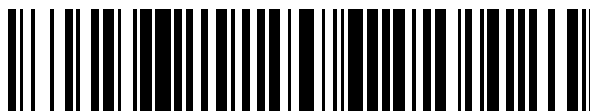


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 885**

51 Int. Cl.:

C07K 14/20 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008** **E 08021660 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2199303**

54 Título: **Polipéptidos y procedimiento para la detección específica de anticuerpos en pacientes con una infección por Borrelia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2013

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
SEEKAMP 31
23560 LÜBECK, DE**

72 Inventor/es:

**KOMOROWSKI, LARS;
PROBST, CHRISTIAN;
JANSSEN, ANTHONINA y
STOECKER, WINFRIED**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 885 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos y procedimiento para la detección específica de anticuerpos en pacientes con una infección por *Borrelia*.

La presente invención se refiere a polipéptidos derivados de OspC ("*Outer surface Protein C*") de bacterias del género *Borrelia*, en especial a una proteína conforme a la reivindicación 1, que comprende un primer polipéptido de OspC, estando unido el primer polipéptido de OspC a través de un puente disulfuro con un segundo polipéptido de OspC. La invención se refiere también a un procedimiento para la detección de anticuerpos contra OspC conforme a la reivindicación 10 y a un procedimiento para la detección de una infección por *Borrelia* conforme a la reivindicación 11, en el que se utiliza una proteína conforme a la invención, precisamente como un kit de diagnóstico conforme a la reivindicación 13 y a una vacuna contra *Borrelia* conforme a la reivindicación 15.

10 **Estado de la técnica**

Las bacterias del género *Borrelia* están descritas como agentes patógenos de varias enfermedades humanas, en especial como agente patógeno de la borreliosis de Lyme y de la fiebre recurrente. La detección de una infección se realiza hoy en día mayoritariamente por medio de la determinación de anticuerpos específicos contra las bacterias en líquidos corporales humanos o animales. A este respecto, la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos que solo se presentan en *Borrelia* indica una infección por *Borrelia*. Las fases tempranas de la infección, en especial infecciones recientes de hasta cuatro semanas después del primer contacto, se caracterizan por la presencia de anticuerpos de la clase IgM, en especial contra los antígenos OspC, p41 (flagelina) y P39 (BmpA), mientras que fases tardías, en especial infecciones finalizadas, curadas o que se manifiestan crónicamente, conllevan la presencia de anticuerpos de la clase IgG, en especial contra los antígenos VisE, P83/P100, P58, OspA, p41 (flagelina), P39, P18 y otros (Wilske y Fingerle, 2005).

Un diagnóstico temprano de la enfermedad es especialmente importante ya que una terapia con antibióticos es más exitosa y sencilla en los estadios tempranos que en los estadios tardíos, así p.ej. en la fase temprana es posible todavía una terapia oral con antibióticos.

Como marcador más importante para una fase temprana de la enfermedad son válidos anticuerpos comunes contra OspC de la clase IgM. En el caso de la de OspC nativa se trata de una proteína de membrana de la familia de las lipoproteínas 6 con un ácido graso acilado que está anclada en la membrana celular exterior (Norris y col., 1992; Hagman y col., 1998). El resto acilo, durante la expresión, paralelamente a la escisión de la secuencia señal por peptidasa de señal II, se adhiere a la única cisteína conservada presente en la secuencia de aminoácidos de la OspC (Wu y Tokunaga, 1986). Sirve como anclaje a la membrana celular lipídica.

Como epítipo más importante para reacciones con anticuerpos humanos de la clase IgM dentro de la OspC vale en general un péptido C-terminal conservado de diez restos de aminoácidos cuyo grupo carboxilo terminal debe ser libremente accesible (Mathiesen y col., 1998a; Mathiesen y col., 1998b) como también se menciona en la publicación de patente PCT WO 9742221. Además de esto están descritos epítopos en la región central poco conservada de la OspC (Eamhart y col., 2005).

Para la detección de los anticuerpos se utilizan normalmente antígenos purificados de *Borrelia* en ensayos inmunobioquímicos como ELISA, transferencia por líneas o de Western. En el procedimiento se unen habitualmente antígenos individuales o varios a una fase sólida con la que se pone en contacto un líquido corporal a analizar y los anticuerpos unidos se detectan por medio de una molécula informadora. Tales kits se comercializan p.ej. por EUROIMMUN AG como EUROLINE-WB y Anti-*Borrelia*-plus-VisE-ELISA. Procedimientos similares están descritos en la literatura (Hansen y col., 1988; Cutler y Wright, 1989; Fister y col., 1989).

Los procedimientos que solo se basan en preparados no recombinantes solo pueden reproducirse con gran despliegue de medios y son por lo tanto muy costosos, ya que para el cultivo *in vitro* de *Borrelia* se utilizan esencialmente medios de cultivo complejos que contienen componentes naturales no definidos químicamente, como fracciones séricas de mamíferos que contienen proteínas y mezclas complejas de proteínas, p.ej. extractos musculares tratados proteolíticamente, extractos de levadura o gelatina. Un kit comercial basado en esto puede obtenerse p.ej. en Sigma Aldrich (Complete BSK-H). Composiciones similares están descritas en la literatura con las denominaciones MKP y BSK II (Ruzic-Sabljić y Strie, 2004).

Es un inconveniente que los componentes no definidos químicamente de estos medios sufren fuertes oscilaciones en sus composiciones de carga a carga, entrañan el riesgo de la impurificación con virus o micoplasmas y son muy costosos de producir. De forma correspondiente, las *Borrelia* cultivadas *in vitro* muestran habitualmente, dependiendo de los medios de cultivo respectivamente utilizados o dependiendo de los distintos componentes de los medios de cultivo respectivamente utilizados, fuertes oscilaciones de sus tasas de crecimiento y de su patrón de expresión génica. En especial se han encontrado genes de estas que se expresan *in vivo* en función del correspondiente organismo huésped (Pollack y col., 1993; Yang y col., 2001). Esto es válido en especial para la

OspC. Además también tienen la temperatura de cultivo así como la concentración de oxígeno y dióxido de carbono una influencia decisiva sobre el tipo y la cantidad de las proteínas expresadas (Seshu y col., 2004; Hyde y col., 2007). De este modo pueden compararse entre sí con dificultad en especial los resultados de distintos laboratorios que cultiven *Borrelia*.

5 Los procedimientos que se basan en antígenos purificados individuales de *Borrelia* cultivadas *in vitro* son además propensas a reacciones inespecíficas que se producen por la presencia de otras impurezas no suficientemente reducidas. En especial en procedimientos que solo generan una señal, como por ejemplo ELISA o transferencia por líneas, se obtienen pues con regularidad falsos resultados positivos. Por el contrario, las transferencias de Western, que evitan este problema mediante la resolución local de las señales, presentan el inconveniente de que generan un
10 coste adicional substancial debido a la necesaria electroforesis y la transferencia a una membrana.

En otros procedimientos se usan antígenos que se obtienen por técnicas recombinantes, p.ej. por expresión heteróloga de antígenos o fragmentos de antígenos en *E. coli*, como se menciona p.ej. en la publicación de patente europea EP 0506868. Son variantes que pueden obtenerse comercialmente p.ej. EUROLINE-WB y Anti-Borrelia-plus-VisE-ELISA (IgG) y la línea recombinante recomline *Borrelia* IgM (Mikrogen). En la literatura están descritos
15 procedimientos similares (Hauser y col., 1998; Lawrenz y col., 1999; Wilske y Fingerle, 2005). En general los antígenos recombinantes presentan la ventaja de que pueden purificarse, p.ej. por fusión con polipéptidos de purificación, p.ej. con la marca de polihistidina (= His-tag), de manera definida y con menor coste que los antígenos nativos.

Es posible la expresión heteróloga de OspC, incluso de la secuencia señal propia de él, en *E. coli* y la subsiguiente acilación, pero conduce sin embargo a una menor eficiencia de expresión (Fuchs y col., 1992). Por ello se utilizan en
20 general construcciones de delección de la OspC con eficiencia de expresión incrementada en las que falta al menos la secuencia señal. A este respecto, en el estado de la técnica se delecionan al menos los primeros 19 aminoácidos de la OspC, incluso la cisteína presente en la secuencia de aminoácidos de la OspC (Fuchs y col., 1992; Wilske y col., 1993; Wilske y col., 1995; Eicken y col., 2001; Kumaran y col., 2001) y en algunos casos se completa por fusión N-terminal con pelipéptidos heterólogos, por ejemplo con His-tag.

25 Tales variantes acortadas N-terminalmente se han utilizado también para la elucidación de la estructura espacial de la OspC (Kumaran y col., 2001; Eicken y col., 2001). Para ello se delecionan los 31 primeros (Eicken y col., 2001) o 37 (Kumaran y col., 2001) restos de aminoácidos de la OspC en las variantes recombinantes de OspC para conseguir en especial una cantidad y pureza adecuadas de la OspC. De las dos estructuras espaciales de ejemplo se desprende que la OspC recombinante tiende a la dimerización. Esta dimerización se produce debido a las interacciones iónicas y enlaces de
30 puente de hidrógeno, pero no por un enlace covalente.

Hay también intentos de preparar variantes aciladas de la OspC por preconexión de una secuencia señal heteróloga recombinante, como se menciona p.ej. en la publicación de patente europea EP 1741718. Debido a la adhesión del ácido graso tales variantes de OspC deben poseer una mayor inmunogenicidad *in vivo* que las variantes de OspC delecionadas o modificadas N-terminalmente descritas hasta aquí.

35 Rauer y col., 1996, *Journal of spirochetel and tick-borne diseases* 3, 105-108, describe un estudio de OspC nativa y recombinante de las cepas GrHo y Pko. En la extracción celular en condiciones no reductoras puede configurarse un puente disulfuro en una cisteína. En Rauer y col., 1998, *Journal of clinical microbiology* 36, 857-861, se da a conocer un ELISA para la determinación de IgM humana dirigida contra antígenos de *Borrelia* usando un fragmento interno recombinante de flagelina en combinación con OspC recombinante de la cepa GeHo.

40 En el documento WO 97/49812 A1 se describe un procedimiento para la purificación de proteína Osp recombinante no lipídica.

Las variantes recombinantes de la OspC utilizadas hasta ahora para el diagnóstico presentan en general el inconveniente de que se diferencian de la OspC nativa purificada de *Borrelia* cultivada *in vitro* porque no están modificadas o lo están de otra manera que post-traduccionalmente y la presencia de epítomos conformacionales o la
45 accesibilidad de epítomos en general no es comparable o no está garantizada. La expresión de estos inconvenientes es la menor reactividad específica descrita regularmente en la literatura de las variantes recombinantes de OspC utilizadas hasta ahora respecto a preparados no recombinantes. Esto se condensa en elevadas tasas de falsos resultados positivos en tales procedimientos de diagnóstico.

Es por consiguiente necesario el desarrollo de variantes recombinantes de OspC que puedan utilizarse con
50 realización más sencilla y definida en relación a los antígenos nativos en procedimientos de diagnóstico y que al mismo tiempo no conduzcan a los inconvenientes descritos para las variantes recombinantes de OspC actuales para facilitar el establecimiento de tales diagnósticos *in vitro* o la realización de tales procedimientos de diagnóstico o estandarizar los resultados de distintos laboratorios.

Descripción de la invención

Sorprendentemente se ha comprobado ahora que los problemas descritos pueden resolverse mediante la invención, en especial mediante el objeto de las reivindicaciones.

5 Es objeto de la invención una proteína conforme a la reivindicación 1, que comprende un primer polipéptido de OspC, estando unido el primer polipéptido de OspC covalentemente con un segundo polipéptido de OspC. El primer polipéptido de OspC está unido a través de un puente disulfuro con un segundo polipéptido de OspC, formándose el puente disulfuro por unión de una cisteína que no está alejada más de 100 posiciones de aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido de OspC.

10 Un polipéptido de OspC en el sentido de la invención, en especial el primer y/o segundo polipéptido de OspC, presenta una identidad de aminoácidos de al menos el 70% con la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9. Se identifica (en esta zona homóloga) especificidad de anticuerpo contra OspC de *Borrelia*. Preferentemente la identidad de aminoácidos asciende a al menos el 80%, al menos al 90%, al menos al 95% o al menos al 99% con una o varias de las secuencias según SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9. Estas secuencias corresponden a las secuencias nativas de la OspC de los tres tipos de cepa de las genoespecies de *Borrelia* *Borrelia afzelii* (VS461), *Borrelia garinii* (20047) y *Borrelia burgdorferi* (B31). La identidad de aminoácidos entre estas cepas asciende al 70% o 76% (véase la Fig. 1). La identidad de aminoácidos se determina preferentemente con el programa CLUSTAL 2.0.10 con ajustes estándar. En el marco de la invención puede utilizarse en especial una secuencia de OspC de otra cepa de *Borrelia*, p.ej. PKo, o una variante de la misma, siendo decisiva la unión específica mediante anticuerpos contra OspC de *Borrelia*.

20 Un reconocimiento específico de anticuerpos contra OspC de *Borrelia* significa en el marco de la invención que anticuerpos contra OspC de *Borrelia* en condiciones adecuadas para ello, que conoce el técnico en la materia y se describen por ejemplo en los ejemplos, se unen al polipéptido o proteína, pero no a otra proteína no emparentada. Como anticuerpos contra OspC de *Borrelia* puede utilizarse por ejemplo suero de pacientes con fase temprana inequívoca de una infección por *Borrelia*, pero también anticuerpos que se hayan preparado p.ej. por inmunización de ratones o conejos con OspC nativo purificado (p.ej. EUROIMMUN), en especial anticuerpos policlonales.

25 *Borrelia* comprende todas las bacterias del género *Borrelia*, mencionándose a modo de ejemplo *B. burgdorferi*, *B. garinii* y *B. afzelii*.

30 Un polipéptido de OspC en el sentido de la invención, en especial el primer y/o segundo polipéptido de OspC, puede comprender al menos un epítipo que se reconozca específicamente por anticuerpos contra OspC de *Borrelia*, comprendiendo el epítipo al menos una secuencia parcial de 10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9, en especial los 10 aminoácidos terminales de esa secuencia. Preferentemente la secuencia parcial comprende el epítipo descrito como inmunodominante en Mathiesen y col., 1998a; Mathiesen y col., 1998b. En especial el o los polipéptidos C-terminales de OspC comprenden una de las secuencias de aminoácidos según SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Es preferido que el o los polipéptidos de OspC finalicen en el extremo C-terminal con la secuencia de la OspC nativa, aquí pues no está contenido ningún otro aminoácido que pudiera impedir el reconocimiento del epítipo C-terminal.

35 Como alternativa o adicionalmente pueden estar presentes en el polipéptido de OspC uno o varios otros epítipos, p.ej. como está descrito por Earnhart y col., 2005.

40 Preferentemente el epítipo o los epítipos están incluidos en otras secuencias de OspC correspondientes a una secuencia de tipo natural de OspC de *Borrelia*. Preferentemente la secuencia parcial de aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9 tiene una longitud de al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 150 o al menos 190 aminoácidos. Preferentemente se trata de los aminoácidos C-terminales de la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9, de homólogos de otras cepas de *Borrelia* u homólogos con una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9.

45 Los polipéptidos de OspC conforme a la invención no presentan ninguna secuencia señal para una acilación. En el estado de la técnica (documento EP 1741718) los polipéptidos expresados, que deberían estar acilados como el polipéptido de tipo natural en la cisteína situada lo más N-terminalmente, se expresaron con una secuencia señal heteróloga. Al contrario de esto, el polipéptido conforme a la invención no contiene ni una secuencia señal homóloga ni una secuencia señal heteróloga. Las secuencias señal que conducen a una acilación comprenden habitualmente una secuencia señal de Braun que es reconocida por la señalpeptidasa II. Tales secuencias señal pueden comprender p.ej. la secuencia L-I-A-C (como OspA u OspB) o L-X-Y-C (en la que X e Y son pequeños aminoácidos neutros) (Fuchs y col., 1992). Preferentemente el polipéptido conforme a la invención tampoco se expresó con una secuencia de acilación y se escindió luego esta. El polipéptido de OspC conforme a la invención por consiguiente tampoco está acilado. La cisteína en la que tendría lugar la acilación en la OspC de tipo natural es en una forma de realización de la invención la cisteína en la que está configurado el puente disulfuro con otro polipéptido de OspC.

Como alternativa o adicionalmente puede estar configurado un puente disulfuro también en otra cisteína. Preferentemente el puente disulfuro se forma por unión de una cisteína que no está más lejos del extremo N-terminal del polipéptido de OspC de aproximadamente 100, preferentemente no más de aproximadamente 50 o no más de aproximadamente 30 posiciones de aminoácidos. En especial el puente disulfuro puede estar configurado en una cisteína que forme el extremo N-terminal del polipéptido, o esté alejado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 116, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos del extremo N-terminal.

Para facilitar la purificación de la proteína conforme a la invención, el polipéptido de OspC/los polipéptidos de OspC en una forma de realización contiene(n) en el extremo N-terminal, en especial en el N terminal de la cisteína en el que está configurado el puente disulfuro, una His-tag que puede presentar p.ej. la secuencia correspondiente a los primeros 12 aminoácidos de la SEC ID N°: 1. En lugar de 8 pueden utilizarse también 6 o 10 histidinas. También pueden incorporarse aquí otras secuencias de aminoácidos conocidas por el estado de la técnica que facilitan la purificación o detección de la proteína, por ejemplo una Flag-tag. Tales secuencias no deberían impedir el reconocimiento por anticuerpos contra OspC de *Borrelia*. Bajo esta hipótesis la unión o la integración de una molécula informadora es también posible en otra localización en la molécula. La molécula informadora puede seleccionarse p.ej. de un grupo que comprende His-tag, Flag-tag, una marca de fluorescencia, biotina y estreptavidina.

En una forma de realización el primer polipéptido de OspC N-terminal comprende una His-tag que limita con una cisteína que está unida con el segundo polipéptido de OspC de la proteína conforme a la invención a través de un puente disulfuro, y a continuación en la cadena polipeptídica del primer polipéptido de OspC el resto de la secuencia de un polipéptido de OspC de una cepa de *Borrelia*, p.ej. *B. burgdorferii*, *B. afzelii* o *B. garinii*, formando esta secuencia el extremo C-terminal del polipéptido. En especial el polipéptido de OspC puede estar constituido por estas secuencias. El segundo (y dado el caso otro) polipéptido de OspC comprende preferentemente los mismos componentes de secuencia His-tag-Cys-Secuencia de OspC o está constituido por estos.

En una forma de realización preferida el primer y/o el segundo polipéptido de OspC presenta una secuencia según SEC ID N°: 2, 5 u 8.

En el marco de la presente invención "un" no se utiliza en general como numeral, sino que con ello puede describirse un número indeterminado. En tanto no se describa otra cosa puede pues representar también dos o más, en especial por un polipéptido de OspC en el sentido de la invención se entiende el primer y/o el segundo polipéptido de OspC de una proteína conforme a la invención. Esto no excluye la presencia de otros polipéptidos de OspC que presenten preferentemente la misma estructura que los primeros polipéptidos de OspC.

Preferentemente las proteínas conforme a la invención son dímeros de dos polipéptidos de OspC. También es básicamente posible una multimerización con otros polipéptidos de OspC u otras moléculas (p.ej. a través de puentes disulfuro adicionales) en tanto esto no impida o limite el reconocimiento por anticuerpos contra OspC de *Borrelia*. Se ha mostrado en el marco de la invención que mediante los puentes disulfuro puede formarse un homodímero de dos polipéptidos de OspC iguales o un heterodímero de distintos polipéptidos de OspC. Por consiguiente es p.ej. posible con una proteína conforme a la invención detectar anticuerpos contra varias cepas de *Borrelia* o producir una vacuna contra varias cepas de *Borrelia*.

En relación a la presente invención proteína se utiliza en general para multímeros de polipéptidos de OspC y polipéptido para cadenas individuales de polipéptido de OspC, pero ambos términos pueden referirse también, lo que para el técnico en la materia será evidente por el contexto, a proteínas, polipéptidos o péptidos conforme al uso idiomático científico general, no diferenciándose entre distintos tamaños.

En el marco de la invención se ha mostrado que la unión directa de puente disulfuro entre los polipéptidos de OspC mejora claramente el reconocimiento por anticuerpos contra OspC de *Borrelia*. Esto conlleva que el reconocimiento de la proteína por anticuerpos contra OspC de *Borrelia* se reduce con la puesta en contacto con al menos un reactivo que destruya el puente disulfuro. En especial un reactivo semejante está seleccionado de un grupo que comprende reactivo que contenga tiol o una combinación de un reactivo que contenga tiol y un haluro de alquilo. Tales reactivos incluyen p.ej. reductores, como ditiotreitól o mercaptoetanol, dado el caso en combinación con un agente alquilante como yodoacetamida. En especial puede utilizarse en primer lugar un reductor y luego un haluro de alquilo.

Una proteína conforme a la invención puede producirse p.ej. en células bacterianas (p.ej. *E. coli*, p.ej. *E. coli* RosettaBlue(DE3)pLacI (Stratagene)), células de insecto (p.ej. células SF6), células de levaduras (p.ej. *S. cerevisiae*) o células de vertebrados (p.ej. células de CHO). La invención comprende un procedimiento para la producción de la proteína conforme a la invención en el que esta se expresa recombinantemente y se purifica. Una purificación es posible p.ej. mediante una cromatografía de afinidad, pudiéndose utilizar por ejemplo anticuerpos contra OspC de *Borrelia* o, cuando se usa p.ej. una His-tag, una cromatografía de afinidad con níquel. Preferentemente en la expresión y/o purificación se utilizan condiciones no reductoras. Preferentemente en la purificación se utiliza un pH de 7 - 9, un pH de 7,5 - 8,5, en especial pH 8. En una cromatografía de afinidad la mezcla a purificar puede p.ej. aplicarse y lavarse con tampón TNI10 y eluirse con tampón TNI150. En el estado de la técnica son conocidos otros procedimientos de producción y purificación

que no impiden la formación de los puentes disulfuro.

En un aspecto la presente invención se dirige a un procedimiento para la detección de anticuerpos contra una proteína conforme a la invención en el que se pone en contacto una muestra biológica con la proteína conforme a la invención y se detecta la unión de anticuerpos que dado el caso puedan estar presentes en la muestra a la proteína.

- 5 En especial se da a conocer un procedimiento para el diagnóstico de una infección por *Borrelia* en el que se pone en contacto una muestra de un paciente con una proteína conforme a la invención y se detecta la unión de anticuerpos que dado el caso puedan estar presentes en la muestra a la proteína, indicando una detección de la unión de anticuerpos una infección por *Borrelia*.

- 10 Es también objeto de la invención el uso de una proteína conforme a la invención para la detección de anticuerpos contra OspC de *Borrelia* y para el diagnóstico de una infección por *Borrelia*. Los anticuerpos detectados son preferentemente anticuerpos del tipo IgM, por lo que se detecta una infección por *Borrelia* en una fase temprana.

- 15 La unión de los anticuerpos puede detectarse p.ej. con un ensayo de inmunofluorescencia, ELISA, ensayo de luminiscencia, transferencia de Western, transferencia por líneas o transferencia por puntos. Como muestra biológica puede utilizarse p.ej. un líquido corporal de un paciente, en especial sangre, suero, plasma, saliva, orina o líquido cefalorraquídeo. Preferentemente se trata cuando se habla de pacientes de un paciente humano o animal en el que debe comprobarse por ejemplo una infección por *Borrelia*.

- 20 Es también objeto de la invención un kit para el diagnóstico de una infección por *Borrelia* que comprende una proteína conforme a la invención. Un kit semejante puede comprender además anticuerpos contra OspC de *Borrelia* y/o tampones o reactivos adecuados para la detección, como p.ej. un anticuerpo que reconozca la IgM humana, opcionalmente marcado con un reactivo adecuado para la detección (p.ej. un colorante de fluorescencia como FITC o PE, una enzima como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante o biotina). Se puede tratar p.ej. de un kit para ensayo de inmunofluorescencia, ELISA, ensayo de luminiscencia, transferencia de Western, transferencia por líneas o transferencia por puntos.

- 25 Es también objeto de la invención el uso de una proteína conforme a la invención para la producción de una vacuna contra una infección por *Borrelia*, así como una vacuna contra una infección por *Borrelia* que comprende una proteína conforme a la invención. Una vacuna semejante puede comprender coadyuvantes, tampones y/o adyuvantes. Se puede tratar de una vacuna de combinación que puede estar dirigida por ejemplo contra dos, tres o más cepas de *Borrelia*. Esto puede conseguirse utilizando proteínas de OspC heterómeras, pero también p.ej. por mezcla de distintos homodímeros. Una vacuna semejante puede formularse p.ej. para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa u oral. Una
30 administración múltiple, p.ej. doble, triple o cuádruple (por ejemplo el día 1, 14, 28, 42), puede ser razonable para mejorar la formación de anticuerpos.

- 35 La presente invención permite en primer lugar la determinación de anticuerpos específicos de OspC usando variantes recombinantes de OspC que proporcionan resultados del mismo valor diagnóstico que con el uso de variantes no recombinantes de OspC. Al mismo tiempo la utilización de las nuevas variantes recombinantes de OspC con puente disulfuro permite una considerable reducción del coste en la preparación de los antígenos respecto a las variantes de OspC nativas válidas hasta ahora como diagnósticas en ensayos competitivos.

- 40 Se ha mostrado que las variantes de OspC según la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 (derivada de OspC madura según la SEC ID N°: 3 de *B. afzelii* VS461 = OspC_{VS461}, Genbank n° de referencia D49379), SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 (derivada de OspC según la SEC ID N°: 6 de *B. garinii* 20047 = OspC₂₀₀₄₇, Genbank n° de referencia L42900), SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 (derivada de OspC según la SEC ID N°: 9 de *B. burgdorferi* B31 = OspC_{B31}, Genbank n° de referencia U01894) pueden expresarse en grandes cantidades en *E. coli* y obtenerse con elevada pureza. A este respecto no se mostró ninguna diferencia en el coste de los trabajos de ingeniería genética, tasas de expresión, coste de la obtención o pureza entre las distintas variantes que se diferencian respectivamente solo en una cisteína según la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2 (derivada de OspC_{VS461}), SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 (derivada de OspC₂₀₀₄₇) y SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 (derivada de
45 OspC_{B31}).

- Además de esto se ha mostrado a modo de ejemplo que la exactitud de diagnóstico de un procedimiento para la determinación de anticuerpos de la clase IgM usando la variante derivada de OspC_{VS461} según la SEC ID N°: 2 es sorprendentemente equivalente a la de un procedimiento establecido usando OspC no recombinante de la cepa VS461. Además se ha mostrado que la exactitud de diagnóstico de estos dos procedimientos es mayor que la de procedimientos
50 que utilizan la variante derivada de OspC_{VS461} según la SEC ID N°: 1 o variantes recombinantes de OspC con deleciones según la literatura científica.

Además se ha mostrado a modo de ejemplo que la variante derivada de OspC_{VS461} según la SEC ID N°: 2 después de purificación bioquímica está presente dimerizada a través de un puente disulfuro y presenta sorprendentemente una mayor reactividad específica que su monómero, su monómero acetilado en la cisteína y el monómero análogo según la

SEC ID N°: 1.

Además se ha mostrado a modo de ejemplo que mezclando las variantes según la SEC ID N°: 2 (derivada de OspC_{VS461}) y la SEC ID N°: 5 (derivada de OspC₂₀₀₄₇) seguido de su reducción y subsiguiente oxidación pueden prepararse heterodímeros con puente disulfuro cuya empleabilidad es básicamente equivalente a la de los homodímeros con puente disulfuro, pero que tienen la ventaja de poder detectar anticuerpos específicos de distintas especies, es decir anticuerpos que se dirigen exclusivamente contra OspC de cepas de *B. afzelii* o exclusivamente contra OspC de cepas de *B. garinii*. El técnico en la materia dispone de medios y procedimientos para separar heterodímeros de homodímeros, p.ej. por enfoque eléctrico. Tal separación no es sin embargo necesaria, pues también pueden utilizarse mezclas de homodímeros y heterodímeros.

Además se ha mostrado a modo de ejemplo que sorprendentemente ratones, tras su inmunización con la variante de OspC según la SEC ID N°: 2 (derivada de OspC_{VS461}) dimerizada a través de puentes disulfuro, presentan un título mayor de anticuerpos contra Borrelia que después de una inmunización con la misma cantidad del monómero de la variante de OspC según la SEC ID N°: 1. De esto puede concluirse una mayor efectividad de las vacunas basadas en los polipéptidos conforme a la invención. Los resultados son trasladables a las otras variantes, a otros animales y a seres humanos.

Los siguientes ejemplos representan el objeto de la invención a modo de ejemplo, sin embargo no deben limitar la invención.

Leyenda

La Figura 1 muestra un alineamiento de Ospc madura de *B. afzelii* VS461 = OspC_{VS461}, de *B. garinii* 20047 = OspC₂₀₀₄₇ y de *B. burgdorferi* B31 = OspC_{B31} determinado con CLUSTAL 2.0.10 con ajustes estándar. La Tabla da el grado de identidad de aminoácidos.

La Figura 2 muestra a modo de ejemplo una transferencia de Western con las variantes His-m-OspC_{VS461} e His-m-Cys-OspC_{VS461} no reducidas tras tinción con Ponceaus S (carril 1-3) así como tras incubación con un suero de un paciente con una borreliosis en el estadio temprano (dilución 1:200) y detección de anticuerpos de IgM unidos (carril 4 y 5). Carril 1: marcador de tamaño Mark 12 (Invitrogen), carril 2 y 4: 15 µg de His-m-OspC_{VS461}, carril 3 y 5: 25 µg de His-m-Cys-OspC_{VS461}.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de vectores para la expresión de OspC en *E. coli*

OspC esta codificado en Borrelia en el plásmido B (nomenclatura basada en el genoma completo de *B. burgdorferi*, marco de lectura BB_B19). Como molde para la amplificación por PCR de las zonas génicas según las SEC ID N°: 10 a 15 que codifican seis variantes de OspC, se utiliza ADN completo de *B. afzelii* cepa VS461, *B. garinii* cepa 20047 y *B. burgdorferi* cepa B31. Para la amplificación de las distintas variantes se utilizan las combinaciones de cebadores según las SEC ID N°: 16 y SEC ID N°: 17 (His-m-OspC_{VS461}), SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 17 (His-Cys-m-OspC_{VS461}), SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20 (His-m-OspC₂₀₀₄₇), SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 20 (His-Cys-m-OspC₂₀₀₄₇), SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 17 (His-m-OspC_{B31}) y SEC ID N°: 23 y SEC ID N°: 17 (His-Cys-m-OspC₃₁). Mediante la PCR se integran en los amplificados los sitios de restricción necesarios respectivamente en el extremo 5' o 3' de la cadena codificadora.

La PCR se lleva a cabo utilizando la "High Fidelity PCR Enzyme Mix" (Fermentas) conforme a las indicaciones del fabricante a escala de 50 µl. Se llevan a cabo 30 ciclos de reacción, resumidos en los pasos 1 a 3:

Paso 1	30 segundos	94°C
Paso 2	45 segundos	56°C
Paso 3	30 segundos	72°C.

Los fragmentos de la PCR se purifican a continuación usando el sistema de purificación extracto Nucleospin® II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) conforme a las indicaciones del fabricante y se recogen en respectivamente 50 µl de Tris-HCl 5 mM pH 8,5. A continuación los fragmentos se escinden con endonucleasas de restricción en los extremos. Las endonucleasas de restricción se adquieren de la firma Fermentas y se utilizan conforme a las indicaciones del fabricante.

Los amplificados se tratan de la manera siguiente con endonucleasas de restricción:

His-m-OspC_{VS461} : NcoI y XhoI,
 His-Cys-m-OspC_{VS461} : Esp3I y XhoI,
 His-m-OspC₂₀₀₄₇ : NcoI y XhoI,
 His-Cys-m-OspC₂₀₀₄₇ : Esp3I y XhoI,

His-m-OspC_{B31} : NcoI y XhoI,
His-Cys-m-OspC_{B31} : PaeI y XhoI.

Los fragmentos de PCR se purifican a continuación usando el sistema de purificación extracto Nucleospin® II conforme a las indicaciones del fabricante y se recogen en respectivamente 50 µl de Tris-HCl 5 mM pH 8,5.

- 5 Los fragmentos de PCR cortados enzimáticamente y purificados se integran a continuación mediante ligación en el plásmido según la SEC ID N°: 24 cortado con NcoI/XhoI. Para la ligación se utiliza el kit Rapid DNA Ligation de la firma Fermentas conforme a las indicaciones del fabricante. La mezcla de ligación se transforma en *E. coli* RosettaBlue (DE3)pLacl (Stratagene).

- 10 Se seleccionan clones positivos basándose en su resistencia a kanamicina/cloranfenicol [50/34 µg/ml]. De estos clones se aíslan los plásmidos obtenidos y se comprueban por análisis de restricción y secuenciación del ADN. Los plásmidos correctos se seleccionan para la realización de la expresión, se inoculan en 20 ml de medio LB que contenga antibiótico y se incuban a 37°C hasta alcanzar una DO600 (d = 1) de 0,6. Añadiendo IPTG (concentración final: 1 mM) se induce la expresión de la proteína y a continuación se incuba durante otras 3 horas a 37°C. Después de ese tiempo las células se sedimentan por centrifugación a 2.200 x g durante 10 minutos, se resuspenden en 20 ml de PBS, se centrifugan de nuevo y finalmente se resuspenden en 1 ml de PBS.

La digestión celular se realiza adicionando un tercio de volumen de tampón NuPAGE-LDS 4x (Invitrogen) que contiene Tris-Cl 141 mM pH 8,5, 2% (p/v) de dodecilsulfato sódico, 10% (p/v) de glicerol, EDTA 0,51 mM, SERVABlue G250 0,22 mM, seguido de una incubación de 10 minutos a 70°C. A continuación se fragmenta el ADN cromosómico por tratamiento con ultrasonidos (sonicador Branson, posición 7, microsonda).

- 20 El lisado celular después de la separación por SDS-PAGE se transfiere a una membrana de celulosa. A continuación se bloquean las posiciones insaturadas de la membrana mediante una incubación con "tampón universal" (EUROIMMUN) con 3% (p/v) de leche en polvo. A continuación se incuba durante 1 hora con un anticuerpo monoclonal de ratón (Merck Biosciences GmbH) dirigido contra la His-tag y diluido 1:2000 en "tampón universal" con 3% (p/v) de leche en polvo. Entonces se lava tres veces respectivamente durante 5 minutos con "tampón universal".
- 25 En un segundo paso de incubación los anticuerpos unidos en el caso positivo a las proteínas reaccionan con una solución de conjugado diluido 1:2000 en "tampón universal", que como conjugado contiene un anticuerpo de IgG-anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (Sigma). A continuación se lava como después de la incubación de anti-His-tag. En un tercer paso de incubación se detectan entonces los anticuerpos unidos con una "solución de sustrato" de NBT/BCIP (cloruro de 4-nitrobluetetrazolio/fosfato de clorobromoindolilo, EUROIMMUN).

30 Resultados:

En una transferencia de Western, una vez realizada la SDS-PAGE reductora, puede detectarse la expresión de las construcciones recombinantes por la presencia de proteínas reactivas a His-tag cuyos tamaños coincidan bien con las masas predichas sobre la base de las secuencias de aminoácidos de 23-25 kDa. Las células que contienen el vector plasmídico no modificado no presentan ninguna proteína correspondiente.

35 **Ejemplo 2: Purificación de variantes recombinantes de OspC por cromatografía de afinidad**

La columna de afinidad es una columna de centrifugación NiNTA (Qiagen) que se maneja conforme a las recomendaciones del fabricante.

- 40 Las células recolectadas conforme al Ejemplo 1 se centrifugan de nuevo como se ha descrito, se resuspenden en 1 ml de "tampón TNI10" (Tris-HCl 5 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM) y se disgregan por tratamiento de ultrasonidos de 1 minuto por tres veces (sonicador Branson, posición 7, microsonda). 0,5 ml del sobrenadante se aplican a una columna de centrifugación NiNTA equilibrada con "tampón TNI10".

Las proteínas que no se unen o lo hacen débilmente se eliminan de la columna por lavado varias veces con 0,5 ml de "tampón TNI10". La elución se realiza con 0,2 ml de "tampón TNI150" (Tris-HCl 5 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; imidazol 150 mM). La fracción de elución se analiza por transferencia de Western como en el Ejemplo 1.

45 Resultados:

- 50 Los eluidos contienen esencialmente proteínas que tras la tinción de la membrana de transferencia de Western con solución de tinción de Ponceau-S corresponden a respectivas bandas correspondientemente de un tamaño de aproximadamente 23-25 kDa. Después de la transferencia de Western y la detección de la His-tag puede verse una banda correspondiente del mismo tamaño. Este resultado indica que la proteína expresada tras la cromatografía está presente en componentes esencialmente libres de *E. coli*.

Ejemplo 3: Transferencias por líneas para la determinación de anticuerpos anti-OspC utilizando las variantes

recombinantes de OspC

- Se recubren en forma de líneas membranas de nitrocelulosa con una OspC recombinante purificada conforme al Ejemplo 2 diluida (concentración: 20 - 100 µg/ml) en glicerina al 10% (p/v). A continuación las membranas se secan durante la noche, se bloquean durante 1 hora con “tampón universal” (EUROIMMUN), se fijan a una fase sólida, se cortan con un escalpelo en ángulo de 90° respecto a las líneas de OspC en tiras de aproximadamente 2 mm de ancho y a continuación se almacenan a 4°C en bolsas de aluminio con bolsas de secado hasta su utilización. La incubación de las tiras se realiza como está indicado en las instrucciones de trabajo de las tiras EUROLINE-WB (EUROIMMUN), que se incuban como comparación. Como comparación adicional sirve la incubación de tiras de recomLine Borrelia (Mikrogen) conforme a las indicaciones del fabricante.
- Para la determinación de la sensibilidad y especificidad se analizaron 25 muestras de suero de pacientes con fase temprana inequívoca de una infección por Borrelia, así como 50 muestras de suero de embarazadas (que frecuentemente presentan anticuerpos inespecíficos) sin indicios de una infección por Borrelia y 25 pares de muestras de suero de personas sanas, que se tomaron con un distanciamiento de 14 días, en relación a la presencia de anticuerpos de la clase de inmunoglobulina M (IgM) específicos de OspC. Se comprobaron las reacciones positivas en las personas sanas por análisis de la seroconversión a IgM (comparación día 0/día 14) con varios sistemas de ensayo para la detección de anticuerpos de la clase IgM contra Borrelia, p.ej. EUROLINE-WB IgG y anti-Borrelia-ELISA IgG (EUROIMMUN). En caso de ninguna reacción positiva la muestra subsiguiente probó una conversión sérica.

Tabla 1:

	n	EUROLINE-WB IgM	His-Cys-m-OspC _{VS461} SEC ID N°: 2	His-m-OspC _{VS461} SEC ID N°: 1	línea recomb. de Borrelia IgM _{Borrelia afzelii}
		IgM anti-OspC			
Fase temprana [n]	20	17	17	17	19
Sensibilidad [%]	20	85	85	85	95
Embarazada sana [n]	50	2	2	6	8
Donante de sangre sano [n]	25	4	4	7	9
Especificidad [%]	75	92	92	82,7	77,3
Exactitud de diagnóstico [%]	100	90,5	90,5	83,2	81,1

Resultados:

Los resultados están resumidos a modo de ejemplo para OspC de *B. afzelii* en la Tabla 1.

- Un gran parte de los sueros de pacientes en una fase temprana de la infección por Borrelia presentan anticuerpos IgM contra OspC. En el estudio la transferencia de Western con la OspC nativa procedente de *B. afzelii* y la transferencia por líneas con His-Cys-m-OspC_{VS461} presentan sensibilidades y especificidades aproximadamente equivalentes y al mismo tiempo las mayores exactitudes de diagnóstico. La transferencia por líneas con la variante His-m-OspC_{VS461} y la OspC recombinante de *B. afzelii* en la transferencia recomb. de IgM de Borrelia se distinguen por el contrario sobre todo por reacciones inespecíficas en las personas sanas.

Ejemplo 4: Análisis de las variantes recombinantes de OspC

- Conforme al Ejemplo 2 se separan las distintas variantes de OspC purificadas por SDS-PAGE. A este respecto la separación se realiza tanto en condiciones no reductoras, en condiciones reductoras en presencia de ditioneitol (DTT) y en condiciones alquilantes en presencia de yodoacetamida después de reducción con DTT. A continuación se lleva a cabo una transferencia de Western conforme al Ejemplo 1. Paralelamente al anticuerpo monoclonal contra la His-tag mencionado en el Ejemplo 1 se incuban también sueros positivos a IgM anti-OspC conforme al Ejemplo 3 en una dilución 1:200. En el caso de sueros humanos se utiliza en el segundo paso de incubación un conjugado de

IgG-anti-humana diluido 1:10 en "tampón universal" y fosfatasa alcalina (EUROIMMUN).

Resultados:

La separación en condiciones reductoras y alquilantes conduce tanto tras tinción con Ponceau-S como también tras detección de la His-tag conforme al Ejemplo 1 respectivamente a bandas correspondientes a un tamaño de aproximadamente 23-35 kDa. Esto se encuentra también para las variantes His-m-OspC_{VS461} (SEC ID N°: 1), His-m-OspC₂₀₀₄₇ (SEC ID N°: 4) e His-m-OspC_{B31} (SEC ID N°: 7) en condiciones no reductoras. Por el contrario, en las variantes His-Cys-m-OspC_{VS461} (SEC ID N°: 2), His-Cys-m-OspC₂₀₀₄₇ (SEC ID N°: 5) e His-Cys-m-OspC_{B31} (SEC ID N°: 8) están presentes respectivamente dos bandas a 23-25 y 45-50 kDa que están teñidas respectivamente aproximadamente con la misma intensidad. Estos resultados indican que las variantes His-Cys-m-OspC_{VS461}, His-Cys-m-OspC₂₀₀₄₇ e His-Cys-m-OspC_{B31} están presentes respectivamente como dímeros en los que respectivamente dos monómeros están unidos entre sí a través de puentes disulfuro (v. Figura 2).

Después de incubación con sueros humanos la distribución de las bandas en las respectivas variantes es idéntica, pero es extraño que las bandas a 45-50 kDa estén teñidas respectivamente substancialmente más intensamente que las bandas a 23-25 kDa. Las distintas intensidades de color tras tinción directa con Ponceau-S y tinción inmunológica tras incubación con sueros humanos indican que los dímeros presentan reactividades específicas respectivamente mayores que los monómeros (v. Figura 2).

Ejemplo 5: Preparación de heterodímeros

Se mezclan entre sí en proporciones iguales alícuotas de dos de las variantes de OspC dimérica purificadas conforme al Ejemplo 2, p.ej. His-m-Cys-OspC_{VS461} e His-m-Cys-OspC₂₀₀₄₇. Una alícuota de la mezcla se guarda para la analítica. El resto se reduce adicionando DTT y se comprueba el resultado de la reducción mediante SDS-PAGE no reductora y transferencia de Western conforme al Ejemplo 4. A continuación la mezcla se libera de DTT por diálisis exhaustiva contra Tris-HCl 20 mM pH 8,5 y se le hace pasar durante 24 horas mediante una punta de pipeta aire a presión para crear un medio oxidante. Finalmente la mezcla se analiza mediante enfoque isoelectrico no reductor entre pH 6 y 9 con el sistema ZoomRunner (Invitrogen) conforme a las indicaciones del fabricante, subsiguiente SDS-PAGE y transferencia de Western. Como comparación se analizan los dos distintos dímeros de OspC y la mezcla antes de la adición de DTT.

Resultados:

His-m-Cys-OspC_{VS461} presenta una mancha correspondiente aprox. a pH 7,5 y 24 kDa, His-m-OspC₂₀₀₄₇ por el contrario correspondiente aprox. a pH 6,5 y 24 kDa. La mezcla de His-m-OspC_{VS461} e His-m-OspC₂₀₀₄₇ presenta antes de la reducción dos manchas correspondientes aprox. a pH 7,5 / 24 kDa y pH 6,5 / 24 kDa. La mezcla reducida y oxidada con aire a continuación presenta por el contrario tres manchas correspondientes aprox. a pH 7,5 / 24 kDa, pH 6,8 / 24 kDa y pH 6,5 / 24 kDa. Los resultados indican que al menos parcialmente están presentes heterodímeros.

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de dímeros de OspC con puente disulfuro

Las proteínas His-m-OspC_{VS461} e His-Cys-m-OspC_{VS461} purificadas conforme al Ejemplo se inyectan subcutáneamente sin adyuvante a respectivos 10 ratones hembra C3H/He de 4 a 6 semanas de edad una vez y luego a intervalos de 14, 28 y 42 días en porciones de sendos 100 µg por dosis. Como controles se inyectan otros 10 ratones respectivamente con solución de sal común al 0,9% (p/v). A todos los animales se les saca sangre el día de la primera inyección y luego después de 24, 38, 52 y 66 días. Se determinan los anticuerpos específicos de OspC en una dilución 1:1000 del suero respectivo usando un ELISA de IgM anti-Borrelia (EUROIMMUN) en el que el conjugado para la detección de anticuerpos humanos unidos se intercambia por un conjugado diluido 1:2000 en tampón de dilución de conjugado (EUROIMMUN) para la detección de anticuerpos murinos de la clase IgG (Dianova) unidos. De los resultados se determina el valor medio (VM) y la desviación típica (σ) de respectivamente 10 animales tratados del mismo modo.

Para la comprobación de la especificidad de la respuesta inmunitaria se incuban las 30 muestras de suero del día de la última extracción de sangre en tiras de EUROLINE-WB (EUROIMMUN) a una dilución 1:500 y se detectan los anticuerpos murinos unidos conforme al ensayo 1.

45

Tabla 2:

Antígeno	n	Día									
		0		24		38		52		66	
		VM	σ	VM	σ	VM	σ	VM	σ	VM	σ
Solución de sal común al 0,95 (p/v)	10	0,015	0,002	0,019	0,004	0,019	0,006	0,014	0,002	0,024	0,005
His-m-OspC _{VS461}	10	0,014	0,003	0,017	0,003	0,069	0,114	0,722	0,986	2,195	1,518
His-m-Cys-OspC _{VS461}	10	0,013	0,002	0,036	0,024	1,043	0,995	1,892	1,288	3,868	0,202

Resultados:

5 Los resultados se indican en extinción a 450 nm y están resumidos en la Tabla 2.

Se muestra que se producen valores de medición esencialmente más rápidamente y mayores si los animales se inmunizaron con la variante His-m-Cys-OspC_{VS461}. Además se muestra que al final del periodo de inmunización todos los sueros de animales que se inmunizaron con la variante His-m-Cys-OspC_{VS461} producen valores de medición elevados cerca del valor medio. Por el contrario valores de medición muy bajos o bajos en algunos animales que se inmunizaron con la variante His-m-OspC_{VS461} indican que la inmunización en esos animales no ha conducido a un título de anticuerpos substancial.

La incubación en tiras de EUROLINE-WB (EUROIMMUN) muestra que todos los sueros que producen en ELISA una extinción elevada ($E_{450\text{ nm}} \geq 0,3$) producen una banda en el lugar de migración de la OspC. A este respecto la intensidad de las bandas se correlaciona aproximadamente con la extinción.

15 Ambos resultados tomados conjuntamente sugieren que los ratones que se inmunizaron con la variante His-m-Cys-OspC_{VS461} producen anticuerpos más rápidamente que tras la inmunización con la variante His-m-OspC_{VS461} y que se alcanzan concentraciones de anticuerpos mayores al final de la inmunización.

Lista bibliográfica

1 Cutler SJ, Wright DJ: Comparison of immunofluorescence and enzyme linked immunosorbente assays for diagnosing Lyme disease. J Clin Pathol 42:869-871 (1989).

2 Earnhart CG, Buckles EL, Dumler JS, Marconi RT: Demonstration of OspC type diversity in invasive human lyme diseases isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. Infect Immun 73:7869-7877 (2005).

3 Elcken C, Sharma V, Klabunde T, Owens RT, Pikas DS, Hook M, Sacchettini JC: Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from Borrelia burgdorferi. J. Biol Chem 276:10010-10015 (2001).

4 Fister RD, Weymouth LA, McLaughlin JC, Ryan RW, Tilton RC: Comparative evaluation of three products for the detection of Borrelia burgdorferi antibody in human serum. J Clin Microbiol 27:2834-2837 (1989).

5 Fuchs R, Jauris S, Lottspeich F, Preac-Mursic V, Wilske B, Soutscheck E: Molecular analysis and expression of a Borrelia burgdorferi gene encoding a 22 kDa protein (pC) in Escherichia coli. Mol Microbiol 6:503-509 (1992).

6 Hagman KE, Lahdenne P, Popova TG, Porcella SF, Akins DR, Radolf JD, Norgard MV: Decorin-binding protein of Borrelia burgdorferi is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis. Infect Immun 66:2674-2683 (1998).

7 Hansen K, Hindersson P, Pedersen NS: Measurement of antibodies to the Borrelia burgdorferi flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease: J Clin Microbiol 26:338-346 (1998).

8 Hauser U, Lehnert G, Wilske B: Diagnostic value of proteins of three Borrelia species (Borrelia burgdorferi sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Clin Diagn Lab Immunol 5:456-462 (1998).

9 Hyde JA, Trzeciakowski JP, Skare JT: Borrelia burgdorferi alters its gene expression and antigenic profile in response to CO2 levels. J Bacteriol 189:437-445 (2007).

10 Kumaran D, Eswaramoorthy S, Luft BJ, Koide S, Dunn JJ, Lawson CL, Swaminathan S: Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. EMBO J 20:971-978 (2001).

- 11 Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP, Norris SJ: Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 37:3997-4004 (1999).
- 12 Mathiesen MJ, Christiansen M, Hansen K, Holm A, Asbrink E, Theisen M: Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 36:3474-3479 (1998a).
- 5 13 Mathiesen MJ, Holm A, Christiansen M, Blom J, Hansen K, Ostergaard S, Theisen M: The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface-exposed conserved structural motif. *Infect Immun* 66:4073-4079 (1998b).
- 10 14 Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG: Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* 60:4662-4672 (1992).
- 15 15 Pollack RJ, Telford SR, III, Spielman A: Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 31:1251-1255 (1993).
- 16 Ruzic-Sabljić E, Strle F: Comparison of growth of *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi sensu stricto* in MKP and BSK-II medium. *Int J Med Microbiol* 294:407-412 (2004).
- 17 Seshu J, Boylan JA, Gherardini FC, Skare JT: Dissolved oxygen levels alter gene expression and antigen profiles in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 72:1580-1586 (2004).
- 18 Wilske B, Fingerle V: *Lyme-Borreliose Diagnostik* 2005.
- 19 Wilske B, Jauris-Heipke S, Lobentanzer R, Pradel I, Preac-Mursic V, Rossler D, Soutschek E, Johnson RC: Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J Clin Microbiol* 33:103-109 (1995).
- 20 20 Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E, Schwab E, Will G, Wanner G: Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 61:2182-2191 (1993).
- 21 Wu HC, Tokunaga M: Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 125:127-157 (1986).
- 25 22 Yang X, Popova TG, Goldberg MS, Norgard MV: Influence of cultivation media on genetic regulatory patterns in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69:4159-4163 (2001).
- 23 WO 9742221
- 24 EP1741718

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EUROIMMUN AG

Komorowski, Lars

Janssen, Antonia

5 Probst, Christian

<120> Polipéptidos y procedimiento para la detección específica de anticuerpos en pacientes con una infección por Borrelia

<130> ?

10 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 203
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Generada por ingeniería genética

<400> 1

25 Met Ser His His His His His His His His Ser Met Gly Asn Asn Ser
1 5 10 15
Gly Lys Gly Gly Asp Ile Ala Ser Thr Asn Pro Asp Glu Ser Ala Lys
20 25 30
Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala
30 35 40 45
Val Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp
50 55 60
Glu Leu Ala Lys Thr Ile Gly Lys Lys Ile Glu Ala Asn Gly Leu Gly
65 70 75 80
35 Asn Glu Ala Asp Lys Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile
85 90 95
Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Gly Leu Glu Gly
100 105 110
40 Leu Asn Lys Glu Ile Ala Glu Ala Lys Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr
115 120 125
Lys Lys Leu Gln Asp Ser Asn Ala Asp Leu Gly Lys His Asn Ala Thr
130 135 140
45 Asp Ala Asp Ser Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys Thr
145 150 155 160
Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Val Glu Ser Leu
165 170 175
Ser Lys Ala Ala Lys Glu Ala Leu Ser Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr
180 185 190
50 Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
195 200

<210> 2
<211> 203
55 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Generada por ingeniería genética

60 <400> 2

5 Met Ser His His His His His His His His Ser Met Cys Asn Asn Ser
 1 5 10
 Gly Lys Gly Gly Asp Ile Ala Ser Thr Asn Pro Asp Glu Ser Ala Lys
 20 25 30
 Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala
 35 40 45
 Val Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp
 50 55 60
 10 Glu Leu Ala Lys Thr Ile Gly Lys Lys Ile Glu Ala Asn Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Glu Ala Asp Lys Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile
 85 90 95
 15 Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Gly Leu Glu Gly
 100 105 110
 Leu Asn Lys Glu Ile Ala Glu Ala Lys Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr
 115 120 125
 Lys Lys Leu Gln Asp Ser Asn Ala Asp Leu Gly Lys His Asn Ala Thr
 130 135 140
 20 Asp Ala Asp Ser Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys Thr
 145 150 155 160
 Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 25 Ser Lys Ala Ala Lys Glu Ala Leu Ser Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr
 180 185 190
 Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 195 200

30 <210> 3
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Borrelia afzelii VS461

35 <400>3

40 Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly Asp Ile Ala Ser Thr Asn Pro Asp
 1 5 10 15
 Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr
 20 25 30
 Asp Ser Asn Ala Val Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Thr Ile Gly Lys Lys Ile Glu Ala
 50 55 60
 45 Asn Gly Leu Gly Asn Glu Ala Asp Lys Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly
 65 70 75 80
 Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys
 85 90 95
 Gly Leu Glu Gly Leu Asn Lys Glu Ile Ala Glu Ala Lys Lys Cys Ser
 100 105 110
 50 Glu Ala Phe Thr Lys Lys Leu Gln Asp Ser Asn Ala Asp Leu Gly Lys
 115 120 125
 His Asn Ala Thr Asp Ala Asp Ser Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn
 130 135 140
 55 Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Leu Phe Lys Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Ala Leu Ser Asn Ser Val
 165 170 175
 60 Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 180 185 190

ES 2 421 885 T3

<210> 4
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Generada por ingeniería genética

<400> 4

10

```

Met Ser His His His His His His His His Ser Met Gly Asn Asn Ser
1      5      10
Gly Gly Asp Thr Ala Ser Thr Asn Pro Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro
20      25
Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val
35      40      45
Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Ile Ser Ser Ile Asp Glu Leu
50      55      60
Ala Lys Ala Ile Gly Gln Arg Ile Gln Gln Asn Gly Leu Val Ala Asp
65      70      75      80
Ala Gly His Asn Ser Ala Leu Leu Ala Gly Ala His Glu Ile Ser Ile
85      90      95
Leu Ile Thr Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Gly Leu Glu Gly Leu Lys
100     105     110
Ala Glu Ile Ala Glu Ala Lys Lys Tyr Ser Glu Ala Phe Thr Lys Lys
115     120     125
Leu Lys Asp Asn His Ala Gln Leu Gly Ile Gln Asn Gly Ala Ser Leu
130     135     140
Asp Asp Glu Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Val Asp Lys Thr
145     150     155     160
Lys Gly Ala Glu Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ser Val Glu Ser Leu
165     170     175
Ser Lys Ala Ala Gln Glu Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr
180     185     190
Asn Pro Val Val Ala Glu Thr Pro Lys Lys Pro
195     200
  
```

35

<210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Generada por ingeniería genética

<400> 5

45

1 Met Ser His His His His His His His His Ser Met Cys Asn Asn Ser
 5 Gly Gly Asp Thr Ala Ser Thr Asn Pro Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro
 10 Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val
 15 Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Ile Ser Ser Ile Asp Glu Leu
 20 Ala Lys Ala Ile Gly Gln Arg Ile Gln Gln Asn Gly Leu Val Ala Asp
 25 Ala Gly His Asn Ser Ala Leu Leu Ala Gly Ala His Glu Ile Ser Ile
 30 Leu Ile Thr Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Gly Leu Glu Gly Leu Lys
 35 Ala Glu Ile Ala Glu Ala Lys Lys Tyr Ser Glu Ala Phe Thr Lys Lys
 40 Leu Lys Asp Asn His Ala Gln Leu Gly Ile Gln Asn Gly Ala Ser Leu
 45 Asp Asp Glu Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Val Asp Lys Thr
 50 Lys Gly Ala Glu Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ser Val Glu Ser Leu
 55 Ser Lys Ala Ala Gln Glu Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr
 60 Asn Pro Val Val Ala Glu Thr Pro Lys Lys Pro
 65 195 200

<210> 6
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Borrelia garinii 20047

<400>6
 35 Cys Asn Asn Ser Gly Gly Asp Thr Ala Ser Thr Asn Pro Asp Glu Ser
 40 Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser
 45 Asn Ala Phe Val Leu Ala Val Lys Ala Glu Val Glu Ala Leu Ile Ser Ser
 50 Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Gln Arg Ile Gln Gln Asn Gly
 55 Leu Val Ala Asp Ala Gly His Asn Ser Ala Leu Leu Ala Gly Ala His
 60 Glu Ile Ser Ile Leu Ile Thr Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Gly Leu
 65 Glu Gly Leu Lys Ala Glu Ile Ala Glu Ala Lys Lys Tyr Ser Glu Ala
 70 Phe Thr Lys Lys Leu Lys Asp Asn His Ala Gln Leu Gly Ile Gln Asn
 75 Gly Ala Ser Leu Asp Asp Glu Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn
 80 Val Asp Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ser
 85 Val Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Gln Glu Ala Leu Thr Asn Ser Val
 90 Lys Glu Leu Thr Asn Pro Val Val Ala Glu Thr Pro Lys Lys Pro
 95 180 185 190

ES 2 421 885 T3

<210> 7
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Generada por ingeniería genética
 <400> 7

10

```

Met Ser His His His His His His His Ser Met Gly Asn Asn Ser
1      5      10
Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val Lys
      20      25      30
Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala
      35      40      45
Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp
      50      55      60
Glu Ile Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile His Gln Asn Asn Gly
65      70      75      80
    
```

20

```

Leu Asp Thr Glu Asn Asn His Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr
      85      90      95
Ala Ile Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn Glu
      100      105      110
Gly Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys Lys Cys Ser Glu Thr Phe
      115      120      125
Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Leu Gly Lys Glu Gly Val
      130      135      140
Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys
145      150      155      160
Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu Ser Val Glu Val
      165      170      175
Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu
35      180      185      190
Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
      195      200
    
```

35

<210> 8
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Generada por ingeniería genética
 <400> 8

45

1 Met Ser His His His His His His His His Ser Met Cys Asn Asn Ser
 5 Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val Lys
 10 Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala
 15 Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp
 20 Glu Ile Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile His Gln Asn Asn Gly
 25 Leu Asp Thr Glu Asn Asn His Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr
 30 Ala Ile Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn Glu
 35 Gly Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys Lys Cys Ser Glu Thr Phe
 40 Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Leu Gly Lys Glu Gly Val
 45 Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys
 50 Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu Ser Val Glu Val
 55 Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu
 60 Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 195 200

<210> 9
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Borrelia burgdorferi B31

<400>9

35 Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp
 40 Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr
 45 Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu
 50 Ser Ser Ile Asp Glu Ile Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile His
 55 Gln Asn Asn Gly Leu Asp Thr Glu Asn Asn His Asn Gly Ser Leu Leu
 60 Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly
 65 Leu Lys Asn Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys Lys Cys
 70 Ser Glu Thr Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Leu Gly
 75 Lys Glu Gly Val Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr
 80 Asn Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu
 85 Ser Val Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser
 90 Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 180 185 190

ES 2 421 885 T3

<210> 10
 <211> 609
 <212> ADN
 <213> Sintético

<400> 10

5	atgagccatc	atcatcatca	tcatcatcat	tccatgggta	ataattcagg	gaaaggtggg	60
	gatattgcat	ctactaatcc	tgatgagtct	gcgaaaggac	ctaattcttac	agaaataagc	120
	aaaaaaaaata	cagattccaa	tgacagttgta	ctagctgtga	aagaagttga	ggctttgctt	180
	tcatctatag	atgaacttgc	taaaactatt	ggtaaaaaaaa	tagaggcaaa	tggtttgggt	240
	aacgaagcgg	ataaaaaacgg	atcattatta	gcaggagcct	atgcaatc	aaccctaata	300
10	aaacaaaaat	tagatggatt	gaaaggtcta	gaaggattaa	ataaagaaat	tgcgagggcc	360
	aagaaatggt	ccgaagcatt	tactaaaaag	ctacaagata	gtaacgcaga	tcttgaaaa	420
	cataatgcta	ctgatgctga	ttcaaaaagaa	gcaattttga	aaacaaatgg	gactaaaact	480
	aagggtgcta	aagaacttga	agagttgttt	aatcagtag	aaagcttgtc	aaaagcagct	540
	aaagaagcat	taagtaattc	agttaaagag	cttacaagcc	ctgttgtggc	agaaagtcca	600
15	aaaaaacct						609

<210> 11
 <211> 609
 <212> ADN
 <213> Sintético

<400> 11

20	atgagccatc	atcatcatca	tcatcatcat	tccatgtgta	ataattcagg	gaaaggtggg	60
	gatattgcat	ctactaatcc	tgatgagtct	gcgaaaggac	ctaattcttac	agaaataagc	120
25	aaaaaaaaata	cagattccaa	tgacagttgta	ctagctgtga	aagaagttga	ggctttgctt	180
	tcatctatag	atgaacttgc	taaaactatt	ggtaaaaaaaa	tagaggcaaa	tggtttgggt	240
	aacgaagcgg	ataaaaaacgg	atcattatta	gcaggagcct	atgcaatc	aaccctaata	300
	aaacaaaaat	tagatggatt	gaaaggtcta	gaaggattaa	ataaagaaat	tgcgagggcc	360
	aagaaatggt	ccgaagcatt	tactaaaaag	ctacaagata	gtaacgcaga	tcttgaaaa	420
	cataatgcta	ctgatgctga	ttcaaaaagaa	gcaattttga	aaacaaatgg	gactaaaact	480
30	aagggtgcta	aagaacttga	agagttgttt	aatcagtag	aaagcttgtc	aaaagcagct	540
	aaagaagcat	taagtaattc	agttaaagag	cttacaagcc	ctgttgtggc	agaaagtcca	600
	aaaaaacct						609

<210> 12
 <211> 609
 <212> ADN
 <213> Sintético

<400> 12

35	atgagccatc	atcatcatca	tcatcatcat	tccatgggta	ataattcagg	tggggatact	60
	gcatctacta	atcctgatga	atctgttaag	gggcctaadc	ttacagaaat	aagcaaaaaa	120
	attacagatt	ctaatgcatt	tgtactggct	gtgaaagaag	ttgaggcttt	gatctcatct	180
	atagatgaac	ttgctaaagc	tatttgtcaa	agaatacaac	aaaatggttt	agttgctgat	240
	gcgggtcaca	acagcgcatt	gtagcagga	gcccatgaaa	tatcaatcct	aataacacaa	300
45	aaattagatg	gattaaaagg	tttagaagga	ttaaaagcag	agattgcaga	agctaagaaa	360
	tattctgaag	catttactaa	aaaactaaaa	gataatcatg	cacagcttgg	tatacagaat	420
	ggtgcttctc	ttgatgatga	ggcaaaaaaa	gctattttaa	aaacaaatgt	ggacaaaacc	480
	aagggtgctg	aagagcttga	aaagttatct	aatcagtag	aaagcttgtc	aaaagcagcg	540
	caagaagcac	taactaattc	agttaaagag	cttacaatc	ctgttgtggc	agaaactcca	600
50	aaaaaacct						609

<210> 13
 <211> 609
 <212> ADN
 <213> Sintético

<400> 13

ES 2 421 885 T3

5
10
atgagccatc atcatcatca tcatcatcat tccatgtgta ataattcagg tggggatact 60
gcatctacta atcctgatga atctgttaag gggcctaato ttacagaaat aagcaaaaaa 120
attacagatt ctaatgcatt tgtactggct gtgaaagaag ttgaggcttt gatctcatct 180
atagatgaac ttgctaaagc tattgggtcaa agaatacaac aaaatggttt agttgctgat 240
gcgggtcaca acagcgcatt gttagcagga gcccatgaaa tatcaatcct aataacacaa 300
aaattagatg gattaaaaag tttagaagga ttaaaagcag agattgcaga agctaagaaa 360
tattctgaag catttactaa aaaactaaaa gataatcatg cacagcttgg tatacagaat 420
gggtgcttctc ttgatgatga ggcaaaaaaa gctattttta aaacaaatgt ggacaaaacc 480
aagggtgctg aagagcttga aaagtatttt aatcagtag aaagcttgtc aaaagcagcg 540
caagaagcac taactaattc agttaaagag cttacaaatc ctgttgtggc agaaaactcca 600
aaaaaacct 609

<210> 14
<211> 612
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 14

20
25
atgagccatc atcatcatca tcatcatcat tccatgggta ataattcagg gaaagatggg 60
aatacatctg caaattctgc tgatgagtct gttaaagggc ctaatcttac agaaataagt 120
aaaaaaatta cggattctaa tgccggtttta cttgctgtga aagaggttga agcgttgctg 180
tcatctatag atgaaattgc tgctaaagct attggtaaaa aaatacacca aaataatggt 240
ttggataccg aaaataatca caatggatca ttgttagcgg gagcttatgc aatatcaacc 300
ctaataaaaac aaaaattaga tggattgaaa aatgaaggat taaaggaaaa aattgatgcg 360
gctaagaaat gttctgaaac atttactaat aaattaaaag aaaaacacac agatcttggg 420
aaagaaggtg ttactgatgc tgatgcaaaa gaagccattt taaaaacaaa tggactaaa 480
actaaaggtg ctgaagaact tggaaaatta tttgaatcag tagaggtctt gtcaaaaagca 540
gctaaagaga tgcttgctaa ttcagttaaa gagcttacia gccctgttgt ggcagaaagt 600
ccaaaaaaac ct 612

30
<210> 15
<211> 612
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 15

35
40
45
atgagccatc atcatcatca tcatcatcat tccatgtgta ataattcagg gaaagatggg 60
aatacatctg caaattctgc tgatgagtct gttaaagggc ctaatcttac agaaataagt 120
aaaaaaatta cggattctaa tgccggtttta cttgctgtga aagaggttga agcgttgctg 180
tcatctatag atgaaattgc tgctaaagct attggtaaaa aaatacacca aaataatggt 240
ttggataccg aaaataatca caatggatca ttgttagcgg gagcttatgc aatatcaacc 300
ctaataaaaac aaaaattaga tggattgaaa aatgaaggat taaaggaaaa aattgatgcg 360
gctaagaaat gttctgaaac atttactaat aaattaaaag aaaaacacac agatcttggg 420
aaagaaggtg ttactgatgc tgatgcaaaa gaagccattt taaaaacaaa tggactaaa 480
actaaaggtg ctgaagaact tggaaaatta tttgaatcag tagaggtctt gtcaaaaagca 540
gctaaagaga tgcttgctaa ttcagttaaa gagcttacia gccctgttgt ggcagaaagt 600
ccaaaaaaac ct 612

50
<210> 16
<211> 31
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 16

tagaccatgg gtaataattc agggaaaggt g 31

55
<210> 17
<211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 17

gcagagtgcc tcgagttaag gtittttgg actttctgcc ac 42

<210> 18
 <211> 43
 <212> ADN
 5 <213> Sintético

 <400> 18
atatgtctc ccatgtgcaa taattcaggg aaagtgggg ata 43

 <210> 19
 10 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Sintético

 <400> 19
atatgtctc ccatgggtaa taattcaggt ggggatactg catc 44
 15

 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Sintético
 20 <400> 20
atactogagt taaggtttt ttggagttc tgccac 36

 <210> 21
 <211> 44
 <212> ADN
 25 <213> Sintético

 <400> 21
atatgtctc ccatgtgtaa taattcaggt ggggatactg catc 44

 <210> 22
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Sintético

 <400> 22
tagaccatgg gtaataattc agggaaagat ggg 33

 <210> 23
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Sintético
 35

 <400> 23
atatgtctc ccatgtgcaa taattcaggg aaagatggga atac 44
 40

 <210> 24
 <211> 5287
 <212> ADN
 <213> Sintético

 <400> 24
 45

ES 2 421 885 T3

	ggggaattgt	gagcggataa	caattccoct	ctagaaataa	ttttgtttaa	ctttaagaag	60
	gagatatacc	atgagccatc	atcatcatca	tcacatcat	tccatggoga	tatccctcga	120
	gtaagtcgag	caccaccacc	accaccactg	agatccggct	gctaacaaag	cccgaagga	180
	agctgagttg	gctgctgcca	ccgctgagca	ataactagca	taacccttg	gggcctctaa	240
5	acgggtcttg	aggggttttt	tgctgaaagg	aggaactata	tccggattgg	cgaatgggac	300
	gcgccctgta	gcggcgcat	aagcgcggcg	gggtgtgggtg	ttacgcgcag	cgtgaccgct	360
	acacttgcca	gcgccctagc	gcccgcctct	ttegttttct	tccttctct	tctcgccacg	420
	ttegcggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	ccgatttagt	480
	gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattagggtg	atggttcacg	tagtgggcca	540
	tcgccctgat	agacggtttt	tcgccctttg	acgttgaggt	ccacgttctt	taatagtggg	600
10	ctcttgttcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	tgattataaa	660
	gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggta	aaaaatgagc	tgatttaaca	aaaatttaac	720
	gcgaatttta	acaaaatatt	aacgtttaca	atctcaggtg	gcacttttcg	gggaaatgtg	780
	cgcggaacce	ctatttgttt	atcttcttaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaat	840
	taattcttag	aaaaactcat	cgagcatcaa	atgaaactgc	aatttattca	tatcaggatt	900
15	atcaatacca	tatttttgaa	aaagccggtt	ctgtaatgaa	ggagaaaact	caccgaggca	960
	gttccatagg	atggcaagat	cctggtatcg	gtctgcgatt	ccgactcgtc	caacatcaat	1020
	acaacctatt	aatttcccct	cgtcaaaaat	aagggttatca	agtgagaaat	caccatgagt	1080
	gacgaactgaa	tccggtgaga	atggcaaaaag	tttatgcatt	tctttccaga	cttgttcaac	1140
	aggccagcca	ttacgctcgt	catcaaaaatc	actcgcacat	accaaaccgt	tattcattcg	1200
20	tgattgcgcc	tgagcgagac	gaaatacggg	atcgtctgta	aaaggacaat	tacaaacagg	1260
	aatcgaatgc	aaccggcgca	ggaacactgc	cagcgcatca	acaatatttt	cacctgaatc	1320
	aggatattct	tctaatacct	ggaatgctgt	tttcccgggg	atcgcagtgg	tgagtaacca	1380
	tgcatcatca	ggagtacgga	taaaatgctt	gatggtcggg	agaggcataa	attccgtcag	1440
	ccagtttagt	ctgaccatct	catctgtaac	atcattggca	acgctacctt	tgccatgttt	1500
25	cagaaacaac	tctggcgcat	cgggcttccc	atacaatcga	tagattgtcg	cacctgattg	1560
	cccgaacatta	tcgcgagccc	atctataccc	atataaatca	gcacccatgt	tggaaattta	1620
	tcgcggccta	gagcaagacg	tttcccgttg	aatatggctc	ataacacccc	ttgtattact	1680
	gtttatgtaa	gcagacagtt	ttattgttca	tgaccaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	1740
	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	ccttttttct	1800
	tcgcgcgtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcgggtg	gtttgtttgc	1860
30	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	1920
	caaatactgt	ccttcttagt	tagccgtagt	tagggcacca	cttcaagaac	tctgtagcac	1980

	cgctacata	cctcgtctctg	ctaactcctgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	2040
	cgtgtcttac	cggttggac	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	cggtcgggct	2100
	gaacggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	2160
	acctacagcg	tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaa	gcgacaggt	2220
5	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	2280
	cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggttcc	gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	2340
	gatgctcgtc	agggggcg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	2400
	tcctggcctt	ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	tgcttatcc	cctgattctg	2460
	tggataaccg	tattaccgcc	tttgagtgg	ctgataccgc	tcgccgcagc	cgaaacgaccg	2520
10	agcgcagcga	gtcagtgagc	gaggaagcgg	aagagcgct	gatgcggtat	tttctcctta	2580
	cgcatctgtg	cggtatttca	caccgcatat	atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	2640
	tgccgcatag	ttaagccagt	atacactccg	ctatcgctac	gtgactgggt	catggctgcg	2700
	ccccgacacc	cgccaacacc	cgctgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	2760
	gcttacagac	aagctgtgac	cgctccggg	agctgcatgt	gtcagaggtt	ttcaccgtca	2820
	tcaccgaaac	gcgcgaggca	gctgcggtaa	agctcatcag	cgaggctcgt	aagcgattca	2880
15	cagatgtctg	cctgttcac	cgctccagc	tcggtgagtt	tctccagaag	cgtaaatgtc	2940
	tggcttctga	taaagcgggc	catgtaagg	gcggtttttt	cctggttgg	cactgatgcc	3000
	tccgtgtaag	gggtatttct	gttcatggg	gtaatgatac	cgatgaaacg	agagaggatg	3060
	ctcacgatac	gggttactga	tgatgaacat	gcccggttac	tggaaacgtt	tgagggtaaa	3120
	caactggcgg	tatggatgcg	gcgggaccag	agaaaaatca	ctcagggtca	atgccagcgc	3180
20	ttcgtaata	cagatgtagg	tgttccacag	ggtagccagc	agcatcctgc	gatgcagatc	3240
	cggaacataa	tggtgcaggg	cgctgacttc	cgctttcca	gactttacga	aacacggaaa	3300
	ccgaagacca	ttcatgttgt	tgctcaggtc	gcagacggtt	tgacgagca	gtcgttccac	3360
	gttcgctcgc	gtatcgggtg	ttcattctgc	taaccagtaa	ggcaaccccc	ccagcctagc	3420
	cggttctca	acgacaggag	cacgatcatg	cgcaaccctg	gggcccgcct	gcccggcagata	3480
	atggcctgct	tctcgcgaa	acgtttggg	gcgggaccag	tgacgaaggc	ttgagcgagg	3540
25	gcgtgcaaga	ttccgaatac	cgcaagcgac	aggccgatca	tcgtcgcgct	ccagcgaaag	3600
	cggtcctcgc	cgaaaatgac	ccagagcgct	gcccggcacct	gtcctacgag	ttgcatgata	3660
	aagaagacag	tcataagtgc	ggcgacgata	gtcatgcccc	gcgcccaccg	gaaggagctg	3720
	actgggttga	aggtctctcaa	gggcatcggg	cgagatcccc	gtgcctaatt	agtgagctaa	3780
	cttacattaa	ttgctgtg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	3840
	ctgcattaat	gaatcgccca	acgcgcgggg	agaggcgggt	tgctgattgg	gcccagggt	3900
	ggttttctt	ttcaccagt	agacgggcaa	cagctgattg	cccttaccg	ctgagcctg	3960
	agagagttgc	agcaagcggg	ccacgctggg	ttgccccagc	aggcgaaaat	cctgtttgat	4020
	ggtggttaac	ggcgggat	aacatgagct	gtcttcggta	tcgtcgtatc	ccactaccga	4080
	gatatccgca	ccaacgcgca	gcccggactc	ggtaatggcg	cgcttgcgc	ccagcgcct	4140
30	ctgatcgttg	gcaaccagca	tcgcagtggg	aacgatgccc	tcattcagca	ttgcatggg	4200
	ttgttgaana	ccggacatgg	cactccagtc	gccttcccgt	tcgctatcg	gctgaatttg	4260
	attgagagtg	agatatttat	gccagccagc	cagacgcaga	cgcccgaga	cagaactta	4320
	tggcccgcct	aacagcgcga	tttgctggg	acccaatg	accagatgct	ccacgcccag	4380
	tcgctaccg	tcttcatggg	agaaaataat	actgttgatg	ggtgtctggg	cagagacatc	4440
	aagaaataac	gcccgaacat	tagtgcaggc	agcttccaca	gcaatggcat	cctggtcatc	4500
	cagcggatag	ttaatgatca	gcccactgac	gcgttgcgcg	agaagattgt	gcaccgccc	4560
	tttacaggct	tcgacgccc	ttcgtctac	catcgacacc	accacgctgg	caccagttg	4620
	atcggcgcga	gatttaatcg	ccgcgacaat	ttgcgacggc	gcgtgcaggg	ccagactgga	4680
35	ggtggcaacg	ccaatcagca	acgactggtt	gcccgcagct	tggttgcca	cgcggttggg	4740
	aatgtaattc	agctccgcca	tcgcccgttc	cacttttcc	cgcttttcc	cagaaacgtg	4800
	gctggcctgg	ttcaccacgc	gggaaacggg	ctgataagag	acaccggcat	actctgcgac	4860
	atcgtataac	gttactgggt	tcacattcac	caccctgaat	tgactctctt	ccgggcgcta	4920
	tcatgccata	ccgcgaaagg	ttttgcgcca	ttcgatggg	tcgggatct	cgacgctctc	4980
	ccttatgcga	ctcctgcatt	aggaagcagc	ccagtagtag	ggtgagggcc	ttgagcaccg	5040
	ccgccgcaag	gaatggtgca	tgcaaggaga	tgccgccc	cagtcccccg	gccacggggc	5100
	ctgccaccat	acccacgccc	aaacaagcgc	tcatgagccc	gaagtggcga	gcccgatctt	5160
	ccccaccggt	gatgtcggcg	atataggcgc	cagcaaccgc	acctgtggcg	ccggtgatgc	5220
40	cgccacgat	gcgtcggcg	tagaggatcg	agatctcgat	cccgcgaaat	taatacgact	5280
	caactata						5287

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína que comprende un primer polipéptido de OspC, caracterizada porque el primer polipéptido de OspC está unido a través de un puente disulfuro con un segundo polipéptido de OspC, formándose el puente disulfuro por unión de una cisteína que no está alejada más de 100 posiciones de aminoácidos del extremo N-terminal del polipéptido de OspC, presentando el primer y el segundo polipéptido de OspC una identidad de aminoácidos de al menos el 70% con la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9.
2. Proteína conforme a la reivindicación 1, caracterizada porque el primer y/o el segundo polipéptido de OspC presenta una identidad de aminoácidos de al menos el 90% con la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9 y es reconocido específicamente por anticuerpos contra OspC de Borrelia.
- 10 3. Proteína conforme a la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque el primer y/o el segundo polipéptido de OspC comprende al menos un epítipo que es reconocido específicamente por anticuerpos contra OspC de Borrelia, comprendiendo el epítipo al menos una secuencia parcial de 10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9.
- 15 4. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el primer y/o el segundo polipéptido de OspC C-terminal presenta una de las secuencias de aminoácidos según SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9.
5. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el primer y/o el segundo polipéptido de OspC no presenta ninguna secuencia de reconocimiento para una acilación.
- 20 6. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el puente disulfuro se forma por unión de una cisteína que no está alejada más de 30 posiciones de aminoácidos del extremo N-terminal del primer y/o del segundo polipéptido de OspC.
7. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque el primer y/o el segundo polipéptido de OspC C-terminal presenta una secuencia según SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6.
8. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque mediante el puente disulfuro se forma un homodímero de dos polipéptidos de OspC iguales o un heterodímero de distintos polipéptidos de OspC.
- 25 9. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque el reconocimiento del polipéptido por anticuerpos contra OspC de Borrelia se reduce al ponerlo en contacto con al menos un reactivo que contenga tiol, dado el caso en combinación con un haluro de alquilo.
- 30 10. Procedimiento para la detección de anticuerpos contra una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se pone en contacto una muestra biológica con la proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9 y se detecta la unión de anticuerpos a la proteína.
11. Procedimiento para el diagnóstico de una infección por Borrelia, caracterizado porque se pone en contacto una muestra biológica de un paciente con una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9 y se detecta la unión de anticuerpos a la proteína, indicando una detección de la unión de anticuerpos una infección por Borrelia.
- 35 12. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque la unión de los anticuerpos se detecta con un ensayo de inmunofluorescencia, ELISA, ensayo de luminiscencia, transferencia de Western, transferencia por líneas o transferencia por puntos.
13. Kit para el diagnóstico de una infección por Borrelia que comprende una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 14. Uso de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de una vacuna contra una infección por Borrelia.
15. Vacuna contra una infección por Borrelia que comprenda una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9.

Fig. 1

CLUSTAL 2.0.10 alineamiento de secuencia múltiple

```

VS461  CNNSGKGGDIASNPDESAGPNLTEISKKITDSNAVVLAVKEVEALLSSIDELA-KTIG 59
B31    CNNSGKDGNTSANSADSVKGNLTEISKKITDSNAVLLAVKEVEALLSSIDEIAAKAIG 60
20047  CNNSG--GDTASTNPDESVKGNLTEISKKITDSNAFVLAVKEVEALISSIDELA-KAIG 57
***** *: ::...**.******.::*****;*****:* *:**

VS461  KKIEAN-GLGNEADKNGSLLAGAYAISTLIKQKLDGLKGLEGLNKEIAEAKKCSEAFTHK 118
B31    KKIHQNGLDTENNHNGLSLLAGAYAISTLIKQKLDGLK-NEGLKEKIDAAKKCSETFTNK 119
20047  QRIQQN-GLVADAGHNSALLAGAHEISILITQKLDGLKGLEGLKAEIAEAKKYSEAFTHK 116
::*. * ** : :.*:*****: ** *.***** ***: :* *** **:***:

VS461  LQDSNADLGKHN--ATDADSKEAILKTNGTKTKGAKELEELFKSVESLSKAAKEALSNSV 176
B31    LKEKHTDLGKEG--VTDADAKEAILKTNGTKTKGAEELGKLFESVEVLSKAAKEMLANSV 177
20047  LKDNHAQLGIQNGASLDDEAKKAILKTNVDKTKGAELEKLFKSVESLSKAAQEALTNSV 176
*:::..: ** .. * :*:***** *****:* *:*:* ***:*** ***:***

VS461  KELTSPVVAESPCKP 191
B31    KELTSPVVAESPCKP 192
20047  KELTNPVVAETPKKP 191
*****.*****:*****
    
```

SecA	Nombre	Long (aa)	SecB	Nombre	Long (aa)	Puntuación
1	VS461	195	2	B31	195	76
1	VS461	195	3	20047	195	76
2	B31	195	3	20047	195	70

Fig. 2

