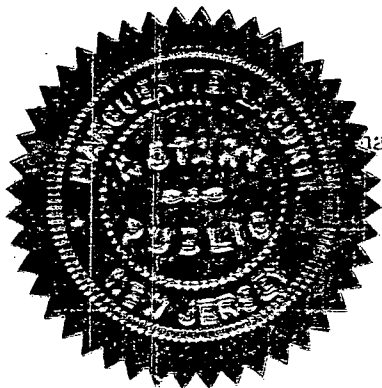
4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

**Resolution of the Board of Directors
of Schering-Plough Ltd. of November 7, 2002.**



Signature):

Marguerite La Corte

Marguerite La Corte

Notary Public of New Jersey

My Commission Expires October 7, 2003

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 May 2008 (15.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/057396 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)

(74) Agent: DAVIS, Michael, D.; Schering-plough Corporation, Patent Department, K-6-1 1990, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/023101

(22) International Filing Date:
1 November 2007 (01.11.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/864,258 3 November 2006 (03.11.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING-PLOUGH LTD. [CH/CH]; Weistrasse 20, P.O. Box, CH-6000 Lucerne 6 (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CALLISTER, Steven, M. [US/US]; 2050 Grandview Boulevard, Onalaska, WI 54650 (US). LAFLEUR, Rhonda [US/US]; 17164 Clark Street, Omaha, NE 68118 (US). WASMOEN, Terri, L. [US/US]; 14009 Meredith Circle, Omaha, NE 68164 (US).

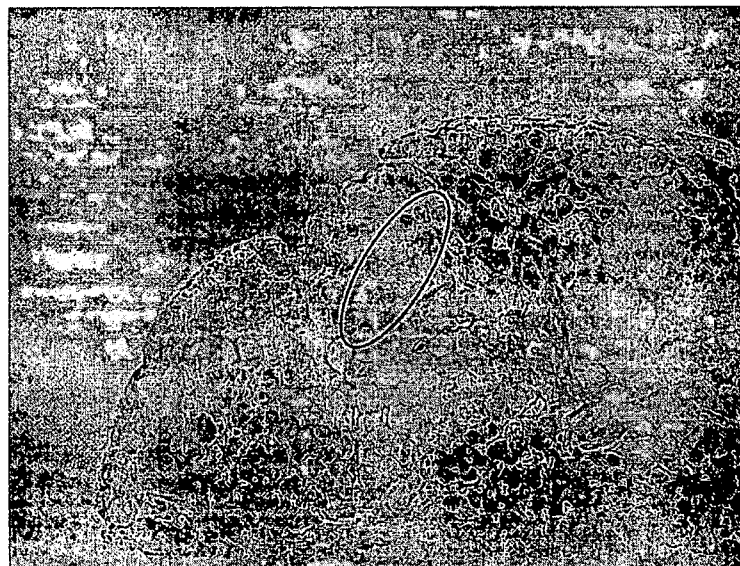
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(54) Title: CANINE LYME DISEASE VACCINE



(57) Abstract: The present invention provides a vaccine for canine Lyme disease and methods of making and using the vaccine alone, or in combinations with other protective agents.

WO 2008/057396 A2

CANINE LYME DISEASE VACCINE

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application is a non-provisional application that claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) of provisional application U.S. Serial No. 60/864,258 filed November 3, 2006, the contents of which are hereby incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention relates to a vaccine for canine Lyme disease. Methods of making and using the vaccine alone or in combinations with other protective agents are also provided.

BACKGROUND

15 Canine Lyme disease is caused by infection with *Borrelia* species (spp.) spirochetes, including primarily *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) in the United States and *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, and *B. afzelii* in Europe (Baranton et al., *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1992,42:378-383; Hovius et al., *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38:2611-2621). The spirochetes are transmitted as the infected *Ixodes* spp. ticks obtain a blood meal, and the resulting infection in canines results in clinical signs ranging from subclinical synovitis to acute arthritis and arthralgia (Jacobson et al., *Semin. Vet. Med. Surg.* 1996, 11:172-182; Summers et al, *J. Comp. Path.* 2005, 133:1-13).
20 Importantly, the incidence of canine Lyme disease cases continues to increase annually coincident with increased numbers of human cases (Haninkova et al., *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12:604-610).

25 The antibodies produced in response to infection with *Borrelia* spp. have two distinct functions, but heretofore, both responses could be ineffective at eliminating sequestered spirochetes from a mammalian host. A number of explanations have
30 been postulated for this defect in the normal immune response to natural infection, including antigenic variation (Schwan, *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31:108-112; Tokarz et al., *Infect. Immun.* 2004, 72:5419-5432), host mimicry (Barbour et al. *Microbiol. Rev.* 1986, 50:381-400), and intracellular localization (Ma et al., *Infect. Immun.* 1991, 59:671-678).
35

The most common humoral immune response is the production of non-specific binding/opsonizing (coating) antibodies that "mark" the spirochete for ingestion by phagocytic cells. Unfortunately, opsonizing antibodies are induced by several proteins common to other microorganisms (viz. 41 kDa proteins that
5 comprise bacterial flagella), making their value for vaccination-induced antibody-mediated immunity, at best, questionable.

A second common immune response is the production of borreliacidal (lethal) antibodies. In contrast to opsonizing antibodies, borreliacidal antibodies recognize epitopes on only a few *Borrelia* spp. proteins. After binding to the specific target on
10 the spirochete, the borreliacidal antibodies most commonly induce complement to form a membrane attack complex that kills the organism without the necessity of scavenging by phagocytic cells.

The canine Lyme disease bacterins presently employed in vaccines were developed to provide protection by inducing OspA borreliacidal antibodies (Hsien-Chu et al., *JAVMA* 1992, 201:403-411; Ma et al., *Vaccine* 1996, 14:1366-1374;
15 Wikle et al., *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2006, 4:23-28; Straubinger et al., *Vaccine* 2001, 20:181-193) that kill the OspA-expressing spirochetes in the infected ticks as the parasites procure a bloodmeal (Fikrig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89:5418-5421). Straubinger et al., (*Vaccine* 2002, 20:181-193) has reported
20 that a whole cell vaccine induced significantly higher titers of borreliacidal antibodies than a recombinant OspA. Although such vaccines have been reasonably successful, vaccination failures have been reported (Levy et al. *JAVMA* 1993, 202:1834-1838; Ma et al., *Vaccine* 1996, 14:1366-1374; Schutzer et al., *N. Engl. J. Med.* 1997, 337:794-795).

It is now understood that the OspA borreliacidal antibodies generated often fail to sterilize feeding ticks, because the antibodies only recognize *B. burgdorferi* ss (Jobe et al., *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32:618-622; Lovrich et al., *Infect. Immun.* 1995, 63:2113-2119) that are expressing OspA, and the ticks are commonly infected with
25 *B. burgdorferi* ss spirochetes that are not expressing OspA (Fikrig et al., *Infect. Immun.* 1995, 63:1658-1662; Ohnishi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98:670-675). In addition, the ticks are commonly also infected with other pathogenic *Borrelia* spp. including *B. afzelii* and *B. garinii* (Ornstein et al., *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39:1294-1298), while the OspA antibodies are genospecies specific (Lovrich
30

et al., *Infect. Immun.* 1995, 63:2113-2119). Moreover, the 'window of opportunity' for protection by OspA borreliacidal antibodies is limited even when the spirochetes are susceptible, because the expression of OspA, which mediates attachment to the tick midgut (Pal et al., *J. Clin. Invest.* 2000, 106:561-569), is down-regulated shortly after the infected tick begins feeding (Schwan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:2909-2913).

B. burgdorferi ss OspC is another potential target for borreliacidal antibody-mediated immunity (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741). This protein appears to have an epitope that is responsible for inducing borreliacidal antibodies and is conserved among the pathogenic *Borrelia* spp. (Lovrich et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751). Although the specific function of the OspC protein remains unknown, it has been suggested that OspC expression is required for infection of mammals, but not for infection of ticks (Grimm et al., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(9):3142-3147). In any event, Lyme disease spirochetes express OspC shortly after the tick begins feeding (Schwan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:2909-2913) and must continue to express OspC in order to establish an infection in mammals (Stewart et al., *Infect. Immun.* 2006, 74:3547-3553, Tilly et al., *Infect. Immun.* 2006, 74:3554-3564). Therefore, the "window of effectiveness" of the OspC borreliacidal antibodies is increased significantly compared to OspA borreliacidal antibodies.

It has been shown that the OspC protein can induce protective borreliacidal antibodies (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741, Ikushima et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000, 29:15-21), but some previous "mapping" studies have localized the epitopes to highly heterogeneous regions of the protein (Buckles et al., *Clin. Vacc. Immunol.* 2006, 13:1162-1165). Therefore, borreliacidal OspC antibodies raised against these regions would only provide antibody-mediated immunity against a small number of *Borrelia* spp. isolates. Lovrich et al. (*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751) identified an OspC borreliacidal antibody epitope within the C-terminal 7 amino acids (OspC7) of the protein. Most significantly, the epitope is conserved among the pathogenic *Borrelia* spp. However, traditional laboratory *B. burgdorferi* ss isolates that express OspA (i.e., contain the *ospA/ospB* operon) cannot be manipulated in the laboratory to also induce significant levels of OspC borreliacidal antibodies without significantly

impairing their ability to induce OspA borreliacidal antibodies. Moreover, vaccinating with killed traditional laboratory *B. burgdorferi* ss isolates that express OspA does not induce borreliacidal OspC antibodies (Schwan et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:2909-2913, Obonyo et al., 1999, *J. Clin. Microbiol.*, 37:2137-2141).

Callister et al., (U.S. Patent Nos. 6,210,676 and 6,464,985, incorporated by reference herein) have suggested employing an immunogenic polypeptide fragment of OspC, alone or in combination with an OspA polypeptide, to prepare a vaccine to protect humans and other mammals against Lyme disease. Livey et al. (U.S. Patent No. 6,872,550, incorporated by reference herein) also proposed a vaccine for immunizing against Lyme disease prepared from a combination of recombinant OspA, OspB, and OspC proteins. However, to date, no recombinant protein vaccine has been shown to be an improvement over the vaccines that are currently marketed. Therefore, there remains a longstanding need in the art for an improved vaccine to protect mammals, and especially canines, from Lyme disease.

The citation of any reference herein should not be construed as an admission that such reference is available as "prior art" to the instant application.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the present invention provides new immunogenic compositions that may be used in vaccines. In one aspect of the present invention, a vaccine protects against Lyme disease. In a particular embodiment of this type, the recipient of the vaccine is a canine. In another embodiment, the recipient of the vaccine is a domestic cat. Other domestic mammals may be protected by the vaccines and/or methods of the present invention such as horses and/or cattle. The present invention further provides combination vaccines for eliciting protective immunity against Lyme disease and other diseases, e.g., other canine infectious diseases. Methods of making and using the vaccines of the present invention are also provided.

A vaccine of the present invention comprises an immunologically effective amount of organisms of a first or a single strain (optionally inactivated) that expresses OspC antigen. The strain is one that, when grown under standard culture conditions, is killed in the presence of OspC-specific borreliacidal antibodies

(complement is optionally required), including borreliacidal antibodies against the conserved epitope OspC7, elicited in an animal vaccinated by *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439). In a particular embodiment of this type, the first or a single strain of *Borrelia* genospecies constitutively expresses the OspC antigen. In
5 a more particular embodiment, the first strain is *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).

A vaccine composition of the present invention can further include an immunologically effective amount of inactivated organisms from one or more additional strains (which may be collectively labeled herein as the second strain),
10 from a pathogenic *Borrelia* genospecies. In a particular embodiment the second strain exhibits OspA and OspB antigens.

Examples of appropriate second strains include one or more of the following: *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680), *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210), *B. afzelii* (e.g., available as ATCC No. 51567) and *B. garinii* (e.g., available
15 as ATCC Nos. 51383 and 51991), *B. burgdorferi* ss DK7, *B. burgdorferi* ss 61BV3, *B. burgdorferi* ss ZS7, *B. burgdorferi* ss Pka, *B. burgdorferi* ss IP1, IP2, IP3, *B. burgdorferi* ss H11, *B. burgdorferi* ss P1F, *B. burgdorferi* ss Mil, *B. burgdorferi* ss 20006, *B. burgdorferi* ss 212, *B. burgdorferi* ss ESP1, *B. burgdorferi* ss Ne-56, *B. burgdorferi* ss Z136, *B. burgdorferi* ss ia, and/or any combinations thereof.

The vaccine composition broadly includes from about 1×10^4 to about 1×10^{10} organisms per milliliter of each respective strain. In a particular embodiment, the vaccine includes from about 1×10^6 to about 5×10^9 organisms per milliliter of each respective strain. In another embodiment, the vaccine includes from about 1.0×10^8 to about 5×10^8 organisms per milliliter of the (or each) second
20 strain and from about 5.0×10^8 to about 5×10^9 organisms per milliliter of the first strain.

The vaccine composition also can include a pharmaceutically acceptable adjuvant, e.g., such as, aluminum compounds (e.g., aluminum phosphate, aluminum hydroxide) metabolizable and non-metabolizable oils, block polymers,
30 immune stimulating complexes, vitamins and minerals, and CARBOPOL® (e.g., CARBOPOL 941). In a particular embodiment the pharmaceutically acceptable adjuvant comprises a uniformly dispersed micron size oil droplets in water emulsion (e.g., as sold under the trademark Emulsigen®).

Optionally, the vaccine composition also includes a pharmaceutically acceptable immune stimulant, e.g., cytokines, growth factors, chemokines, supernatants from cell cultures of lymphocytes, monocytes, or cells from lymphoid organs, cell preparations and/or extracts from plants, bacteria or parasites, or mitogens.

The invention further provides for a method of immunizing a canine, or other mammal, against pathogenic *Borrelia* spp., specifically *B. burgdorferi* ss, comprising injecting the canine with an immunologically effective amount of the above described inventive vaccine. Such vaccines can include from about 1×10^8 to about 3×10^9 organisms of each respective strain, for example. Vaccines may be administered by a route such as: intramuscular injection, subcutaneous injection, intravenous injection, intradermal injection, oral administration, intranasal administration, and combinations thereof. In a particular embodiment, after vaccination, the immunized canine produces borreliacidal antibodies.

The invention further provides serum obtained from a vaccinated animal that contains borreliacidal antibodies that bind to *B. burgdorferi* ss OspC. Similarly, the invention provides for purified antibodies that bind to OspC. In a particular embodiment, the serum contains a significant proportion of OspC7-specific borreliacidal antibodies.

The invention further provides combination vaccines that include one or more strains of the *Borrelia* genospecies of the present invention in combination with one or more other canine pathogens and/or immunogens, including, e.g., immunogens for eliciting immunity to canine distemper virus; canine adenovirus; canine parvovirus; canine parainfluenza virus; canine coronavirus; canine influenza virus; and/or *Leptospira* serovars, e.g., *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa, *Leptospira interrogans* serovar canicola, *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae, and/or *Leptospira interrogans* serovar pomona. Additional canine pathogens that can be added to a combination vaccine of the present invention include *Leishmania* organisms such as *Leishmania major* and *Leishmania infantum*; *Bordetella bronchiseptica*; a *Mycoplasma* species (e.g., *Mycoplasma cynos*); rabies virus; anaplasma organisms such as *anaplasma phagocytophilum* and *anaplasma platys*; and *Ehrlichia canis*.

These and other aspects of the present invention will be better appreciated by reference to the following Figures and the Detailed Description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

5 FIG. 1 is a Western blot of a normal dog serum control (NS) or sera from a dog after vaccination (study day 43) with the test product (TP) or after challenge (study day 134) with *B. burgdorferi* ss-infected ticks (NI). Note the presence of infection-specific antibodies against a protein with a molecular weight of approximately 20 kDa.

10 FIG. 2A is a Western blot of a normal dog serum control (NS) or sera from separate cohorts of individual dogs (numbered from 1-15) after vaccination with placebo and challenge with *B. burgdorferi* ss-infected ticks (study day 134).

 FIG. 2B is a Western blot of a normal dog serum control (NS) or sera from separate cohorts of individual dogs (numbered from 1-15) after vaccination with the
15 test product. Note the presence of the infection-specific 20 kDa antibodies in 14 (93%) dogs vaccinated with placebo (FIG. 2A) and 0 ($p < 0.0001$) dogs vaccinated with the test product (FIG. 2B).

 FIG. 3A is a representative example of the histopathological changes in the joints of placebo-vaccinated dogs that were infected with *B. burgdorferi* ss. The
20 area within the rectangle represents a significant infiltration of neutrophils and mononuclear cells characteristic of canine Lyme arthritis

 FIG. 3B is a representative example of the absence of histopathological changes in the joints of test product-vaccinated dogs that were infected with
25 *B. burgdorferi* ss. The area within the oval is devoid of any infiltrating neutrophils and mononuclear cells.

 FIG. 4 illustrates determination of OspC7 ELISA reactivity using normal sera (N) from individuals with no previous history (chart-review) of Lyme or Lyme-related symptoms ($n = 36$), uncharacterized sera from blood donors (BD, $n = 100$) or individuals undergoing cholesterol screenings (CS, $n = 100$), or sera from volunteers
30 with blood factors or illnesses that commonly cross-react with *B. burgdorferi* ss antigens, including antinuclear antibodies (ANA, $n = 20$), rheumatoid factor (RF, $n = 20$), mononucleosis (EBV, $n = 10$), cytomegalovirus (CMV, $n = 10$), syphilis (SYPH, $n = 13$) or Rocky Mountain spotted fever (RMSF $n = 4$). The solid line denotes three

standard deviations above the mean adsorbance value of the normal and potential cross-reactive sera. Values above the line correspond to positive results to a 99% probability (1% background value).

FIG. 5 illustrates OspC7 ELISA reactivity using sera from probable Lyme disease patients with erythema migrans (n = 86) representing patients with typical Lyme lesions, likely Lyme patients with "atypical lesions" (n = 22), and possible Lyme patients with constitutional symptoms (n = 49) [earliest clinical signs]. The solid line denotes three standard deviations above the mean adsorbance value of the normal and potential cross-reactive sera.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides vaccine compositions that include an immunologically effective amount of organisms from one or more strains of a *Borrelia* genospecies that induce an effective borreliacidal antibody-mediated immunity in the recipient vaccinated animal. When organisms of such strains are grown under standard *Borrelia* genospecies growth conditions they are killed in the presence of OspC-specific antibodies, e.g., an antibody or antibodies elicited in an animal vaccinated with *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).

In one aspect of the present invention, the window of effectiveness of the antibodies induced by a vaccine of the present invention is increased significantly compared to conventional vaccines based solely on OspA borreliacidal antibodies. In another aspect, a vaccine of the present invention provides a better chance of stimulating a beneficial immunologic memory response, e.g., due to the expression of OspC *in vivo*, and/or an additional and/or enhanced protection against multiple pathogenic strains of *Borrelia* spp.

In one embodiment of the present invention, when the organisms of such strains are grown under standard *Borrelia* genospecies growth conditions, they constitutively express OspC antigen. In a particular embodiment of this type, when the organisms of such strains are grown under standard *Borrelia* genospecies growth conditions they are killed by a complement specific reaction. In yet another embodiment, a significant proportion of the OspC-specific borreliacidal antibodies in the sera induced by a vaccine comprising organisms of such strains are specific for the conserved epitope OspC7 and thereby, provide protection against multiple

pathogenic *Borrelia* genospecies (e.g. *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, and/or *B. garinii*). In still another embodiment, organisms of such strains exhibit no OspA or OspB antigen. In yet another embodiment, organisms of such strains have any two or more of these properties. In yet another embodiment, organisms of such strains have any three or more of these properties. In still another embodiment, organisms of such strains have any four or more of these properties. In a particular embodiment, organisms of such strains have all of these properties. One such particular strain is *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).

In an alternative embodiment, the inventive vaccine is a composition that includes both a first strain as described above and an effective amount of organisms of at least a second strain. The second strain is preferably from a pathogenic *Borrelia* genospecies that induces borreliacidal OspA antibodies when administered as a part of the inventive vaccine. One or more additional compatible vaccine genospecies can also be included therein. In addition, the vaccines of the present invention can include one or more other mammalian (e.g., canine) pathogens and/or immunogens.

In order to more fully appreciate the invention, the following definitions are provided.

The use of singular terms for convenience in description is in no way intended to be so limiting. Thus, for example, reference to a composition comprising "a polypeptide" includes reference to one or more of such polypeptides. In addition, reference to an "organism" includes reference to a plurality of such organisms, unless otherwise indicated.

As used herein the term "approximately" is used interchangeably with the term "about" and signifies that a value is within fifty percent of the indicated value i.e., a composition containing "approximately" 1×10^{10} organisms per milliliter contains from 5×10^9 to 5×10^{10} organisms per milliliter.

The term "genospecies," was first used and defined by G. Baranton et al., 1992, *International J. of Systematic Bacteriology* 42: 378-383, and is used herein in the same way that the term, "species" is employed in describing the taxonomy of non-*Borrelia* organisms.

"Standard growth conditions" for culturing *Borrelia* genospecies require growth at a temperature ranging from about 33°C to about 35°C, in BSK (Barbour

Stoenner Kelly) medium. BSK medium as described herein was prepared according to Callister et al. [*Detection of Borreliacidal Antibodies by Flow Cytometry*, Sections 11.5.1 - 11.5.12, *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley and Sons, Inc. Supplement 26, (2003) hereby incorporated by reference herein in its entirety].
5 (BSK medium is also commercially available, e.g., from Sigma, St. Louis, MO).

As used herein "OspC7" is an immunodominant OspC borreliacidal antibody epitope located in a 7 amino acid region (Lovrich et al., 2005, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12:746-751, incorporated by reference herein in its entirety) within the C-terminal 50 amino acids of OspC, as disclosed by Callister et al. (U.S. Pat. Nos.
10 6,210,676 B1 and 6,464,985 B1, which are incorporated by reference herein in their entireties) that is absolutely conserved among the known pathogenic *Borrelia* spp. This conservation is readily confirmed by a BLAST search of the codon segment encoding the 7 amino acid segment described by Lovrich et al. Such a search, when conducted on October 9, 2006 generated a results list of 100 *Borrelia* species
15 containing the above noted OspC 7-mer epitope coding segment.

An "OspC-specific borreliacidal antibody" is one that is found, e.g., in the serum of an animal vaccinated with *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439), and is one that selectively binds to any epitope of the OspC antigen and kills the spirochetes dependent or independent of complement. An "OspC7-specific
20 borreliacidal antibody" is one that is found, e.g., in the serum of an animal vaccinated with *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439), and is one that selectively binds to the 7 C-terminal amino acids of OspC as described by Lovrich et al. [*Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12:746-751, (2005), incorporated by reference herein in its entirety] and kills the spirochetes (generally by inducing a complement-mediated membrane attack complex). The specificity of OspC borreliacidal
25 antibodies has been well-established. For example, OspC borreliacidal antibodies are detected commonly in Lyme disease sera by measuring the susceptibility of *B. burgdorferi* ss 50772 in a borreliacidal antibody test. Sera from human patients with closely-related illnesses only rarely (2%) contain cross-reactive antibodies that
30 also kill strain 50772 (described in detail by Callister, et al., 1996, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3(4): 399-402). Moreover, a peptide ELISA that uses the OspC7 borreliacidal epitope accurately captures borreliacidal antibodies in Lyme disease sera, and sera from patients with other closely related illnesses only

5 rarely (< 2%) contain cross-reactive antibodies that also bind the OspC7 peptide (illustrated by Figs. 4 and 5).

When a "significant proportion" of the OspC-specific borreliacidal antibodies in sera induced by a vaccine are specific for the conserved epitope OspC7, it means
5 that there is a measurable reduction in the OspC-specific borreliacidal antibodies in the sera following the absorption of that sera with OspC7. It is preferably defined as at least a 2-fold reduction in the borreliacidal antibody titer of the sera detected by using *B. burgdorferi* ss 50772, and more preferably as a 2- to 4-fold, or greater
10 reduction in the borreliacidal antibody titer of the sera following the absorption of that sera with OspC7.

A "complement specific reaction" is an antibody reaction that requires serum complement to be present in order for *Borrelia* spp. organism(s) to be killed by a borreliacidal antibody.

For the purposes of this invention, an "inactivated" *Borrelia burgdorferi* ss
15 organism is an organism which is capable of eliciting an immune response in an animal, but is not capable of infecting the animal. The *Borrelia burgdorferi* ss isolates may be inactivated by an agent selected from the group consisting of binary ethyleneimine, formalin, beta-propiolactone, thimerosal, or heat. In a particular embodiment, the *Borrelia burgdorferi* ss isolates are inactivated by binary
20 ethyleneimine.

The terms "adjuvant" and "immune stimulant" are used interchangeably herein, and are defined as one or more substances that cause stimulation of the immune system. In this context, an adjuvant is used to enhance an immune response to one or more vaccine antigens/isolates. An adjuvant may be
25 administered to the target animal before, in combination with, or after the administration of the vaccine. Adjuvants of the present invention may be obtained from any of a number of sources including from natural sources, recombinant sources, and/or be chemically synthesized, etc. Examples of chemical compounds used as adjuvants include, but are not limited to aluminum compounds,
30 metabolizable and non-metabolizable oils, block polymers, ISCOM's (immune stimulating complexes), vitamins and minerals (including but not limited to: vitamin E, vitamin A, selenium, and vitamin B12), Quil A (saponins), and polymers of acrylic acid cross-linked with polyalkenyl ethers or divinyl glycol e.g., CARBOPOL®.

Additional examples of adjuvants, that sometimes have been referred to specifically as immune stimulants, include bacterial and fungal cell wall components (e.g., lipopolysaccharides, lipoproteins, glycoproteins, muramylpeptides, *beta*-1,3/1,6-glucans), various complex carbohydrates derived from plants (e.g., glycans, acemannan), various proteins and peptides derived from animals (e.g., hormones, cytokines, co-stimulatory factors), and novel nucleic acids derived from viruses and other sources (e.g., double stranded RNA, CpG). In addition, any number of combinations of the aforementioned substances may provide an adjuvant effect, and therefore, can form an adjuvant of the present invention. One preferred adjuvant is Emulsigen®.

B. burgdorferi ss 50772 (ATCC No. PTA-439) as stated in US Patent No. 6,210,676, and *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680) as stated in US Patent No. 6,316,005, were deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard Manassas (VA) 20110 on July 30, 1999, and April 11, 2000, respectively. The co-owners of the rights to the present invention individually hold the rights to these two aforementioned patents.

It is also to be understood that this invention is not limited to the particular configurations, process steps, and materials disclosed herein as such configurations, process steps, and materials may vary somewhat. It is also to be understood that the terminology employed herein is used for the purpose of describing particular embodiments only and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims and equivalents thereof.

Additional Vaccine Strains

• Additional OspC Strains

In one aspect, the present invention provides the use of *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439) in a vaccine that protects against Lyme disease, either alone, or in combination with other *Borrelia* genospecies strains. Notably, *B. burgdorferi* ss 50772 was initially rejected as a candidate for being useful in a vaccine because it was incorrectly reported that this strain did not express OspC (Anderson et al., 1996, *J. Clin. Microbiol.*, 34:524-529).

The present invention further provides unique and specific criteria to select/identify other such useful isolates for vaccines of the present invention. In particular, isolates can be selected/identified that are susceptible to being killed by OspC-specific antibodies, and preferably, for also possessing one or more, or all of the following attributes: (i) the susceptibility to being killed by OspC-specific antibodies through a complement specific reaction, (ii) the ability to induce OspC borreliacidal antibodies in a recipient vaccinated by that isolate; (iii) for a significant proportion of the OspC borreliacidal antibodies so induced to be specific for the conserved epitope within the C-terminal 7 amino acids (OspC7); (iv) lacking the capacity to express OspA and OspB; and/or (v) the ability to express OspC constitutively *in vitro*.

A. Suppression of OspA/B Expression and Enhancement of OspC Expression by Culture Conditions

It has been shown by Obonyo et al. (*J. Clin. Microbiol.* 1999, 37:2137-2141) that OspA expression can be downregulated, and OspC expression can be upregulated over a five day period by co-culturing a normal pathogenic *Borrelia* spp. strain (strains JMNT and N40 of *B. burgdorferi* ss) with a tick cell line (*Ixodes scapularis* ISE6). The most pronounced effect was seen by culturing at 37°C. Thus, this method will convert one or more conventional pathogenic *Borrelia* strains into a form useful for a vaccine of the present invention.

B. Suppression of OspA/B Expression and Enhancement of OspC Expression by Mutation

In a further embodiment, genetic manipulation of a *Borrelia* spp. strain that originally expresses OspA and OspB is employed to downregulate or to delete the genes that code for the expression of OspA and OspB that results in the upregulation of OspC expression. Any art-known method of genetic manipulation is contemplated to be employed for this purpose. For example, an inactivated analog of the OspA/OspB gene is introduced into a plurality of organisms of an available *Borrelia* spp. strain in the form of a *Borrelia* spp. compatible plasmid prepared with an antibiotic selection marker (see, e.g., Grimm et al., 2004, *Proc. Nat'l Acad. Sci* 101(9):3142-3147 who report that OspC expression can be blocked in a *Borrelia*

spp. by inserting OspC inactivation and complementation plasmids into a *B. burgdorferi* B31-A3 strain). Recombination events between the introduced plasmid and the naturally occurring plasmid carrying OspA/OspB will result in a certain number of successful recombinant *Borrelia* spp. organisms carrying a mutated OspA/OspB plasmid. Selection can be premised, for example, via a linked antibiotic resistance and growth in the presence of the corresponding antibiotic. *Borrelia* spp. organisms with selective elimination of OspA/OspB expression are contemplated to upregulate the expression of OspC.

In a further optional embodiment, one or more additional *B. burgdorferi* ss or *Borrelia* spp. organisms that express OspA, OspB, and/or one or more additional Osp antigens can be included in the vaccine composition as additional organisms.

Preferably, each respective inactivated organism is present in the vaccine in a concentration ranging from about 1×10^4 to about 1×10^{10} organisms/mL. In particular, the vaccine is preferably administered to a canine in a dose of no less than 1.0×10^8 organisms/mL of *B. burgdorferi* ss S-1-10, and no less than 5.0×10^8 organisms/mL of *B. burgdorferi* ss 50772.

• Additional OspA Strains

A second strain, providing the OspA antigen, can be a conventional pathogenic laboratory *B. burgdorferi* ss isolate (Barbour et al., 1985, *J. Clin. Microbiol.* 52:478-484) such as *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210). A particular second organism is the exemplified *B. burgdorferi* ss S-1-10 strain (ATCC No. PTA-1680). Additional strains suitable for use as the second organism for vaccine compositions optimized for regions outside of North America include, e.g., the strains: *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210), *B. afzelii* (e.g., available as ATCC No. 51567) and *B. garinii* (e.g., available as ATCC Nos. 51383 and 51991), as well as those listed in Table 1 below.

Table 1

Strain	Country	Cultured from
<i>B. burgdorferi</i> ss DK7 ¹	Denmark	skin
<i>B. burgdorferi</i> ss 61BV3 ¹	Germany	skin
<i>B. burgdorferi</i> ss ZS7 ¹	Switzerland	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss Pka ¹	Germany	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss IP1,IP2,IP3 ¹	France	CSF
<i>B. burgdorferi</i> ss Hll ¹	Italy	blood
<i>B. burgdorferi</i> ss P1F ¹	Switzerland	synovia
<i>B. burgdorferi</i> ss Mil ¹	Slovakia	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss 20006 ¹	France	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss 212 ¹	France	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss ESP1 ¹	Spain	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss Ne-56 ¹	Switzerland	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss Z136 ¹	Germany	tick
<i>B. burgdorferi</i> ss ia ²	Finland	CSF

¹ Lagal et al., J. Clin. Microbiol. 2003, 41:5059-5065.

² Heikkila et al, J. Clin. Microbiol. 2002, 40:1174-1180.

The vaccine composition can include a pharmaceutically acceptable adjuvant. "Adjuvants" are agents that nonspecifically increase an immune response to a particular antigen, thus reducing the quantity of antigen necessary in any given vaccine, and/or the frequency of injection necessary in order to generate an adequate immune response to the antigen of interest. Suitable adjuvants for the vaccination of animals include, but are not limited to, Adjuvant 65 (containing peanut oil, mannide monooleate and aluminum monostearate); Freund's complete or incomplete adjuvant; mineral gels, such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, and alum; surfactants, such as hexadecylamine, octadecylamine, lysolecithin, dimethyldioctadecylammonium bromide, N,N-dioctadecyl-N',N'-bis (2-hydroxymethyl) propanediamine, methoxyhexadecylglycerol, and pluronic polyols; polyanions, such as pyran, dextran sulfate, poly IC, polyacrylic acid, and CARBOPOL[®] (e.g., CARBOPOL 941); peptides, such as muramyl dipeptide, dimethylglycine and tuftsin; and oil emulsions. Information concerning adjuvants is disclosed, e.g., in the series by P. Tijssen [*Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, 3rd Edition, 1987, Elsevier, New York, incorporated by reference herein].

Optionally, the vaccine composition can further include a pharmaceutically acceptable immune stimulant, such as bacterial and/or fungal cell wall components (e.g., lipopolysaccharides, lipoproteins, glycoproteins, muramylpeptides), various complex carbohydrates derived from plants (e.g., glycans, acemannan), various proteins and peptides derived from animals (e.g., hormones, cytokines, co-stimulatory factors), and novel nucleic acids derived from viruses and/or other sources (e.g., double stranded RNA, CpG).

The vaccine composition is readily administered by any standard route including intravenous, intramuscular, subcutaneous, oral, intranasal, intradermal, and/or intraperitoneal vaccination. The artisan will appreciate that the vaccine composition is preferably formulated appropriately for each type of recipient animal and route of administration.

Thus, the present invention also provides methods of immunizing a canine against *B. burgdorferi* ss and other *Borrelia* spp. One such method comprises injecting a canine with an immunologically effective amount of a vaccine of the present invention, so that the canine produces appropriate OspA and OspC borreliacidal antibodies.

In one embodiment, the subcutaneous administration of the present invention results in the production of high concentrations of OspA and OspC borreliacidal antibodies including borreliacidal antibodies specific for OspC7. In another embodiment, the present invention provides a vaccine that comprises a specific, minimum amount of each *B. burgdorferi* ss strain that is effective against harmful *Borrelia* spp. In another embodiment, a vaccine of the present invention is effective for the prevention of *B. burgdorferi* ss and other pathogenic *Borrelia* spp. infections in dogs. In a particular embodiment, the vaccine comprises a safe and immunologically effective combination of two *B. burgdorferi* ss strains of the present invention and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

The present invention discloses that a vaccine comprising a specific minimal amount of two *B. burgdorferi* ss isolates protects dogs from *Borrelia* spp. following tick challenge. The present invention further discloses a vaccine that elicits specific minimal amounts of *B. burgdorferi* ss-specific OspA and *Borrelia* spp.-specific OspC borreliacidal antibodies in vaccinated dogs. The vaccines of the present invention also may be administered with an acceptable immune stimulant and/or adjuvant.

EXAMPLES

The following examples serve to provide further appreciation of the invention but are not meant in any way to restrict the effective scope of the invention.

EXAMPLE 1

VACCINATION WITH RECOMBINANT OSPA

A. MATERIALS AND METHODS

- **Animals:**

Five- to 10-week old LVG hamsters were obtained from Charles River Breeding Laboratories, Inc. (Wilmington, Mass.). Hamsters were housed three or four per cage at an ambient temperature of 21°C and provided with food and water *ad libitum*.

- **Vaccination of hamsters and collection of serum:**

Hamsters were vaccinated subcutaneously in the back of the neck with 0.5 mL of a commercially available recombinant OspA (rOspA) vaccine, RECOMBITEK® Lyme, (Merial Limited, Duluth, GA), and given a booster three weeks after the primary vaccination. At 3, 7, 9, and 15 weeks after the primary vaccination, groups of five hamsters each were mildly anesthetized by inhalation of ether contained in a nose-and-mouth cup and bled by intracardiac puncture. The blood was allowed to clot, and the serum was separated and stored at -70°C until use. In addition, hamster sera from three unvaccinated hamsters were pooled and used as a normal serum control. As an additional control, 20 hamsters were vaccinated in both hind thighs with 0.25 mL of a commercially available whole cell canine Lyme disease vaccine (Galaxy, Solvay Animal Health, Inc., Mendota Heights, Minn., now Schering-Plough Animal Health, Elkhorn, Nebraska) that contained *B. burgdorferi* ss S-1-10. The animals were given a booster, and sera were collected as described above.

- **Preparation of BSK Medium:**

Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) broth medium was used for *in vitro* cultivation of *B. burgdorferi* and was the primary substrate used in the borreliacidal antibody test and in methods described throughout the present application. BSK medium was prepared as described by Callister et al., [*Detection of Borreliacidal Antibodies by Flow Cytometry*, Section 11.5.1 - 11.5.12, *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley and Sons, Inc., Supplement 26, (2003) hereby incorporated by reference herein in its entirety. In brief, the BSK medium was prepared by the following method.

Materials:

HEPES (Sigma)
Neopeptone (Difco)
Sodium citrate (Sigma)
Glucose (Sigma)
Sodium bicarbonate (Sigma)
TC yeastolate (Difco)
Pyruvic acid (Sigma)
N-acetyl glucosamine (Sigma)
Bovine serum albumin (Sigma)
Gelatin (microbiological grade; Difco)
5N NaOH
10x Connaught Medical Research Laboratories (CMRL) 1066
(MP Biomedicals) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium
(Sigma) with L-glutamine and without sodium bicarbonate
Rabbit serum (Life Technologies), heat-inactivated 45 min at 56°C.
56°C water bath
Positive-pressure pump
Millipore filter manifold
Prefilter (124 mm)
0.2-, 0.45-, and 0.8-µm filters (142-mm diameter)
0.2-µm bell filters
Sterile 100-ml containers
Dark-field microscope

Preparation of BSK medium

1. The following were combined in a 2-liter flask, with from 2 to 4 hours of mixing. 900 mL Mini-Q double-filtered or deionized distilled water:

- 5 6.0 g HEPES
- 5.0 g neopeptone
- 0.7 g sodium citrate
- 5.0 g glucose
- 2.2 g sodium bicarbonate
- 2.5 g TC yeastolate
- 10 0.8 g pyruvic acid
- 0.4 g N-acetyl glucosamine
- 50 g bovine serum albumin (fraction V)

2. The components were slowly mixed using the slowest stir plate setting because
15 vigorous stirring may result in breakdown products toxic to *B. burgdorferi*.

3. While the BSK components were mixing, the gelatin solution was prepared as follows: in a 500-mL flask, 200 mL Milli-Q double-filtered or deionized distilled water and 14 g gelatin were combined and heated on a medium setting with stirring to
20 dissolve. The solution was then autoclaved for 15 min at 121°C, and then placed in a 56°C water bath.

4. When BSK components were dissolved completely, the solution was adjusted to pH 7.5 with 5N NaOH.
25

5. The 200 mL gelatin solution, 100 mL 10x CMRL 1066 medium, and 64 mL heat-inactivated rabbit serum (45 min at 56°C) were then combined with the other BSK components and thoroughly mixed.

30 **BSK Medium Sterilized**

6. Using the positive-pressure pump, BSK medium was pumped through the Millipore filter manifold loaded with a 124-mm prefilter and 142-mm 0.2-, 0.45-, and 0.8-µm pore diameter filters stacked from smallest (bottom) to largest (top) pore size. [The BSK medium cannot be sterilized by autoclaving. Pre-filtration was
35 necessary to remove large particulates prior to filter sterilization.]

7. The BSK medium was then filter-sterilized into a sterile container using the positive-pressure pump and a sterile 0.2- μ m bell filter.

Sterility Confirmed

5 8. A 1-mL aliquot of sterile BSK was aseptically removed and transferred to a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube, and incubated overnight at 35°C. The remaining filter-sterilized BSK was stored at 4°C.

9. Following the incubation, the sterile BSK was examined using dark-field
10 microscopy to confirm sterility.

10. The sterile BSK was then transferred into sterile storage containers.
[Headspace was kept to a minimum when filling the storage containers in order to
reduce the oxidation of the sterile BSK medium.]

15

Quality Control Of Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) Medium

Before using BSK medium, it is important to make sure that BSK supports the growth of small numbers of *Borrelia* spp. and that the viable spirochetes grow without clumping. A highly variable component of BSK medium is bovine serum albumin (BSA). The quality control protocol employed herein utilized test cultures to
20 incubate and inspect resulting cultures, as described in detail by Callister *et al.*, 2003, *Id.*

- **Detection of OspA borreliacidal antibodies:**

25 OspA borreliacidal antibodies were detected using a flow cytometric procedure and *B. burgdorferi* ss S-1-10 (Callister *et al.*, *Arch. Intern. Med.* 1994, 154:1625-1632). A fresh culture of the spirochetes was diluted with fresh BSK to a concentration of approximately 5×10^6 spirochetes/mL. Concomitantly, serum samples were diluted 1:40 with fresh BSK and sterilized by passage through a
30 0.2 micron (μ m) pore-size microcentrifuge filter. A 200 μ L aliquot was then transferred to a sterile 1.5 mL screw-cap microcentrifuge tube and serially diluted in BSK from 1:80 to 1:20,480. Serum samples were heat-inactivated at 56°C for 10 min, and a 100 μ L aliquot of the spirochete suspension (5×10^5 spirochetes) and

10 μ L of sterile guinea pig complement (Sigma) were added. The assays were mixed thoroughly and incubated for 16-24 hours at 35°C.

Following incubation, 100 μ L of each assay suspension was transferred to a polypropylene tube containing 400 μ L of PBS and 1 μ g/mL acridine orange. A
5 FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) was then used to detect borreliacidal activity. Spirochetes were isolated by gating (CellQuest software, Becton Dickinson) and analyzed for 1-2 min with the flow rate set at low. The OspA borreliacidal antibodies were detected indirectly by monitoring the increased fluorescence intensity that occurs when the acridine
10 orange intercalates into blebbed, non-viable spirochetes. A $\geq 13\%$ shift in the mean fluorescence intensity compared to a normal serum control was considered positive (Callister et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9:908-912). The presence of blebbed, non-motile *B. burgdorferi* was then confirmed by darkfield microscopy. A positive control was included with each assay, and identical reactivity (+/- one
15 dilution) from run to run was required to minimize interassay variability. In addition, serum samples collected from each dog were assayed concurrently.

B. RESULTS

Vaccination with the rOspA vaccine induced only minimal amounts (mean
20 titer < 61) of OspA borreliacidal antibodies after 7 weeks that were not detected after 15 weeks (Table 2). In contrast, hamsters vaccinated with the canine vaccine that contained a typical (Barbour et al., *J. Infect. Dis.* 1985, 152-478-484) *B. burgdorferi* ss strain (S-1-10) induced high levels of borreliacidal OspA antibodies that peaked at week 7 (titer > 2560) and remained elevated for the duration of the
25 study.

Table 2. Mean titer^a of OspA borreliacidal antibodies^b after vaccination with rOspA or GALAXY™ (S-1-10) canine Lyme disease vaccines.

Vaccine	Week 3	Week 7	Week 9	Week 15
rOspA	9	61	4	ND ^c
S-1-10	1470	>2560	970	735

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using *B. burgdorferi* ss S-1-10.

^c ND = None detected.

Therefore, the canine recombinant OspA vaccine fails to elicit significant titers of OspA borreliacidal antibodies in hamsters.

EXAMPLE 2

VACCINATION WITH RECOMBINANT OSPC

A. MATERIALS AND METHODS

• Animals:

Five- to 10-week old LVG hamsters were obtained from Charles River Breeding Laboratories, Inc. (Wilmington, Mass.). Hamsters were housed three or four per cage at an ambient temperature of 21°C and provided with food and water *ad libitum*.

• Preparation of recombinant ("r") OspC vaccine

rOspC was recovered from *E. coli* JM109 containing pX3-22 as described previously (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741). Briefly, the *E. coli* was cultured at 37°C in 2xTY broth containing ampicillin, and isopropyl-β-d-galactopyranoside (IPTG) (0.1 mM) was added during the exponential growth phase. Cells were pelleted by centrifugation, resuspended in phosphate buffered saline (PBS), and lysed by sonication. Triton X-100 (1% vol/vol) was added, and the lysate was centrifuged at 10,000 x g for 5 min. The sonicated *E. coli* cells were then pelleted by centrifugation, and the supernatant was passed over a column

containing SoftLink resin (Promega) that bound the OspC via a biotinylated purification tag on the amino terminus. The bound OspC was then eluted with a purification buffer that also contained 5 mM biotin (Sigma).

5 • **Vaccination of hamsters and collection of serum:**

Hamsters were vaccinated subcutaneously in the back of the neck with 0.1 mL of Freund's complete adjuvant that contained 75 µg of rOspC and then given a booster of 75 µg of rOspC in 0.1 mL of Freund's incomplete adjuvant three weeks after the primary vaccination. At 5 weeks after the primary vaccination, the
10 hamsters were mildly anesthetized by inhalation of ether contained in a nose-and-mouth cup and bled by intracardiac puncture. The blood was allowed to clot, and the serum was separated and stored at -70°C until use. In addition, hamster sera from three normal hamsters were pooled and used as a normal serum control.

15 • **Detection of OspC Antibodies:**

rOspC was diluted to 1000 ng/mL in coating buffer (0.015 M Na₂CO₃, 0.035 M NaHCO₃, pH 9.6) and 100 µL amounts were added to individual flat-bottomed amine-binding microtiter wells (Costar, Cambridge, Mass.). Microtiter plates were incubated overnight at 4°C. After incubation, plates were washed 3 times with PBS
20 (pH 7.2) and blocked with PBS containing 0.05% TWEEN 20 (Sigma) and 1% bovine serum albumin (Sigma) for 1 hour at room temperature with shaking. After blocking, plates were washed again with PBS. Subsequently, 100 µL amounts of hamster serum serially diluted from 1:80 to 1:20,480 in PBS/Tween was added to individual wells, and the plates were incubated for 1 hour at room temperature.
25 Following incubation, plates were washed three times with PBS, 100 µL of anti-hamster IgG horseradish peroxidase conjugate (Organon Teknika Cappel) diluted 1:3000 in PBS/Tween was added to each well, and the plates were re-incubated at room temperature for 1 hour. Plates were then washed 3 times with PBS and 100 µL of o-phenylenediamine phosphate (0.4 mg/ml; Sigma) was added to each well
30 and allowed to incubate at room temperature for 30 min. Reactions were stopped by adding 100 µL of 1 N H₂SO₄ and absorbances at 490 nm (model EL 311; Bio-Tek Inc. Winooski, Vt.) were immediately determined.

• **Detection of OspC borreliacidal antibodies:**

OspC borreliacidal antibodies were detected as described above (Example 1), except *B. burgdorferi* ss 50772 was used.

5 **B. RESULTS**

Vaccination with the rOspC vaccine induced high levels of OspC antibodies detected by the ELISA (Table 3, *infra*), but only a low level (titer 80) of borreliacidal activity was present. The vaccination with rOspC had therefore induced high concentrations of OspC antibodies, but the response was comprised almost entirely of antibodies (eg. opsonizing) that would not provide protection against infection. This was especially significant when one considered the 75 µg concentration of proteins in the *B. burgdorferi* ss 50772 vaccine was calculated without accounting for the presence of numerous additional non-OspC proteins. The collective results (Examples 1 and 2) therefore confirmed previous findings (Straubinger et al. *Vaccine* 2003, 20:181-193) that recombinant Osps stimulated significantly less amounts of borreliacidal antibodies than intact *B. burgdorferi* ss.

20 **Table 3. Mean titer^a of antibodies detected by OspC ELISA or OspC borreliacidal antibody test^b after vaccination with rOspC.**

Sample	Antibody titer detected by:	
	OspC ELISA	OspC borreliacidal antibody test
Normal	ND ^c	ND
rOspC	10240	80

^a Reciprocal dilution of pooled serum from 5 hamsters.

^b Detected by using *B. burgdorferi* ss 50772

^c ND = None detected.

30 Therefore, the canine recombinant OspC vaccine fails to elicit significant titers of OspC borreliacidal antibodies in hamsters.

EXAMPLE 3**VACCINATION WITH *B. BURGDORFERI* ss ISOLATE S-1-10****A. MATERIALS AND METHODS****5 • Organism:**

B. burgdorferi ss S-1-10 is a typical pathogenic strain generally indistinguishable from *B. burgdorferi* ss B31 (Barbour et al., *J. Infect. Dis.*, 1985, 152:478-484). The isolate was originally recovered by Dr. Steven M. Callister, Gundersen Lutheran Medical Foundation, La Crosse, WI, from the kidney of a white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*, captured February 1988 from a site near La Crosse, WI, and was licensed by Solvay Animal Health for incorporation into a canine Lyme disease vaccine. The subsequent commercial product (GALAXY™ Lyme) was acquired by Schering Plough Animal Health on April 17, 1997. The organism expresses OspA, OspB, and OspC. However, as is typical of infectious *B. burgdorferi* ss isolates, significantly higher concentrations of OspA and OspB are produced when the spirochetes are cultured in laboratory BSK medium. It has been shown that the expression of OspC can be maximized by incubation at 35°C (Schwan, *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31:108-112).

20 • Animals

Eight-week-old beagle puppies (Ridgland Farms, Mount Horeb, WI) were housed communally, and food and water was available *ad libitum*. The experiment was reviewed and approved by the Schering Plough Animal Health Animal Care and Use Committee (IACUC).

25

• Preparation of *B. burgdorferi* ss S-1-10 vaccine:

A fresh culture of *B. burgdorferi* ss S-1-10 that had reached logarithmic growth phase by incubation in BSK at 35°C was inactivated by adding binary ethylenimine (BEI) to a final concentration of 10 mM and incubating for an additional 48 hours. After inactivation, the BEI was neutralized by adding sterile sodium thiosulfate and incubating at 35°C for 6 to 12 hours. The spirochetes were then pelleted by centrifugation and resuspended in sterile balanced salt solution containing ≤ 30 μ g of gentamicin/mL and ≤ 30 units of nystatin/mL. The spirochetes

were then blended with 5% Emulsigen® (MVP Laboratories, Inc.) and 1% HEPES so that a 1.0 mL dose contained $\geq 2.5 \times 10^7$ spirochetes.

• **Vaccination and collection of serum:**

Dogs were vaccinated subcutaneously in the neck with a 1 mL dose of the S-1-10 vaccine and boosted with an additional 1 mL dose after 21 days. Whole blood was collected immediately prior to the booster vaccination (study day 21) and at study days 28, 35, 47, 83, and 113 by venipuncture of the jugular vein. The serum was separated by centrifugation and stored at -20°C until tested.

• **Detection of borreliacidal antibodies:**

OspA and OspC borreliacidal antibodies were detected by flow cytometry employing *B. burgdorferi* ss S-1-10 and 50772, as described above in Examples 1 and 2.

B. RESULTS

Vaccination with *B. burgdorferi* ss S-1-10 reliably induced high levels of borreliacidal OspA antibodies that were detectable at study day 21, peaked at study day 28, and remained detectable at study day 113 (Table 4, *infra*). In contrast, OspC borreliacidal antibodies were not detected (titer less than 1:80). Thus, the conventional *B. burgdorferi* ss strain failed to induce the production of OspC borreliacidal antibodies despite maximizing the OspC expression by incubating the spirochetes at 35°C.

Table 4. Mean titers^a (n = 8) of OspA or OspC borreliacidal antibodies after vaccination with *B. burgdorferi* ss S-1-10.

Borreliacidal Antibody	Day 21	Day 28	Day 35	Day 47	Day 83	Day 113
OspA ^b	202	9481	9481	4740	1613	1382
OspC ^c	ND ^d	ND	ND	ND	ND	ND

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using *B. burgdorferi* ss S-1-10.

^c Detected by using *B. burgdorferi* ss 50772.

^d ND = None detected.

Therefore, a vaccine employing *B. burgdorferi* ss isolate S-1-10 failed to elicit a significant titer of OspC borreliacidal antibodies.

EXAMPLE 4

5 VACCINATION WITH *B. BURGDORFERI* SS ISOLATE 50772

A. MATERIALS AND METHODS

- **Organism:**

10 *B. burgdorferi* ss 50772 is a unique *ospA*-/*ospB*- strain originally reported by Anderson et al., *J. of Clin. Microbiol.*, 1996, 34:524-529, who failed to identify it as expressing OspC antigen. The 50772 strain is described by U.S. Patent No. 6,464,985, incorporated herein by reference in its entirety, as expressing OspC antigen, and this strain is reported by that U.S. patent as deposited with the ATCC as No. PTA-439.

15

- **Animals:**

Eight-week-old beagle puppies (Ridglan Farms, Mount Horeb, WI) were housed communally, and food and water was available *ad libitum*. The experiment was reviewed and approved by the Schering Plough Animal Health Animal Care and Use Committee (IACUC).

20

- **Preparation of *B. burgdorferi* ss 50772 vaccine:**

B. burgdorferi ss 50772 vaccine was prepared as described above in Example 3.

25

- **Vaccination and collection of serum:**

Dogs were vaccinated subcutaneously in the neck with a 1 mL dose of the 50772 vaccine and boosted with an additional 1 mL dose after 21 days. Whole blood was collected immediately prior to the booster vaccination (study day 21) and at study days 28, 35, 47, 83, and 113 by venipuncture of the jugular vein. The serum was separated by centrifugation and stored at -20°C until tested.

30

- **Detection of borreliacidal antibodies:**

OspC borreliacidal antibodies were detected by flow cytometry employing *B. burgdorferi* ss 50772 as described above in Examples 1 and 2.

5 B. RESULTS

Vaccination with *B. burgdorferi* ss 50772 reliably induced high levels of borreliacidal OspC antibodies that peaked at study day 35 and remained detectable at study day 113 (Table 5, *infra*). Thus, in contrast to vaccinations with rOspC or a traditional *B. burgdorferi* ss isolate (S-1-10), vaccination with the unique *B.*
10 *burgdorferi* ss strain 50772 induced significant levels of OspC borreliacidal antibodies.

Table 5. Mean Titers^a (n = 8) of OspC Borreliacidal Antibodies^b After Vaccination with *B. burgdorferi* ss 50772.

Day 21	Day 28	Day 35	Day 47	Day 83	Day 113
ND ^c	5530	1097	435	274	202

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using *B. burgdorferi* ss 50772.

^c ND = None detected.

Therefore, a vaccine comprising the *B. burgdorferi* ss isolate 50772 induces high concentrations of OspC borreliacidal antibodies.

25 EXAMPLE 5

PREPARATION OF A VACCINE COMPRISING B. BURGDORFERI SS ISOLATES S-1-10 AND 50772

30 A. MATERIALS AND METHODS

- **Growth:**

Frozen stock cultures of *B. burgdorferi* ss S-1-10 and *B. burgdorferi* ss 50772 were cultured under standard conditions, *i.e.*, the stock cultures were grown at $33 \pm 2^\circ\text{C}$ and $35 \pm 2^\circ\text{C}$, respectively, in individual screw cap culture tubes containing 5 to 17 mL of BSK (Barbour Stoenner Kelly) medium [prepared according to Callister *et*

al., 1990, *J. of Clinical Microbiology* 28: 363-365, hereby incorporated by reference in its entirety herein] under an atmosphere of air enriched with 5%CO₂. After reaching logarithmic growth, the cultures were used to inoculate 150 to 200 mL of fresh BSK medium, which were next incubated until the cultures reached logarithmic growth. The resultant suspensions were then used to inoculate 5 to 10 liters of fresh BSK contained in 10 to 20 liter jugs (production culture) prior to an additional incubation, as described above.

- **Inactivation:**

The spirochetes in the production cultures were inactivated by adding BEI to a concentration of 10mM and incubating with slow stirring for 24 to 48 hours. After inactivating the spirochetes, the BEI was neutralized by adding 10.6 mL of sterile 3.015M sodium thiosulfate to each liter of BSK/spirochete suspension and incubating with slow stirring for 6 to 12 hours.

- **Concentration and blending:**

Inactivated spirochetes were pelleted by centrifugation and resuspended in a sterile balanced salt solution containing 30.0 µg/mL of gentamicin and 30 units/mL of nystatin. The test vaccine was blended with 5% Emulsigen® (MVP Laboratories, Inc.) and filled in 2.0 mL glass vials so each dose (1.0 mL) contained $\geq 2.5 \times 10^7$ organisms/mL of *B. burgdorferi* ss S-1-10, $\geq 5.0 \times 10^8$ organisms/mL of *B. burgdorferi* ss 50772, 1% HEPES, 29 µg/mL gentamicin, and 29 units/mL nystatin.

EXAMPLE 6

SAFETY AND EFFICACY OF A VACCINE COMPRISING B. BURGDORFERI SS ISOLATES S-1-10 AND 50772

A. MATERIALS AND METHODS

- **Animals:**

Eight-week-old beagle puppies (Ridgman Farms, Mount Horeb, WI) were housed individually or communally, and food and water was available *ad libitum*. The experiment was reviewed and approved by the Schering Plough Animal Health Animal Care and Use Committee (IACUC).

- **Vaccination and collection of sera:**

Dogs were vaccinated subcutaneously in the neck with a 1 mL dose of the vaccine and boosted with an additional 1 mL dose after 21 days. Whole blood was collected prior to the initial (study day -3) and booster vaccination (study day 21) and also on study days 28, 35, 43, 78, 106, 134, 162, and 197 by venipuncture of the jugular vein. The serum was separated by centrifugation and stored at -20°C until tested.

- **Post-vaccination observations:**

After each vaccination, injection sites were palpated daily until no reaction could be felt, and rectal temperatures were recorded 4-6 hours post-vaccination and on days 1-3 post-vaccination.

- **Tick challenge:**

Three weeks after the second vaccination, dogs were shaved on the right side of the thoracic cavity, and 10 female and 10 male *B. burgdorferi* ss-infected *I. scapularis* ticks were placed in a rubber cup that was secured to the shaved area with tape and bandage wrap. The ticks were allowed to feed for 7 days.

- **Detection of *B. burgdorferi* ss in ticks:**

The tick mouthparts were removed by scalpel, and the midguts were teased and smeared onto glass slides and allowed to dry overnight at room temperature. After drying, the slides were fixed in acetone for 8-10 min and air-dried. Species-specific mouse OspA monoclonal antibody H5332 was diluted 1:40 in PBS (pH 7.2) and overlaid with goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate-labeled immunoglobulin G antibody diluted 1:500 in PBS. After incubation, slides were rinsed with PBS, air-dried, and examined by fluorescence microscopy. Each slide was examined independently by two experienced microbiologists.

- **Blood samples:**

Whole blood was collected in serum separation transport (SST) tubes on study days 78, 106, 134, 162, and 197, and the serum was separated and stored at -20°C until tested.

5

- **Removal of OspA antibodies:**

Recombinant (r)OspA was recovered from *Escherichia coli* ("*E. coli*") DH5 α expressing OspA-glutathione-S-transferase fusion protein as described previously (Callister et al., *J. Infect. Dis.* 1993, 167:158-164). Briefly, the *E. coli* was cultured at 37°C in 2xTY broth containing ampicillin, and isopropyl- β -d-galactopyranoside ("IPTG") (0.1 mM) was added during the exponential growth phase. Cells were pelleted by centrifugation, resuspended in phosphate buffered saline ("PBS"), and lysed by sonication. Triton X-100 (1% vol/vol) was added, and the lysate was centrifuged at 10,000 x g for 5 minutes (min.). The supernatant containing the fusion protein was then passed over a glutathione-Sepharose 4B column (Pharmacia), and the recombinant OspA was eluted with 50 mM Tris-Cl (pH 8.0) plus 5 mM reduced glutathione and resuspended in purification buffer (50 mM Tris [pH 8], 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100).

The rOspA fusion protein was then bound to Sepharose 4B by cyanogen bromide (CNBr) activation. Specifically, 0.8 g of CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) was washed with coupling buffer (0.1 M NaHCO₃-0.5 M NaCl, pH 8.3), a 2 mg amount of OspA in coupling buffer was added to the gel, and the mixture was gently shaken at room temperature for 2 hours. After the gel was washed twice with coupling buffer, 4 mL of ethanolamine (pH 9) was added, and the gel was incubated for 2 hours to block unbound sites. The gel was washed three times with 50 mL of 0.1 M sodium acetate-0.5 M NaCl (pH 4.0) and then equilibrated in PBS. A 1 mL sample of immune serum diluted ten-fold in PBS was passed over the column four times.

30

• Removal of OspC antibodies:

rOspC was recovered from *E. coli* JM109 containing pX3-22 as described previously (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741). Production of the recombinant protein was induced as described for rOspA above. The sonicated *E. coli* cells were then pelleted by centrifugation, and the supernatant was passed over a column containing SoftLink resin (Promega) that bound the OspC via a biotinylated purification tag on the amino-terminus. The bound OspC was then eluted with a purification buffer that also contained 5 mM biotin (Sigma).

A 1 mL volume of Tetralink tetrameric avidin resin (Promega) was then washed, suspended in 40 mL of PBS, and loaded onto a 10-mm by 70-mm polypropylene column. A 0.5 mg amount of dialyzed rOspC in a 1 mL volume of PBS was passed over the column and binding was confirmed by protein assay (Bio-Rad). A 1 mL volume of immune serum diluted ten-fold in PBS was passed over the column four times.

• Removal of OspC7-specific antibodies:

A fusion protein containing the 7 C-terminal amino acids of OspC (OspC7) was recovered from *E. coli* JM109 containing pXT7 as described previously (Lovrich et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751, incorporated by reference herein in its entirety). Production of the recombinant protein was induced as described for rOspA above. The sonicated *E. coli* cells were then pelleted by centrifugation, and the supernatant was passed over a column containing SoftLink resin (Promega) that bound the OspC7 via a biotinylated purification tag on the amino-terminus. The bound OspC7 was then eluted with a purification buffer that also contained 5 mM biotin (Sigma). A 1 mL volume of Tetralink tetrameric avidin resin (Promega) was then washed, suspended in 40 mL of PBS, and loaded onto a 10-mm by 70-mm polypropylene column. A 0.5 mg amount of dialyzed rOspC in a 1 mL volume of PBS was passed over the column and binding was confirmed by protein assay (Bio-Rad). A 1 mL volume of immune serum diluted ten-fold in PBS was passed over the column four times.

- **Detection of borreliacidal antibodies:**

OspA and OspC borreliacidal antibodies were detected by flow cytometry employing *B. burgdorferi* ss S-1-10 and 50772 as described above in Examples 1 and 2.

- **Skin biopsies:**

Skin biopsies were taken from sites adjacent to tick attachment on study days 78, 106, 134, 162, and 197 with a disposable 4 mm puncture device. The biopsies were placed into separate tubes containing 9 mL of BSK (Callister et.al, *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28:363-365) supplemented with gelatin (BSK+G), 40-50 micrograms (μ g)/mL rifampin, and 8 μ g/mL kanamycin. Cultures were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 weeks and examined weekly by dark-field microscopy for spirochetes.

- **Immune suppression:**

Dogs were immune suppressed by daily administration of dexamethasone (0.4 mg/lb body weight) for 5 days beginning 13 weeks post-challenge.

- **Clinical observations:**

Dogs were observed daily for limb/joint disorders including stiffness (reluctant to put full weight on limbs), limping (favoring a limb while walking or running), or lameness (non-weight bearing). Scoring was made by the consensus of at least two observers, and dogs were examined by the Attending Veterinarian to rule out any other external injuries.

- **Necropsy:**

Dogs that had limb/joint disorders for at least 3 consecutive observation periods were euthanized and necropsied. Tissue samples from the elbow, carpus, knee, tarsus, heart, spleen, bladder, and both kidneys were collected and processed for isolation of *B. burgdorferi* by culture. Joint tissues were cultured in individual tubes containing 9 mL BSK+G. Other tissues (heart, spleen, urinary bladder, and kidneys) were combined with 9 mL BSK+G, homogenized thoroughly with a

stomacher, and a 1 mL amount was transferred to a separate tube containing 9 mL of fresh BSK+G. Cultures were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

The remaining dogs were euthanized and necropsied at the end of the study. Tissue samples from these dogs were collected from the joint capsule and tendon of the elbow, carpus, knee, and tarsus and stored in 10% buffered formalin for histopathology examination. In addition, samples from the joint capsules of the elbow, carpus, knee, and tarsus were placed into individual tubes containing 9 mL BSK+G or BSK+G with antibiotics and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 weeks.

• **Western Blotting:**

Western blotting was performed using standard techniques.

B. burgdorferi ss 297 was boiled in sample buffer for 5 min and 150 μg of total protein was loaded onto a 0.1% SDS-12% polyacrylamide gel (4% polyacrylamide stacking gel without comb). Protein concentrations were determined with a protein determination kit, and two gels were run simultaneously in an electrophoresis unit. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose, and the nitrocellulose was cut into strips and blocked with PBS-0.3% TWEEN 20 for 30 min at 22°C . Strips were incubated for 1 hour at 22°C with dog serum diluted 1:100 and washed three times with PBS-0.05% TWEEN 20. Horseradish peroxidase-labeled anti-dog IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) was added, and the strips were incubated for 30 min at 22°C before developing with the TMB Membrane Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD).

B. RESULTS

• **Safety of the vaccine:**

Dogs remained clinically normal following vaccination, including no increases in rectal temperature. Dogs vaccinated with the vaccine did however develop slight swelling at the injection site that resolved within 8 days. The largest reaction measured $1 \times 1 \times 0.5 \text{ cm}$ (24 hour post-vaccination).

• **Post-vaccination serology:**

Vaccination with placebo failed to induce antibodies specific for *B. burgdorferi* ss. In contrast, vaccination with the vaccine induced significant levels of borreliacidal antibodies detected by using *B. burgdorferi* ss isolates

5 S-1-10 or 50772. The mean titer of borreliacidal antibodies detected by using S-1-10 peaked one week after the booster vaccination (study day 28) and remained detectable at study day 197 (Table 6 below). Similarly, high concentrations of borreliacidal antibodies specific for isolate 50772 were present by study day 28 and remained elevated at study day 43 and detectable at study day 197 (Table 7 below).

10

Table 6. Mean titers^a (n = 15) of borreliacidal activity^b after vaccination with the vaccine.

Group	Day -3	Day 21	Day 28	Day 35	Day 43	Day 78	Day 106	Day 134	Day 162	Day 197
Vaccinate s	ND ^c	> 211	> 8128	> 6160	> 4889	1404	970	970	1016	220
Controls	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using borreliacidal antibody test with *B. burgdorferi* ss S-1-10.

^c ND = None detected.

15

Table 7. Mean titers^a (n = 15) of borreliacidal activity^b after vaccination with the vaccine.

Group	Day -3	Day 21	Day 28	Day 35	Day 43	Day 78	Day 106	Day 134	Day 162	Day 197
Vaccinate s	ND ^c	ND	1470	884	221	50	48	46	42	42
Controls	ND	ND	ND	ND	ND	N/A ^d	N/A	N/A	N/A	N/A

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using borreliacidal antibody test with *B. burgdorferi* ss 50772.

^c ND = None detected.

^d N/A = Not applicable.

• **Confirmation of OspA and OspC borreliacidal antibodies.**

20

To confirm that the borreliacidal activity was due to OspA and OspC borreliacidal antibodies, immune sera from five dogs vaccinated with the vaccine were passed over separate columns containing rOspA or rOspC and the effects on the borreliacidal activities were examined. Removing OspA-specific or OspC-

specific antibodies by adsorbing the sera with the recombinant proteins significantly (≥ 4 -fold reduction) decreased the borreliacidal activity detected by using the *B. burgdorferi* ss S-1-10 or 50772 isolates, respectively. The collective findings therefore confirmed the vaccine induced significant levels of OspA and OspC borreliacidal antibodies, and the borreliacidal activities detected by the *B. burgdorferi* ss S-1-10 or 50772 were almost entirely specific OspA or OspC borreliacidal antibodies, respectively. See Table 8 below.

Table 8. Effect of removing OspA or OspC antibodies on borreliacidal activity in sera from dogs (n = 5) vaccinated with the vaccine.

Serum	Borreliacidal Antibody Titer ^a :			
	OspA ^b		OspC ^c	
	before absorption	after absorption	before absorption	after absorption
1	5120	160	5120	640
2	2560	160	5120	320
3	10240	ND ^d	5120	320
4	2560	ND	1280	160
5	1280	80	2560	320
OspA control	2560	ND	--	--
OspC control	--	--	2560	ND

^a Reciprocal dilution.

^b Sera collected on study day 43.

^c Sera collected on study day 28.

^d ND = None detected.

• Confirmation of OspC7-specific borreliacidal antibodies

To confirm that the OspC borreliacidal antibodies contained a significant proportion of borreliacidal antibodies specific for OspC7, immune sera from five dogs vaccinated with the vaccine were passed over a column containing rOspC7, and the effects on the borreliacidal activity were examined. Removing the OspC7-specific antibodies by adsorbing the sera with the recombinant OspC7 protein significantly (2- to 4-fold reduction) decreased the borreliacidal activity detected by using the *B. burgdorferi* ss 50772 isolate. Therefore, the findings confirmed that the vaccine induced significant levels of OspC borreliacidal antibodies specific for the conserved OspC7 epitope. See Table 9 below.

Table 9. Effect of removing OspC7 antibodies on borreliacidal activity in sera from dogs (n = 5) vaccinated with the vaccine.

Serum	Borreliacidal Antibody Titer ^a :	
	before absorption	after absorption
1	20480	5120
2	10240	5120
3	10240	2560
4	5120	2560
5	10240	2560
OspC control	2560	ND

^a Reciprocal dilution.

^b Sera collected on study day 28.

^c ND = None detected.

• Ability of the OspA and OspC borreliacidal antibodies to sterilize infected ticks:

Examining the midguts of the ticks that fed on the vaccinated or control dogs confirmed that the OspA and OspC borreliacidal antibodies induced by the vaccine had sterilized the ticks. *B. burgdorferi* ss were detected in the tick smears from 34 (32%) of 106 female ticks that had fed on 13 of 15 placebo-vaccinated dogs (Table 10 below). In contrast, no spirochetes (0 of 99) were detected in the midguts from the female ticks that fed on dogs vaccinated with the vaccine ($p < 0.0001$).

Table 10. Detection of *B. burgdorferi* ss in female ticks removed from vaccinated or control dogs.

Treatment Group	Female Ticks Processed (Engorged and Not engorged)	Smears Positive for <i>B. burgdorferi</i>	Total No. of Dogs Positive
Vaccinates	99/151 (61%)	0/99 (0%)	0/15
Controls	106/148 (64%)	34/106 (32%)	13/15*

* $p < 0.0001$

• **Ability of the vaccine to prevent recovery of *B. burgdorferi* ss from the skin:**

The vaccine-induced borreliacidal antibodies also prevented the spirochetes from colonizing the skin. *B. burgdorferi* ss were recovered from 56 (79%) of 71 biopsies collected from the placebo-vaccinated dogs at monthly intervals following tick-challenge (Table 11 below) and spirochetes were recovered from at least one skin biopsy from 14 (93%) of the 15 dogs. In contrast, *B. burgdorferi* ss were not recovered from any skin biopsies collected from the dogs vaccinated with the vaccine ($p < 0.0001$).

Table 11. Isolation of *B. burgdorferi* ss from the skin of vaccinated or non-vaccinated control dogs.

Treatment Group	Day 78	Day 106	Day 134	Day 162	Day 197	Total Biopsies Positive	Total No. of Dogs Positive
Vaccinated	0/15	0/15	0/15	0/15	0/13	0/73 (0%)	0/15 (0%)
Controls	12/15	13/15	11/15	11/14	9/12	56/71 (79%)	14/15* (93%)

$P < 0.0001$

• **Ability of the vaccine to prevent serologic evidence of infection:**

The vaccine also prevented the development of Lyme disease-specific antibodies. A previous investigation (SPAHC Report B01-184-01R) confirmed that infection with *B. burgdorferi* ss reliably induced dog antibodies that bound an approximately 20 kDa protein, and the response was not induced by the vaccine (Fig. 1). In the current study, antibodies that bound the infection-specific 20 kDa protein were detected readily in the immune sera from 14 (93%) of the 15 placebo-vaccinated control dogs (Fig. 2A). In addition, the serum that did not contain any 20 kDa protein antibodies was collected from the control dog that also failed to yield spirochetes from the skin. In contrast, 20 kDa protein antibodies were not produced ($p < 0.0001$) by any of the dogs vaccinated with the vaccine (Fig. 2B).

In addition, dogs with Lyme disease produce non-OspC borreliacidal antibodies that are also detectable by using the *B. burgdorferi* ss 50772 isolate (Callister et al., *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38:3670-3674). The specific target of the response is unknown, but the antibodies provide highly specific serodiagnostic confirmation of infection. Dogs vaccinated with the vaccine were already producing OspC borreliacidal antibodies, but no dogs developed a significant (≥ 4 -fold) increase in the level of *B. burgdorferi* ss 50772-specific borreliacidal antibodies after the tick challenge. It was therefore highly unlikely the vaccinated dogs were infected with spirochetes. In contrast, borreliacidal antibodies were not produced by the placebo-vaccinated dogs prior to challenge, but 10 (67%; $p = 0.0002$) of the 15 dogs developed significant levels (titers $\geq 1:640$) of borreliacidal antibodies detected by using *B. burgdorferi* ss 50772 after the ticks were allowed to feed (Table 12 below).

Table 12. Mean titers^a of borreliacidal antibodies^b after tick challenge.

Treatment Group	Day 78	Day 106	Day 134	Day 162	Day 197	Total No. of Dogs with Increase Titers
Vaccinates	50	48	46	42	42	0/15
Controls	> 121	> 463	> 640	> 390	> 403	10/15*

* $p = 0.0002$

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using *B. burgdorferi* ss 50772.

• **Ability of the vaccine to prevent frank limb/joint disorders:**

Previous studies (Summers et al., *J. Comp. Path.* 2005, 133:1-13, Wikle et al., *J. Appl. Res. Vet. Med.* 2006, 4:23-28) demonstrated that infection with *B. burgdorferi* ss only rarely cause frank limb/joint disorders (e.g., swelling, lameness) and our findings confirmed this. Only one (8%) placebo-vaccinated control dog developed a joint abnormality. The left front leg was stiff 9 weeks after the tick-challenge, and *B. burgdorferi* ss spirochetes were recovered from the elbow. However, the findings were not significant because two dogs vaccinated with the vaccine also developed stiffness in one or more limbs, but, in contrast to the dog that received placebo, spirochetes were not recovered from any tissues.

To exacerbate the development of frank symptoms, the remaining dogs were immunosuppressed. Subsequently, three placebo-vaccinated control dogs became lame, and *B. burgdorferi* ss were recovered from two of these dogs. In contrast, no immunosuppressed dogs vaccinated with the vaccine developed lameness. Thus, the collective findings suggested the vaccine prevented the development of Lyme arthritis, although the results were not significant ($p = 0.0996$). However, see the additional data presented and discussed below.

• **Ability of the vaccine to prevent erosive changes associated with *B. burgdorferi* ss infection:**

When the joints of the dogs discussed above were examined microscopically, however, the findings clearly demonstrated the effectiveness of the vaccine. The joint capsules from the remaining dogs ($n = 13$) vaccinated with the vaccine were normal. In contrast, one or more joint tissues from 6 ($p = 0.0034$) of the 11 remaining placebo-vaccinated control dogs (Table 7 above) had significant inflammation characterized by infiltration of neutrophils and mononuclear cells (Fig. 3). Moreover, *B. burgdorferi* ss were not recovered from any tissues from the dogs vaccinated with the vaccine, but spirochetes were recovered from joint tissues from 5 (83%) of the 6 placebo-vaccinated control dogs with erosive changes. The collective findings therefore, confirmed the vaccine prevented canine Lyme arthritis and also corroborated previous reports that the syndrome is characterized most often by subclinical synovitis (Summers *et al.*, *J. Comp. Path.* 2005, 133:1-13; Wikle *et al.*, *J. Appl. Res. Vet. Med.* 2006, 4:23-28).

EXAMPLE 7

SPECIFICITY OF NATURALLY-OCCURRING BORRELIACIDAL ANTIBODIES DIRECTED TO THE OSPC7 EPITOPE

Data confirming that borreliacidal antibodies elicited in a mammal against OspC7 are specific have been obtained by analyzing sera from individuals (human) with and without a history of Lyme disease or Lyme-related symptoms, as follows.

A. MATERIALS AND METHODS

1. Sera:

Normal sera from individuals with no previous history (chart-review) of Lyme disease or Lyme-related symptoms (n = 36), uncharacterized sera from blood donors (n = 100) or individuals undergoing cholesterol screenings (n = 100), or sera from volunteers with blood factors or illnesses that commonly cross-react with *B. burgdorferi* ss antigens, including antinuclear antibodies (n = 20), rheumatoid factor (n = 20), mononucleosis (n = 10), cytomegalovirus (n = 10), syphilis (n = 13) or Rocky Mountain spotted fever (n = 4), were from archived samples stored at -20°C. Lyme disease sera were collected from patients evaluated at Gundersen Lutheran Medical Center during 2003 or 2004. Sera (n = 86) from patients with erythema migrans (EM) that fulfilled the CDC surveillance criterion (Centers for Disease Control and Prevention. Morb. Mort. Wkly. Rep. 1990, 39:19-21.) were classified as likely Lyme, sera (n = 22) from patients with tick exposures and atypical skin lesions were classified as probable Lyme (n = 49), and sera from patients with tick exposure and constitutional symptoms that included primarily headache, fever, myalgia, and arthralgia were classified as possible Lyme. The sera were collected during the initial visit, stored at -20°C, and blinded prior to testing.

OspC7 peptide. The 7-aa OspC7 peptide (AESPKKP; SEQ ID NO: 1) was synthesized at the University of Wisconsin Biotechnology Center (Madison, WI) by using an automated synthesizer (Protein Technologies) and the Fmoc method (Fields, et al., Peptide Res. 1991, 4:95-101). Following synthesis, the amino-terminal end of the peptide was biotinylated manually by HBTU activation and purified by high-pressure liquid chromatography. Composition was confirmed using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (predicted mass 1095.4; observed mass 1095.8).

OspC7 ELISA. Individual wells of microtiter plates (Immunolon 2 HB, Thermo Labsystems, Franklin, MA) were coated with 100 µL of a 4 µg/ml suspension of streptavidin (Pierce, Rockland, IL) contained in carbonate buffer (90 mM NaHCO₃, 60 mM Na₂CO₃; pH 9.6) and incubated overnight at 4°C. Following incubation, plates were washed five times with Tris-buffered saline (TBS-

475
T; 13 mM Tris HCl, 3 mM Tris base, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl; pH 7.4) containing 0.05% Tween 20. After washing, 200 μ L of blocking buffer (15 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 3% fetal bovine serum, 0.05% Tween 20) containing 1 μ g/mL of biotinylated OspC7 peptide was added to each well and incubated with rotation (150 rpm) for 1 hour at room temperature. Plates were washed three times with TBS-T and reacted with 100 μ L amounts of sera diluted 1:200 in blocking buffer for 1 hour at room temperature. The secondary antibody was peroxidase-conjugated goat anti-human IgM and IgG (Kirkegaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.) diluted 1/15,000 in blocking buffer. After incubation for one hour, the bound secondary antibody was quantified by the addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide in citrate buffer (Sigma, St. Louis, Mo.) and determination of the OD at 490 nm (SpectraMax 250; Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.).

B. RESULTS

In previous studies (Jobe et al., *Clin. Diagn. Lab. Immuno.* 2003, 10:573-578, Lovrich et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751), a highly conserved immunodominant OspC borreliacidal antibody epitope was localized to the region within the 7 amino acids nearest the C-terminus (OspC7). To confirm the epitope induced antibodies specific to infection with *Borrelia* spp., the reactivities of an ELISA that used OspC7 using sera from patients with Lyme disease (Fig. 5) and sera from normal subjects or patients with other illnesses likely to produce antibodies that could also bind *Borrelia* spp. proteins (Fig. 4) were compared. In Figs. 4 and 5, the line at Absorbance 1.25 defines three standard deviations above the mean absorbance of the normal and potentially cross-reactive sera. Any results that fall above the line therefore have a 99% probability that the reactivity is significant (true positive). Significant reactivity was detected only rarely in the normal or potentially cross-reactive sera (Fig. 4). It should also be noted that the majority of the positive results were obtained using sera that could have come from Lyme disease patients, because the sera (CS) were obtained from a group of 100 patients being seen at Gundersen Lutheran Medical Center for a variety of ailments. The region is a highly endemic focus of Lyme disease, and the identities and clinical histories of the patients were unknown. In contrast, positive sera were not detected

in serum samples ($n = 100$) collected randomly from blood donors (BD) in Milwaukee, a non-endemic region of Wisconsin.

In addition, positive results (greater than 3 standard deviations above the mean of the sera that should be non-reactive – Fig. 4) were detected commonly in the sera from the Lyme disease patients and the absorbance values were high (Fig. 5). The collective findings therefore confirmed the high specificity of the antibodies directed against the OspC7 epitope and the immunodominance of the response during human Lyme disease.

Summarizing the above-exemplified data, groups (15 dogs) of 8 week-old puppies were vaccinated and boosted with a vaccine that contained 5.0×10^8 *B. burgdorferi* ss 50772, 2.5×10^7 *B. burgdorferi* S-1-10 ss and 5% Emulsigen® or a placebo that contained only 5% Emulsigen®. The vaccine caused slight swelling at the site of the injection that resolved quickly. More significantly, the vaccine induced high concentrations of borreliacidal OspA and OspC antibodies that peaked a week after the booster vaccination and remained detectable for the duration of the study. In addition, a significant proportion of the OspC borreliacidal antibodies were specific for the highly conserved epitope within OspC7.

B. burgdorferi ss-infected female *I. scapularis* ticks were then allowed to feed on the vaccinated dogs, and an examination of the midguts from the ticks confirmed that the OspA and OspC borreliacidal antibodies in the bloodmeal completely eliminated *B. burgdorferi* ss. Specifically, *B. burgdorferi* ss were detected in 34 (32%) ticks collected from the control dogs vaccinated with placebo and not detected in ticks ($n = 99$) that fed on the dogs vaccinated with the vaccine ($p < 0.0001$). In addition, the vaccine recipients remained negative for Lyme disease by several indirect and direct methods used commonly to confirm infection. In contrast, 10 (67%) control dogs produced antibodies against an "infection-specific" 20 kDa *B. burgdorferi* ss protein and 8 (53%) produced "infection-specific" borreliacidal antibodies. Moreover, four (27%) dogs developed persistent lameness, and *B. burgdorferi* ss were recovered from the joints of 3 (75%) of the 4 lame animals. In addition, inflammatory infiltrates developed in the joint capsules of 6 (55%) of the 11 placebo-vaccinated dogs examined. More compelling, *B. burgdorferi* ss were recovered from the skin and joints of 14 (93%) and 8 (53%) control dogs, respectively, while spirochetes were not recovered from dogs

vaccinated with the test product. Thus, the inventive Lyme disease vaccine caused minimal side effects and provided complete protection against infection with *B. burgdorferi* ss.

EXAMPLE 8

DURATION OF IMMUNITY OF THE VACCINE COMPRISING B. BURGDORFERI SS ISOLATES S-1-10 AND 50772

A. MATERIALS AND METHODS

- **Animals:**

Materials and methods are described in Example 6 above.

- **Vaccination and collection of sera:**

Dogs were vaccinated subcutaneously in the neck with a 1 mL dose of the vaccine and boosted with an additional 1 mL dose after 21 days. Whole blood was collected prior to the initial (study day -4) and booster vaccination (study day 21) and also on study days 28, 35, 49, 79, 114, 142, 175, 210, 238, 266, 302, 322, 357, and 394 by venipuncture of the jugular vein. The serum was separated by centrifugation and stored at -20°C until tested.

- **Post-vaccination observations:**

Dogs were observed daily.

- **Tick challenge:**

One year after the second vaccination, dogs were shaved on the right side of the thoracic cavity, and 10 female and 10 male *B. burgdorferi*-infected *I. scapularis* ticks were placed in a rubber cup that was secured to the shaved area with tape and bandage wrap. The ticks were allowed to feed for 7 days.

- **Detection of *B. burgdorferi* ss in ticks:**

Detection was performed in the manner described in Example 6 above.

- **Blood samples:**

Whole blood was collected in serum separation transport (SST) tubes on study days 43 post-challenge (PC), 77 PC, 112 PC, 147 PC, 174 PC, and 241 PC, and the serum separated and stored at -20°C until tested.

5

- **Detection of borreliacidal antibodies:**

OspA and OspC borreliacidal antibodies were detected by flow cytometry as described in Examples 1 and 2 above.

10

- **Skin biopsies:**

Skin biopsies were taken from sites adjacent to tick attachment on study days 43 post-challenge (PC), 77 PC, 112 PC, 147 PC, 174 PC, and 241 PC with a disposable 4 mm puncture device. The biopsies were processed as described in Example 6 above.

15

- **Immune suppression:**

Dogs were immune suppressed by daily administration of dexamethasone (0.4 mg/lb body weight) for 5 days beginning at approximately 20 weeks post-challenge.

20

- **Clinical observations:**

Clinical observations were performed as in Example 6 above.

- **Necropsy:**

25

Necropsy was performed as in Example 6 above.

B. RESULTS

- **Post-vaccination serology:**

Vaccination with a placebo failed to induce antibodies specific for *B. burgdorferi* ss. In contrast, vaccination with the vaccine induced significant levels of borreliacidal antibodies detected by using *B. burgdorferi* ss isolates S-1-10 and 50772. The mean borreliacidal antibody titer against S-1-10 peaked one week

30

(study day 28) after the booster vaccination, and the response remained detectable until study day 394 (Table 13). Similarly, high concentrations of borreliacidal antibodies specific for isolate 50772 were detected on study day 28, titers remained elevated on study day 49, and low levels remained detectable after 79 days (Table 14).

Table 13. Mean titers^a (n = 15) of borreliacidal activity^b after vaccination with the vaccine.

Group	Day -4	Day 21	Day 28	Day 35	Day 49	Day 79	Day 114	Day 142
Vaccinates	ND ^c	192	>7075	>5120	>4457	735	926	532
Controls	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Group	Day 175	Day 210	Day 238	Day 266	Day 302	Day 322	Day 357	Day 394
Vaccinates	702	611	926	557	508	351	211	175
Controls	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using borreliacidal antibody test with *B. burgdorferi* ss S-1-10.

^c ND = None detected.

Table 14. Mean titers^a (n = 15) of borreliacidal activity^b after vaccination with the vaccine.

Group	Day -4	Day 21	Day 28	Day 35	Day 49	Day 79	Day 114	Day 142
Vaccinates	ND ^c	40	1689	532	69	41	ND	ND
Controls	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Group	Day 175	Day 210	Day 238	Day 266	Day 302	Day 322	Day 357	Day 394
Vaccinates	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Controls	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using borreliacidal antibody test with *B. burgdorferi* ss 50772.

^c ND = None detected.

• **Ability of the OspA and OspC borreliacidal antibodies to sterilize infected ticks:**

Examining the midguts of the ticks that fed on the vaccinated or control dogs confirmed that the OspA and OspC borreliacidal antibodies induced by the vaccine had sterilized the ticks. *B. burgdorferi* ss were detected in the tick smears from 15 (16%) of 95 female ticks that had fed on 12 of 15 placebo-vaccinated dogs (Table 15). In contrast, *B. burgdorferi* ss were detected in the tick smears from only 2 (3%) of 75 female ticks that had fed on 2 of 15 vaccinated dogs ($p = 0.0003$).

Table 15. Detection of *B. burgdorferi* ss in female ticks removed from vaccinated or control dogs.

Treatment Group	^a Female Ticks Processed	Smears Positive for <i>B. burgdorferi</i>	Total No. of Dogs Positive
Vaccinates	75/148 (51%)	2/75 (3%)	2/15
Controls	95/146 (65%)	15/95 (16%)	12/15*

* $p = 0.0003$

^aEngorged and not engorged

- **Ability of the vaccine to prevent recovery of *B. burgdorferi* ss from the skin:**

The vaccine-induced borreliacidal antibodies also prevented a sustained infection of *B. burgdorferi* organisms in the skin. *B. burgdorferi* ss were recovered from 33 (44%) of 75 biopsies collected from the placebo-vaccinated dogs at monthly intervals following tick-challenge (Table 16). In contrast, *B. burgdorferi* ss were recovered from only 6 (8%) of 75 biopsies collected from the dogs vaccinated with the vaccine ($p < 0.0001$). Spirochetes were recovered from at least one skin biopsy from 10 (67%) of the 15 control dogs, compared to 6 (40%) of the 15 vaccinated dogs. However, isolations from the vaccinated dogs were limited to only the first month post-challenge, whereas, 8 (80%) of the 10 culture positive control dogs had *B. burgdorferi*-positive skin biopsy cultures throughout the following months of the study.

Table 16. Isolation of *B. burgdorferi* ss from the skin of vaccinated or non vaccinated control dogs.

Treatment Group	Day 43 PC	Day 77 PC	Day 112 PC	Day 147 PC	Day 174 PC	Biopsies Positive (Total) ^b	Dogs Positive (Total) ^c	Dogs Positive (Total) ^d
Vaccinates (A)	6/15	0/15	0/15	0/15	0/15	6/75 (8%)	6/15 (40%)	0/6 (0%)
Controls (B)	9/15	8/15*	7/15 ^a *	6/15*	3/15	33/75** (44%)	10/15 (67%)	8/10 (80%)

^a One new dog.

^b Total Biopsies that were positive.

^c Total number of Dogs that were positive.

^d Total number of dogs that were positive after the first month.

* $p < 0.05$

** $p < 0.0001$

• **Ability of the vaccine to prevent serologic evidence of infection:**

The vaccine also prevented the development of Lyme disease-specific antibodies. Dogs with Lyme disease produce non-OspC borreliacidal antibodies that are also detectable by using the *B. burgdorferi* ss 50772 isolate (as described in Example 6). Significant, increased levels (≥ 4 -fold increase) of borreliacidal antibodies against strain 50772 were observed post-challenge in 5 (33%) of the 15 placebo-vaccinated control dogs compared to none of the dogs vaccinated with the test vaccine.

Table 17. Mean titers^a of borreliacidal antibodies^b after tick challenge.

Treatment Group	Day 43 PC	Day 77 PC	Day 112 PC	Day 147 PC	Day 174 PC	Total No. of Dogs with Increased Titers
Vaccinates	40	40	40	40	40	0/15
Controls	48	66	88	88	106	5/15 ^c

^a Reciprocal dilution.

^b Detected by using *B. burgdorferi* ss 50772.

^c ≥ 4 -fold increase titer

- **Ability of the vaccine to prevent frank limb/joint disorders and erosive changes associated with *B. burgdorferi* ss infection:**

Previous studies demonstrated that infection with *B. burgdorferi* ss only rarely
5 causes frank limb/joint disorders (Example 6), and the tick challenge model has
been shown to be less effective in older dogs. To exacerbate the development of
frank symptoms, the dogs were immunosuppressed with dexamethasone
approximately 3 months post-challenge. Four placebo-vaccinated control dogs
either became lame or developed erosive lesions in the joint tissue. In contrast,
10 none of the dogs vaccinated with a vaccine of the present invention developed any
clinical signs of limb/joint disorders or the erosive lesions often seen in the joint
tissue.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments
15 described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those
described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing
description. Such modifications are intended to fall within the scope of the
appended claims.

It is further to be understood that all base sizes or amino acid sizes, and all
20 molecular weight or molecular mass values, given for nucleic acids or polypeptides
are approximate, and are provided for description.

Various publications are cited herein, the disclosures of which are hereby
incorporated by reference in their entireties.

25

WE CLAIM:

1. A vaccine composition comprising an immunologically effective amount of organisms from a first or a single strain of a *Borrelia* genospecies;
wherein when organisms of said first or said single strain are grown under
5 standard *Borrelia* genospecies growth conditions they are killed in the presence of an OspC-specific antibody elicited in an animal injected with *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).
2. The vaccine of claim 1, wherein the immunologically effective amount of
10 organisms has been inactivated.
3. The vaccine of claim 1, wherein said first or said single strain exhibits an OspC antigen on its cell surface; and
wherein OspC-borreliacidal antibodies are induced in a canine when said
15 canine is immunized with said vaccine composition.
4. The vaccine composition of claim 3, wherein a significant proportion of the OspC-specific borreliocidal antibodies are specific for OspC7.
- 20 5. The vaccine composition of claim 3, wherein said first or said single strain is *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).
6. The vaccine composition of claim 1 further comprising an immunologically effective amount of inactivated organisms of a second strain that is from a *Borrelia*
25 genospecies; and wherein said second strain exhibits an OspA antigen, an OspB antigen, or exhibits both an OspA antigen and an OspB antigen on its cell surface.
7. The vaccine composition of claim 6, wherein OspC-borreliacidal antibodies and OspA-borreliacidal antibodies are induced in a canine when said canine is
30 immunized with said vaccine composition.

8. The vaccine composition of claim 6, wherein the second strain is strain *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680).

5 9. The vaccine composition of claim 6 comprising from about 1×10^4 to about 1×10^{10} organisms per milliliter of the first strain and from about 1×10^4 to about 1×10^{10} organisms per milliliter of the second strain.

10 10. The vaccine composition of claim 9 comprising from about 5.0×10^8 to about 5×10^9 organisms per milliliter of the first strain and from about 1.0×10^8 to about 5×10^8 organisms per milliliter of the second strain.

11. The vaccine composition of claim 1 further comprising a pharmaceutically acceptable adjuvant.

15 12. The vaccine composition of claim 1 further comprising a pharmaceutically acceptable immune stimulant.

13. The vaccine composition of claim 1 further comprising at least one non-*Borrelia* immunogen for eliciting protective immunity to a non-*Borrelia* pathogen.

20 14. The vaccine composition of claim 13, wherein the non-*Borrelia* immunogen is selected from the group consisting of canine distemper virus, canine adenovirus, canine parvovirus, canine parainfluenza virus, canine coronavirus, canine influenza virus, *Leptospira* serovars, *Leishmania* organisms, *Bordetella bronchiseptica*,
25 *Mycoplasma* species, rabies virus, *Ehrlichia canis*, an *anaplasma* organism, and combinations thereof.

15. The vaccine composition of claim 14, wherein the *Leptospira* serovars are selected from the group consisting of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa,
30 *Leptospira interrogans* serovar canicola, *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae, *Leptospira interrogans* serovar pomona, and combinations thereof.

16. The vaccine composition of claim 14, wherein the *Mycoplasma* species comprises *Mycoplasma cynos*.

17. A method of immunizing a canine against a pathogenic *Borrelia* genospecies comprising injecting the canine with an immunologically effective amount of the vaccine of claim 1.

18. A method of immunizing a canine against a pathogenic *Borrelia* genospecies comprising injecting the canine with an immunologically effective amount of the vaccine of claim 6.

19. The method of claim 18 wherein the second strain is *B. burgdorferi* sensu stricto.

20. The method of claim 18 wherein the second strain is selected from the group consisting of *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680), *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210), *B. afzelii* (ATCC No. 51567), *B. garinii* (ATCC Nos. 51383 or 51991), *B. burgdorferi* ss DK7, *B. burgdorferi* ss 61BV3, *B. burgdorferi* ss ZS7, *B. burgdorferi* ss Pka, *B. burgdorferi* ss IP1,IP2,IP3, *B. burgdorferi* ss HII, *B. burgdorferi* ss P1F, *B. burgdorferi* ss Mil, *B. burgdorferi* ss 20006, *B. burgdorferi* ss 212, *B. burgdorferi* ss ESP1, *B. burgdorferi* ss Ne-56, *B. burgdorferi* ss Z136, *B. burgdorferi* ss ia, and combinations thereof.

21. The method of claim 18 wherein the immunized canine produces borreliacidal antibodies.

22. The method of claim 18 wherein the canine is injected with from about 5×10^7 to about 5×10^9 of each respective strain of *Borrelia* species.

23. Serum comprising borreliacidal antibodies that bind to *B. burgdorferi* OspC obtained from a canine immunized by the method of claim 21.

61

24. Borreliacidal antibodies that bind to *B. burgdorferi* ss OspC obtained from a canine immunized by the method of claim 21.

5 25. The borreliacidal antibodies of claim 24 that comprise OspC7-specific antibodies.

FIG. 1

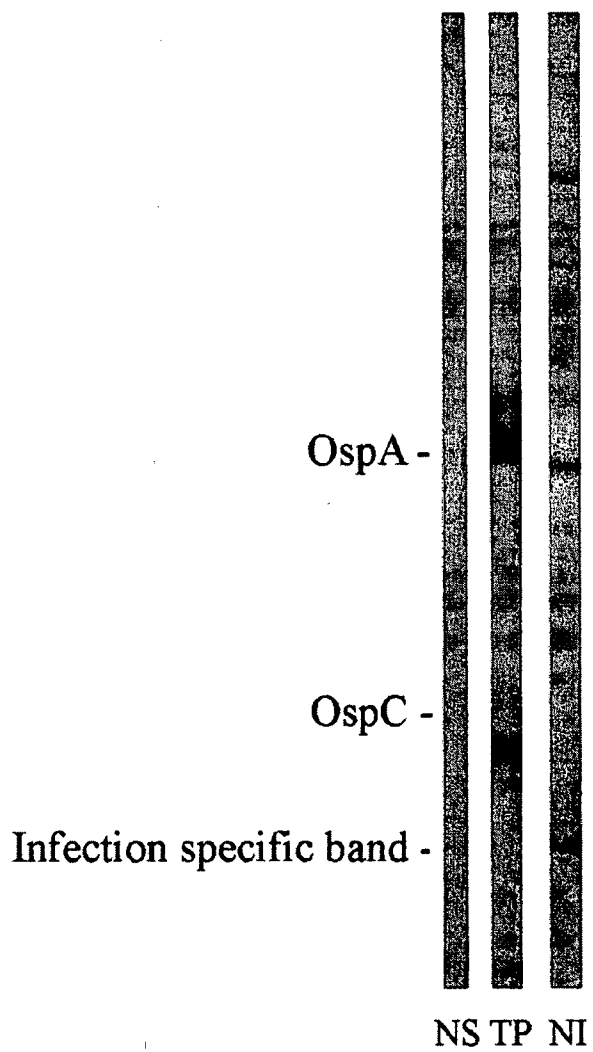
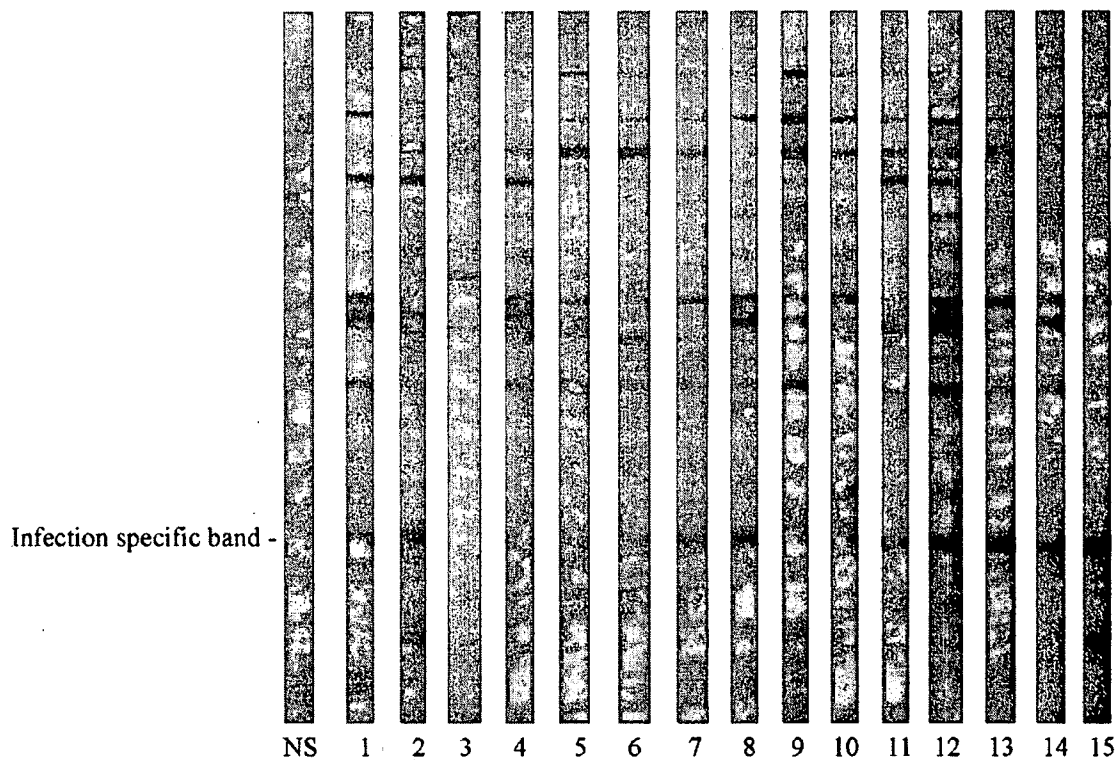


FIG. 2A



84

FIG. 2B

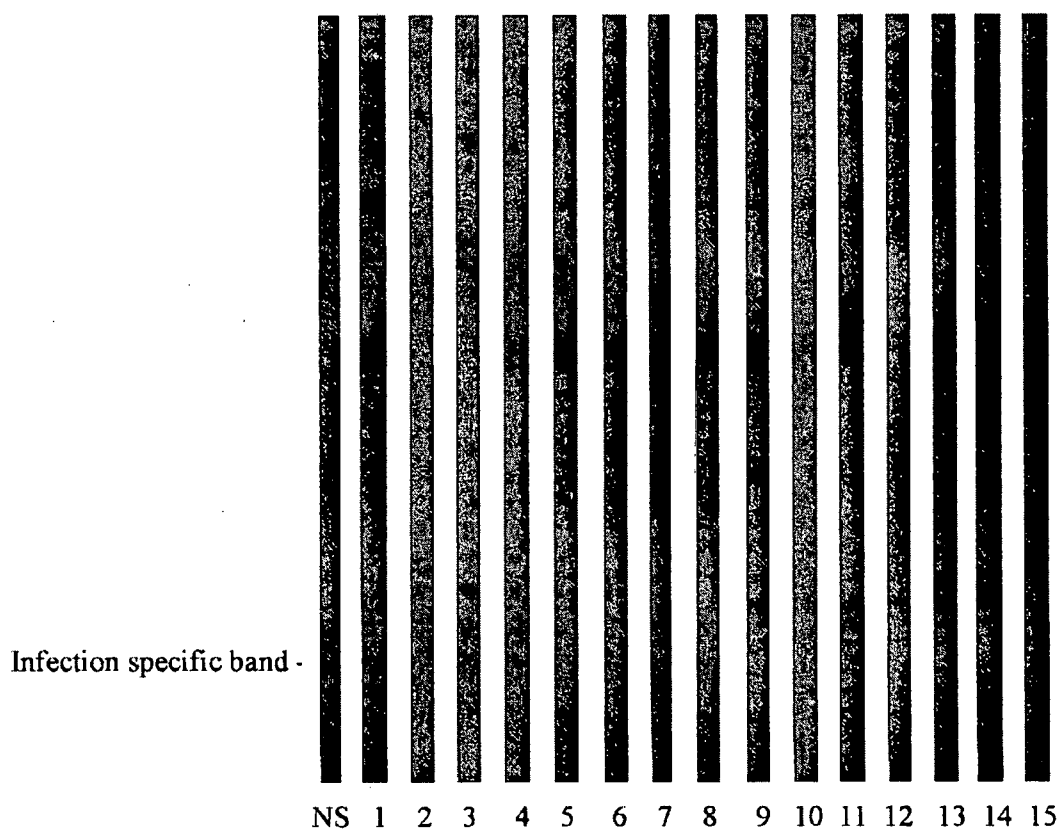


FIG. 3A

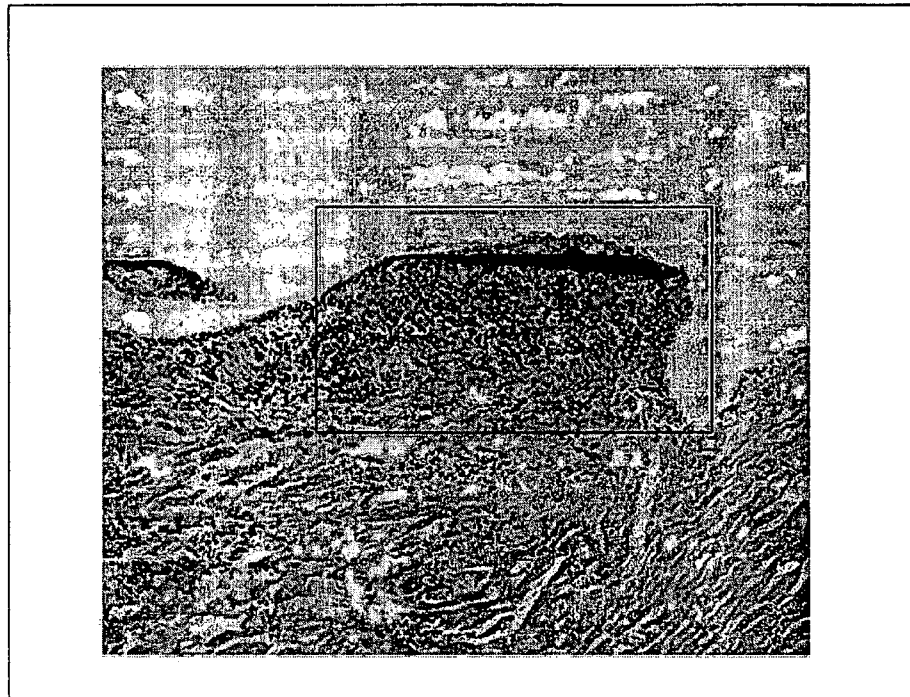


FIG. 3B

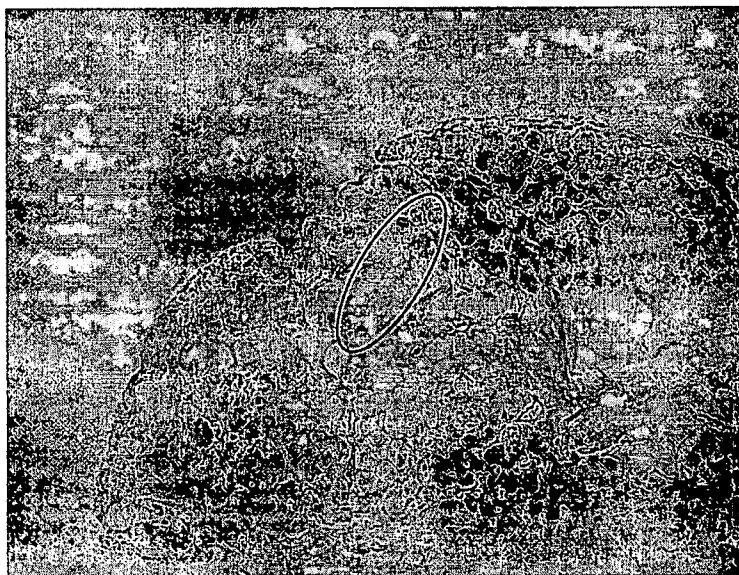


FIG. 4

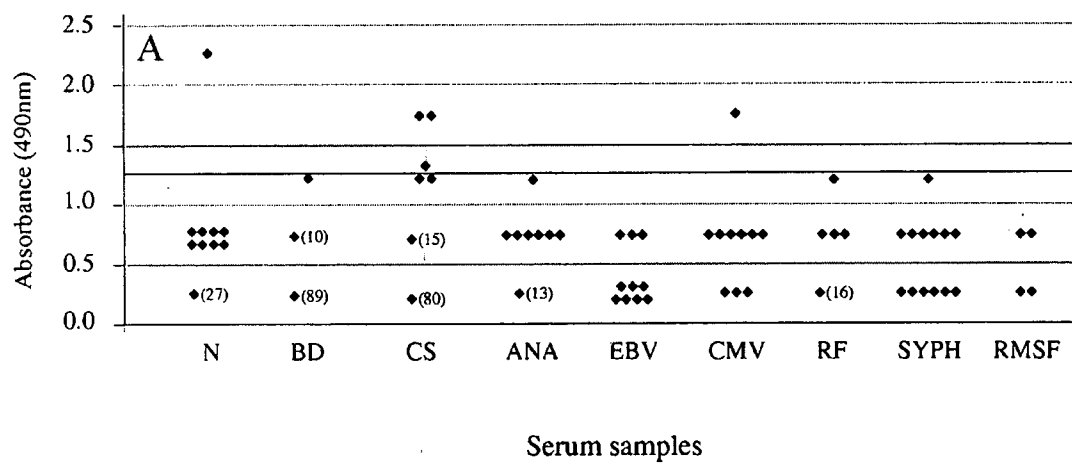
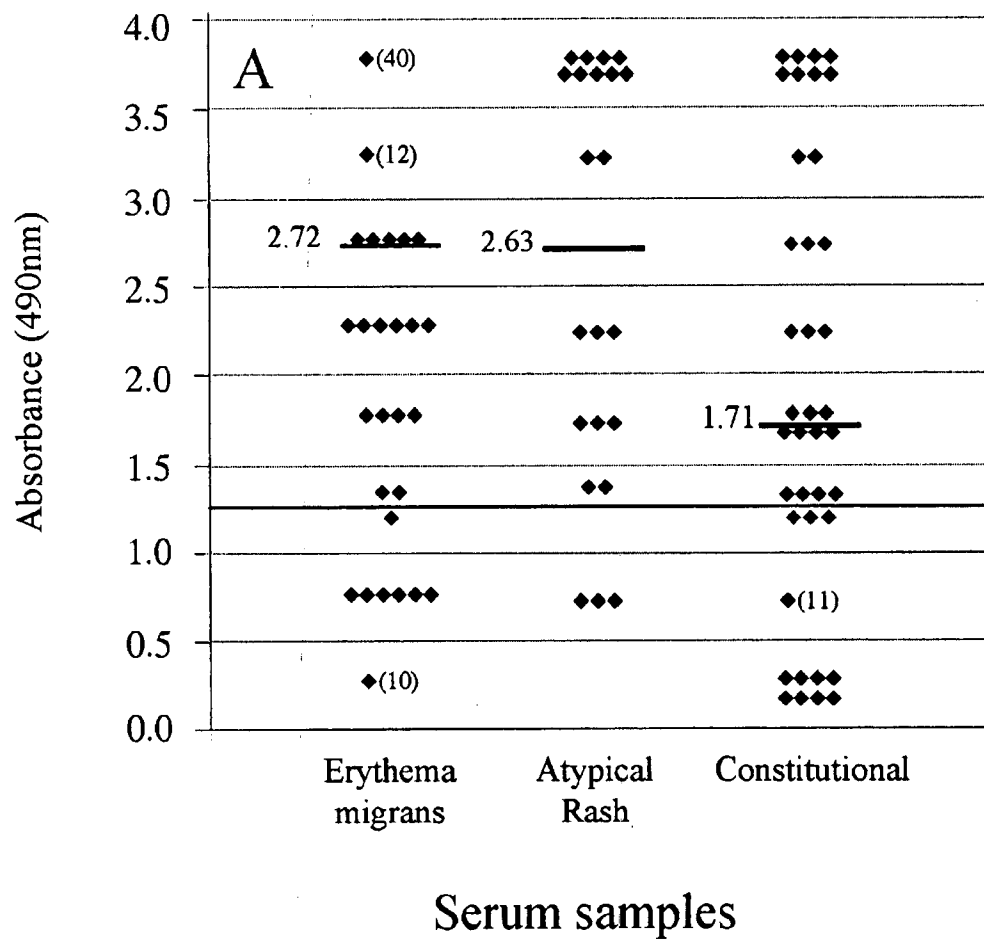


FIG. 5



VACUNA PARA LA ENFERMEDAD DE LYME CANINA

REFERENCIA CRUZADA PARA SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud es una solicitud no provisional que reivindica prioridad bajo la 35 U.S. § 119(e) de la solicitud provisional serial U.S. No. 60/864,258 presentada el 3 de noviembre de 2006, los contenidos de los cuales son incorporados en la presente en su totalidad como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 El presente invento se refiere a una vacuna para la enfermedad de Lyme canina. Los métodos para la fabricación y uso de la vacuna sola o en combinaciones con otros agentes protectivos son además proporcionados.

ANTECEDENTES

- 15 La enfermedad de Lyme canina o borreliosis es causada por la infección por especies de espiroquetas *Borrelia (spp.)*, incluyendo principalmente *B. burgdorferi* en sentido estricto (ss) en los Estados Unidos y *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, y *B. afzelii* en Europa (Baranton et al., *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1992, 42:378-383; Hovius et al., *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38;2611-2621). Las espiroquetas son transmitidas a través de garrapatas del género *Ixodes* spp cuando estas obtienen
- 20 sangre como alimento del huésped, resultando en infección en caninos con signos clínicos que varían desde sinovitis subclínica hasta artritis aguda y artralgias (Jacobson et al., *Semin. Vet. Med. Surg.* 1996, 11;172-182; Summers et al, *J. Comp. Path.* 2005, 133;1-13). Importantemente, la incidencia de casos de enfermedad de Lyme canina continua incrementándose anualmente coincidiendo con elevados números de casos humanos (Haninkova et al., *Emerg. Infect. Dis.*
- 25 2006, 12;604-610).

Los anticuerpos producidos en respuesta a la infección con *Borrelia* spp. tienen dos funciones distintas, pero hasta ahora, ambas respuestas podrían ser inefectivas al eliminar espiroquetas secuestradas a partir del huésped mamífero. Un número de explicaciones han sido postuladas

para este defecto en la respuesta inmune normal para la infección natural, incluyendo variación antigénica (Schwan, *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31:108-112; Todar et al., *Infect. Immun.* 2004, 72:5419-5432), mimetismo del huésped (Barbour et al. *Microbiol. Rev.* 1986, 50:381-400), y localización intracelular (Ma et al., *Infect. Immun.* 1991, 59:671-678).

5 La respuesta inmune humoral más común es la producción de anticuerpos no específicos unión/opsonizante (coagulación) que “marcan” la espiroqueta para la ingestión por células fagocíticas. Desafortunadamente, los anticuerpos opsonizantes son inducidos por muchas proteínas comunes a otros microorganismos (viz. Proteínas kDa que comprenden flagelos bacterianos), haciendo cuestionable sus valores para la vacunación inducida por inmunidad
10 mediada por anticuerpos.

Una segunda respuesta común inmune es la producción de anticuerpos borrelícos (letales). En contraste a los anticuerpos opsonizantes, los anticuerpos borrelícos reconocen epítopes sobre solo unas cuantas proteínas de *Borrelia* spp. Después de unirse a un blanco específico sobre la espiroqueta, los anticuerpos borrelícos comúnmente inducen el complemento para formar
15 complejos de ataque de membrana para eliminar los organismos sin la necesidad de barrido por las células fagocíticas.

Las bacterinas de la enfermedad de Lyme canina *presentemente* empleadas en vacunas fueron desarrolladas para proporcionar protección mediante la inducción de anticuerpos OspA borrelícos (Hsien-Chu et al., *Javma* 1992, 201:403-411; Ma et al., *Vaccine* 1996, 14:1366-
20 1374; Wicle et al., *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2006, 4:23-28; Straubinger et al., *Vaccine* 2001, 20:181-193) que elimina las espiroquetas que expresan OspA en las garrapatas infectadas mientras los parásitos obtienen sangre como alimento (Fikring et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89:5418-5421). Straubinger et al., *Vaccine* 2002, 20:181-193) ha reportado que una vacuna celular completa indujo significativamente mas altas titulaciones de anticuerpos borrelícos que
25 una OspA recombinante. Aunque tales vacunas han sido razonablemente exitosas, fallas en la vacunación han sido reportadas (Levy et al. *JAVMA* 1993, 202:1834-1838; Ma et al., *Vaccine* 1996, 14:1366-1374; Schutzer et al., *N. Engl. J. Med.* 1997, 337:794-795).

Ahora se entiende que los anticuerpos borrelícos OspA generaron muchas veces fallas para esterilizar las garrapatas alimentadoras, porque los anticuerpos solo reconocen a *B. burgdorferi*
30 ss (Jobe et al., *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32:618-622; Lovrich et al., *Infect. Immun.* 1995,

63:2113-2119) que están expresando OspA, y las garrapatas son comúnmente infectadas con espiroquetas *B. burgdorferi* que no están expresando OspA (Fikrin et al., *Infect. Immun.* 1995, 63:1658-1662; Ohnishi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98:670-675). Además, las garrapatas son comúnmente infectas por otras bacterias patogénicas de la especie *Borrelia* spp. incluyendo *B. afzelii* y *B. garinii* (Ornstein et al., *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39:1294-1298), mientras los anticuerpos OspA son genoespecies específicas (Lovrich et al., *Infect. Immun.* 1995, 63:2113-2119). Además, las “ventana de oportunidad” para protección por anticuerpos borrelidas OspA es limitada inclusive cuando las espiroquetas son susceptibles, porque la expresión del OspA, la cual media la unión al intestino medio de la garrapata (Pal et al., *J. Clin. Invest.* 2000, 106:561-569), es regulada negativamente poco después de que la garrapata infectada empieza a alimentarse (Schwan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:2909-2913).

La OspC de *B. burgdorferi* ss es otro potencial blanco para los anticuerpos borrelidas mediados por inmunidad (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741). Esta proteína parece tener un epítipo que es responsable en la inducción de anticuerpos borrelidas y están conservados entre las especies patogénicas de *Borrelia* spp. (Lovrich et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751). Aunque la función específica de la proteína OIPC permanece desconocida, se ha sugerido que la expresión de la OspC se requiere para la infección de mamíferos, pero no para infección de garrapatas (Grimm et al., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(9):3142-3147). En cualquier evento, las espiroquetas de la enfermedad de Lyme expresan OspC poco después de que la garrapata empieza a alimentarse (Schwan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:2909-2913) y debe continuar para expresar la OspC para establecer una infección en mamíferos (Stewart et al., *Infect. Immun.* 2006, 74:3547-3553, Tilly et al., *Infect. Immun.* 2006, 74:3554-3564). Por lo tanto, la “la ventana de efectividad” de los anticuerpos borrelidas de la OspC está incrementada significativamente comparada con los anticuerpos borrelidas de la OspA.

Se ha demostrado que la proteína OspC induce anticuerpos borrelidas protectivos (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741, Ikushima et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000, 29:15-21), pero algunos estudios previos de “mapeo” han localizado los epítopes en regiones de la proteína altamente heterogéneas (Buckles et al., *Clin. Vacc. Immunol.* 2006, 13:1162-1165). Por lo tanto, los anticuerpos borrelidas de la OspC hechos contra estas regiones solamente proporcionarían inmunidad mediada por anticuerpos contra un pequeño número de *Borrelia* spp.

2
A

aisladas. Lovrich et al. (*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751) identificaron un epítotope de anticuerpo borrelícida de la OspC dentro del aminoácido C-terminal 7 (OspC7) de la proteína. Más significativamente, el epítotope está conservado entre las especies patogénicas de *Borrelia* spp. Sin embargo, aislamiento de *B. burgdorferi* ss en laboratorio tradicional que expresa la
5 OspA (ejemplo, contiene el operón *OspA/OspB*) no puede ser manipulado en laboratorio para inducir niveles significativos de anticuerpos borrelícidas de OspC sin significativamente afectar su habilidad para inducir anticuerpos borrelícidas de OspC. Además, el vacunar con aislados muertos de *B. burgdorferi* ss de laboratorio tradicional que expresan OspA no inducen anticuerpos OspC borrelícidas (Schwan et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:2909-2913,
10 Obonyo et al., 1999, *J. Clin. Microbio.*, 37:2137-2141).

Callister et al., (Patente U.S. Nos. 6,210,676 y 6,464,985, incorporados aquí como referencia) han sugerido emplear un fragmento polipeptídico inmunológico de OspC, solo o en combinación con un polipéptido OspA, para preparar una vacuna para proteger a los humanos y otros mamíferos contra la enfermedad de Lyme. Livey et al. (Patente U.S. No. 6,872,550, incorporados
15 aquí como referencia) además propusieron una vacuna para la inmunización contra la enfermedad de Lyme preparada a partir de una combinación de proteínas recombinantes OspA, OspB, y OspC. Sin embargo, a la fecha, vacunas de proteínas no recombinantes han demostrado ser un mejoramiento sobre las vacunas que son actualmente comercializadas. Por lo tanto, allí permanece una necesidad antigua en el arte para una vacuna mejorada para proteger mamíferos, y
20 especialmente caninos, de la enfermedad de Lyme. La consulta de cualquier referencia aquí, no debería ser interpretada como una admisión que tal referencia es disponible como “arte previa” para la solicitud inmediata.

RESUMEN DEL INVENTO

25 En consecuencia, el presente invento proporciona nuevas composiciones inmunogénicas que pueden ser usadas en vacunas. En un aspecto del presente invento, una vacuna protege contra la enfermedad de Lyme. En una realización particular de este tipo, el recipiente de la vacuna es un canino. En otra realización, el receptor de la vacuna es un gato doméstico. Otros mamíferos domésticos pueden ser protegidos por vacunas y/o métodos del presente invento tales como
30 caballos y/o reses. El presente invento además proporciona vacunas de combinación para

provocar inmunidad protectora contra la enfermedad de Lyme y otras enfermedades, por ejemplo, otras enfermedades infecciosas caninas. En el presente invento además se proporciona métodos de fabricación y uso de las vacunas.

Una vacuna del presente invento comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de organismos de una cepa individual (opcionalmente inactivados) que expresen el antígeno OspC. La cepa es una que, al crecer bajo condiciones de cultivo estándar, es eliminada en la presencia de anticuerpos borrelícos OspC específicos (el complemento es opcionalmente requerido) incluyendo anticuerpos borrelícos contra el epítipo OspC7 conservado, provocado en un animal vacunado por *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439). En una realización particular de este tipo, la primera cepa o cepa individual de genoespecies de *Borrelia* constitutivamente expresan el antígeno OspC. En una personificación más particular, la primera cepa es *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).

Ejemplos de segundas cepas apropiadas incluyen uno o más de los siguientes: *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680), *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No.35210), *B. afzelii* (por ejemplo, disponible como ATCC No. 51567) y *B. garinii* (por ejemplo disponible como ATCC Nos. 51383 y 51991), *B. burgdorferi* ss DK7, *B. burgdorferi* ss 61BV3, *B. burgdorferi* ss ZS7, *B. burgdorferi* ss Pka, *B. burgdorferi* ss IP1, IP2, IP 3, *B. burgdorferi* ss Hll, *B. burgdorferi* ss P1F, *B. burgdorferi* ss Mil, *B. burgdorferi* ss 20006, *B. burgdorferi* ss 212, *B. burgdorferi* ss ESP1, *B. burgdorferi* ss Ne-56, *B. burgdorferi* ss Z136, *B. burgdorferi* ss ia, y/o cualquier componentes de estos.

La composición de la vacuna ampliamente incluye desde cerca de 1×10^4 a 1×10^{10} organismos por milímetro de cada cepa respectiva. En una realización particular, la vacuna incluye desde cerca de 1×10^6 a aproximadamente 5×10^9 organismos por milímetro de cada cepa respectiva. En otra realización la vacuna incluye desde cerca de 1.0×10^8 a aproximadamente 5×10^8 organismos por milímetro de (o cada) la segunda cepa y desde aproximadamente 5.0×10^8 a aproximadamente 5×10^9 organismos por milímetro de la primera cepa.

La composición de la vacuna además puede incluir un adyuvante farmacéuticamente aceptable, ejemplo, tales como compuestos de aluminio (ejemplo, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio) aceites metabolizables y no metabolizables, polímeros de bloqueo, complejos

estimulantes inmunes, vitaminas y minerales, y CARBOPOL® (ejemplo, CARBOPOL 941). En una realización individual del adyuvante farmacéuticamente aceptable comprende unas gotas de aceite de tamaño micrón uniformemente dispersas en emulsión de agua (ejemplo; como las vendidas bajo la marca registrada Emulsigen®).

- 5 Opcionalmente, la composición de la vacuna además incluye un estimulante inmune farmacéuticamente aceptable, ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas, supernadantes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos, o células de órganos linfoides, preparaciones celulares y/o extractos de plantas, bacterias o parásitos, o mitógenos.

La invención además proporciona un método de inmunización de un canino, u otros mamíferos, contra especies patogénicas de *Borrelia* spp., específicamente *B. burgdorferi* ss, comprende inyectar al canino con una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna inventiva arriba descrita. Tales vacunas pueden incluir desde cerca de 1×10^8 a aproximadamente 3×10^9 organismos de cada cepa respectiva, por ejemplo. Las vacunas pueden ser administradas mediante rutas tales como: inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, administración oral, administración intranasal, y combinaciones de las mismas. En una realización particular, después de la vacunación, el canino inmunizado produce anticuerpos borrelicidas.

El invento además proporciona suero obtenido de un animal vacunado que contiene anticuerpos borrelicidas que se unen a la OspC de *B. burgdorferi* ss. Similarmente, el invento proporciona anticuerpos purificados que se unen a la OspC. En una realización particular, el suero contiene una proporción de anticuerpos borrelicidas OspC7 específicos.

El invento además proporciona vacunas combinadas que incluyen una o más cepas de las genopecies de *Borrelia* del presente invento en combinación con uno u otros patógenos caninos y/o inmunógenos, incluyendo, por ejemplo, inmunógenos para provocar inmunidad para el virus del moquillo canino; adenovirus canino; parvovirus canino; virus parainfluenza canino; coronavirus canino; virus influenza canino; y/o *Leptospira* serovars, por ejemplo, *Leptospira Kirschneri* serovar grippotifosa, *Leptospira interrogans* serovar canicola, *Leptospira interrogans* serovar icterohemorrágica, y/o *Leptospira interrogans* serovar pomona. Patógenos adicionales caninos que pueden ser adheridos a la combinación de la vacuna del presente invento incluyen organismos *Leishmania* tales como *Leishmania* mayor y *Leishmania infantum*; *Bordetella*

2

bronchiseptica; una especie de *Mycoplasma* (ejemplo, *Mycoplasma cynos*), virus de la rabia; organismos anaplasma tales como *anaplasma phagocytophilum* y *anaplasma platys*; y *Ehrlichia canis*.

Estos y otros aspectos el presente invento serán mejor apreciados mediante referencia de las
5 siguientes figuras y de la descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 FIG. 1 es un Western blot de un control de suero de perro normal (NS) o sueros de un perro después de la vacunación (estudio día 43) con el producto de la prueba (TP) o después de la exposición (estudio día 134) con garrapatas infectadas (NI) con *B. Burgdorferi* ss. Note la presencia de anticuerpos específicos de infección contra una proteína con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

15 FIG. 2^a es un Western blot de un control de suero de perro normal (NS) o sueros de cohortes separadas de perros individuales (enumerados del 1-15) después de la vacunación con placebo y exposición con garrapatas infectadas con *B. burgdorferi* ss (estudio día 134).

FIG. 2B es un Western blot de un control de suero de perro normal (NS) o sueros de cohortes separadas de perros individuales (enumerados del 1-15) después de la vacunación con el
20 producto de la prueba. Note la presencia de los anticuerpos específicos de infección de 20 kDa en 14 (93%) de los perros vacunados con placebo (FIG. 2A) y 0 ($p<0.0001$) con perros vacunados con producto de la prueba (FIG.2B).

FIG.3B es un ejemplo representativo de los cambios histopatológicos en las articulaciones de perros vacunados con placebos que fueron infectados con *B. burgdorferi* ss. El área dentro del
25 rectángulo representa una infiltración importante de neutrófilos y células mononucleares característica de la artritis canina de Lyme.

FIG 3B es un ejemplo representativo de la ausencia de cambios histopatológicos en las articulaciones de perros vacunados con el producto de la prueba que fueron infectados con *B.*

burgdorferi ss. El área dentro del óvalo no tiene infiltrados neutrófilos ni de células mononucleares.

FIG. 4 ilustra la determinación de la reactividad de ELISA de OspC7 usando sueros normales (N) de individuos sin previa historia (revisión de mapa) de enfermedad de Lyme o síntomas relacionados con la enfermedad de Lyme (n =36), sueros no caracterizados de donantes de sangre (BD, n=100), o sueros de voluntarios con factores sanguíneos o enfermedades que comúnmente reaccionan cruzadamente con antígenos *B. burgdorferi* ss, incluyendo anticuerpos antinucleares (ANA, n =20), factor reumatoideo (RF, n =20), mononucleosis (EBV, n =10), citomegalovirus (CMV, n =10), sífilis (SYPH, n =13) o fiebre de las Montañas Rocosas (RMSF n =4). La línea densa denota 3 desviaciones estándar encima del valor de la adsorbancia media de los sueros normales y de potencial reacción cruzada. Valores por encima de la línea corresponden a resultados positivos de un 99% de probabilidad (1% valor de antecedente).

FIG. 5 ilustra la reactividad por ELISA de OspC7 usando sueros de pacientes con probable enfermedad de Lyme con eritema migratorio (n =86) representando pacientes con lesiones típicas de la enfermedad de Lyme, probablemente pacientes con enfermedad de Lyme con “lesiones atípicas” (n =22), y posibles pacientes con enfermedad de Lyme con síntomas constitucionales (n =49) [los signos clínicos más tempranos]. La línea densa denota tres desviaciones estándar encima del valor de adsorbancia media de los sueros normales y de potencial reacción cruzada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

El presente invento proporciona composiciones de la vacuna que incluyen una cantidad inmunológicamente efectiva de organismos de una o más cepas de genoespecies de *Borrelia* que inducen una efectiva inmunidad borrelcida mediada por anticuerpos en el animal recipiente vacunado. Cuando los organismos de tales cepas cultivados bajo condiciones de crecimiento estándares de genoespecies de *Borrelia* son eliminados en presencia de anticuerpos específicos de OspC, ejemplo, un anticuerpo o anticuerpos provocado en un animal vacunado con *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).

7

En un aspecto del presente invento, la ventana de efectividad de los anticuerpos inducidos por una vacuna del presente invento están significativamente elevados comparados con vacunas convencionales basados únicamente en anticuerpos borrelidas OspA. En otro aspecto, una vacuna del presente invento proporciona una mejor oportunidad de estimular una respuesta
5 beneficiosa en la memoria inmunológica, ejemplo, debido a la expresión de OspC *in vivo*, y/o una protección adicional y/o mejorada contra múltiple cepas patogénicas de *Borrelia* spp.

En una realización del presente invento, Cuando los organismos de tales cepas cultivados bajo condiciones de crecimiento estándares de genoespecies de *Borrelia*, ellos constitutivamente expresan el antígeno OspC. En una realización particular de este tipo, cuando los organismos de
10 tales cepas son cultivados bajo condiciones de crecimiento estándares de genoespecies de *Borrelia* son eliminados por una reacción específica del complemento. En otra realización, una proporción significativa de anticuerpos borrelidas OspC específicos en los sueros inducidos por una vacuna que comprende organismos de tales cepas son específicos para el epítipo OspC7 conservado y de esa manera, proporcionar protección contra múltiples genoespecies de *Borrelia*
15 (ejemplo *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, y/o *B. garinii*). En otra realización, organismos de tales cepas no exhiben antígenos OspA o OspB. En otra realización, organismos de tales cepas tienen 2 o más de esas propiedades. En otro aspecto, organismos de tales cepas tienen cualquiera de las tres o más de estas propiedades. En otra realización, organismos de tales cepas tienen cualquier de las cuatro o más de estas especies. En una realización particular, organismos de tales cepas
20 tienen todas estas propiedades. Una cepa particular es *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).

En una realización alternativa, la vacuna inventiva es una composición que incluye tanto una primera cepa como se describió arriba y una cantidad efectiva de organismos de al menos de una segunda cepa. La segunda cepa es preferiblemente genoespecies de una *Borrelia* patogénica
25 que induce anticuerpos borrelidas OspA cuando son administrados como parte de la vacuna inventiva. Una o más genoespecies adicionales de la vacuna compatible además pueden ser aquí incluidas. En adición, las vacunas del presente invento pueden incluir uno u otros patógenos mamíferos (ejemplo, caninos) y/o inmunógenos.

Para apreciar completamente el invento, se proporcionan las siguientes definiciones.

K

El uso de los términos en singular por conveniencia en la descripción pretende de ninguna manera ser limitante. Por ende, por ejemplo, referenciar a una composición “un polipéptido” incluye referenciar a uno o más de tales polipéptidos. Además, referenciar a un “organismo” incluye referenciar a una pluralidad de tales organismos, a menos que de otra manera se haya indicado.

Como se uso aquí el termino “aproximadamente” es usado intercambiabilmente con el termino “casi” y significa que el valor esta dentro del 50% del valor indicado, ejemplo, una composición que contiene “aproximadamente” 1×10^{10} organismos por milímetro contiene de 5×10^9 a 5×10^{10} organismos por milímetro.

El termino “genoespecies”, primero fue usado y definido por G. Baranton et al., 1992, *International J. of Systematic Bacteriology* 42: 378-383, y aquí es usado en la misma forma que el termino, “especies” es empleado en la descripción de la taxonomía de los organismos no *Borrelia*.

“Condiciones estándares de crecimiento” para cultivar genoespecies de *Borrelia* requiere crecimiento a una temperatura que oscila desde 33°C a 35°C, en medio BSK (Barbour Stoenner Kelly). El medio BSK como aquí se describió fue preparado de acuerdo a Callister et al. [*Detección de anticuerpos Borrelícidias por flujometría de flujo, Secciones 11.5.1 – 11.5.12, Protocolos Actuales en Citometría*, John Wiley e Hijos, Inc. Suplemento 26, (2003) por este medio incorporados aquí referenciados en su totalidad]. (El medio BSK además esta disponible comercialmente, ejemplo, de Sigma, St. Louis, MO).

Como se uso aquí “OspC7” es un epítoto de anticuerpo borrelícidia OspC inmunodominante localizado en una región amino acido 7 (Lovrich et al., 2005, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12:746-751, incorporados aquí como referencia en su totalidad) dentro del C-terminal amino acido 50 de OspC, como se revelo por Callister et al. (U.S. Pat. Nos. 6,210,676 B1 y 6,464,985 B1, las cuales son aquí incorporadas en su totalidad) que es absolutamente conservado entre las especies patogénicas conocidas de *Borrelia* spp. Esta conservación es fácilmente conservada por una búsqueda BLAST del segmento codón codificando el segmento 7 de aminoácido descrito por Lovrich et al. Tal búsqueda, como se dirigió en Octubre 9, 2006 genero una lista de resultados de 100 especies de *Borrelia* que conteniendo el segmento codificante del epítoto OspC7-mer anotado arriba.

62
N

Un “anticuerpo borrelícida OspC específico” es uno que se encontró, ejemplo, en el suero de un animal vacunado con *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439), y es uno que selectivamente se une a cualquier epítipo del antígenos OspC y elimina las espiroquetas dependientes o independientes del complemento. Un “anticuerpo borrelícida OspC7 específico” es uno que se encontró, ejemplo, en el suero de un animal vacunado con *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439), y es uno que selectivamente se une al aminoácido 7 C-terminal de OspC como lo describió (Lovrich et al., 2005, [*Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12:746-751, (2005). Incorporado aquí como referencia en su totalidad] y elimina las espiroquetas (generalmente mediante la inducción del complejo de ataque de membrana mediado por el complemento). La especificidad de los anticuerpos borrelícidas ha sido bien establecida. Por ejemplo, los anticuerpos borrelícidas OspC son detectados comúnmente en sueros de la enfermedad de Lyme mediante medición de la susceptibilidad de *B. burgdorferi* ss 50772 (descrito en detalle por Callister, et al., 1996, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3 (4):399-402). Además, un péptido ELISA que usa el epítipo borrelícida OspC7 captura exactamente anticuerpos borrelícidas en los sueros de la enfermedad de Lyme, y sueros de pacientes con otras enfermedades estrechamente relacionadas solo pocas veces (< 2%) contiene anticuerpos reactivo cruzados que además se unen al péptidos OspC7 (ilustrado por Figs. 4 y 5).

Cuando una “proporción significativa” de los anticuerpos borrelícidas OspC específicos en sueros inducidos por una vacuna son específicos para el epítipo OspC7 conservado, esto significa que hay una reducción medible en los anticuerpos borrelícidas OspC específicos en los sueros siguiendo la absorción de esos sueros con el OspC7. Es definido preferiblemente como al menos una reducción de 2 veces en la titulación de los sueros de anticuerpos borrelícidas detectados mediante el uso de *B. burgdorferi* ss 50772, y mas preferiblemente como 2 a 4 veces, o mayor reducción en la titulación de los sueros de anticuerpos borrelícidas siguiendo la absorción de esos sueros con el OspC7.

Una “reacción específica de complemento” es una reacción de anticuerpo que requiere sueros con complemento presentes para que el organismo (s) *Borrelia* spp sean eliminados por un anticuerpo borrelícida.

Para el propósito de este invento, un organismo *Borrelia burgdorferi* ss “inactivado” es un organismo el cual es capaz de provocar una respuesta inmune en un animal, pero no es capaz

de infectar el animal. El aislamiento de *Borrelia burgdorferi* ss puede ser inactivado por un agente seleccionado de un grupo consistente en etileneimina binaria, formalina, beta-propiolactona, timerosal, o calor. En una personificación particular, los aislamientos de *Borrelia burgdorferi* ss son inactivados etileneimina binaria.

5 Los términos “adyuvante” y “estimulante inmune” son usados aquí intercambiablemente, y son definidos como una o más sustancias que causan estimulación del sistema inmune. En este contexto, un adyuvante es usado para mejorar una respuesta inmune para una o mas vacunas antígeno-aisladas. Un adyuvante puede ser administrado antes al animal blanco, en combinación con, o después de la administración de la vacuna. Los adyuvantes del presente invento pueden ser
10 obtenidos a partir de cualquier número de fuentes incluyendo de fuentes naturales, fuentes recombinantes, y/o ser sintetizadas químicamente, etc. Ejemplos de compuestos químicos usados como adyuvantes incluyen, pero no limitados a compuestos de aluminio, aceites metabolizable y no metabolizables, polímeros de bloqueo, ISCOM’s (complejos estimulantes inmunes), vitaminas y minerales (incluyendo pero no limitados a: Vitamina E, vitamina A, selenio, y vitamina B12),
15 Quil A (saponinas), y polímeros de ácido acrílico unión cruzada con éteres de polialqueno o divinal glicol, ejemplo, CARBOPOL®.

Ejemplos adicionales de adyuvantes, que algunas veces han sido referenciados específicamente como estimulantes inmunes, incluyen componentes de pared celular bacteriana y fúngica (ejemplo, lipopolisacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas, muralmipéptidos, beta-1,3/1,6-
20 glucanos), varios carbohidratos complejos derivados de plantas (ejemplo, hormonas, citoquinas, factores co-estimuladores), y ácidos nucleicos novedosos derivados de virus y otras fuentes (ejemplo, doble hebra de RNA, CpG). Además, cualquier número de combinaciones de las sustancias ya mencionadas pueden proporcionar un efecto adyuvante, y por lo tanto, pueden formar un adyuvante del presente invento. Un adyuvante preferido es Emulsigen®.

25 *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439) puntualizó en la US Patente No. 6,210,676, y *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680) como se puntualizó en la US Patente No. 6,316,005, fueron depositadas con Colección de Cultivos Tipo Americanos, Universidad de Boulevard Manassas (VA) 20110 en Julio 30, 1999, y Abril 11, 2000, respectivamente. Los co-propietarios de los derechos para el presente invento individualmente
30 mantienen los derechos para estas dos patentes ya mencionadas.

1

Además se entiende que este invento no está limitado a configuraciones particulares, pasos de procesos, y materiales aquí revelados tales como configuraciones, pasos de procesos, y materiales pueden variar de cierta manera. Además se entiende que la terminología aquí empleada es usada con el propósito de escribir solamente realizaciones y no busca ser limitante, ya que el alcance del presente invento será limitado solamente por reivindicaciones anexas y equivalentes de esto.

CEPAS ADICIONALES DE LA VACUNA

• Cepas OspC Adicionales

En un aspecto, el presente invento proporciona el uso de *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439) en una vacuna que protege contra la enfermedad de Lyme, o bien sea sola, o en combinación con otras cepas de genoespecies de *Borrelia*. Notablemente, de *B. burgdorferi* ss 50772 fue inicialmente rechazada como una candidata para ser útil en una vacuna porque ésta fue incorrectamente reportada que esta cepa no expresaba la OspC. (Anderson et al., 1996, *J. Clin. Microbiol.*, 34:524-529).

El presente invento además proporciona criterios únicos y específicos para seleccionar/identificar otros aislamientos útiles para vacunas del presente invento. En particular, los aislamientos pueden ser seleccionados/identificados que son susceptibles para ser eliminados por anticuerpos OspC específicos, y preferiblemente, para además poseer una o más, o todos de los siguientes atributos: (i) la susceptibilidad para ser eliminados por anticuerpos OspC específicos de una reacción específica de complemento, (ii) la habilidad para inducir anticuerpos OspC borrelicidas en un receptor vacunado por ese aislado; (iii) para una proporción significativa de anticuerpos OspC borrelicidas de tal forma inducidos para ser específicos para el epítipo conservado dentro del aminoácido 7 C-terminal (OspC7); (iv) la falta de capacidad para expresar OspA y OspB; y/o (v) la habilidad para expresar OspC constitutivamente *in vitro*.

A. Supresión de la Expresión de OspA/B y Mejoramiento de la Expresión de OspC mediante Condiciones de Cultivos.

Se ha demostrado por Obonyo et al. (*J. Clin. Microbiol.* 1999, 37:2137-2141) que la expresión de OspA puede ser regulada negativamente, y la expresión de OspC puede ser regulada positivamente sobre un periodo de 5 días mediante el co-cultivación de una cepa normal patogénica de *Borrelia* spp. (cepas JMNT y N40 de *B. burgdorferi* ss) con una línea celular de garrapata (*Ixodes scapularis* ISE6). El efecto mas pronunciado fue visto mediante la cultivación a 37°C. Por ende, este método convertirá una o más cepas convencionales patogénicas de *Borrelia* en una forma útil para una vacuna del presente invento.

B. B. Supresión de la Expresión de OspA/B y Mejoramiento de la Expresión de OspC mediante Mutación.

En una realización adicional, la manipulación genética de cepas de *Borrelia* spp que originalmente expresan OspA y OspB es empleada para regular negativamente o para borrar los genes que codifican para la expresión de OspA y OspB que resultan en la regulación positiva de la expresión de OspC. Cualquier método conocido en el arte de manipulación genética está contemplado para ser empleado para este propósito. Por ejemplo, un análogo inactivado del gen de OspA/OspB es introducido dentro de una pluralidad de organismos de una cepa disponible de *Borrelia* spp en la forma de un plásmido compatible de *Borrelia* spp preparado con un marcador de selección de antibiótico (ver, ejemplo, Grim et al., 2004, *Proc. Nat'l Acad. Sci* 101(9):3142-3147 quien reportó que la expresión de OspC puede ser bloqueada en una especie de *Borrelia* spp mediante el insertar plásmidos de complementación y desactivación de OspC en una cepa de *B. burgdorferi* B31-A3. Los eventos de recombinación entre el plásmido introducido y el plásmido que carga los OspA/OspB que se da naturalmente resultará en un cierto número de recombinaciones exitosas de organismos *Borrelia* spp. cargando un plásmido OspA/OspB mutado. La selección puede ser vista, por ejemplo, en forma de un crecimiento y resistencia unida a un antibiótico en la presencia del antibiótico correspondiente. Los organismos *Borrelia* spp con eliminación selectiva de la expresión son contemplados para sobrerregular la expresión de OspC.

2

En una realización opcional adicional, uno o más organismos *B. burgdorferi* ss o *Borrelia* spp que expresen OspA, OspB, y/o uno o más antígenos Osp adicionales pueden ser incluidos en la composición de la vacuna como organismos adicionales.

5 Preferiblemente, cada respectivo organismo inactivado está presente en la vacuna en una concentración oscilando desde casi 1×10^4 a casi 1×10^{10} organismos/ml. En particular, la vacuna es preferiblemente administrada a un canino en una dosis no menos que 1.0×10^8 organismos /ml de *B. burgdorferi* ss S-1-10, y n menos que 5.0×10^8 organismos/ml de *B. burgdorferi* ss 50772.

10 • Cepas Adicionales de OspA

Una segunda cepa, proporcionando el antígeno OspA, puede ser un aislado convencional de *B. burgdorferi* ss patogénico de laboratorio (Barbour et al., 1985, *J. Clin. Microbiol.* 52:478-484) tal como *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210). Un segundo organismo particular es la cepa ejemplificada *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680).
 15 Adecuadas cepas adicionales para el uso como segundo organismo para las composiciones de la vacuna optimizadas para regiones fuera de Norte América incluyen, ejemplo, las cepas: *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210), *B. afzelli* (ejemplo, disponible como ATCC No. 51567) y *B. garinii* (ejemplo, disponible con ATCC Nos. 51383 y 51991), como también aquellas listadas abajo en la Tabla 1.

20

Tabla 1

Cepa	País	Cultivo de
<i>B. burgdorferi</i> ss DK7 ¹	Dinamarca	Piel
<i>B. burgdorferi</i> ss 61 BV3 ¹	Alemania	Piel
<i>B. burgdorferi</i> ss ZS7 ¹	Suiza	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss Pka ¹	Alemania	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss IP1, IP2, IP3 ¹	Francia	LCF



<i>B. burgdorferi</i> ss HII ¹	Italia	Sangre
<i>B. burgdorferi</i> ss P1F ¹	Suiza	Sinovia
<i>B. burgdorferi</i> ss Mil ¹	Eslovaquia	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss 20006 ¹	Francia	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss 212 ¹	Francia	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss ESP1 ¹	España	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss Ne-56 ¹	Suiza	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss Z136 ¹	Alemania	Garrapata
<i>B. burgdorferi</i> ss ia ²	Finlandia	LCF

¹ Lagal et al., J. Clin. Microbiol. 2003, 41 :5059-5065.

² Heikkila et al., j. Clin. Microbiol. 2002, 40:1174-1180.

La composición de la vacuna puede incluir un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 “Adyuvantes” son agentes que incrementan no específicamente una respuesta inmune a un antígeno particular, por ende reduciendo la cantidad de antígeno necesario en una vacuna dada, y/o la frecuencia de la inyección necesaria para generar una adecuada respuesta inmune al antígeno de interés. Adyuvantes adecuados para la vacunación de animales incluyen, pero no limitados a, Adyuvante 65 (que contiene aceite de maní, monooleato de mannide,

10 monoestearato de aluminio); Adyuvante completo o incompleto de Freund; geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y alumbre; surfactantes, tales como hexadecilamina, octadecilamina, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N',N'-bis (2-hidroximetil) propanodiamina, metoxihexadecilglicerol, y polioles plurónicos; polianiones, tales como piran, sulfato de dextrana, poli IC, ácido poliacrílico, y

15 CARBOPOL® (ejemplo, CARBOPOL 941); péptidos, tales dipéptido de muramilo, dimetilglicina y tuftsina; y emulsiones de aceites. Información con respecto a adyuvantes está revelada, ejemplo, en las series por P. Tijssen [*Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, 3rd Edition, 1987, Elsevier, New York, incorporado aquí como referencia].

55

Opcionalmente, la composición de la vacuna puede además incluir un estimulante inmune farmacéuticamente aceptable, tales como componentes de pared celular bacterianos o fúngicos (ejemplo, lipopolisacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas, muramilpéptidos), varios
5 carbohidratos complejos derivados de plantas (ejemplo, glicanos, acemanan), varias proteínas y péptidos derivados de animales (ejemplo, hormonas, citoquinas, factores co-estimuladores), y ácidos nucleicos novedosos derivados de virus y/o otras fuentes (ejemplo, doble hebra de RNA, CpG).

La composición de la vacuna es fácilmente administrada mediante una ruta estándar
10 incluyendo intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral, intranasal, intradérmica, y/o vacunación intraperitoneal. El experto apreciará que la composición de la vacuna es preferiblemente formulada apropiadamente para cada tipo de receptor animal y ruta de administración.

Por ende, el presente invento además proporciona métodos de inmunización de un canino
15 contra *B. burgdorferi* ss y otras especies de *Borrelia* spp. Un método tal comprende inyectar a un canino con una cantidad inmunológicamente efectiva de una vacuna del presente invento, de tal manera que el canino produce apropiados anticuerpos borrelicidas OspA y OspC.

En una realización, la administración subcutánea del presente invento resulta en la
20 producción de altas concentraciones de anticuerpos borrelicidas OspA y OspC incluyendo anticuerpos borrelicidas específicos para OspC7. En otra realización, el presente invento proporciona una vacuna que comprende una cantidad mínima, específica de cada cepa de *B. burgdorferi* ss que es efectiva contra especies dañinas de *Borrelia* spp. En otra realización, una vacuna del presente invento es efectiva para la prevención de *B. burgdorferi* ss y otras infecciones patogénicas de especies *Borrelia* spp en perros. En una realización particular, la
25 vacuna comprende una combinación inmunológicamente segura y efectiva de dos cepas de *B. burgdorferi* ss del presente invento y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

El presente invento revela que una vacuna comprende una cantidad mínima específica de
30 dos aislados de *B. burgdorferi* ss que protege a los perros de especies de *Borrelia* spp. siguiendo la exposición de la garrapata. El presente invento además revela una vacuna que provoca cantidades mínimas específicas de anticuerpos borrelicidas OspA específicos de de

B. burgdorferi ss y OspC específicos de *Borrelia* spp en perros vacunados. Las vacunas del presente invento además pueden ser administradas con un estimulante inmune aceptable y/o adyuvante.

78

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para proveer una mejor apreciación del invento pero no quieren restringir el alcance efectivo de éste.

5

EJEMPLO 1

VACUNACIÓN CON OSPA RECOMBINANTE

A. MATERIALES Y MÉTODOS

• Animales:

10

Se obtuvieron Hámsters LVG de cinco a 10 semanas de edad de Laboratorios Charles River Breeding Inc. (Wilmington, Mass.). Estos se encerraron de a tres o cuatro por jaula a temperatura ambiente de 21°C y se les suministró alimento y agua *ad libitum*.

• Vacunación de hámsters y recolección de suero:

15

Los hámsters fueron vacunados subcutáneamente atrás del cuello con 0.5 mL de vacuna recombinante OspA disponible comercialmente (rOspA) RECOMBITEK® Lyme, (Merial Limited, Duluth, GA) y se les dio un refuerzo tres semanas después de la vacunación primaria. Luego de 3, 7, 9 y 15 semanas luego de la vacunación primaria, grupos de cinco hámsters cada uno fueron levemente anestesiados por inhalación de éter contenido en una copa de nariz y boca y se sangraron por punción intracardiaca. Se dejó que la sangre coagulara y se separó el suero y se almacenó a -70°C hasta su uso. Además, el suero de tres hámsters sin vacunar se agrupó y se usó como suero normal control. Como control adicional, se vacunaron 20 hámsters en la parte posterior de ambas patas con 0.25 mL de vacuna comercial Lyme canina de célula completa. (Galaxy, Solvay Animal Health, Elkhorn, Nebraska) que contenía *B. burgdorferi* ss S-1-10. Se les dio un refuerzo a los animales y se recolectó el suero como se describió arriba.

20

• Preparación de medio BSK:

25

El medio caldo Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) se usó para cultivo *in vitro* de *B. burgdorferi* y fue el sustrato primario usado en la prueba de anticuerpos borreliacídicos y en métodos descritos a través de la aplicación presente. El medio BSK se preparó y describió por Callister et al. (Detección de anticuerpos borreliacídicos por citometría de flujo, sección 11.5.1-11.5.12, *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley and Sons, Inc., Suplemento 26 (2003)

30

incorporado aquí por referencia en su totalidad. En breve, el medio BSK se preparó por el siguiente método.

Materiales:

- 5 HEPES (Sigma)
- Neopeptona (Disco)
- Citrato de sodio (Sigma)
- Glucosa (Sigma)
- Bicarbonato de Sodio (Sigma)
- 10 TC levadurato (Sigma)
- Acido pirúvico (Sigma)
- N-acetilglucosamina (Sigma)
- Albúmina sérica bovina (Sigma)
- Gelatina (grado microbiológico; Difco)
- 15 NaOH 5N
- Connaught Medical research laboratories 10x 1066 (CMRL)
- (MP Biomédica) o Medio 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio (Sigma)
- Suero de conejo (Life Technologies), inactivado con calor a 56 °C por 45 min.
- 20 Baño de agua a 56 °C
- Bomba de presión positiva
- Filtro múltiple millipore
- Prefiltro (124 mm)
- Filtros de 0.2-, 0.45 y 0.8 μ m (diámetro de 142 mm)
- 25 Filtros campana de 0.2 μ m
- Frascos estériles de 100 ml
- Microscopio de campo oscuro

Preparación de medio BSK

- 30 1. Los siguientes se combinaron en un frasco de 2 litros con 2 a 4 horas de agitación en 900 ml de agua desionizada destilada doblemente filtrada en MiniQ:
6.0 g HEPES

89

- 5.0 g neopeptona
- 0.7 g citrato de sodio
- 5.0 g glucosa
- 2.2 g bicarbonato de sodio
- 5 2.5 g TC levadurato
- 0.8 g ácido pirúvico
- 0.4 g de N-acetilglucosamina
- 50 g de albumina sérica bovina (fracción V)

10 2. Los componentes fueron mezclados lentamente usando la placa de agitador más lenta debido a que la agitación rápida puede resultar en productos de descomposición tóxicos para *B. burgdorferi*.

3. Mientras los componentes de BSK se están mezclando, la solución e gelatina se prepara como sigue: en un frasco de 500 mL, se combinan agua desionizada destilada doblemente filtrada MilliQ y 14 g de gelatina y se calientan con agitación para disolver. La solución se coloca en autoclave luego por 15 min a 121 °C y se coloca en un baño de agua a 56 °C.

4. Cuando los componentes BSK se disuelven completamente, la solución se ajusta a pH 7.5 con NaOH 5 N.

20 5. La solución de 200 mL de gelatina, 100 mL de medio 1066 CMRL 10x y 64 mL de suero de conejo inactivado con calor (45 min a 56 °C) se combinan con los otros componentes de BSK y se mezclan completamente.

Medio BSK esterilizado

6. Usando la bomba de presión positiva, el medio BSK se bombea a través de un grupo de filtros Millipore cargados con un prefiltro de 124 mm y filtros de 142 mm de 0.2, 0.45, y 0.8 µm de diámetro apilados del poro más pequeño (fondo) al más grande (arriba). [El medio BSK no puede ser esterilizado mediante autoclave. La prefiltración fue necesaria para remover particulados grandes antes de la esterilización por filtración.]

30 7. El medio BSK luego se esteriliza por filtración en un recipiente estéril usando una bomba e presión positiva y un filtro de campana de 0.2 µm.

Esterilidad confirmada

8. Una alícuota de 1 ml de BSK estéril fue asépticamente removida y transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL estéril e incubado toda la noche a 35 °C. El resto de BSK esterilizado por filtración se almacenó a 4 °C.

9. Luego de la incubación, se examinó BSK estéril usando microscopía de campo oscuro para confirmar esterilidad.

10. El BSK estéril se transfirió luego en recipientes de almacenamiento estériles. [El espacio de cabecera se mantuvo al mínimo cuando se llenaban los recipientes de almacenamiento para reducir la oxidación del medio BSK estéril].

Control de calidad del medio Barbour-Stoener-Kelly (BSK)

10 Antes de usar el medio BSK, es importante asegurarse que BSK permite el crecimiento de números pequeños de *Borrelia* spp. y que las espiroquetas viables crecen sin agruparse. Un componente altamente variable del medio BSK es la albúmina sérica bovina (BSA). El protocolo de control de calidad utilizado aquí usa cultivos prueba para incubar e inspeccionar los cultivos resultantes, como se describe en detalle por Callister *et al.* 2003, Id.

• Detección de anticuerpos anti borreliacídicos OspA:

Anticuerpos OspA borreliacídicos se detectaron usando un procedimiento de citometría de flujo y *B. burgdorferi* ss S-1-10 (Callister et al., *Arch. Inter. Med.* 1994, 154:1625-1632). Un cultivo fresco de espiroquetas se diluyó con BSK fresco a una concentración de aproximadamente 5×10^6 espiroquetas/mL. Posteriormente, las muestras de suero se diluyeron 1:40 con BSK fresco y se esterilizaron pasándose a través de un filtro de microcentrífuga de tamaño de poro de 0.2 micras (μm). Una alícuota de 200 μl se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL de tapa rosca y se diluyó serialmente en BSK de 1:80 hasta 1:20,480. Las muestras de suero se inactivaron con calor a 56 °C por 10 min y se adicionó una alícuota de 100 μl de la suspensión de espiroquetas (5×10^5 espiroquetas) y 10 μl de complemento de cobayo estéril (Sigma). Los ensayos se mezclaron totalmente y se incubaron por 16-24 horas a 35 °C.

Después de la incubación, 100 μl de cada análisis de suspensión se transfirió a un tubo de polipropileno que contenía 400 μl de PBS y 1 $\mu\text{g/ml}$ de naranja de acridina. Un citómetro de flujo FACScan (Sistemas de inmunocitometría Becton Dickinson, San José, CA) se utilizó para detectar actividad borreliacídica. Las espiroquetas se analizaron por colación (CellQuest Software, Becton Dickinson) y se analizaron por 1-2 min con la tasa de flujo programada en

bajo. Los anticuerpos OspA borreliacídicos se detectaron indirectamente monitoreando el aumento en la intensidad de fluorescencia que ocurre cuando el naranja de acridina se intercala entre los bultos de las espiroquetas no viables. Un cambio de >13% en la intensidad de la fluorescencia media comparada con el suero normal control se consideraba positivo (Callister et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9:908-912). La presencia de *B. burgdorferi* con bultos, no mótil fue luego confirmada por microscopía en campo oscuro. Se incluyó un control positivo en cada análisis y una reactividad idéntica (+/- una dilución) de corrida a corrida se requería para minimizar la variabilidad interensayos. Además las muestras de suero recolectadas de cada perro fueron analizadas.

B. RESULTADOS

La vacunación con la vacuna rOspA inducía solo cantidades mínimas (título medio <61) de anticuerpos OspA borreliacídicos luego de 7 semanas que no fueron detectados después de 15 semanas (Tabla 2). En contraste, los hámsters vacunados con la vacuna canina que contenía una cepa ss *B. burgdorferi* (S-1-10) (Barbour et al., *J. Infect. Dis.* 1985, 152-478-484) inducían niveles altos de anticuerpos OspA borreliacídicos que alcanzaron su nivel máximo a la semana 7 (título > 2560) y permanecieron elevados durante todo el estudio.

Tabla 2. Titulación^a promedio de anticuerpos^b borreliacídicos OspA luego de una vacunación con vacunas para la enfermedad de Lyme canina rOspA o GALAXYTM (S-1-10)

Vacuna	Semana 3	Semana 7	Semana 9	Semana 15
rOspA	9	61	4	ND ^c
S-1-10	1470	>2560	970	735

a dilución recíproca

b detectado usando *B. burgdorferi* ss S-1-10

c ND = no se detectó

Entonces, la vacuna recombinante canina OspA no induce títulos de anticuerpos borreliacídicos OspA en hámsters.

EJEMPLO 2

VACUNACIÓN CON OSPC RECOMBINANTE

A. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Animales**

Se obtuvieron hámsters LVG de cinco a diez semanas de edad de Laboratorios Charles River Breeding, Inc. (Wilmington, Mass.). Estos se encerraron de a tres o cuatro por jaula a una temperatura ambiente de 21 °C y se les suministró alimento y agua *ad libitum*.

- **Preparación de vacuna OIPC recombinante (“r”)**

rOspC se recuperó de *E. coli* JM109 que contenía pX3-22 descrito previamente (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178:733-741). Brevemente, la *E. coli* se cultivó a 37 °C en caldo 2xTY que contenía ampicilina e isopropil-B-d-galactopiranosida (IPTG) (0.1 mM) que fue agregado durante la fase de crecimiento exponencial. Las células se precipitaron por centrifugación, se resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS) y se lisaron por sonicación. Se agregó Tritón X-100 (1% vol/vol) y se centrifugó el lisado a 10,000 x g por 5 min. Las células *E. coli* sonicadas se precipitaron por centrifugación y el sobrenadante se pasó por una columna que contenía una resina SoftLink (Promega) en la que se unía OspC a través de una marcación de purificación biotinilada en el amino término. El OIPC unido luego se eluye con un buffer de purificación que también contiene biotina 5 mM (Sigma).

- **Vacunación de hámsters y recolección del suero:**

Los hámsters se vacunaron subcutáneamente en la parte de atrás del cuello con 0.1 mL de adyuvante completo de Freund que contenía 75 µg de rOspC y luego se les dio un refuerzo de 75 µg de rOspC en 0.1 mL de adyuvante incompleto de Freund tres semanas luego de la vacunación primaria. A las 5 semanas después de la vacunación primaria, los hámster fueron levemente anestesiados por inhalación de éter contenido en un copa de nariz y boca y sangrados por punción intracardiaca. Se permitió que la sangre se coagulara y se separó el suero y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Además el suero de tres hámsteres normales se agrupó y se usó como control de suero normal.

- **Detección de anticuerpos OspC:**

rOspC se diluyó a 1000 ng/mL de buffer de cobertura (Na₂CO₃ 0.015M, NaHCO₃ 0.035 M, pH 9.6) y cantidades de 100 µL se adicionaron a celdas de microplacas de

2

fondo plano con unión a amina (Costar, Cambridge, Mass.). Las placas de microtitulación se incubaron toda la noche a 4 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBS (pH 7.2) y se bloquearon con PBS que contenía 0.05% de TWEEN 20 (Sigma) y 1% de Albúmina sérica bovina (Sigma) por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego de bloquearse, las placas se lavaron de nuevo con PBS. Subsecuentemente, cantidades de 100 µL de suero de hámster diluido serialmente de 1:80 a 1:20,480 en PBS/Tween se adicionó a pozos individuales y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS, se agregaron 100 µl de IgG conjugado antihámster con peroxidada de rábano (Organon Teknika Cappel) diluido 1:3000 en PBS/tween y las placas fueron reincubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Luego las placas se lavaron 3 veces con PBS y 100 µl de o-fenilenodiamina fosfato (0.4 mg/ml; Sigma) se adicionaron a cada pozo y se le dejó en incubación a temperatura ambiente por 30 minutos. Las reacciones luego se detuvieron adicionando 100 µL de H₂SO₄ 1N e inmediatamente se determinaron las absorbancias a 490 nm (modelo EL 311; biotek inc. winooski, Vt).

- **Detección de anticuerpos OspC borreliacídicos**

Los anticuerpos borreliacídicos OspC se detectaron como se describe arriba (ejemplo 1), excepto que *B. burgdorferi* ss 50772 fue utilizada.

B. RESULTADOS

La vacunación con vacuna rOspC indujo niveles altos de anticuerpos OspC detectados por ELISA (Tabla 3, *infra*), pero solo un nivel bajo (título 80) de actividad borreliacídica estuvo presente. La vacunación con rOspC indujo entonces concentraciones altas de anticuerpos OspC, pero la respuesta estaba compuesta casi en su totalidad de anticuerpos (opsonización) que no proveería protección contra la infección. Esto era especialmente significativo cuando se considera que la concentración de 75 µg de proteínas en la vacuna *B. burgdorferi* ss 50772 se calculó sin contar la presencia de numerosas proteínas adicionales no OspC. Los resultados colectivos (ejemplos 1 y 2) confirmaron entonces hallazgos previos (Straubinger et al. *Vaccine* 2003, 20:181-193) en el que Osps recombinantes estimularon menor cantidades significativas de anticuerpos antiborreliacídicos que la *B. burgdorferi* ss intacta.

Tabla 3. Titulación promedio^a de anticuerpos detectados mediante ELISA OspC o prueba^b de anticuerpos borreliacídicos OspC luego de una vacunación con rOspC.

Muestra	Titulación de anticuerpos detectado mediante:	
	ELISA OspC	Prueba de anticuerpos borreliacídicos OspC
Normal	ND ^c	ND
rOspC	10240	80

a Dilución recíproca de suero agrupado a partir de 5 hamsters

b detectado usando *B. burgdorferi* ss 50772

c ND = no se detectó

Entonces, la vacuna OspC recombinante canina falla en inducir títulos significativos de anticuerpos borreliacídicos OspC en hámsters.

EJEMPLO 3

VACUNACIÓN CON *B.BURGDORFERI* ss AISLAMIENTO S-1-10

A. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Organismo:**

B. *burgdorferi* ss S-1-10 es una cepa típicamente patogénica generalmente indistinguible de *B. burgdorferi* ss B31 (Barbour et al., *J. Infect. Dis.*, 1985, 152:478-484). El aislamiento fue originalmente recuperado por el Dr. Steven M. Callister, Gundersen Lutheran Medical Foundation, La Crosse, WI, del riñón de un ratón de patas blancas *Peromyscus leucopus*, capturado en Febrero de 1988 de un lugar cerca de La Crosse, WI, y fue licenciado por Solvay Animal Health para incorporación dentro de la vacuna canina de la enfermedad de Lyme. El producto comercial subsiguiente (GALAXY™ Lyme) fue adquirido por Schering Plough Animal Health en abril 17, 1997. El organismo expresa OspA, OspB y OspC. Sin embargo, como es típico de los aislamientos infecciosos de *B. burgdorferi* ss, concentraciones significativamente altas de OspA y OspB se producen cuando las espiroquetas se cultivan en laboratorio en medio BSK. Se ha mostrado que la expresión de OspC puede maximizarse por incubación a 35 °C (Schwan, *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31:108-112).

- **Animales**

Cachorros beagle de ocho semanas de edad (Ridgland Faros, Mount Orbe, WI) fueron encerrados comunalmente, y el alimento y el agua estaba disponible *ad libitum*. El experimento fue revisado y aprobado por el comité para el uso y cuidado de salud animal Schering Plough (IACUC).

- **Preparación de vacuna de *B. burgdorferi* ss S-1-10:**

Un cultivo fresco de *B. burgdorferi* ss S-1-10 que había alcanzado una fase de crecimiento logarítmica por incubación en BSK a 35 °C fue inactivada adicionando etilenimina binaria (BEI) a una concentración final de 10 mM.

- **Preparación de vacuna *B. burgdorferi* ss S-1-10:**

Un cultivo fresco de *B. burgdorferi* ss S-1-10 que había alcanzado una fase de crecimiento logarítmico por incubación en BSK a 35 °C fue inactivada adicionando etilenimina binaria (BEI) a una concentración final de 10 mM e incubando por 48 horas adicionales. Luego de la inactivación, la BEI se neutralizó adicionando tiosulfato de sodio estéril incubándola a 35 °C por 6 a 12 horas. Las espiroquetas fueron precipitadas luego por centrifugación y resuspendidas en solución salina balanceada estéril que contenía <30 µg de gentamicina/ml y <30 unidades de nistatina/ml. Las espiroquetas fueron mezcladas con 5% Emulsigen® (MVP laboratorios Inc.) y 1% de HEPES por lo que 1.0 ml de dosis contenía >2.5 x 10⁷ espiroquetas.

- **Vacunación y recolección de suero:**

Los perros fueron vacunados subcutáneamente en el cuello con una dosis de 1 ml de vacuna S-1-10 y reforzados con una dosis adicional de 1 ml después de 21 días. Se recolectó sangre total inmediatamente antes de la vacunación refuerzo (estudio del día 21) y en los días de estudio 28, 35, 47, 83 y 113 por punción en la vena yugular. El suero se separó por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó.

- **Detección de anticuerpos borreliacídicos:**

Los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC se detectaron por citometría de flujo empleando *B. burgdorferi* ss S-1-10 y 50772 como se describe arriba en los ejemplos 1 y 2.

B. RESULTADOS

La vacunación con *B. burgdorferi* ss S-1-10 indujo confiablemente niveles altos de anticuerpos borreliacídicos OspA que fueron detectables en el estudio del día 21, alcanzaron su pico en el estudio del día 28 y permanecieron detectables al estudio en el día 113 (Tabla 4, *infra*). En contraste, anticuerpos borreliacídicos OspC no fueron detectados (título menor a 1:80). Entonces, la cepa *B. burgdorferi* ss convencional falló en inducir la producción de anticuerpos borreliacídicos OspC a pesar de maximizar la expresión de OspC incubando las espiroquetas a 35 °C.

Tabla 4 Titulación promedio^a (n = 8) de anticuerpos borreliacídicos OspA o OspC luego de una vacunación con *B. burgdorferi* ss S-1-10

Anticuerpo borreliacídico	Día 21	Día 28	Día 35	Día 47	Día 83	Día 113
OspA ^b	202	9481	9481	4740	1613	1382
OspC ^c	ND ^d	ND	ND	ND	ND	ND

a Dilución recíproca

b detectado usando *B. burgdorferi* ss S-1-10

c detectado usando *B. burgdorferi* ss 50772

d ND = no se detectó

Entonces la vacuna que empleaba el asilamiento S-1-10 de *B. burgdorferi* no indujo un título significativo de anticuerpos borreliacídicos OspC.

EJEMPLO 4

VACUNACIÓN CON *B. BURGDORFERI* SS AISLAMIENTO 50772

A. MATERIALES Y MÉTODOS

• Organismo:

B. burgdorferi ss 50772 es una cepa única *ospA*-/ *ospB*- originalmente reportada por Anderson et al. *J. of Clin. Microbiol.*, 1996, 34:524-529, quien no la identifica como expresando el antígeno OspC. La cepa 50772 está descrita por la patente de E.E.U.U. No. 6,464,985 incorporada aquí en su totalidad, expresando el antígeno OspC y esta cepa se reporta por la patente como depositada en la ATCC como No. PTA-439.

- **Animales:**

Cachorros beagle de ocho semanas de edad (Ridgman Farms, Mount Oreb, WI) fueron encerrados comunalmente, y el alimento y el agua estaba disponible *ad libitum*. El experimento fue revisado y aprobado por el comité de uso y cuidado de salud animal Schering Plough (IACUC).

- **Preparación de la vacuna de *B. burgdorferi* ss 50772.**

La cepa 50772 de *B. burgdorferi* ss fue preparada como se describe arriba en el ejemplo 3.

- **Vacunación y recolección del suero:**

Los perros fueron vacunados subcutáneamente en el cuello con una dosis de 1 ml de la vacuna 50772 y reforzados con una dosis adicional de 1 ml después de 21 días. La sangre completa se recolectó inmediatamente antes de la vacunación refuerzo (estudio en el día 21) y en los días de estudio 28, 35, 47, 83 y 113 por punción en la vena yugular. El suero fue separado por centrifugación y almacenado a -20°C hasta su análisis.

- **Detección de los anticuerpos borreliacídicos:**

Los anticuerpos borreliacídicos OspC se detectaron por citometría de flujo empleando *B. burgdorferi* ss 50772 como se describe arriba en los ejemplos 1 y 2.

B. RESULTADOS

La vacunación con *B. burgdorferi* ss 50772 indujo confiablemente altos niveles de anticuerpos borreliacídicos OspC que alcanzaron un pico en el estudio del día 35 y permanecieron detectables en el estudio del día 113 (Tabla 5, *infra*). En contraste a las vacunaciones con rOspC o un aislamiento tradicional de *B. burgdorferi* ss (S-1-10), la vacunación con la cepa única de *B. burgdorferi* 50772, indujo niveles significativos de anticuerpos borreliacídicos OspC.

Tabla 5. Titulación promedio^a (n = 8) de anticuerpos^b borreliacídicos OspC luego de una vacunación con *B. burgdorferi* ss 50772

Día 21	Día 28	Día 35	Día 47	Día 83	Día 113
ND ^c	5530	1097	435	274	202

- a Dilución recíproca
- b detectado usando *B. burgdorferi* ss 50772
- c ND = no se detectó

5 Entonces, la vacuna que incluye el aislamiento 50772 de *B. burgdorferi* ss induce concentraciones altas de anticuerpos borreliacídicos OspC.

EJEMPLO 5

PREPARACIÓN DE LA VACUNA QUE INCLUYE LOS AISLAMIENTOS S-1-10 Y 50772 DE *B. BURGDORFERI* SS

A. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Crecimiento:**

Los cultivos de reserva congelados de *B. burgdorferi* ss S-1-10 y 50772 se cultivaron bajo condiciones estándar, *i.e.*, los cultivos se mantuvieron a $33 \pm 2^\circ\text{C}$ y $35 \pm 2^\circ\text{C}$ respectivamente, en tubos de cultivo de tapa rosca que contenían de 5 a 17 ml de medio BSK (Barbour Stoenner Kelly)[preparado de acuerdo a Callister *et al*, 1990, *J. of Clinical Microbiology* 28: 363-365, incorporado aquí por referencia en su totalidad] bajo una atmósfera de aire enriquecido con 5% de CO_2 . Luego de alcanzar el crecimiento logarítmico, los cultivos se usaron para inocular 150 a 200 ml de medio BSK fresco, el cual se incubó para inocular 5 a 10 litros de medio BSK fresco contenido en jarras de 10 a 20 litros (cultivo de producción) antes de una incubación adicional, como se describe arriba.

- **Inactivación**

Las espiroquetas en los cultivos de producción se inactivaron adicionando BEI a una concentración de 10 mM e incubándolos con agitación lenta por 24 a 48 horas. Luego de inactivar las espiroquetas, se neutralizó la BEI adicionando 10.6 ml de tiosulfato de sodio estéril 3.015M por cada litro de suspensión BSK/espiroqueta e incubando con agitación lenta por 6 a 12 horas.

- **Concentración y mezcla:**

Las espiroquetas inactivadas se precipitaron por centrifugación y se resuspendieron en una solución de sales balanceada estéril que contenía 30.0 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 30 unidades/ml

de nistatina. La vacuna prueba fue mezclada con 5% de Emulsigen® (MVP Laboratorios, Inc.) y transferidos en viales de vidrio de 2.0 ml para que cada dosis (1.0 ml) contuviera $>2.5 \times 10^7$ organismos/ml de *B. burgdorferi* ss S-1-10, $>5.0 \times 10^8$ organismos/ml de *B. burgdorferi* ss 50772, 1% HEPES, 29 µg/ml de gentamicina y 29 unidades/ml de nistatina.

5

EJEMPLO 6

SEGURIDAD Y EFICACIA DE UNA VACUNA QUE CONTIENE *B. BURGDORFERI* AISLAMIENTOS S-1-10 Y 50772

10 A. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Animales:**

Cachorros beagle de ocho semanas de edad (Ridgman Farms, Mount Orbe, WI) se encerraron individualmente o comunalmente y el alimento y el agua estaban disponibles *ad libitum*. El experimento fue revisado y aprobado por el comité de uso y cuidado de salud animal de Schering Plough (IACUC).

15

- **Vacunación y recolección del suero:**

Los perros fueron vacunados subcutáneamente en el cuello con una dosis de 1 ml de la vacuna y reforzados con una dosis adicional de 1 ml luego de 21 días. La sangre completa fue recolectada antes de la vacunación inicial (día de estudio -3) y del refuerzo (día de estudio 21) y también en los días 28, 35, 43, 78, 106, 134, 162 y 197 por punción de la vena yugular. El suero se separó por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta que se analice.

20

- **Observaciones luego de la vacunación:**

Luego de la vacunación, los sitios de la vacunación se palpaban diariamente hasta que no se sintiera reacción y se registraron las temperaturas rectales 4-6 horas luego de la vacunación y en los días 1-3 después de la vacunación.

25

- **Desafío con garrapatas:**

Tres semanas luego de la segunda vacunación, los perros se afeitaron en el lado derecho de la cavidad torácica y 10 hembras y 10 machos de garrapatas *I. scapularis* infectadas con *B. burgdorferi* ss se colocaron en una taza de caucho asegurada sobre el área afeitada con cinta y bandas de envoltura. Se les permitió a las garrapatas alimentarse por 7 días.

30

- **Detección de *B. burgdorferi* ss en las garrapatas:**

Las partes bucales de las garrapatas se removieron con escalpelo y los intestinos fueron extraídos y dispersados en láminas de vidrio y se les dejó secando toda la noche a temperatura ambiente. Luego del secado, las láminas se fijaron en acetona por 8-10 min y se secaron al aire. El anticuerpo monoclonal OspA especie específico contra ratón H5332 se diluyó 1:40 en PBS (pH 7.2) y se cubrió con IgG anti ratón de cabra marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1:500 en PBS. Luego de la incubación, las láminas se lavaron con PBS, se secaron al aire y se examinaron por microscopía de fluorescencia. Cada lámina se examinó independientemente por dos microbiólogos con experiencia.

- **Muestras de sangre:**

Se recolectó sangre total en tubos de transporte de separación de suero (SST) en los días de estudio 78, 106, 134, 162 y 197 y el suero se separó y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó.

- **Retiro de anticuerpos OspA:**

(r)OspA recombinante se recuperó de *Escherichia coli* ("E. coli") DH5α que expresaba una proteína de fusión OspA-glutathion-S-transferasa como se describió previamente (Callister et al., *J. Infect. Dis.* 1993, 167: 158-164). Brevemente, la *E. coli* se cultivó a 37 °C caldo 2xTY que contenía ampicilina e isopropil-B-d-galactopiranosida (IPTG) (0.1 mM) se agregó durante la fase de crecimiento exponencial. Las células se precipitaron por centrifugación, se resuspendieron en solución buffer fosfato salina ("PBS") y se lisaron por sonicación. Se agregó tritón X-100 (1% vol/vol) y el lisado se centrifugó a 10000 x g por 5 minutos (min.). El sobrenadante que contenía la proteína de fusión se pasó a través de una columna de glutatión-sefarosa 4B (Pharmacia), y la OspA recombinante se eluyó con 50 mM de Tris HCl (pH 8.0) mas glutatión reducido 5 mM y resuspendido en buffer de purificación (Tris 50 mM [pH 8], NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, 0.1% Tritón X-100).

La proteína de fusión rOspA fue unida a Sefarosa 4B por activación de bromuro de cianógeno (CNBr). Específicamente, 0.8 g de Sefarosa 4B activada con CNBr se lavó con buffer de acople (0.1 M NaHCO₃-0.5 M NaCl, pH 8.3), se agregó una cantidad de 2 mg de OspA en buffer de acople al gel y la mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente por 2 horas. Luego de que el gel se lavó dos veces con buffer de acople, se adicionaron 4 ml de etanolamina (pH 9) y el gel se incubó por 2 horas para bloquear los sitios sin unirse. El gel se lavó tres veces con 50 ml de acetato de sodio 0.1 M-0.5 M NaCl (pH 4.0) y luego equilibrado en PBS. Una muestra de 1 ml de suero inmune diluido diez veces en PBS se pasó por la columna cuatro veces.

- **Retiro de anticuerpos OspC:**

rOspC fue recuperada de *E. coli* JM109 que contenía pX3-22 como se describió previamente (Rousselle et al., *J. Infect. Dis.* 1998, 178: 733-741). La producción de la proteína recombinante fue inducida como se describe arriba para rOspA. Las células de *E. coli* soncadas se precipitaron por centrifugación y el sobrenadante se pasó por una columna que contenía resina SoftLink (Promega) que se unió a OspC por medio de una marca de purificación biotiniliada en el amino término. La OspC unida fue luego eluida con un buffer de purificación que también contenía biotina 5 mM (Sigma).

Un volumen de 1 ml de resina avidina tetramérica Tetralink (Promega) se lavó luego, se resuspendió en 40 ml de PBS y se sirvió en una columna de polipropileno de 10 mm por 70 mm. Una cantidad de 0.5 mg de rOspC dializada en un volumen de 1 ml de PBS se pasó por una columna y la unión se confirmó por un ensayo de proteínas (Bio-Rad). Un volumen de 1 ml de suero inmune diluido diez veces en PBS se pasó por la columna cuatro veces.

- **Retiro de anticuerpos específicos OspC7:**

Una proteína de fusión que contenía los 7 aminoácidos c-terminal de OspC (OspC7) se recuperaron de *E. coli* JM109 que contenía pXT7 como se describió previamente (Lovrich et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12:746-751, incorporado aquí por referencia en su totalidad).

La producción de la proteína recombinante se indujo como se describió arriba para OspA. Las células de *E. coli* soncadas fueron precipitadas por centrifugación y el sobrenadante se pasó por una columna que contenía resina SoftLink (Promega) que se unió a OspC7 vía una marca de purificación biotinilada en el amino Terminal. La OspC7 unida fue eluida con un buffer de purificación que también contenía biotina 5 mM. Un volumen de 1 ml de resina de avidina tetramérica Tetralink (Promega) se lavó, se resuspendió en 40 ml de PBS y se sembró en una columna de polipropileno de 10 mm por 70 mm. Una cantidad de 0.5 mg de rOspC dializada en un volumen de 1 ml de PBS se pasó por una columna y la unión fue confirmada por análisis de proteína (Bio-Rad). Un volumen de 1 ml de suero inmune diluido diez veces en PBS se pasó por la columna cuatro veces.

- **Detección de anticuerpos borreliacídicos:**

Los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC se detectaron por citometría de flujo empleando *B. burgdorferi* ss S-1-10 y 50772 como se describió arriba en los ejemplos 1 y 2.

- **Biopsias de la piel:**

Las biopsias de la piel se tomaron de sitios adyacentes a la unión de las garrapatas en los días de estudio 78, 106, 134, 162 y 197 con un dispositivo de punción desechable de 4 mm. Las biopsias se localizaron en tubos separados que contenían 9 ml de BSK (Callister et al. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28: 363-365) suplementado con gelatina (BSK+G), 40-50 microgramos (μg)/ml de rifampicina y 8 μg /ml de kanamicina. Los cultivos se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 semanas y examinados semanalmente por microscopía de campo oscuro por espiroquetas.

- **Supresión inmune:**

Los perros fueron suprimidos inmunológicamente por administración diaria de dexametasona (0.4 mg/lb de peso corporal) por 5 días comenzando 13 semanas luego del desafío.

- **Observaciones clínicas:**

Los perros se observaron diariamente para desórdenes de extremidades/articulaciones, incluyendo rigidez (rechazo a poner el peso completo en las extremidades), cojera (favorecer una extremidad cuando se camina o corre) o debilidad (no resistencia al peso). La medición fue hecha por consenso de al menos dos observadores y los perros se examinaron por un veterinario para descartar cualquier otra herida externa.

- **Necropsia:**

Los perros que tuvieron desórdenes de extremidades/articulaciones por al menos 3 periodos consecutivos de observación fueron sometidos a eutanasia y se les realizó una necropsia. Las muestras de tejidos de los codos, carpo, rodilla, tarso, corazón, bazo, vejiga y ambos riñones se recolectaron y procesaron para el aislamiento de *B. burgdorferi* en cultivo. Los tejidos de articulación se cultivaron en tubos individuales que contenían 9 ml de BSK+G. Otros tejidos (corazón, bazo, vejiga urinaria y riñones) se combinaron con 9 ml BSK+G homogenizados bien en un stomacher y una cantidad de 1 ml fue transferido a un tubo separado que contenía 9 ml de BSK+G fresco. Los cultivos se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

El resto de los perros fueron sometidos a eutanasia y necropsia al final del estudio. Las muestras de tejido de éstos perros se recolectaron de la cápsula de las articulaciones y del tendón para examen por histopatología. Además, las muestras de las cápsulas de las articulaciones del codo,

carpo, rodilla y tarso se colocaron en tubos individuales que contenían BSK+G o BSK+G con antibióticos e incubados a 35 ± 2 °C por 3 semanas.

- **Western blot:**

El western blot se realizó usando técnicas estándar. *B. burgdorferi* ss 297 fue hervida en buffer de la muestra por 5 min y 150 µg de proteína total fue servida en un gel de poliacrilamida al 12%-SDS 0.1% (gel de apilado al 4% sin peine). Las concentraciones de proteína se determinaron con un kit de determinación de proteína, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y ésta se cortó en tiras y se bloqueó con PBS-0.3% de Tween 20 por 30 min a 22 °C. Las tiras se incubaron por 1 hora a 22 °C con suero de perro diluido 1:100 y se lavaron tres veces con PBS-TWEEN 20 0.5%. Se adicionó IgG antiperro marcado con peroxidasa de rábano (Kirkegaard & Perry Laboratorios, Githersburg, MD) y las tiras se incubaron por 30 min a 22 °C antes de desarrollarse con el sistema de sustrato de peroxidasa de membrana TMB (Kirkegaard & Perry Laboratorios, Gaithersburg, MD).

B. RESULTADOS

- **Seguridad de la vacuna:**

Los perros permanecieron clínicamente normales después de la vacunación, incluyendo un no aumento de la temperatura rectal. Sin embargo, los perros vacunados con la vacuna desarrollaron un poco inflamación en el sitio de la inyección la cual se resolvió dentro de 8 días. La reacción más grande midió 1x1x0.5 cm (24 horas post vacunación.)

- **Serología post-vacunación:**

La vacunación con placebo no indujo anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* ss. En contraste, la vacunación con la vacuna indujo niveles significativos de anticuerpos borreliacídicos detectados usando los aislamientos S-1-10 y 50772 de *B. burgdorferi* ss. El título medio de anticuerpos borreliacídicos detectados usando S-1-10 alcanzaron el pico una semana después de la vacunación refuerzo (estudio día 28) y permaneció detectable en el estudio del día 197 (Tabla 6 abajo). Similarmente, las concentraciones altas de anticuerpos borreliacídicos específicos para el aislamiento 50772 estaban presentes en el día del estudio número 28 y permanecieron elevados en el día de estudio día 43 y fueron detectables en el día de estudio 197 (tabla 7 abajo).

Tabla 6. Titulación promedio^a (n = 15) de la actividad^b borreliacídica luego de una vacunación con la vacuna.

104

Grupo	Día - 3	Día 21	Día 28	Día 35	Día 43	Día 78	Día 106	Día 134	Día 162	Día 197
Vacunados	ND ^c	>211	>8128	>6160	>4889	1404	970	970	1016	220
Controles	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a Dilución recíproca

b detectado usando la prueba de anticuerpos borreliacídicos con *B. burgdorferi* ss 50772

c ND = no se detectó

5

Tabla 7. Titulación promedio^a (n = 15) de la actividad^b borreliacídica luego de una vacunación con la vacuna.

Grupo	Día - 3	Día 21	Día 28	Día 35	Día 43	Día 78	Día 106	Día 134	Día 162	Día 197
Vacunados	ND ^c	ND	1470	884	221	50	48	46	42	42
Controles	ND	ND	ND	ND	ND	N/A ^d	N/A	N/A	N/A	N/A

a Dilución recíproca

b detectado usando la prueba de anticuerpos borreliacídicos con *B. burgdorferi* ss 50772

c ND = no se detectó

d N/A = no aplica

10

• Confirmación de anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC

15 Para confirmar que la actividad borreliacídica se debía a los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC, el suero inmune de cinco perros vacunados con la vacuna se pasaron por columnas separadas que contenían rOspA o rOspC y los efectos en las actividades borreliacídicas fueron examinadas. La remoción de anticuerpos específicos contra OspA u OspC por adsorción del suero con las proteínas recombinantes disminuyó significativamente (reducción >4 veces) la actividad borreliacídica detectada usando los aislamientos S-1-10 o 50772 respectivamente, de *B. burgdorferi* ss. Los hallazgos colectivos confirmaron entonces que la vacuna indujo niveles significativos de anticuerpos antiborreliacídicos OspA y OspC y las actividades borreliacídicas detectadas por *B. burgdorferi* ss S-1-10 o 50772 fueron casi totalmente anticuerpos borreliacídicos OspA o OspC específicos respectivamente. Mire la tabla 8 abajo.

20

Tabla 8. Efecto de la remoción de anticuerpos OspA o OspC sobre la actividad borreliacídica en suero de perros (n = 5) vacunados con la vacuna.

Titulación de Anticuerpos borreliacídicos ^a				
Suero	OspA ^b		OspC ^c	
	antes de la absorción	luego de la absorción	antes de la absorción	luego de la absorción
1	5120	160	5120	640
2	2560	160	5120	320
3	10240	ND ^d	5120	320
4	2560	ND	1280	160
5	1280	80	2560	320
control OspA	2560	ND	--	--
control OspC	--	--	2560	ND

a Dilución recíproca

b suero recolectado al día 43 del estudio

c suero recolectado al día 28 del estudio

d ND = no se detectó

• Confirmación de anticuerpos borreliacídicos específicos para OspC7

- 10 Para confirmar que los anticuerpos borreliacídicos contienen una proporción significativa de anticuerpos borreliacídicos específicos para OspC7, el suero inmune de cinco perros vacunados con la vacuna se pasaron por una columna que contenía rOspC7, y se examinaron los efectos de actividad borreliacídica. El retiro de anticuerpos específicos contra OspC por absorción del suero con la proteína recombinante OspC7 disminuyó significativamente (reducción de 2 a 4 veces) la actividad borreliacídica detectada utilizando el aislamiento 50772 *B. burgdorferi* ss. Los hallazgos entonces confirmaron que la vacuna indujo niveles significativos de anticuerpos borreliacídicos OspC específicos para el epítipo conservado de OspC7. Mire la tabla 9 de abajo.

Tabla 9. Efecto de la remoción de anticuerpos OspC7 sobre la actividad borreliacídica en suero de perros (n = 5) vacunados con la vacuna.

Titulación de Anticuerpos borreliacídicos ^a		
Suero	antes de la absorción	luego de la absorción
1	20480	5120
2	10240	5120
3	10240	2560
4	5120	2560

108

5	10240	2560
control OspC	2560	ND

- a Dilución recíproca
- b suero recolectado al día 28 del estudio
- c ND = no se detectó

5 • Capacidad de los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC de esterilizar garrapatas infectadas:

El examen de los intestinos de las garrapatas que se alimentaron en los perros vacunados o los control confirmaron que los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC inducidos por la vacuna habían esterilizado las garrapatas. *B. burgdorferi* ss fueron detectados en las láminas de garrapatas de 34 (32%) de las garrapatas hembras que se habían alimentado en 13 de los 15 perros vacunados con placebo (tabla 10 de abajo). En contraste, no se detectaron espiroquetas (0 de 99) en los intestinos de garrapatas hembra que se alimentaron en perros vacunados con la vacuna ($p<0.0001$).

Tabla 10. Detección de *B. burgdorferi* en garrapatas hembras removidas de perros vacunados o de control.

Grupo de tratamiento	Garrapatas hembra procesadas (llenas y no llenas de sangre)	Frotis positivo para <i>B. burgdorferi</i>	No. total de perros positivos
Vacunados	99/151 (61%)	0/99 (0%)	0/15
Controles	106/148 (64%)	34/106 (32%)	13/15*

* $p < 0.0001$

• Capacidad de la vacuna de prevenir recuperación de *B. burgdorferi* ss de la piel:

Los anticuerpos borreliacídicos inducidos por la vacuna también previnieron que las espiroquetas colonizaran la piel. *B. burgdorferi* ss se recuperaron de 56 (79%) de 71 biopsias recolectadas de perros vacunados con placebo a intervalos mensuales después del desafío con las garrapatas (tabla 11 abajo) y se recuperaron espiroquetas de al menos una biopsia de piel de 14 (93%) de 15 perros. En contraste, *B. burgdorferi* ss no se recuperó de ninguna de las biopsias de piel recolectadas de los perros vacunados con la vacuna ($p<0.0001$).

701

Tabla 11. Aislamiento de *B. burgdorferi* ss a partir de la piel de perros vacunados o controles no vacunados

Grupo de Tratamiento	Día 78	Día 106	Día 134	Día 162	Día 197	Total de biopsias positivas	No. total de perros positivos
Vacunados	0/15	0/15	0/15	0/15	0/13	0/73 (0%)	0/15 (0%)
Controles	12/15	13/15	11/15	11/14	9/12	56/71 (79%)	14/15* (93%)

* $p < 0.0001$

• **Capacidad de la vacuna de prevenir evidencia serológica de infección:**

La vacuna también previno el desarrollo de anticuerpos específicos a la enfermedad de Lyme. Una investigación previa (SPAHC Reporte B01-184-01R) confirmó que la infección con *B. burgdorferi* ss indujo confiablemente anticuerpos de perro que se unían a una proteína de aproximadamente 20 kDa y la respuesta no fue inducida por la vacuna (Fig. 1). En el estudio actual, los anticuerpos que se unieron a la proteína específica de la infección de 20 KDa se detectaron fácilmente en el suero inmune de 14 (93%) de los 15 perros control vacunados con placebo (Fig. 2A). Además, el suero que no contenía ningún anticuerpo contra la proteína de 20 KDa se recolectó del perro control que también falló en producir espiroquetas en la piel. En contraste, los anticuerpos contra la proteína de 20 KDa no se produjeron ($p < 0.0001$) en ninguno de los perros vacunados con la vacuna (Fig. 2B).

Además, los perros con la enfermedad de Lyme producen anticuerpos borreliacídicos que también son detectables usando el aislamiento 50772 de *B. burgdorferi* ss (Callister et al. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38:3670-3674). El objetivo específico de la respuesta es desconocido, pero los anticuerpos proveen confirmación serodiagnóstica de la enfermedad altamente específica. Los perros vacunados con la vacuna ya estaban produciendo anticuerpos borreliacídicos OspC, pero ningún perro desarrolló un aumento significativo (> 4 veces) en el nivel de anticuerpos borreliacídicos específicos para *B. burgdorferi* ss 50772 luego del desafío con garrapatas. Entonces era altamente improbable que los perros vacunados estuvieran infectados con espiroquetas. En contraste, los anticuerpos borreliacídicos no fueron producidos por los perros vacunados con placebo antes del desafío, pero 10 (67%; $p = 0.0002$) de los 15 perros desarrollaron

108

niveles significativos (títulos > 1:640) de anticuerpos borreliacídicos detectados usando *B. burgdorferi* ss 50772 luego de que se les permitió a las garrapatas alimentarse (Tabla 12 abajo).

Tabla 12. Titulación^a promedio con anticuerpos borreliacídicos^b luego de una exposición a garrapatas

Grupo de tratamiento	Día 78	Día 106	Día 134	Día 162	Día 197	No. total de perros con títulos aumentados
Vacunados	50	48	46	42	42	0/15
Controles	>121	>463	>640	>390	>403	10/15*

* p < 0.0001

a dilución recíproca

b detectado usando *B. burgdorferi* ss 50772

• **Capacidad de la vacuna de prevenir desórdenes verdaderos de extremidades/articulaciones:**

Los estudios previos (Summers et al., *J. Comp. Path.* 2005, 133:1-13, Wikle et al., *J. Appl. Res. Vet. Met.* 2006, 4:23-28) demostraron que la infección con *B. burgdorferi* ss solamente de manera rara causa desórdenes de extremidades/articulaciones (ej. inflamación, debilidad) y nuestros resultados confirmaron esto. Solo uno (8%) de los perros control vacunados con placebo desarrolló una anomalía de articulación. La pata frontal izquierda estaba rígida 9 semanas luego del desafío con garrapatas y las espiroquetas de *B. burgdorferi* ss se recuperaron del codo. Sin embargo, estos hallazgos no eran significativos porque dos perros vacunados con la vacuna también desarrollaron rigidez en una o más extremidades, pero, en contraste con el perro que recibió el placebo, no se recuperaron espiroquetas de ningún tejido.

Para exacerbar el desarrollo de síntomas verdaderos, el resto de los perros se inmunosuprimieron. Subsecuentemente, tres perros control vacunados con placebo se volvieron débiles y *B. burgdorferi* ss fueron recuperados de dos de estos perros. En contraste, ningún perro inmunosuprimido vacunado con la vacuna desarrolló debilidad. Entonces, los hallazgos colectivos sugieren que la vacuna previno el desarrollo de artritis por Lyme, aunque los

resultados no fueron significativos ($p=0.0996$). Sin embargo, vea los datos adicionales presentados y discutidos abajo.

- **Capacidad de la vacuna de prevenir cambios erosivos asociados con la infección de *B. burgdorferi* ss:**

5 Sin embargo, cuando las articulaciones de los perros discutidas arriba fueron examinadas microscópicamente, los hallazgos claramente demuestran la efectividad de la vacuna. Las cápsulas de las articulaciones del resto de los perros ($n=13$) vacunadas con la vacuna fueron normales. En contraste, uno o mas de los tejidos de las articulaciones de 6 ($p=0.0034$) del resto de los 11 perros vacunados con placebo (Tabla 7 arriba) tuvieron inflamación significativa
10 caracterizada por infiltración de neutrófilos y células mononucleares (Fig. 3). Además, *B. burgdorferi* ss no fue recuperada de ninguno de los tejidos de los perros vacunados con la vacuna, pero las espiroquetas se recuperaron de los tejidos de las articulaciones de 5 (83%) de los perros control vacunados con el placebo con cambios erosivos. Entonces los hallazgos colectivos confirman que la vacuna previno artritis canina por Lyme y también corroboraron reportes
15 previos en que el síndrome es caracterizado más a menudo por sinovitis subclínica (Summers *et al.*, *J. Comp. Path.* 2005, 133:1-13; Wikle *et al.*, *J. Appl. Res. Vet. Med.* 2006, 4:23-28).

EJEMPLO 7

ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS BORRELIACÍDICOS QUE OCURREN 20 NATURALMENTE DIRIGIDOS CONTRA EL EPÍTOPE OSPC7

Los datos confirmaron que los anticuerpos borreliacídicos inducidos en mamíferos contra OspC7 específicos se obtuvieron analizando sueros de individuos (humanos) con y sin historia de la enfermedad de Lyme o síntomas relacionados con Lyme, como sigue.

A. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Suero:

El suero normal de individuos sin historia previa (revisión de gráfica) de enfermedad de Lyme o síntoma relacionados con Lyme ($n=36$), suero sin caracterizar de donadores de sangre ($n=100$) o individuos bajo análisis de colesterol ($n=100$), o suero de voluntarios con factores sanguíneos o enfermedades que comúnmente reaccionan cruzadamente con antígenos de *B. burgdorferi* ss,
30 incluyendo anticuerpos antinucleares ($n=20$), factor reumatoideo ($n=20$), mononucleosis ($n=10$), citomegalovirus ($n=10$), sífilis ($n=13$) o fiebre de manchas de Rocky Mountain ($n=4$), obtenidas

de muestras archivadas almacenadas a -20 °C. Los sueros de la enfermedad de Lyme se recolectaron de pacientes evaluados en el Centro médico Gundersen Lutheran durante 2003 o 2004. Los sueros de los pacientes con eritema migrans (EM) que alcanzaron el criterio de vigilancia de la CDC (Centros para control y prevención de la enfermedad, Morb. Mort. Wkly. Rep. 1990, 39:19-21.) fueron clasificados como probables Lyme, suero (n=22) de pacientes con exposición a garrapatas y lesiones de la piel atípicas se clasificaron como probables Lyme (n=49) y sueros de pacientes con exposición a garrapatas y síntomas constitucionales que incluyeron principalmente dolor de cabeza, fiebre, mialgia y artralgia se clasificaron como probables Lyme. El suero se recolectó durante la visita inicial, se almacenó a -20°C y se ocultaron antes del análisis.

Péptido OSpC7. El péptido OsC7 con 7 aaa (AESPKKP; SEQ ID NO:1) se sintetizó en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Winconsin (Madison, WI) usando un sintetizador automatizado (Protein Technologies) y por el método Fmoc (Fields et al. Peptide Res. 1991, 4:95-101). Después de la síntesis, el aminotérmino del péptido fue biotinilado manualmente por activación HBTU y se purificó por cromatografía líquida de alta presión. La composición se confirmó usando espectrometría de masas de desorción de tiempo de ionización de la luz asistida por una matriz láser (MALDI-TOF) (masa predicha 1095.4; masa observada 1095.8).

ELISA OSpC7. Pozos individuales de placas de microtitulación (Immunolon 2 HB, Thermo Labsystems, Franklin, MA) se cubrieron con 100 µl de una suspensión de estreptavidina de 4 µg/ml (Pierce, Rockland, IL) contenida en buffer carbonato (90 mM de NaHCO₃, 60 mM Na₂CO₃; pH 9.6) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Luego de la incubación, las placas se lavaron cinco veces con solución salina con buffer Tris (TBS-T; 13 mM Tris HCl, 3 mM base Tris, 140 mM de NaCl, 2.7 mM KCl; pH 7.4) que contenía 0.0% Tween 20. Luego del lavado, se adicionaron 200 µl de buffer de bloqueo (15 mM NaCl, 10 mM de Tris HCl, 3% de suero fetal bovino, 0.05% de tween 20) que contenía 1 µg/ml de péptido OSpC7 biotinilado y se incubó con rotación (150 rpm) por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario era IgM e IgG antihumano de cabra conjugado con peroxidasa (Kirkegaard Perry Laboratorios, Gaithersburg, Md.) diluido 1/15000 en buffer de bloqueo. Luego de la incubación por una hora, el anticuerpo secundario unido fue cuantificado por la adición de *o*-fenildiamina y peróxido de hidrógeno en buffer citrato (Sigma, St. Louis, Mo.) y la determinación de DO a 490 nm (SpectraMax 250; Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.).

B. RESULTADOS

En estudios previos (Jobe et al., *Clin. Diagn. Lab. Immuno.* 2003, 10:573-578, Lovrich et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12 :746-751), un anticuerpo borreliacídico altamente conservado contra el epítipo de OspC se localizó a la región dentro de los 7 aminoácidos más cercanos al C-terminal (OspC7). Para confirmar los anticuerpos inducidos por el epítipo específicos a la infección con *Borrelia* spp., las reactividades de una ELISA que usó OspC7 usando sueros de pacientes con la enfermedad de Lyme (Fig. 5) y sueros de sujetos normales o pacientes con otras enfermedades que probablemente producen anticuerpos que también pueden unirse a las proteínas de *Borrelia* spp. (Fig. 4) se compararon. En las Figs. 4 y 5 la línea a la Absorbancia 1.25 define tres desviaciones estándar sobre la absorbancia media de la normal y suero potencia de reacción cruzada. Cualquier resultado que ocurra sobre la línea, tendrá entonces una probabilidad de 99% que la reactividad sea significativa (verdadero positivo). La reactividad significativa se detectó solo raramente en los sueros normales o con reacción cruzada potencial (Fig. 4). También se debe notar que la mayoría de los resultados positivos se obtuvieron usando suero que pudo haber provenido de pacientes con la enfermedad de Lyme, ya que el suero (CS) se obtuvo de un grupo de 100 pacientes vistos en el Centro Médico Gundersen Lutheran por una variedad de enfermedades. La región es un foco altamente endémico para la enfermedad de Lyme y las identidades y las historias clínicas de los pacientes eran desconocidas. En contraste, los sueros positivos no se detectaron en las muestras de suero (n=100) colectadas al azar de donadores de sangre (DS) en Milwaukee, una región no endémica de Wisconsin.

Además, los resultados positivos (mayor a 3 desviaciones estándar sobre la media del suero de los pacientes con enfermedad de Lyme y los valores de absorbancia fueron altos (Fig. 5). Los hallazgos colectivos confirmaron entonces la alta especificidad de los anticuerpos dirigidos contra el epítipo OspC7 y la inmunodominancia de la respuesta durante la enfermedad de Lyme humana.

Resumiendo los datos arriba ejemplificados, grupos de cachorros de 8 semanas de edad (15 perros) se vacunaron y se reforzaron con una vacuna que contenía 5.0×10^8 *B. burgdorferi* ss 50772, 2.5×10^7 *B. burgdorferi* S-1-10 y 5% de Emulsigen® o un placebo que solo contenía 5% de Emulsigen®. La vacuna causó una pequeña inflamación en el sitio de la inyección que

se resolvió rápidamente. Más significativamente, la vacuna indujo concentraciones altas de anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC que alcanzaron su pico una semana después de la vacunación refuerzo y permanecieron detectables por la duración del estudio. Además, una proporción significativa de los anticuerpos borreliacídicos OspC fueron específicos para el epítipo altamente conservado dentro de OspC7.

Garrapatas hembra *I. scapularis* infectadas *B. burgdorferi* ss se les permitió alimentarse en los perros vacunados y un examen de los intestinos de las garrapatas confirmaron que los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC en la sangre eliminaron completamente *B. burgdorferi* ss. Específicamente, *B. burgdorferi* se detectó en 34 (32%) de las garrapatas recolectadas de los perros control vacunados con placebo y no se detectaron en garrapatas (n=99) que se alimentaron en perros vacunados con la vacuna ($p<0.0001$). Además, los receptores de la vacuna permanecieron negativos para la enfermedad de Lyme por varios métodos indirectos y directos usados comúnmente para confirmar la infección. En contraste, 10 (67%) de los perros control produjeron anticuerpos contra la proteína de 20KDa “infección específica” de *B. burgdorferi* ss y 8 (53%) produjeron anticuerpos borreliacídicos “infección específicos”. Además, cuatro (27%) de los perros desarrollaron debilidad persistente y *B. burgdorferi* ss fue recuperada de las articulaciones de 3 (75%) de los 4 animales débiles. Adicionalmente, los infiltrados inflamatorios desarrollados en las cápsulas de la articulación de 6 (55%) de los perros vacunados con placebo se examinaron. Mas convincente, *B. burgdorferi* ss se recuperó de la piel y articulaciones de 14 (93%) y 8 (53%) de los perros control respectivamente, mientras que no se recuperaron espiroquetas de perros vacunados con el producto prueba. Entonces, la vacuna contra enfermedad de Lyme inventada causó efectos colaterales mínimos y dio protección completa contra la infección por *B. burgdorferi* ss.

EJEMPLO 8

DURACIÓN DE LA INMUNIDAD DE LA VACUNA QUE CONTENÍA AISLAMIENTOS S-1-10 Y 50772 DE *B. BURGDORFERI* SS

A. MATERIALES Y MÉTODOS

- Animales

Los materiales y métodos se describen en el ejemplo 6 arriba.

- **Vacunación y recolección de suero:**

Los perros fueron vacunados subcutáneamente en el cuello con una dosis de 1 ml de la vacuna y reforzados con una dosis adicional de 1 ml luego de 21 días. Se recolectó la sangre completa antes de la vacunación inicial (estudio en el día -4) y del refuerzo (estudio día 21) y también en los días estudio 28, 35, 49, 79, 114, 142, 175, 210, 238, 266, 302, 322, 357 y 394 por punción en la vena yugular. El suero se separó por centrifugación y se almacenó a -20°C hasta que fue analizado.

- **Observaciones post vacunación:**

Los perros se observaron diariamente.

- **Desafío con garrapatas:**

Un año después de la segunda vacunación, los perros se afeitaron en el lado derecho de la cavidad torácica y 10 garrapatas hembras y 10 macho *I. scapularis* infectadas con *B. burgdorferi* se colocaron en una taza de caucho que se aseguró en la región afeitada con cinta y con envoltura de vendas. Se permitió que las garrapatas se alimentaran por 7 días.

- **Detección de *B. burgdorferi* en garrapatas:**

La detección se llevó a cabo de la manera descrita en el Ejemplo 6 de arriba.

- **Muestras de sangre:**

Se recolectó sangre completa en tubos de transporte de separación de suero (SST) en los días de estudio 43 después del desafío (DD), 77 DD, 112 DD, 147 DD, 174 DD y 241 DD y el suero fue separado y almacenado a -20°C hasta su análisis.

- **Detección de anticuerpos borreliacídicos:**

Los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC se detectaron por citometría de flujo como se describe en los Ejemplos 1 y 2 arriba.

- **Biopsias de piel:**

Se tomaron biopsias de piel de los sitios adyacentes a la unión en los días de estudio 43 después del desafío (DD), 7 DD, 112 DD, 147 DD, 174 DD y 241 DD con un artefacto de punción de 4 mm. Las biopsias se procesaron como se describe en el ejemplo 6 de arriba.

- **Inmuno supresión:**

Los perros fueron inmunosuprimidos por administración diaria de dexametasona (0.4 mg/lb de peso corporal) por 5 días comenzando aproximadamente 20 semanas luego del desafío.

- **Observaciones clínicas:**

Las observaciones clínicas se llevaron a cabo como en el ejemplo 6 de arriba.

- **Necropsia**

La necropsia se llevó a cabo como en el ejemplo 6 de arriba.

5 B. RESULTADOS

- **Serología post vacunación:**

La vacunación con un placebo no indujo anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* ss. En contraste, la vacunación con la vacuna indujo niveles significativos de anticuerpos borreliacídicos detectados usando los aislamientos S-1-10 y 50772 de *B. burgdorferi* ss. El título medio de anticuerpo borreliacídico contra S-1-10 alcanzó su pico una semana (día de estudio 28) luego de la vacunación refuerzo y la respuesta permaneció detectable hasta el día de estudio 394 (tabla 13). Similarmente, se detectaron concentraciones altas de anticuerpos borreliacídicos específicos contra el aislamiento 50772 en el día de estudio 28, los títulos permanecieron elevados en el día de estudio 49 y los niveles bajos permanecieron detectables luego de 79 días (tabla 14).

Tabla 13. Titulación promedio^a (n = 15) de la actividad^b borreliacídica luego de una vacunación con la vacuna.

Grupo	Día - 4	Día 21	Día 28	Día 35	Día 49	Día 79	Día 114	Día 142	Día 175	Día 210
Vacunados	ND ^c	192	>7075	>5120	>4457	735	926	532	702	611
Controles	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Grupo	Día 238	Día 266	Día 302	Día 322	Día 357	Día 394
Vacunados	926	557	508	351	211	175
Controles	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a Dilución recíproca

b detectado usando la prueba de anticuerpos borreliacídicos con *B. burgdorferi* ss S-1-10

c ND = no se detectó.

Tabla 14. Titulación promedio^a (n = 15) de la actividad^b borreliacídica luego de una vacunación con la vacuna.

Grupo	Día - 4	Día 21	Día 28	Día 35	Día 49	Día 79	Día 114	Día 142	Día 175	Día 210
Vacunados	ND ^c	40	1689	532	69	41	ND	ND	ND	ND
Controles	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Grupo	Día 238	Día 266	Día 302	Día 322	Día 357	Día 394
Vacunados	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Controles	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a Dilución recíproca

b detectado usando la prueba de anticuerpos borreliacídicos con *B. burgdorferi* ss 50772

c ND = no se detectó

• **Capacidad de los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC de esterilizar las garrapatas infectadas:**

Al examinar los intestinos de las garrapatas que se alimentaron en los perros vacunados o en los control, se confirmó que los anticuerpos borreliacídicos OspA y OspC inducidos por la vacuna habían esterilizado las garrapatas. *B. burgdorferi* ss fue detectada en las láminas de 15 (16%) de 95 garrapatas hembras que se habían alimentado en 12 de los 15 perros vacunados con placebo (tabla 15). En contraste, *B. burgdorferi* ss se detectó en las láminas de garrapatas de solo 2 (3%) de 75 garrapatas hembra que se habían alimentado en 2 de los 15 perros vacunados ($p=0.0003$).

Tabla 15. Detección de *B. burgdorferi* en garrapatas hembras removidas de perros vacunados o de control.

Grupo de tratamiento	Garrapatas ^a hembra procesadas (llenas y no llenas de sangre)	Frotis positivo para <i>B.</i> <i>burgdorferi</i>	No. total de perros positivos
Vacunados	75/148 (51%)	2/75 (3%)	2/15
Controles	95/146 (65%)	15/95 (16%)	12/15*

* $p = 0.0003$

a llenas y no llenas de sangre

- **Capacidad de la vacuna para prevenir la recuperación de *B. burgdorferi* ss de la piel:**

Los anticuerpos borreliacídicos inducidos por la vacuna también previnieron una infección sostenible de organismos de *B. burgdorferi* ss en la piel. *B. burgdorferi* ss se recuperó de 33 (44%) de 75 biopsias recolectadas de perros vacunados con placebo a intervalos mensuales después del desafío con garrapatas (tabla 16). En contraste, *B. burgdorferi* ss se recuperaron solo de 6 (8%) de las 75 biopsias recolectadas de los perros vacunados con la vacuna ($p < 0.0001$). Las espiroquetas se recuperaron de al menos una biopsia de piel de 10 (67%) de los 15 perros control, comparado con 6 (40%) de los 15 perros vacunados. Sin embargo, los aislamientos de los perros vacunados se limitaron solo al primer mes luego del desafío, mientras que 8 (80%) de los 10 cultivos positivos de los perros control tuvieron biopsia de la piel positiva para *B. burgdorferi* a través de los meses siguientes del estudio.

Tabla 16. Aislamiento de *B. burgdorferi* ss a partir de la piel de perros vacunados o controles no vacunados

Grupo de Tratamiento	Día 43 PC	Día 77 PC	Día 112 PC	Día 147 PC	Día 174 PC	Total de biopsias positivas ^b	No. total de perros positivos ^c	No. total de perros positivos ^d
Vacunados (A)	6/15	0/15	0/15	0/15	0/15	6/75 (8%)	6/15 (40%)	0/6 (0%)
Controles (B)	9/15	8/15*	7/15 ^{a*}	6/15 ^{a*}	3/15	33/75** (44%)	10/15 (67%)	8/10 (80%)

15 a un perro nuevo

b biopsias totales positivas

c número total de perros positivos

d número total de perros positivos luego del primer mes

* $p < 0.05$

20 ** $p < 0.0001$

- **Capacidad de la vacuna de prevenir evidencia serológica de la infección:**

La vacuna también previno el desarrollo de anticuerpos específicos contra la enfermedad de Lyme. Los perros con la enfermedad de Lyme producen anticuerpos borreliacídicos no OspC que

también son detectables usando el aislamiento 50772 de *B. burgdorferi* ss (como se describe en el ejemplo 6). Se observaron niveles aumentados significativos (> 4 veces) de anticuerpos borreliacídicos contra el aislamiento 50772 luego del desafío en 5 (33%) de los perros vacunados con placebo, comparados con ninguno de los perros vacunados con la vacuna prueba.

5 **Tabla 17. Titulación^a promedio con anticuerpos borreliacídicos^b luego de una exposición a garrapatas**

Grupo de tratamiento	Día 43 PC	Día 77 PC	Día 112 PC	Día 147 PC	Día 174 PC	No. total de perros con títulos aumentados
Vacunados	40	40	40	40	40	0/15
Controles	48	66	88	88	106	5/15*

a dilución recíproca

b detectado usando *B. burgdorferi* ss 50772

c $\geq$ incremento de títulos en cuatro veces

10

- **Capacidad de la vacuna de prevenir desórdenes verdaderos de extremidades/articulaciones y cambios erosivos asociados con la infección de *B. burgdorferi*:**

15 Los estudios previos demostraron que la infección con *B. burgdorferi* ss solo raramente causa desórdenes verdaderos de extremidades/articulaciones (ejemplo 6) y el modelo del reto con garrapatas se ha mostrado que es menos efectiva en perros más viejos. Para exacerbar el desarrollo de los síntomas verdaderos, los perros se inmunosuprimieron con dexametasona aproximadamente 3 meses luego del desafío. Los cuatro perros control vacunados con placebo se volvieron o débiles o desarrollaron lesiones erosivas en el tejido de las articulaciones. En
20 contraste, ninguno de los perros vacunados con la vacuna del presente invento desarrolló ninguna señal clínica de desórdenes en las extremidades/articulaciones o las lesiones erosivas vistas a menudo en el tejido de articulación.

25 El presente invento no está limitado en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente. Inclusive, varias modificaciones del invento adicionalmente a las ya

descritas en la presente serán aparentes a aquellos expertos en el estado de la técnica a partir de la anterior descripción. Se pretende que tales modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

5 Se entenderá adicionalmente que todos los tamaños de base y de aminoácidos, y todos los montos de pesos moleculares o de masa molecular dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se suministran en aras de la descripción.

10 Varias publicaciones están citadas en la presente, las divulgaciones de las cuales están incorporadas en su totalidad como referencia.

REIVINDICACIONES:

1. Una composición de vacuna la cual comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de organismos provenientes de una primera o una única cepa de una genoespecie *Borrelia*;
5 en donde cuando los organismos de dicha primera o dicha única cepa son cultivados bajo condiciones de crecimiento estándar de la genoespecie *Borrelia*, son erradicados en presencia de un anticuerpo OspC-específico educido en un animal inyectado con *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1, en donde la cantidad inmunológicamente efectiva de los organismos ha sido inactivada.
3. La vacuna de la reivindicación 1, en donde dicha primera o dicha única cepa exhibe un antígeno OspC sobre su superficie celular; y
15 en donde los anticuerpos OspC-borreliacídicos son inducidos en un canino en donde dicho canino es inmunizado con dicha composición de vacuna.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 3, en donde una proporción significativa de los anticuerpos OspC-borreliacídicos son específicos para el OspC7.
- 20 5. La composición de vacuna de la reivindicación 3, en donde dicha primera o dicha única cepa es la *B. burgdorferi* ss 50772 (ATCC No. PTA-439).
6. La composición de vacuna de la reivindicación 1 que además comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de organismos inactivados de una segunda cepa perteneciente de a la genoespecie *Borrelia*; y en donde dicha segunda cepa exhibe un antígeno OspA, un antígeno OspB, o exhibe tanto un antígeno OspA como un antígeno OspB sobre su superficie celular.
7. La composición de vacuna de la reivindicación 6, en donde los anticuerpos OspC-
30 borreliacídicos y los anticuerpos OspA-borreliacídicos son inducidos en un canino cuando dicho canino está inmunizado con dicha composición de vacuna.

119

8. La composición de vacuna de la reivindicación 6, en donde la segunda cepa es la cepa *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680).

5 9. La composición de vacuna de la reivindicación 6 la cual comprende entre 1×10^4 aproximadamente y 1×10^{10} aproximadamente por mililitro de la primera cepa y entre 1×10^4 aproximadamente y 1×10^{10} aproximadamente por mililitro de la segunda cepa.

10. La composición de vacuna de la reivindicación 9 la cual comprende entre 5.0×10^8 aproximadamente y 5×10^9 aproximadamente por mililitro de la primera cepa y entre 1.0×10^8 aproximadamente y 5×10^8 aproximadamente por mililitro de la segunda cepa.

11. La composición de vacuna de la reivindicación 1 que además comprende un coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

12. La composición de vacuna de la reivindicación 1 que además comprende un estimulante inmune farmacéuticamente aceptable.

13. La composición de vacuna de la reivindicación 1 que además comprende por lo menos un inmonógeno no proveniente de la *Borrelia* para educir inmunidad protectora a un patógeno no proveniente de la *Borrelia*.

14. La composición de vacuna de la reivindicación 13, en donde el inmunógeno no proveniente de la *Borrelia* es seleccionado a partir del grupo que consiste del moquillo canino, adenovirus canino, parvovirus canino, virus de la parainfluenza canina, coronavirus canina, virus de la influenza canina, *Leptospira* serovars, organismos de la *Leishmania*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma* especie, virus de la rabia, *Ehrlichia canis*, un organismo *anaplasma*, y combinaciones de los mismos.

15. La composición de vacuna de la reivindicación 14, en donde el *Leptospira* serovars es seleccionado a partir del grupo que consiste de *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa,

Leptospira interrogans serovar canicola, *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae, *Leptospira interrogans* serovar pomona, y combinaciones de los mismos.

16. La composición de vacuna de la reivindicación 14, en donde el *Mycoplasma* especie comprende *Mycoplasma cynos*.

17. Un método de inmunizar un can contra una genoespecie *Borrelia* patogénica el cual comprende inyectar el can con una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de la reivindicación 1.

18. Un método de inmunizar un can contra una genoespecie *Borrelia* patogénica el cual comprende inyectar el can con una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de la reivindicación 6.

19. El método de la reivindicación 18 en donde la segunda cepa es *B. burgdorferi* en sentido estricto.

20. El método de la reivindicación 18 en donde la segunda cepa es seleccionada del grupo que consiste de *B. burgdorferi* ss S-1-10 (ATCC No. PTA-1680), *B. burgdorferi* ss B-31 (ATCC No. 35210), *B. afzelii* (ATCC No. 51567), *B. garinii* (ATCC Nos. 51383 o 51991), *B. burgdorferi* ss DK7, *B. burgdorferi* ss 61BV3, *B. burgdorferi* ss ZS7, *B. burgdorferi* ss Pka, *B. burgdorferi* ss IP1, IP2, IP3, *B. burgdorferi* ss HII, *B. burgdorferi* ss P1F, *B. burgdorferi* ss Mil, *B. burgdorferi* ss 20006, *B. burgdorferi* ss 212, *B. burgdorferi* ss ESP1, *B. burgdorferi* ss Ne-56, *B. burgdorferi* ss Z136, *B. burgdorferi* ss ia, y combinaciones de las mismas.

21. El método de la reivindicación 18 en donde el can inmunizado produce anticuerpos borreliacídicos.

22. El método de la reivindicación 18 en donde el can es inyectado con 5×10^7 hasta 5×10^9 aproximadamente de cada cepa respectiva de *Borrelia* especie.

23. Suero que comprende anticuerpos borreliacídicos que se fijan al *B. burgdorferi* OspC obtenido a partir de un can inmunizado mediante el método de la reivindicación 21.

24. Anticuerpos borreliacídicos que se fijan al *B. burgdorferi* ss OspC obtenido a partir de un
5 can inmunizado mediante el método de la reivindicación 21.

25. Los anticuerpos borreliacídicos de la reivindicación 24 que comprenden los anticuerpos OspC7-específicos.

122

FIG. 1

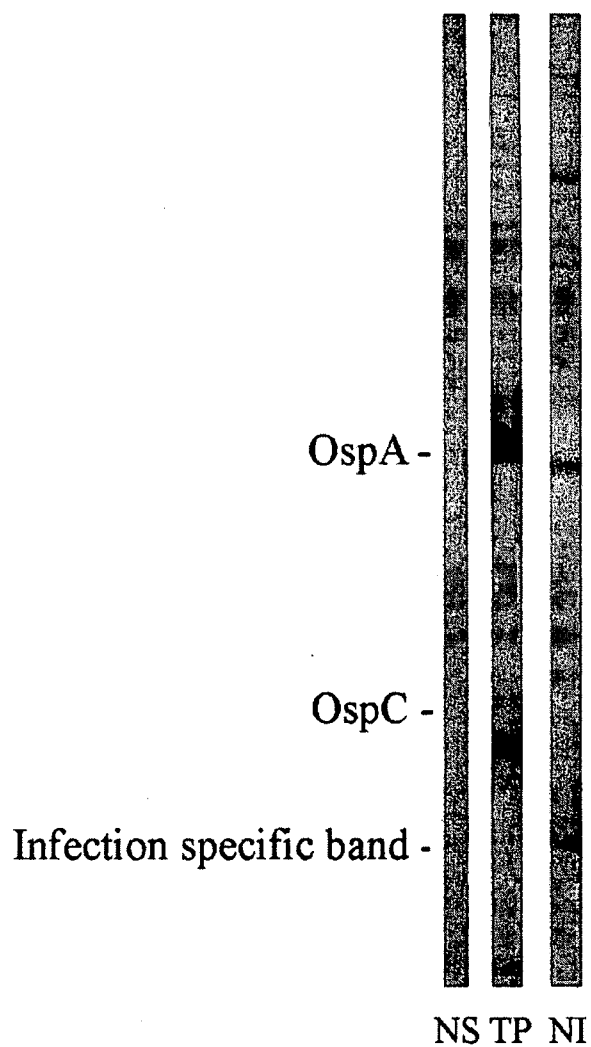


FIG. 2A

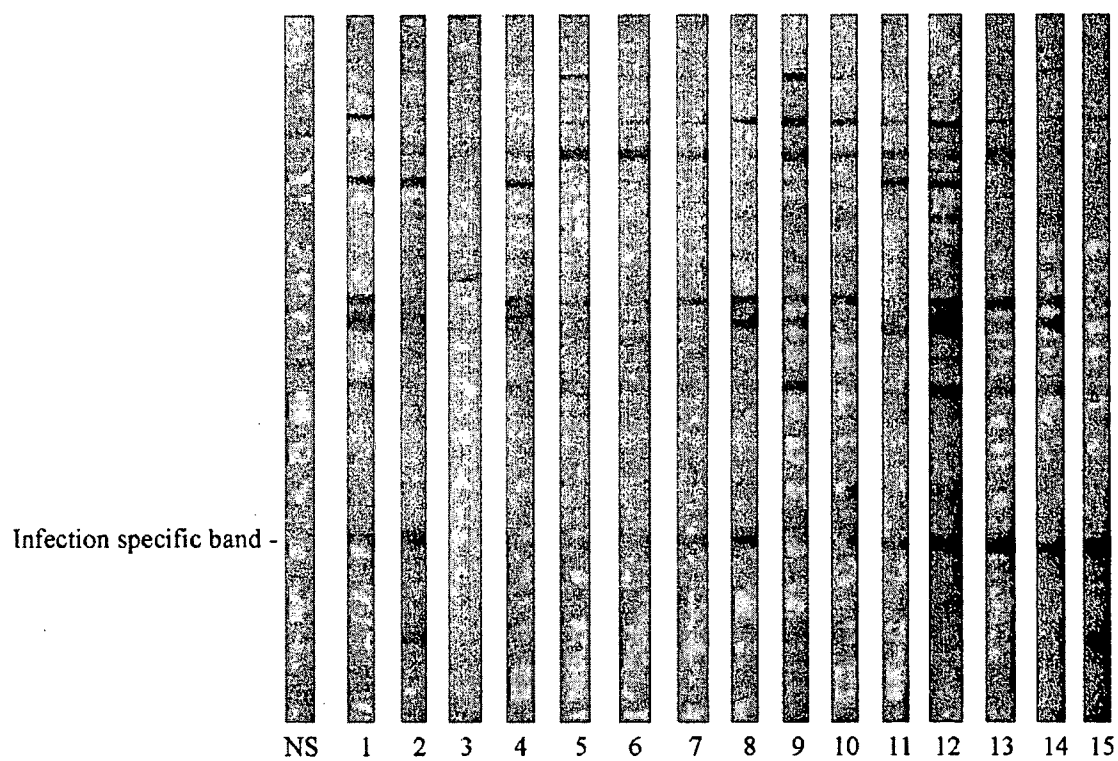
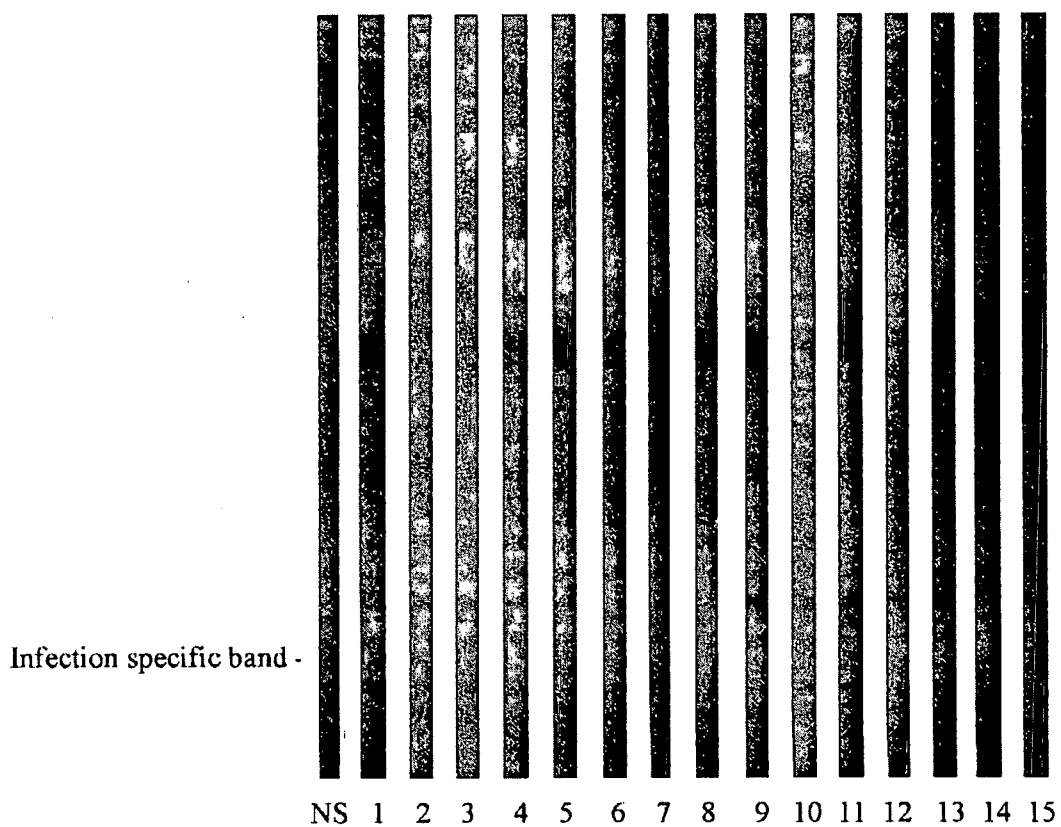


FIG. 2B



23

FIG. 3A



FIG. 3B

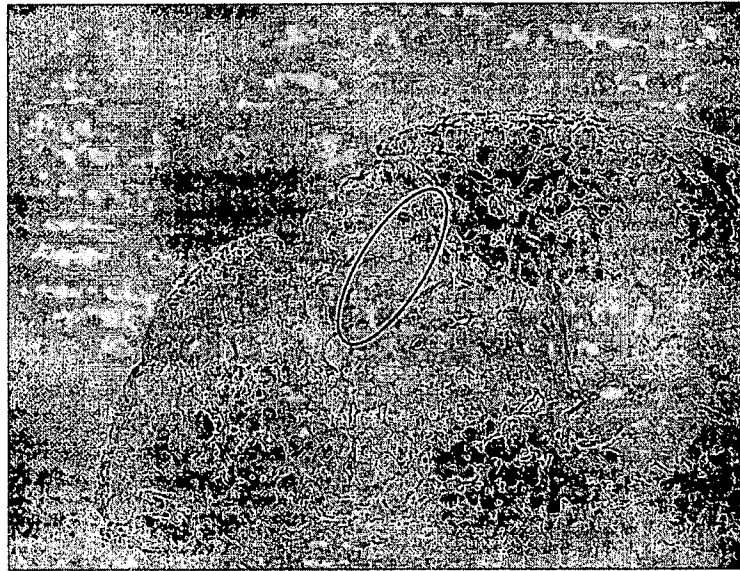


FIG. 4

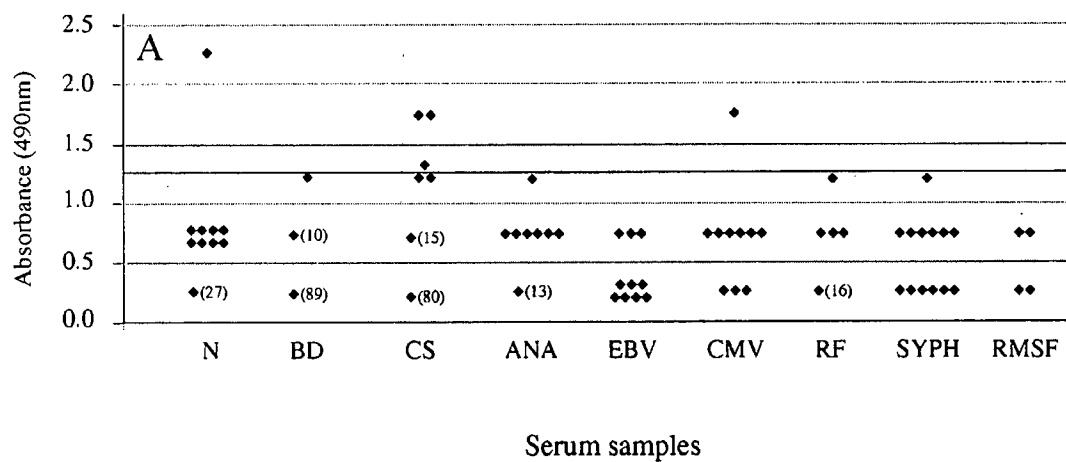
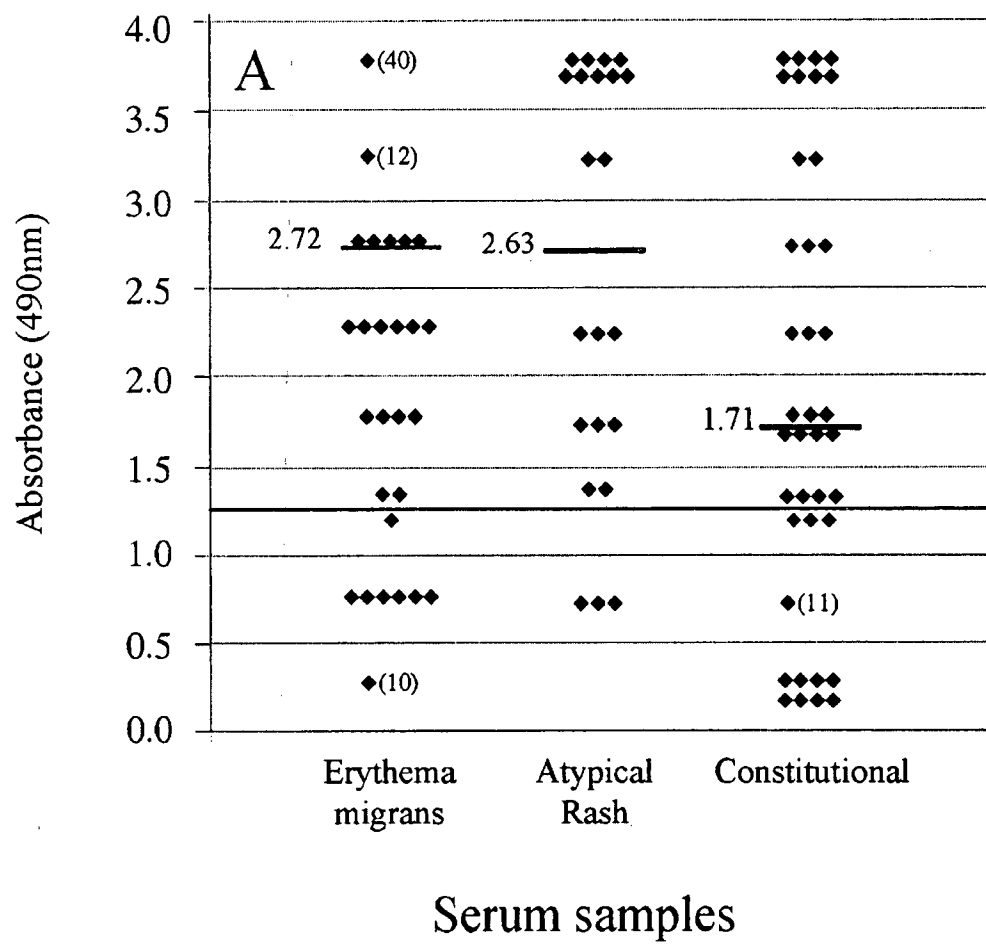


FIG. 5



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 May 2008 (15.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/057396 A3(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/US2007/023101(22) International Filing Date:
1 November 2007 (01.11.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/864,258 3 November 2006 (03.11.2006) US(71) Applicant (for all designated States except US): **SCHERING-PLOUGH LTD.** [CH/CH]; Weystrasse 20, P.O. Box, CH-6000 Lucerne 6 (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CALLISTER, Steven, M.** [US/US]; 2050 Grandview Boulevard, Onalaska, WI 54650 (US). **LAFLEUR, Rhonda** [US/US]; 17164 Clark Street, Omaha, NE 68118 (US). **WASMOEN, Terri, L.** [US/US]; 14009 Meredith Circle, Omaha, NE 68164 (US).(74) Agent: **DAVIS, Michael, D.**; Schering-plough Corporation, Patent Department, K-6-1 1990, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LY, MA, MD, ME, 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.

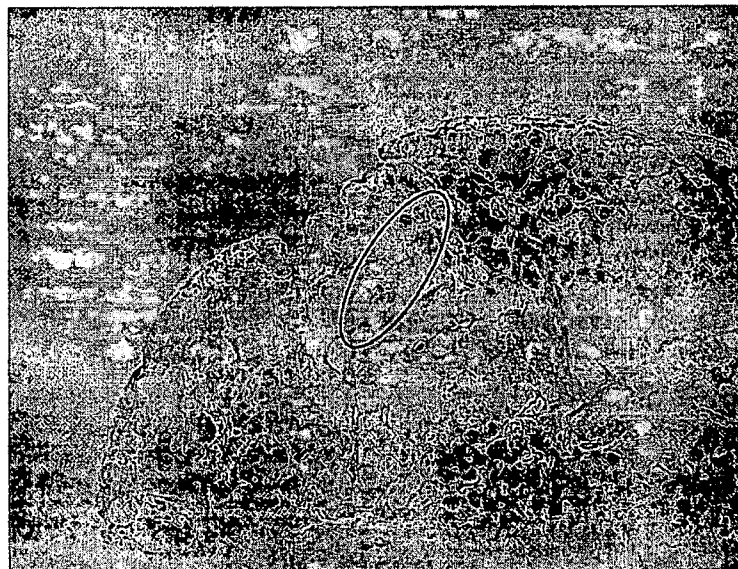
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
16 October 2008

(54) Title: CANINE LYME DISEASE VACCINE



(57) Abstract: The present invention provides a vaccine for canine Lyme disease and methods of making and using the vaccine alone, or in combinations with other protective agents.

WO 2008/057396 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/023101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/02

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)
A61K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/06745 A (GUNDERSEN LUTHERAN MEDICAL FOU [US]; CALLISTER STEVEN N [US]; LOVRICH) 10 February 2000 (2000-02-10)	1,3-5, 11,12
Y	the whole document	1-25
X	LABRECHE P T ET AL: "Ability of borreliacidal anti-Borrelia burgdorferi 50772 antibodies to provide protection against hamster-adapted Lyme disease spirochetes" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, THE SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 102, 19 May 2002 (2002-05-19), page 196, XP009102993 ISSN: 1060-2011	1,3-5
Y	the whole document	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *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)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *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
- *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
- *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.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 2008

Date of mailing of the international search report

11/08/2008

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/023101

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STRAUBINGER R K ET AL: "Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 1-2, 12 October 2001 (2001-10-12), pages 181-193, XP004305131 ISSN: 0264-410X	1-3
Y	the whole document	1-25
X	JACOBSON ET AL: "Lyme disease: Laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs" CLINICAL TECHNIQUES IN SMALL ANIMAL PRACTICE, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 11, no. 3, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 172-182, XP005825249 ISSN: 1096-2867	1
Y	the whole document	1-25
X	JOHNSON R C ET AL: "Passive immunization of hamsters against experimental infection with the Lyme disease spirochete." INFECTION AND IMMUNITY SEP 1986, vol. 53, no. 3, September 1986 (1986-09), pages 713-714, XP002489762 ISSN: 0019-9567	1
Y	the whole document	1-25
X	JOHNSON R C ET AL: "Active immunization of hamsters against experimental infection with Borrelia burgdorferi." INFECTION AND IMMUNITY DEC 1986, vol. 54, no. 3, December 1986 (1986-12), pages 897-898, XP002489763 ISSN: 0019-9567	1
Y	the whole document	1-25
X	TOPFER ET AL: "Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 25, no. 2, 2 August 2006 (2006-08-02), pages 314-326, XP005798946 ISSN: 0264-410X	1,3,11, 12
Y	the whole document	1-25

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/023101

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LOVRICH STEVEN D ET AL: "Borreliacidal OspC antibodies specific for a highly conserved epitope are immunodominant in human lyme disease and do not occur in mice or hamsters" CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 6, June 2005 (2005-06), pages 746-751, XP002489764 ISSN: 1071-412X the whole document	1-25
Y	KRAUSE A ET AL: "Vaccination against Lyme borreliosis" INFECTION, vol. 29, no. Supplement 1, May 2001 (2001-05), page 37, XP009103742 & EUROPEAN CONFERENCE ON INFECTIOUS DISEASES AND TROPICAL MEDICINE; LEIPZIG, GERMANY; MAY 03-06, 2001 ISSN: 0300-8126 the whole document	1-25
Y	WO 94/25596 A (IMMUNO AG [AT]; LIVEY IAN [AT]; CROWE BRIAN [AT]; DORNER FRIEDRICH [AT]) 10 November 1994 (1994-11-10) the whole document	1-25
X	WO 2006/038115 A (PFIZER PROD INC [US]; FRANTZ JOSEPH [US]; NEWBY THOMAS JACK [US]; TUCK) 13 April 2006 (2006-04-13) the whole document	13-16
X	DUVAL D ET AL: "VACCINE-ASSOCIATED IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA IN THE DOG" JOURNAL OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 10, no. 5, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 290-295, XP008035876 ISSN: 0891-6640 the whole document	13,14

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/023101

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GILMORE R D ET AL: "The protective capability of the <i>Borrelia burgdorferi</i> outer surface protein C is dependent on the conformational structure of the immunogen" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 98, 1998, page 222; XP009103765 & 98TH GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; ATLANTA, GEORGIA, USA; MAY 17-21, 1998 ISSN: 1060-2011 the whole document	1-25
Y	WILSKE B ET AL: "Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for <i>Borrelia</i> vaccine development" INFECTION, vol. 24, no. 2, 1996, pages 208-212, XP009103741 ISSN: 0300-8126 the whole document	1-25
A	LOVRICH S D ET AL: "Abilities of OspA Proteins from Different Seroprotective Groups of <i>Borrelia burgdorferi</i> To Protect Hamsters from Infection" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 6, 1995, pages 2113-2119, XP002489765 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-25
Y	BROWN E L ET AL: "Multicomponent Lyme vaccine: Three is not a crowd" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 23, no. 28, 25 May 2005 (2005-05-25), pages 3687-3696, XP004887028 ISSN: 0264-410X the whole document	1-25
Y	ROUSELLE JILL C ET AL: "Borreliacidal antibody production against outer surface protein C of <i>Borrelia burgdorferi</i>" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, vol. 178, no. 3, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 733-741, XP009102994 ISSN: 0022-1899 the whole document	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

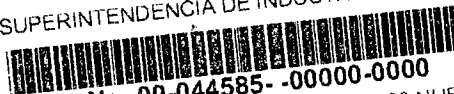
International application No

PCT/US2007/023101

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0006745	A	10-02-2000	AT 386805 T	15-03-2008
			AU 5328299 A	21-02-2000
			CA 2332570 A1	10-02-2000
			DK 1100922 T3	16-06-2008
			EP 1100922 A1	23-05-2001
			ES 2302385 T3	01-07-2008
			JP 3631960 B2	23-03-2005
			JP 2002523019 T	30-07-2002
			NO 20010412 A	29-03-2001
WO 9425596	A	10-11-1994	AT 162550 T	15-02-1998
			AU 683260 B2	06-11-1997
			AU 6722994 A	21-11-1994
			CA 2161534 A1	10-11-1994
			CZ 9502839 A3	13-03-1996
			DE 69408135 D1	26-02-1998
			DE 69408135 T2	10-06-1998
			DK 701612 T3	21-09-1998
			EP 0701612 A1	20-03-1996
			ES 2114687 T3	01-06-1998
			FI 955150 A	28-12-1995
			HR 940279 A2	31-10-1997
			HU 72923 A2	28-06-1996
			JP 8509371 T	08-10-1996
			NO 954318 A	29-12-1995
			PL 311301 A1	05-02-1996
			SK 134195 A3	08-05-1996
WO 2006038115	A	13-04-2006	AU 2005290921 A1	13-04-2006
			CA 2583689 A1	13-04-2006
			CN 101035558 A	12-09-2007
			EP 1799253 A1	27-06-2007
			JP 2008515873 T	15-05-2008
			KR 20070050499 A	15-05-2007

134

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-044585- -00000-0000

 Fecha: 2009-05-04 16:34:29 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 134
rcio
CIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◇ Descripción de la invención ☒
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐

Sondia Rodríguez
 Firma Responsable

Fecha Mayo 4-9

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
 Conmutador: 3 82 0840
 Fax: 3505220
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING - PLOUGH LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	9 44585
	Solicitud internacional	PCT/US2007/023101
	Fecha inicio fase nacional	03/06/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6909

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 19 JUN. 2009
jfernand

137

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

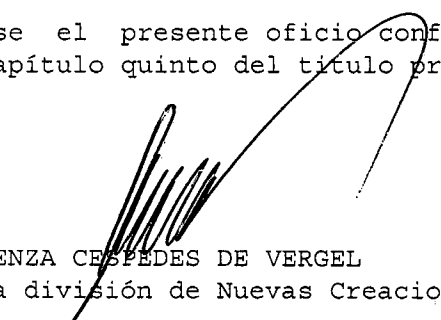
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING - PLOUGH LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	9 44585
	Solicitud internacional	PCT/US2007/023101
	Fecha inicio fase nacional	03/06/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6910

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 13 JUN. 2009
jfernand