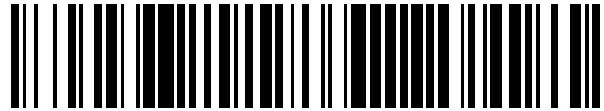


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 407**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10763762 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2470908**

54 Título: **Proteínas utilizadas para el diagnóstico de una borreliosis de Lyme**

30 Prioridad:

28.08.2009 FR 0904094

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

30.10.2013

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

**LEVET, LIONEL y
MEJAN-LETOURNEUR, ODILE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 427 407 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

Proteínas utilizadas para el diagnóstico de una borreliosis de Lyme

5 La borreliosis de Lyme (LB) es una enfermedad infecciosa no contagiosa, debida a una espiroqueta llamada *Borrelia burgdorferi*, transmitida al hombre por una picadura de la garrapata del género *Ixodes*. La LB, sin tratamiento, conduce a diversos problemas patológicos (dermatológicos, artríticos, cardíacos, neurológicos y a veces oculares). Es la enfermedad transmitida por vector más común en los EE.UU. y en algunos países templados del hemisferio norte.

10 Varias especies de *Borrelia*, actualmente denominadas con el término de grupo burgdorferi o *Borrelia burgdorferi* en sentido amplio (que incluyen *Borrelia burgdorferi* en sentido estricto, *B. garinii* y *B. afzelii*) están implicadas en esta infección. Estas especies son patógenas para el hombre.

En Estados Unidos, la especie infecciosa implicada es *Borrelia burgdorferi* en sentido estricto. En Europa a esta especie se le añaden *B. garinii* y *B. afzelii*. En Asia, las especies implicadas son *B. garinii* y *B. afzelii*.

En estados Unidos hay declarados alrededor de 10.000 casos. En Europa las tasas de incidencia varían en menos de 5 por 100.000.

15 La borreliosis de Lyme evoluciona pasando por tres fases distintas, de la infección precoz a la fase tardía. La fase precoz (fase I) puede ser asintomática o traducirse en un cuadro pseudogripal. En el 50-80% de los casos se observa la aparición de una erupción cutánea inflamatoria, varios días después de la picadura de la garrapata, de aspecto muy particular, llamada eritema migratorio (EM). En ausencia de tratamiento, la diseminación de *Borrelia* por vía sanguínea se traduce varias semanas después en artritis inflamatorias sobrevenidas, afecciones neurológicas (neuroborreliosis) y meníngeas, manifestaciones cutáneas y cardíacas (fase II). Después de varios meses o años, la enfermedad evoluciona hacia una forma crónica atrófica, encefalopatía, encefalomiелitis y artritis crónica (fase III).

20 Existe un tropismo orgánico particular de cada una de las especies de *Borrelia burgdorferi*. Si la primera fase de eritema migratorio está ligada indistintamente a las tres especies, la evolución hacia una forma neurológica está asociada de forma preferente a la especie *B. garinii*, las artritis más bien a *B. burgdorferi* en sentido estricto, y la acrodermatitis crónica atrófica es específica de *B. afzelii*.

25 La similitud de los síntomas clínicos de la borreliosis de Lyme y de otras enfermedades no relacionadas, así como la variabilidad de las manifestaciones, hacen difícil el diagnóstico clínico. El diagnóstico de la borreliosis puede ser particularmente difícil basándose en las observaciones clínicas, si están ausentes las pruebas de anamnesis (picadura de garrapata o EM). La fase precoz de la enfermedad puede no ser aparente hasta el momento en el que alcanza las fases clínicas más avanzadas.

Debido a esto, el diagnóstico de la LB se basa en signos clínicos y también en la detección de los anticuerpos específicos de patógenos de *Borrelia burgdorferi* en el suero, con más frecuencia por ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas) o también EIA, IFA.

35 En Europa la evaluación de la respuesta serológica es complicada debido a la existencia de tres especies patógenas y a la variabilidad entre especies para los antígenos inmunodominantes principales. Los antígenos usados actualmente de forma rutinaria para la detección de las IgG e IgM de LB son de muestras celulares de *Borrelia burgdorferi* en sentido amplio tratadas con ultrasonidos. Los resultados de los ensayos serológicos con estos antígenos en términos de especificidad y de sensibilidad son muy variables. Así pues, debido a una especificidad insuficiente, que implica reactividades cruzadas con anticuerpos asociados a bacterias patógenas, en particular *Treponema pallidum* (agente etiológico de la sífilis), garrapatas, *rickettsias*, *erlichia* o *Helicobacter pylori*, el diagnóstico de las muestras positivas ensayadas por ELISA debe confirmarse por inmunotransferencia. La sensibilidad también es un factor principal. En efecto, *Borrelia burgdorferi* en sentido amplio expresa diferentes proteínas de superficie por adaptación a diversos microentornos, de modo que la diversidad genética y la expresión diferencial de los genes de *Borrelia burgdorferi* en los pacientes tienen implicaciones importantes para el desarrollo de los ensayos serológicos de LB.

45 Por lo tanto, era necesario desarrollar un kit que palie los inconvenientes citados antes y que más en particular responda a los criterios de especificidad y de sensibilidad esperados.

50 La proteína VlsE (surface expressed lipoprotein with Extensive antigenic Variation) es expresada principalmente in vivo, de forma transitoria y rápidamente después de infección del hospedante. Es muy inmunogénica en el hospedante infectado, implicando la producción de IgG e IgM. El locus de Vls está localizado en un plásmido lineal de 28 kb (lp28-1) presente en las tres genoespecies de borrelia responsables de Lyme y compuesto de casetes silenciosos y de un sitio de expresión (VlsE). In vivo, se producen recombinaciones aleatorias entre casetes de expresión y casetes silenciosos en el transcurso de la infección y son el origen de la variabilidad antigénica de VlsE. La proteína VlsE está compuesta de seis regiones variables VR1-VR6, situadas en la superficie de la proteína VlsE, espaciadas por regiones invariables IR1-IR6.

55

Es conocido que las proteínas VlsE presentan una heterogeneidad importante inter e intraespecies. En 2004, Göttner et al. [1] describieron una identidad de aproximadamente 47 a 58% a nivel proteico de VlsE procedente de cuatro cepas.

5 El documento US2009/0162875 describe proteínas quiméricas que comprenden la región IR6 de VlsE para el diagnóstico de una borreliosis.

Para paliar los problemas de sensibilidad y especificidad citados antes, los autores de la invención han producido una proteína quimérica de Borrelia que comprende al menos una secuencia del dominio extracelular de una proteína VlsE de una primera especie de Borrelia que corresponde a una cepa determinada y al menos una secuencia de una región IR6 de una proteína VlsE de una segunda especie de Borrelia o de la primera especie de Borrelia pero que
10 corresponde a una cepa diferente de la de la primera especie, comprendiendo dicha proteína quimérica (o que consiste esencialmente en o incluso que consiste en):

15 - la secuencia del dominio extracelular de la proteína VlsE de la primera especie de Borrelia que está compuesta de 5 regiones variables VR1, VR2, VR3, VR4 y VR5, y de 6 regiones invariables IR1, IR2, IR3, IR4, IR5 y IR6, seleccionándose dicha al menos una secuencia del dominio extracelular del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5, o una variante de una de dichas secuencias SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 y 5, presentando dicha variante una identidad de al menos 50% (preferiblemente identidad de al menos 60% o al menos 70% y ventajosamente una identidad de al menos 80% o al menos 85%) con las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un inmunocomplejo con los anticuerpos producidos después de una infección por Borrelia, y

20 - la al menos una secuencia de la región IR6 de la segunda especie de Borrelia o de la primera especie de Borrelia pero que corresponde a una cepa diferente de la de la primera especie, se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 o una variante de una de dichas secuencias de SEQ ID NO 6, 7 y 8, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% (preferiblemente una identidad de al menos 85% y ventajosamente de al menos 90%) con las SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, con la condición de que la variante de dicha secuencia sea capaz de formar un inmunocomplejo con los anticuerpos producidos después de una infección por Borrelia.

25 La proteína quimérica identificada más arriba puede comprender además una secuencia variable VR6 de una especie de Borrelia, identificándose esta secuencia en la SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias.

Una proteína quimérica preferida comprende (o consiste esencialmente en o consiste en):

30 - la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 1, presentando dicha variante una identidad de al menos 50% (preferiblemente una identidad de al menos 60% o al menos 70% y ventajosamente una identidad de al menos 80% o al menos 85%) con la SEQ ID NO: 1,

- la secuencia SEQ ID NO: 6 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 6, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% (preferiblemente de al menos 85% y ventajosamente una identidad de al menos 90%) con la SEQ ID NO: 6,

35 - la secuencia SEQ ID NO: 7 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 7, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% (preferiblemente de al menos 85% y ventajosamente una identidad de al menos 90%) con la SEQ ID NO: 7,

40 - la secuencia SEQ ID NO: 8 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 8, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% (preferiblemente de al menos 85% y ventajosamente una identidad de al menos 90%) con la SEQ ID NO: 8,

- y opcionalmente, la secuencia variable VR6 identificada en la SEQ ID NO: 9.

Así pues, una de las proteínas quiméricas de la invención comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia SEQ ID NO: 1, la secuencia SEQ ID NO: 6, la secuencia SEQ ID NO: 7 y la secuencia SEQ ID NO: 8, incluso además la secuencia SEQ ID NO: 9.

45 Las proteínas quiméricas de la invención se identifican en particular como que comprenden (o consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23; siendo la proteína más preferida la que comprende o que consiste en una secuencia identificada en la SEQ ID NO: 20 en la lista de secuencias.

50 La SEQ ID NO: 1: corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. garinii* (cepa pBi) con corte de su secuencia señal (aa 1-19) y la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6, es decir, que este dominio extracelular está compuesto de las regiones IR1, VR1, IR2, VR2, IR3, VR3, IR4, VR4, IR5, VR5 y IR6 de *B. garinii* (cepa pBi).

La SEQ ID NO: 2: corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. garinii* (cepa pBr) con corte de su secuencia señal y la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6, es decir, que este

dominio extracelular está compuesto de las regiones IR1, VR1, IR2, VR2, IR3, VR3, IR4, VR4, IR5, VR5 y IR6 de *B. garinii* (cepa pBr).

5 La SEQ ID NO: 3: corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. garinii* (cepa pLi) con corte de su secuencia señal y la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6, es decir, que este dominio extracelular está compuesto de las regiones IR1, VR1, IR2, VR2, IR3, VR3, IR4, VR4, IR5, VR5 y IR6 de *B. garinii* (cepa pLi).

10 La SEQ ID NO: 4: corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. afzelii* (cepa pKo) con corte de su secuencia señal y la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6, es decir, que este dominio extracelular está compuesto de las regiones IR1, VR1, IR2, VR2, IR3, VR3, IR4, VR4, IR5, VR5 y IR6 de *B. afzelii* (cepa pKo).

La SEQ ID NO: 5: corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. burgdorferi* en sentido estricto (cepa B31) con corte de su secuencia señal y la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6, es decir, que este dominio extracelular está compuesto de las regiones IR1, VR1, IR2, VR2, IR3, VR3, IR4, VR4, IR5, VR5 y IR6 de *B. burgdorferi* (cepa B31).

15 La SEQ ID NO: 6 corresponde a la secuencia del dominio IR6 de *B. burgdorferi* en sentido estricto (cepa B31).

La SEQ ID NO: 7 corresponde a la secuencia del dominio IR6 de *B. afzelii* (cepa ACA-1).

La SEQ ID NO: 8 corresponde a la secuencia del dominio IR6 de *B. garinii* (cepa Ip90).

La SEQ ID NO: 9 corresponde a la secuencia de la región variable VR6 de *B. burgdorferi* en sentido estricto (cepa B31). Esta secuencia se puede introducir en la construcción como brazo espaciador entre los dominios IR6.

20 Se puede añadir una secuencia de al menos 6 histidinas (cola de polihistidina identificada en la SEQ ID NO: 10, codificada por una cualquiera de las secuencias nucleicas identificadas en las SEQ ID NO: 11, 12 y 13, a nivel del extremo N-terminal o C-terminal de la proteína, para permitir su purificación en resina de metal-quelato, así como aminoácidos adicionales representados en la SEQ ID NO: 14 y codificados por la secuencia SEQ ID NO: 15 situada más arriba de la cola de polihistidina. En esta configuración, la proteína comprende o consisten en una secuencia
25 identificada como SEQ ID NO: 21. Alternativamente, se puede poner una secuencia de 8 histidinas representada en la SEQ ID NO: 16 y codificada por la SEQ ID NO: 17 en posición N-terminal de la proteína en el sitio de la secuencia de 6 histidinas, lo que permite estabilizar el anclaje de la proteína recombinante en la resina de metal-quelato y mejorar las condiciones de purificación, así como aminoácidos adicionales representados en la SEQ ID NO: 18 y codificados por la secuencia SEQ ID NO: 19. En esta configuración, la proteína comprende o consiste en una
30 secuencia identificada como SEQ ID NO: 23.

Las proteínas preferidas de la invención son las identificadas como SEQ ID NO: 21 y 23, codificadas respectivamente por las secuencias SEQ ID NO: 22 y 24.

La invención tiene también como objeto las secuencias de ADN que codifican las proteínas como se han definido anteriormente y en particular las secuencias identificadas de SEQ ID NO: 22 y 24.

35 La invención también tiene como objeto un casete de expresión que está funcionalmente en una célula derivada de un organismo procariota (por ejemplo: *Escherichia coli*) o eucariota, tal como una levadura (por ejemplo: *Pichia*, *Schizosaccharomyces*) que permite la expresión del ácido nucleico descrito más arriba (ADN), cuando está situado bajo el control de los elementos que permiten su expresión, así como el vector que comprende dicho casete.

40 La proteína de la invención se puede usar en particular para el diagnóstico de una infección por Borrelia. Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para el diagnóstico in vitro de una borreliosis de Lyme en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero, sangre, plasma etc.), según el cual se pone en contacto la muestra biológica con al menos una proteína como se ha definido más arriba y se determina si hay formación de un inmunocomplejo entre dicha proteína y los anticuerpos de la muestra biológica (IgG y/o IgM), por ejemplo, por adición de al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada con cualquier marcador adecuado. Por
45 marcador se entiende un trazador capaz de generar una señal. Una lista no limitante de estos trazadores comprende enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo, por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes o colorantes; grupos de densidad electrónica detectables por microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas como la conductividad, por métodos de
50 amperometría o voltametría, o por mediciones de impedancia; grupos detectables por métodos ópticos como la difracción, resonancia de plasmón de superficie, variación del ángulo de contacto, o por métodos físicos como la espectroscopía de fuerza atómica, el efecto túnel, etc.; moléculas radiactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I . Preferiblemente, la proteína se inmoviliza sobre un soporte sólido que puede ser el cono de un aparato Vidas®, los pocillos de una placa de microvaloración, una partícula, un gel, etc.

55 En un modo de realización de la invención, la muestra se pone además en contacto con al menos una proteína de

fusión quimérica seleccionada de las descritas a continuación:

- (a) una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende (o consiste en) la secuencia SEQ ID NO: 25 y la secuencia SEQ ID NO: 26 o una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con la SEQ ID NO: 25 y una secuencia que presenta una identidad de al menos 50% con la SEQ ID NO: 26,
- 5 (b) una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende (o consiste en) la secuencia SEQ ID NO: 27 y la secuencia SEQ ID NO: 28 o una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con la SEQ ID NO: 27 y una secuencia que presenta una identidad de al menos 50% con la SEQ ID NO: 28,
- (c) una proteína, cuya secuencia de aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia seleccionada de:
- 10 (i) la secuencia SEQ ID NO: 29 y la secuencia SEQ ID NO: 31 o una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con la SEQ ID NO: 29 y una secuencia que presenta una identidad de al menos 50% con la SEQ ID NO: 31,
- (ii) la secuencia SEQ ID NO: 30 y la secuencia SEQ ID NO: 31 o una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con la SEQ ID NO: 30 y una secuencia que presenta una identidad de al menos 50% con la SEQ ID NO: 31,
- 15 (iii) la secuencia SEQ ID NO: 29, la secuencia SEQ ID NO: 30 y la secuencia SEQ ID NO: 31, o una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con la SEQ ID NO: 29, una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con la SEQ ID NO: 29 y una secuencia que presenta una identidad de al menos 50% con la SEQ ID NO: 31,
- 20 (d) una proteína, cuya secuencia de aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 32, 34, 36, o una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 33, 35, 37 y 38, descritas con más detalle más adelante.

Cada una de las proteínas identificadas más arriba comprende al menos una secuencia del dominio extracelular de una proteína DbpA de una especie de *Borrelia* seleccionada de *B. afzelii* (SEQ ID NO : 25), *B. burgdorferi* en sentido estricto (SEQ ID NO : 27) y *B. garinii* (grupo III: SEQ ID NO: 29) (grupo IV: SEQ ID NO: 30) o una secuencia que presenta una identidad de al menos 40% con dichas secuencias, y al menos una secuencia de una proteína OspC de *B. afzelii* (SEQ ID NO: 26), *B. burgdorferi* en sentido estricto (SEQ ID NO: 28) y *B. garinii* (SEQ ID NO: 31) o una secuencia que presenta una identidad de al menos 50% con dichas secuencias. Preferiblemente, la o las secuencias de DbpA están colocadas en el lado N-terminal de la proteína recombinante, y la secuencia OspC está colocada en el lado C-terminal de la proteína recombinante.

30 Como se ha descrito previamente, se puede añadir una secuencia de al menos 6 histidinas a nivel del extremo N-terminal o C-terminal de la proteína para permitir su purificación en resina de metal-quelato. La secuencia de 6 histidinas identificada en la SEQ ID NO: 10, está colocada preferiblemente en el lado N-terminal de la construcción. Pueden estar presentes aminoácidos adicionales secuencia arriba de la cola de poli-His, debido a la inserción en la secuencia de ADN codificante de una pequeña secuencia que permite facilitar la clonación de la secuencia de interés en el plásmido de expresión, por ejemplo, el patrón "MGRS" (SEQ ID NO: 14) codificado por

35 ATGAGGGGATCC (SEQ ID NO: 15).

Se puede introducir una región de unión entre cada una de las secuencias DbpA y OspC que componen una proteína recombinante quimérica. Este tipo de región corresponde a una región de espaciamento, flexible, que asegura una mejor accesibilidad de los potenciales anticuerpos a cada uno de los dominios. En general, es rica en aminoácidos Gly y Ser, aminoácidos descritos como que aportan flexibilidad en la estructura terciaria de la proteína. También se puede introducir en una secuencia de interés codificante un brazo de ADN (o conector) para favorecer la unión entre las secuencias que codifican dos proteínas de interés. Por ejemplo, el patrón "GSGG" (SEQ ID NO: 46) codificado por la secuencia GGTTCCGGGGT (SEQ ID NO: 47) que actúa como brazo de unión entre las proteínas DbpA grupo IV y OspC de *B. garinii*.

45 Los ejemplos de estas proteínas están representados por las SEQ ID NO: 33, 35, 37 y 38 en la lista de secuencias.

Las proteínas descritas más arriba e identificadas como las SEQ ID NO: 32 a 38 en la lista de secuencias son codificadas respectivamente por las correspondientes secuencias de ADN identificadas en las SEQ ID NO: 39 a 45.

La invención tiene también por objeto un kit para el diagnóstico in vitro de una borreliosis de Lyme, que comprende al menos una proteína VlsE quimérica tal como la descrita más arriba y opcionalmente al menos una proteína de fusión quimérica DbpA/OspC como se ha definido previamente, y preferiblemente comprende al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada con cualquier marcador adecuado que responda a las definiciones dadas previamente.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Preparación de construcciones plasmídicas que codifican las proteínas recombinantes quiméricas VlsE

Las secuencias de ADN que codifican las diferentes secuencias de la proteína están identificadas en la tabla 1.

Tabla 1: Origen de las secuencias

proteína	Especies de <i>B. burgdorferi</i> *Aislado ; **aminoácidos (aa) ; ***n° de acceso en GenBank		
	B. sentido estricto	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
VisE	-	-	*PBi; "aa 20-293; ***AJ630106 (GenScript Corp)
IR6	*B31; **aa 274-305; ***U76405 (GeneArt GmbH)	*ACA-1; **aa 172-188; ***U76405 (GeneArt GmbH)	*Ip90; **aa 167-191; ***AAN87834 (GeneArt GmbH)

5 Las secuencias se han optimizado para su expresión en *E. coli* usando GeneOptimizer™ y han sido sintetizadas respectivamente por GenScript corporation (Scotch Plains, NJ, EE.UU.) o GeneArt GmbH (Regensburg, Alemania).

10 Se han realizado modificaciones complementarias en el ADN, eliminaciones o asociaciones de diferentes secuencias mediante la PCR por ingeniería genética usando las técnicas de la PCR bien conocidas para el experto en la técnica, y descritas, por ejemplo, en Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989. Las secuencias de ADN se han ligado en el vector de expresión pMR [2] o pET-3d (Novagen®). Las construcciones plasmídicas y las correspondientes proteínas citadas en el ejemplo (bLYM110, bLYM125) están descritas en la tabla 2.

Tabla 2: Construcciones plasmídicas y proteínas correspondientes

Características de las proteínas recombinantes			Características de las construcciones plasmídicas	
Nombre	Marcador N-terminal	Secuencia de <i>B. burgdorferi</i>	Vector parental	Sitio de inserción en el vector de la secuencia inserto
bLYM110 SEQ ID NO: 21	6 x His	VisE <i>garii</i> pBi aa 20-293 + 3 IR6 [sentido estricto B21 aa 274-	pMR78	5'BamHI / 3'HindIII
bLYM125 SEQ ID NO: 23	8 x His	305 + <i>afzelii</i> ACA-1 aa 172-188 + <i>garii</i> Ip90 aa 167-191]	pET-3d	5'NcoI / 3'BamHI

Ejemplo 2: Expresión de las proteínas recombinantes del ejemplo 1 y purificación

15 Se usó una construcción plasmídica descrita en el ejemplo 1 para transformar una bacteria *E. coli* (cepa BL21) según un protocolo clásico conocido por el experto en la materia. Las bacterias transformadas se seleccionaron por su resistencia a la ampicilina que portan el vector pMR o pET.

20 Después se seleccionó un clon de bacteria recombinante para sembrar un precultivo de 40 ml de medio 2xYT (triptona 16 g/l; extracto de levadura 10 g/l; NaCl 5 g/l, pH 7,0) que contenía ampicilina 100 µg/ml. Después de 15 a 18 h de incubación a 30°C con agitación a 250 rpm, se usó este precultivo para sembrar 1 litro de medio 2xYT que contenía 2% de glucosa y ampicilina 100 µg/ml. Este cultivo se incubó a 30°C con agitación a 250 rpm hasta que la DO a 600 nm alcanzó 1,0/1,2. El cultivo se mantuvo durante 3 h 30 min, o 4 h a 30°C añadiendo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM y se recogió por centrifugación a 6000 g durante 30 min. El sedimento celular se almacenó a -60°C. Para la purificación, la biomasa húmeda se volvió a suspender en un tampón de lisis que contenía inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y nucleasa benzonasa (Novagen®) y se sometió a una rotura celular a 1,6 kbar en un destructor de células (Constant System Ltd, Daventry, Reino Unido). Después, el lisato se centrifugó a 10.000 rpm durante 45 min a 2-8°C. Después de filtración sobre un filtro de 0,22 µm, se cargó el líquido sobrenadante en una columna NiNTA (Quiagen®) equilibrada en un tampón de lisis. Después la resina se lavó con el mismo tampón hasta que la A_{280nm} alcanzó la línea base. Se llevó a cabo una elución con el tampón de elución y la proteína purificada se dializó en un casete Pierce de diálisis Slide-A-Lyser® 10000 o 20000 MWCO (corte de exclusión de peso molecular) frente al tampón de diálisis. Las condiciones de purificación en el gel de Ni-NTA se describen en la tabla 3.

25

30

Tabla 3: purificación de las proteínas recombinantes

Proteína	bLYM110 SEQ ID NO: 21	bLYM125 SEQ ID NO: 23
Tampón de lisis y de lavado	Tampón A ¹	Tampón A ¹ + Urea 2 M
Tampón de elución	Tampón B ²	Tampón B ² modificado con imidazol 600 mM
Etapa de elución 1	86% de Tampón A + 14% de Tampón B (4CV)	92% de Tampón A + 8% de Tampón B (4CV)
Etapa de elución 2	100% de Tampón B	100% de Tampón B
Rendimiento de purificación mg de proteína / g de biomasa húmeda	0,5	0,8
Rendimiento de purificación mg de proteína / litro de cultivo	8,7	17
¹ Fosfato sódico 50 mM, Imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0,1%, Glicerol al 5%, pH = 7,8		
² Fosfato sódico 50 mM, Imidazol 325 mM, NaCl 500 mM, Glicerol al 5%, pH = 7,5		

5 Las muestras se analizaron con NuPAGE® Novex® 4-12% en un tampón de circulación NuPAGE® MES-SDS, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen™). Las proteínas o bien se tiñeron con azul brillante de Coomassie o bien se transfirieron por electroforesis sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% (p/v) en PBS y se incubó con un anticuerpo anti-pentahistidina (Qiagen®) en PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Se usó un conjugado de IgG de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch laboratories) en PBS/Tween como anticuerpo secundario.

10 La determinación de la concentración de proteínas se realizó usando el kit de ensayo de Bradford (Pierce Coomassie Plus, Perbio Science) con BSA como referencia proteica.

Ejemplo 3: Detección de las IgG y las IgM humanas con la proteína recombinante quimérica bLYM110 del ejemplo 2 por una técnica de inmunotransferencia en línea

La proteína recombinante se depositó sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF, Immobilon, Millipore®, Bedford, Mass. EE.UU.) según el siguiente protocolo:

15 La concentración de proteína se ajustó a 1 mg/ml en PBS a pH 7,2, y se diluyó en PBS a pH 7,2 con Tween 20 al 0,03% (dilución 1/200) añadido. La membrana de PVDF se humidificó en metanol, se lavó en agua desmineralizada y se puso sobre un papel de transferencia húmedo. Se sumergió una regla de plástico en la dilución de proteínas y se fijó sobre la membrana de PVDF. Tras el depósito de las proteínas y secado de las membranas, las membranas se cortaron verticalmente en bandas. Antes de usarlas, las bandas se incubaron con gelatina al 5% en TBS a pH 7,5 durante 1 h a 37°C. Los protocolos de inmunotransferencia se realizaron a temperatura ambiente como describen Bretz A.G. et al. [3]. Las bandas se incubaron durante 2 h con sueros humanos diluidos a 1/200 en TBS con gelatina al 1%, se lavaron y se incubaron con las IgG o IgM anti-humanas marcadas con fosfatasa alcalina (Sigma™, St-Louis, EE.UU.) diluidas a 1/1000 en TBS con gelatina al 1%. Después de lavado, las bandas se incubaron con el sustrato BCIP-NBT (KPL, Gaithersburg, MD, EE.UU.) durante 30 min, se lavaron con agua destilada y se secaron.

25 Panel de sueros ensayados

30 Los sueros humanos se recogieron de pacientes de LB típicos bien definidos clínicamente, que correspondían a las diferentes fases de la LB (22 con eritema migratorio [EM], 5 con carditis, 20 con neuroborreliosis [NB], 20 con artritis de Lyme [LA], 20 con acrodermatitis crónica atrófica [ACA] y 10 con linfocitoma de cutis benigno [LCB]). Se encontraron IgG anti-Lyme por inmunotransferencia, descrita previamente usando los lisatos de células enteras [4], en los sueros de los pacientes con LA, ACA y carditis. El EM, NB y LCB se identificaron clínicamente, pero los sueros correspondientes no se encontraron positivos por inmunotransferencia [4], ni por los kits disponibles en el comercio (VIDAS® Lyme (biomérieux®), Borrelia IgG, (Diasorin®) y Borrelia IgM (r-biopharm®)). Al contrario, todos los casos de NB incluidos en el estudio tenían anticuerpos detectables en el líquido cefalorraquídeo [LCR] (extendiéndose el índice de 2 a 27,1).

35 El grupo de control negativo consistía en 31 sueros que anteriormente se había encontrado que eran negativos para la presencia de anticuerpos anti-Lyme en los ensayos clásicos. Además, se ensayaron 64 sueros de donantes de sangre sanos residentes en una región endémica para Lyme (Monthley, Valis, Suiza) con la proteína recombinante. La intensidad de la reacción se evaluó como sigue: [+], [++], [+++], [-] o resultados equívocos. Los resultados equívocos se consideraron como negativos.

40 Los resultados se presentan a continuación en la tabla 4

Tabla 4

IgG						
Fase I	Fase II		Fase III			Donantes
EM (n=22)	NB (n=20)	Carditis (n=5)	LA (n=19)	ACA (n=20)	Linf. (n=10)	(n=64)
17 77,3%	20 100%	5 100%	19 100%	20 100%	9 90%	6 9,4%
12 [+++] 4 [++] 1 [+]	11 [+++] 7 [++] 2 [+]	4 [+++] 1 [++]	13 [+++] 4 [++] 2 [+]	20 [+++]	3 [+++] 2 [++] 4 [+]	6 [+]
Positivos totales IgG 93,7%						
IgM						
EM (n=22)	NB (n=20)	Carditis (n=5)				(n=64)
5 22%	4 20%	2 40%				1 1,5%
1 [++] 4 [+]	2 [++] 1 [+]	1 [++] 1 [+]				1 [+]
Positivos totales IgM 23,4%						

Detección de las IgG

5 Los resultados indican que la proteína recombinante bLYM110 es un antígeno de diagnóstico muy sensible para las IgG en todas las fases de la infección. En la fase I de la infección las IgG se detectaron en 17 de 22 casos de pacientes con un EM (es decir, 77,3% de sensibilidad). Cinco de los pacientes con EM que se encontraron negativos con la proteína recombinante lo eran también con la inmunotransferencia del laboratorio y con los kits disponibles en el comercio. Siete sueros de EM que se encontraron positivos con la proteína recombinante, no se detectaron por inmunotransferencia, lo que representa una mejora de 31,8% de la sensibilidad con la proteína recombinante. En la fase primaria de la infección, en ausencia del enrojecimiento característico, el diagnóstico puede ser difícil, ya que las otras manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme no son específicas. Además, solamente algunos pacientes que tienen un EM son detectados por los ensayos clásicos. Por lo tanto, la proteína de la invención mejora la detección de las IgG en la fase I de la infección, llevando su detección a más de 77% en los pacientes que presentan un EM.

15 Detección de las IgM

Se encontraron IgM anti-proteína quimérica en 23,4% de los sueros de LB. La proteína detecta con más frecuencia las IgG que las IgM en los sueros de los pacientes de LB en las fases I y II.

Ejemplo 4: preparación de construcciones plasmídicas que codifican las proteínas recombinantes quiméricas DpbA-OspC.

20 Las secuencias de ADN que codifican las diferentes secuencias de DbpA y OspC descritas, se identifican en la tabla 5. Las secuencias de ADN se optimizaron para favorecer la expresión en *E. Coli* usando GeneOptimizer™ y fueron sintetizadas respectivamente por GenScript corporation (Scotch Plains, NJ, EE.UU.) o GeneArt GmbH Regensburg, Alemania).

Tabla 5

Proteína	Especies de <i>B. burgdorferi</i>		
	<i>B. sensu stricto</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
DbpA	*B31; **aa 2-192; ***AF069269	*PKo; **aa 2-150; ***AJ131967	*40; **aa 2-187; ***AF441832 *PBi; **aa 2-176; ***AJ841673
OspC	*B31; **aa 26-210; ***X73622	*PKo; **aa 2-212; ***X62162	*PEi; **aa 32-208; ***AJ749866

25 Cada proteína quimérica recombinante comprende al menos una región de epítipo que corresponde al dominio extracelular de una secuencia de DbpA de *Borrelia burgdorferi* en sentido estricto o de *B. afzelii* o *B. garinii* y al menos una región de epítipo que corresponde al dominio extracelular de una secuencia de OspC de *Borrelia burgdorferi* en sentido estricto o de *B. afzelii* o *B. garinii*.

Las asociaciones de diferentes secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de DbpA y/o OspC así como las modificaciones de las secuencias de nucleótidos, tales como eliminaciones, adición de secuencia de unión o adición de secuencia conectora, se han realizado por ingeniería genética usando las técnicas de PCR bien conocidas para el experto en la materia y están descritas, por ejemplo en Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Las secuencias de ADN que codifican las proteínas quiméricas de interés se han introducido en el vector de expresión pMR [2] entre el sitio de restricción BamHI en 5' y el sitio EcoRI o HindIII en 3'. Las construcciones plasmídicas y las proteínas correspondientes citadas en el ejemplo (bLYM114, bLYM120 y bLYM121) se describen en la tabla 6. La presencia de MRGS N-terminal de las proteínas recombinantes y la secuencia de nucleótidos ATG AGG GGA TCC correspondiente se introdujo por la técnica de clonación usada en el vector de expresión pMR. Solo el codón de inicio ATG y por consiguiente el aminoácido Met es realmente indispensable en esta secuencia.

Se introdujo una secuencia poli-His (6 x histidina) en el lado N-terminal de cada proteína recombinante. Esta secuencia permite la purificación de las proteínas recombinantes en columna de afinidad de metal-quelato. Es una región de fijación en el gel de Ni-NTA que permite facilitar posteriormente la etapa de purificación de la proteína recombinante quimérica. Este péptido HHHHHH (SEQ ID NO: 10) es codificado por la secuencia de nucleótidos CATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO: 11) o CATCATCATCATCATCAC (SEQ ID NO: 12) o CATCATCACCACCATCAT (SEQ ID NO: 13) o por cualquier otra secuencia que codifica la secuencia SEQ ID NO: 10.

A modo indicativo, esta región de fijación particular, que comprende una sucesión de histidinas, permite, en particular, la fijación orientada de la proteína recombinante en un soporte constituido por silicio u óxidos metálicos.

Tabla 6: construcciones plasmídicas y proteínas correspondientes

Características de las proteínas recombinantes			Características de las construcciones plasmídicas		
Nombre	Marcador N-terminal	Secuencia de <i>B. burgdorferi</i>	nombre	Vector parental	Sitio de inserción en el vector de la secuencia inserto
bLYM114 SEQ ID NO: 33	6 x His	<i>B. afzelii</i> cepa PKo DbpA aa 2-150 + OspC aa 2-212	pOL114	pMR78*	5'BamHI / 3'EcoRI
bLYM120 SEQ ID NO: 35	6 x His	B. sentido estricto cepa B31 DbpA aa 28-192 + OspC aa 26-210	pOL120	pMR78*	5'BamHI / 3'HindIII
bLYM121 SEQ ID NO: 38	6 x His	<i>B. garinii</i> DbpA III aa 25-187 cepa 40 + DbpA IV aa 24-176 cepa PBi + OspC aa 32-208 cepa PEi	pOL121	pMR78*	5'BamHI / 3'HindIII

• [2]

Ejemplo 5: Expresión de las proteínas recombinantes bLYM114, bLYM120 y bLYM121 del ejemplo 4 y purificación

Se usó una construcción plasmídica en la que se insertó una secuencia SEQ ID NO: 40, 42 ó 45 en un vector de expresión (pMR) para transformar una bacteria E. coli (cepa BL21) según un protocolo clásico conocido por el experto en la técnica. Las bacterias transformadas se seleccionaron por su resistencia a la ampicilina que llevaba el vector pMR.

Después se seleccionó un clon de bacteria recombinante para sembrar un precultivo de 40 ml de medio 2xYT (triptona 16 g/l; extracto de levadura 10 g/l; NaCl 5 g/l, pH 7,0) que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Después de 15 a 18 h de incubación a 30°C con agitación a 250 rpm, se usó este precultivo para sembrar 1 litro de medio 2xYT que contenía 2% de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo se incubó a 30°C con agitación a 250 rpm, hasta que la DO a 600 nm alcanzó 1,0/1,2. El cultivo se mantuvo durante 3 h 30 min o 4 h a 30°C añadiendo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM y se recogió por centrifugación a 6000 g durante 30 min. El sedimento celular se almacenó a -60°C. Para la purificación, se descongeló la biomasa húmeda y se volvió a suspender en un tampón de lisis que contenía inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche™) y nucleasa benzonasa (Novagen) y se sometió a una rotura celular a 1,6 kbar en un destructor de células (Constant System Ltd, Daventry, Reino Unido). Después el lisato se centrifugó a 10.000 rpm durante 45 min a 2-8°C. El líquido sobrenadante obtenido contiene las proteínas solubles. Este líquido sobrenadante se filtró sobre filtro de 0,45 µ y se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de quelación de metales (matriz de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA, Qiagen). Para hacer esto, el líquido sobrenadante se depositó (1 ml/min) a 18-25°C en una columna de 8 ml de gel de Ni-NTA equilibrada con tampón A (véase la tabla 7). Después la columna se lavó con tampón A, hasta obtener a la salida de la columna una DO_{280nm} = 0. La elución de la proteína recombinante se obtuvo por aplicación de un tampón B, siguiendo las indicaciones indicadas en la tabla 7, y la proteína purificada se dializó en casete de diálisis de MWCO 1000 o 20000 (Slide-A-Lyser®, Pierce) frente a un tampón de diálisis. Las condiciones de purificación en gel Ni-NTS se describen en la tabla 7.

Tabla 7: purificación de las proteínas recombinantes

Proteína	bLYM114	bLYM120	bLYM121
Tampón de lisis y de lavado	Tampón A ¹		
Tampón de elución	Tampón B ²		
Etapas de elución 1	90% de tampón A + 10% de tampón B (4CV)	92% de tampón + 8% de tampón (4CV)	100% de tampón B
Etapas de elución 2	100% de tampón B	100% de tampón B	NA
Rendimiento de purificación mg de proteína / g de biomasa húmeda	12	13	20
Rendimiento de purificación mg de proteína / litro de cultivo	80	122	245
¹ Fosfato sódico 50 mM, Imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0,1%, Glicerol al 5%, pH = 7,8			
² Fosfato sódico 50 mM, Imidazol 325 mM, NaCl 500 mM, Glicerol al 5%, pH = 7,5			

Las muestras se analizaron sobre NuPAGE® Novex® 4-12% en un tampón NuPAGE® MES-SDS, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las proteínas o bien se tiñeron con azul brillante de Coomassie o bien se transfirieron por electroforesis sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% (p/v) en PBS y se incubó con un anticuerpo anti-pentahistidina (Qiagen®) en PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Se usó un conjugado de IgG de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch laboratories) en PBS/Tween como anticuerpo secundario.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó usando el kit de ensayo de Bradford (Pierce Coomassie Plus, Perbio Science) con BSA como referencia proteica.

Ejemplo 6: Detección de las IgG y las IgM humanas con proteínas recombinantes quiméricas por una técnica de inmunotransferencia en línea

Cada proteína recombinante se depositó sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF, Immobilon, Millipore®, Bedford, Mass. EE.UU.) según el siguiente protocolo:

La concentración de proteína se ajustó a 1 mg/ml en PBS a pH 7,2, y se diluyó en PBS a pH 7,2 con Tween 20 al 0,03% añadido (dilución 1/200). La membrana de PVDF se humidificó en metanol, se lavó en agua desmineralizada y se puso sobre un papel de transferencia húmedo. Se sumergió una regla de plástico en la dilución de proteínas y se fijó sobre la membrana de PVDF. Tras el depósito de las proteínas y secado de las membranas, las membranas se cortaron verticalmente en bandas. Antes de usarlas, las bandas se incubaron con gelatina al 5% en TBS a pH 7,5 durante 1 h a 37°C. Los protocolos de inmunotransferencia se realizaron a temperatura ambiente como describen Bretz A.G. et al. [3]. Las bandas se incubaron durante 2 h con sueros humanos diluidos a 1/200 en TBS con gelatina al 1%, se lavaron e incubaron con un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM humanas marcado con fosfatasa alcalina (Sigma™, St-Louis, EE.UU.) diluidos a 1/1000 en TBS con gelatina al 1%. Después de lavado, las bandas se incubaron con el sustrato BCIP-NBT (KPL, Gaithersburg, MD, EE.UU.) durante 30 min, y después se lavaron con agua destilada y se secaron.

Panel de sueros ensayados

Los sueros humanos se recogieron de pacientes de LB típicos bien definidos clínicamente, que correspondían a las diferentes fases de la LB (22 con eritema migratorio [EM], 5 con carditis, 20 con neuroborreliosis [NB], 20 con artritis de Lyme [LA], 20 con acrodermatitis crónica atrófica [ACA] y 10 con linfocitoma de cutis benigno [LCB]). Se encontraron IgG anti-Lyme por inmunotransferencia, usando lisatos de células enteras [4], en los sueros de pacientes con LA, ACA y carditis. El EM, NB y LCB se identificaron clínicamente, pero los sueros correspondientes no se encontraron positivos por inmunotransferencia [4], ni por los kits disponibles en el comercio (VIDAS® Lyme (biomérieux®), Borrelia IgG, (Diasorin®) y Borrelia IgM (r-biopharm®)). Al contrario, todos los casos de NB incluidos en el estudio tenían anticuerpos detectables en el líquido cefalorraquídeo [LCR] (extendiéndose el índice de 2 a 27,1 por VIDAS® Lyme (biomérieux®). La presencia de IgM solo se buscó en los casos clínicos en fase I y II y no en las fases crónicas.

El grupo de control negativo consistía en 31 sueros que anteriormente se había encontrado que eran negativos para la presencia de anticuerpos anti-Lyme en los ensayos clásicos. Además, se ensayaron 64 sueros de donantes de sangre sanos residentes en una región endémica para Lyme (Monthley, Valis, Suiza) con la proteína recombinante.

La intensidad de la reacción se evaluó como sigue: [+], [++], [+++], [-] o resultados equívocos. Los resultados equívocos se consideraron como negativos.

Los resultados se presentan a continuación en la tabla 8.

Tabla 8: reactividad en la inmunotransferencia en línea de sueros humanos de pacientes con borreliosis de Lyme

con 3 proteínas recombinantes quiméricas

Proteína recombinante	IgG						IgM		
	Fase I	Fase II		Fase III			Fase I	Fase II	
	EM (n=22)	NB (n=20)	Carditis (n=5)	LA (n=19)	ACA (n=20)	LCB (n=10)	EM (n=22)	NB (n=20)	Carditis (n=5)
bLYM114	5	10	0	7	12	2	7	7	2
bLYM120	6	7	0	8	6	0	11	7	2
bLYM121	2	10	5	9	8	0	7	7	2
Σ bLYM 114+120+121	9	13	5	18	17	2	11	7	2
sueros positivos (%) e intensidad de la reacción	40,9% 1 [+++] 4 [++] 4 [+]	59,1% 8 [+++] 2 [++] 3 [+]	100% 4 [+++] 1 [+]	94,7% 7 [++ +] 8 [++] 3 [+]	85% 8 [+++] 5 [++] 4 [+]	20% 1 [+++] 1 [+]	50% 1 [+++] 7 [++] 5 [+]	35% 5 [++] 2 [+]	40% 2 [++]
Positivos totales e intensidad de la reacción	66,7% 28 [+++] 20 [++] 16 [+]						42,5% 1 [+++] 14 [++] 7 [+]		

La especificidad es de 100% basado en 31 sueros procedentes de sujetos sanos que se ha determinado que son negativos para Lyme por los ensayos estándar comercializados.

5 Detección de las IgG

Los resultados indican que las proteínas de fusión quiméricas recombinantes son herramientas de diagnóstico sensibles a las IgG y las IgM en todas las fases de la infección. Ponen de manifiesto un efecto complementario de las tres proteínas recombinantes basadas respectivamente en las secuencias de *Borrelia afzelii*, *B.* en sentido estricto y *B. garinii*, para la detección de las IgG. El uso combinado de las tres proteínas recombinantes quiméricas permite detectar IgG en la fase I de la infección en 9 de 22 casos de pacientes con EM (es decir, 40,9% de sensibilidad).

10

Detección de las IgM

Las IgM anti-proteínas quiméricas se encontraron en 11 de 22 casos (es decir, 50% de sensibilidad). Por lo tanto, estas proteínas quiméricas detectan más a menudo las IgM que las IgG en los sueros de pacientes de LB en la fase I. Los ensayos realizados en controles: inmunotransferencia [4] y el kit comercializado de Borrelia IgM (r-biopharm®) no detectan más los sueros positivos para IgM. Además, 3 sueros que se encontraron negativos por el ensayo de inmunotransferencia y Borrelia IgM (r-biopharm®) son detectados por las 3 proteínas quiméricas citadas en el ejemplo (3/3) o por una de las 3 proteínas citadas en el ejemplo (1/3). El uso combinado de las tres proteínas recombinantes permite mejorar un 13,6% la sensibilidad de la detección de las IgM en la fase I de la infección.

15

20 Ejemplo 7: Evaluación y validación de las proteínas recombinantes quiméricas bLYM114, bLYM120, bLYM121 y bLYM125 en un ensayo VIDAS® (bioMérieux)

Esta validación se realizó en el ensayo VIDAS® mediante el uso de:

- 1) las proteínas quiméricas recombinantes bLYM114, bLYM120 y bLYM121, obtenidas según los ejemplos 4, 5, para la detección de las IgM, y

25 - 2) las proteínas quiméricas recombinantes bLYM114, bLYM120, obtenidas según los ejemplos 4 y 5 y la proteína quimérica bLYM125, obtenida según el ejemplo 1, 2 para la detección de las IgG.

El principio del ensayo VIDAS® es el siguiente: un cono constituye el soporte sólido que sirve también de sistema de pipeteo para los reactivos presentes en el pasador. Donde las proteínas recombinantes se fijan sobre el cono. Después de una etapa de dilución, la muestra se aspira y descarga varias veces en el interior del cono. Esto permite que las inmunoglobulinas anti-Lyme de la muestra se unan a las proteínas recombinantes. Los componentes que no se han unido se eliminan por lavado. Se incuban un anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas conjugado con la fosfatasa alcalina (PAL) en el cono en el que se fija a las inmunoglobulinas anti-Lyme. Las etapas de lavado eliminan el conjugado que no se ha fijado. Durante la última etapa de revelado, el sustrato de la fosfatasa alcalina (PAL), el 4-

30

metil-umbeliferil-fosfato, se hidroliza a 4-metil-umbeliferona cuya fluorescencia emitida a 450 nm se mide. La intensidad de la fluorescencia se mide mediante el sistema óptico de Vidas® y es proporcional a la presencia de inmunoglobulinas anti-Lyme presentes en la muestra. Los resultados son analizados automáticamente por VIDAS® y se expresan en VRF (valor relativo de fluorescencia).

- 5 De esta forma se han dosificado 255 sueros positivos (sueros equívocos + sueros positivos) y 298 sueros negativos (equívocos + negativos) con el sistema Vidas®.

Los conos Vidas® Lyme IgG se sensibilizan mediante 300 µl de disolución que comprende las proteínas bLYM114, bLYM120 y bLYM125 de la invención con una concentración de 1 µg/ml, cada una en una disolución de sensibilización común.

- 10 En la última etapa los sueros se incuban durante 5,3 min para la formación de los complejos antígenos-anticuerpos. En la segunda etapa, las anti-IgG humanas marcadas con PAL se incuban durante 5,3 min.

Los resultados se dan como índice en relación a un umbral de positividad situado en 135 VRF en el protocolo.

- De los 255 sueros positivos ensayados, 246 son positivos y 9 son falsos negativos, lo que corresponde a una sensibilidad de 96,5%.

- 15 - De los 298 sueros negativos ensayados, 284 son negativos y 14 son falsos positivos, lo que corresponde a una especificidad de 95,3%.

Referencias bibliográficas

1. Göttner G. et al., Int. J. Microbiol. 293, Suppl. 37, 172-173 (2004)
2. Arnaud N. et al., Gene 1997; 199:149-156.
3. Bretz A.G., K. Ryffel, P. Hutter, E. Dayer and O. Péter. Specificities and sensitivities of four monoclonal antibodies for typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2001 ; 8 : 376-384.
4. Ryffel K., Péter O., Rutti B. and E. Dayer. Scored antibody reactivity by immunoblot suggests organotropism of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. valaisiana* in human. J. Clin. Microbiol. 1999 ; 37:4086-92
5. Steere AC. et al., Clin Infect Dis 2008; 47:188-195.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux

5 <120> Proteínas utilizadas para el diagnóstico de una borreliosis de Lyme.

<130> Lyme VlsE PCT

<160> 47

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

15 <211> 274

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 1

20

```

Lys Asn Asn Val Gly Gly Asp Asp Lys Lys Asp Thr Ala Ala Ser Ile
 1          5          10          15

Phe Tyr Gln Ser Ile Ile Asn Leu Gly Asn Gly Phe Ile Glu Val Phe
          20          25          30

Asn Ala Phe Ser Gly Leu Val Ala Asp Ala Phe Ser Lys Ala Asp Pro
          35          40          45

Lys Lys Ser Asp Val Lys Thr Tyr Phe Asp Ser Ile Thr Lys Thr Leu
 50          55          60

Lys Asp Thr Lys Thr Lys Leu Glu Asp Ile Ser Lys Glu Lys Thr Gly
 65          70          75          80

Gly Glu Lys Thr Pro Ala Val Glu Gly Ile Ala Glu Val Val Lys Thr
          85          90          95

Val Gly Glu Trp Leu Asp Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Gly Gly Gly
          100          105          110

Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Ser Asp Lys Ile Gly Asn Val Ala Ala
          115          120          125

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Asp Lys Glu Ser Val Asn Gly Ile Ala Gly
          130          135          140

Ala Ile Lys Gly Ile Val Glu Ala Ala Lys Lys Val Glu Gly Val Lys
          145          150          155          160

Phe Ala Pro Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Asp Gly Asn Lys
          165          170          175

Lys Ala Gly Lys Leu Phe Gly Thr Ala Ala Gly Ala Asp Ala Gly Asp
          180          185          190
    
```

Val Lys Asp Ala Ala Ala Ala Val Gly Ala Val Ser Gly Glu Gln Ile
 195 200 205

Leu Asn Ala Ile Val Thr Ala Ala Gly Gln Ala Gly Gln Ala Gly Lys
 210 215 220

Lys Ala Asp Glu Ala Lys Asn Ala Ile Glu Ala Ala Ile Gly Ala Ala
 225 230 235 240

Gly Asp Ala Asp Phe Gly Asp Asp Ile Lys Lys Lys Asn Asp Gln Ile
 245 250 255

Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Asp Gly Lys Phe Ala
 260 265 270

Gly Ala

<210> 2
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 2

Lys Asn Ser Ala Gly Asp Ile Ser Asn Lys Ser Asp Glu Asn Asp Pro
 1 5 10 15

Thr Thr Leu Phe Tyr Gln Ser Ile Ile Lys Leu Gly Asn Gly Phe Leu
 20 25 30

Glu Val Phe Thr Ser Phe Gly Gly Met Val Ala Asp Ala Phe Gly Ala
 35 40 45

Lys Trp Glu Ala Lys Lys Ser Thr Ile Lys Thr Tyr Phe Asp Thr Met
 50 55 60

Ser Gln Lys Leu Glu Glu Thr Lys Lys Gly Leu Glu Lys Leu Ala Asn
 65 70 75 80

Asn Gly Glu Glu Ser Glu Ser Glu Asn Lys Ile Gly Asp Ala Val Ala
 85 90 95

Ser Thr Ile Lys Glu Val Gly Glu Trp Leu Thr Glu Met Ala Thr Ala
 100 105 110

Ala Gly Gly Ala Ala Lys Val Ala Asp Ser Gly Gly Asp Glu Ile Gly
 115 120 125

ES 2 427 407 T3

Lys Val Glu Asn Ala Gly Ala Asn Ala Asn Lys Gly Asp Lys Thr Ser
 130 135 140

Val Asn Gly Ile Ala Lys Gly Ile Lys Ala Ile Val Gly Val Ala Lys
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Lys Trp Glu Pro Ala Ala Ala Ala Glu Ala Gly Asp
 165 170 175

Ala Asn Gly Asn Lys Asn Ala Gly Lys Leu Phe Ala Thr Gly Gly Gln
 180 185 190

Gly Asp Ala Ala Ala Gly Lys Glu Ala Ala Leu Ala Val Ser Gly Val
 195 200 205

Ser Gly Asp Gln Ile Leu Asn Ala Ile Val Thr Asp Ala Glu Gly Asp
 210 215 220

Lys Asn Gly Val Ala Thr Ala Asn Ala Thr Asn Ser Ile Asp Ala Ala
 225 230 235 240

Ile Gly Ala Asp Gly Asp Asn Gly Ala Ser Gly Phe Asp Ala Met Lys
 245 250 255

Lys Lys Asn Asp Lys Ile Ala Ala Ala Ile Val Leu Arg Gly Met Ala
 260 265 270

Lys Asp Gly Lys Phe Ala Val Lys
 275 280

- 5 <210> 3
- <211> 284
- <212> PRT
- <213> Borrelia sp.

<400> 3
 Lys Asn Asn Ala Glu Leu Ala Glu Ala Glu Ala Lys Asn Gln Ser Ala
 1 5 10 15

Lys Asp Phe Tyr His Ala Ile Ile Lys Leu Gly Tyr Gly Phe Val Asp
 20 25 30

Val Phe Asn Ala Ile Gly Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Tyr Lys Ala
 35 40 45

Asp Pro Lys Lys Ser Asp Val Lys Asn Tyr Phe Asp Ser Ile Ala Ser
 50 55 60

10 Ile Leu Lys Glu Thr Gln Thr Lys Leu Asp Ala Leu Ser Lys Glu Gln
 65 70 75 80

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Thr Gln Val Val Asp Ala Ala Lys Lys Ala
 85 90 95

Gly Glu Trp Ile Lys Glu Met His Lys Ala Val Glu Asp Thr Ala Lys
 100 105 110

Ala Gly Gly Glu Gly Gly Ser Glu Ser Ile Ala Asn Val Ala Ala Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Asn Asp Gly Ala Gly Ala Lys Ala Asp Val Asn Ser Val
 130 135 140

Thr Gly Ile Ala Lys Gly Met Lys Ala Ile Val Asp Ala Ala Gly Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Leu Lys Pro Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Asn
 165 170 175

Asp Ala Gly Lys Leu Phe Ala Ser Gly Ala Asn Ala Asn Ala Ala Ala
 180 185 190

Asn Ala Asp Asp Ala Glu Gly Ala Ala Glu Ala Ala Gly Lys Ala Val
 195 200 205

Ser Ala Val Ser Gly Asp Gln Ile Leu Lys Ala Ile Val Asp Ala Ala
 210 215 220

Gly Ala Thr Ala Gly Lys Lys Ala Asn Glu Ala Thr Asn Ala Val Glu
 225 230 235 240

Ala Ala Ile Gly Asp Asp Asn Ala Gly Gln Ala Gly Ala Ala Phe Ala
 245 250 255

Ala Gly Met Gln Asn Lys Asn Asp Gln Ile Ala Ala Ala Ile Val Leu
 260 265 270

Arg Gly Leu Ala Lys Ser Gly Lys Phe Ala Asn Glu
 275 280

<210> 4
 <211> 279
 5 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 4

10 Lys Asn Asn Ala Val Gly Lys Gly Asn Asp Asp Lys Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

ES 2 427 407 T3

Thr Phe Tyr Glu Ser Ile Ile Asn Leu Gly Asn Gly Phe Ile Asp Val
 20 25 30
 Phe Asn Ala Phe Ser Gly Leu Val Ala Asp Thr Phe Phe Lys Ser Asp
 35 40 45
 Pro Lys Lys Ser Asp Val Lys Thr Tyr Phe Glu Ser Ile Ser Ser Thr
 50 55 60
 Leu Lys Ala Thr Lys Gly Lys Leu Asp Glu Leu Val Ser Ala Lys Lys
 65 70 75 80
 Gly Glu Gly Gly Ser Val Lys Ala Ser Val Glu Ser Ala Val Asp Glu
 85 90 95
 Val Ser Lys Trp Leu Glu Glu Met Ile Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala
 100 105 110
 Lys Val Gly Gly Thr Gly Gly Asp Gly Lys Ile Gly Asp Ser Ala Ala
 115 120 125
 Asn His Gly Ala Lys Ala Asp Lys Asp Ser Val Lys Gly Ile Ala Lys
 130 135 140
 Gly Ile Lys Gly Ile Val Asp Ala Ala Gly Lys Ala Leu Gly Glu Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Lys Asp Val Lys Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ala Asn Ala
 165 170 175
 Asp Ala Gly Lys Leu Phe Ala Gly Asn Ala Asn Ala Ala Val Gly Ala
 180 185 190
 Ala Ala Asp Ile Ala Lys Ala Ala Gly Ala Val Thr Ala Val Ser Gly
 195 200 205
 Glu Gln Ile Leu Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Asp Pro Ala Asn
 210 215 220
 Gln Ala Gly Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Asn Pro Ile Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Thr Asp Asp Asp Asn Gly Ala Ala Phe Lys Asp Glu Met Lys
 245 250 255
 Lys Ser Asp Lys Ile Ala Ala Ala Ile Val Leu Arg Gly Val Ala Lys
 260 265 270
 Asp Gly Lys Phe Ala Val Lys
 275

ES 2 427 407 T3

<210> 5
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 5

Lys Ser Gln Val Ala Asp Lys Asp Asp Pro Thr Asn Lys Phe Tyr Gln
 1 5 10 15

Ser Val Ile Gln Leu Gly Asn Gly Phe Leu Asp Val Phe Thr Ser Phe
 20 25 30

Gly Gly Leu Val Ala Glu Ala Phe Gly Phe Lys Ser Asp Pro Lys Lys
 35 40 45

Ser Asp Val Lys Thr Tyr Phe Thr Thr Val Ala Ala Lys Leu Glu Lys
 50 55 60

Thr Lys Thr Asp Leu Asn Ser Leu Pro Lys Glu Lys Ser Asp Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Thr Thr Gly Lys Pro Asp Ser Thr Gly Ser Val Gly Thr Ala Val
 85 90 95

Glu Gly Ala Ile Lys Glu Val Ser Glu Leu Leu Asp Lys Leu Val Lys
 100 105 110

Ala Val Lys Thr Ala Glu Gly Ala Ser Ser Gly Thr Ala Ala Ile Gly
 115 120 125

Glu Val Val Ala Asp Ala Asp Ala Ala Lys Val Ala Asp Lys Ala Ser
 130 135 140

Val Lys Gly Ile Ala Lys Gly Ile Lys Glu Ile Val Glu Ala Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Glu Lys Leu Lys Ala Val Ala Ala Lys Gly Glu Asn Asn
 165 170 175

Lys Gly Ala Gly Lys Leu Phe Gly Lys Ala Gly Ala Ala Ala His Gly
 180 185 190

Asp Ser Glu Ala Ala Ser Lys Ala Ala Gly Ala Val Ser Ala Val Ser
 195 200 205

Gly Glu Gln Ile Leu Ser Ala Ile Val Thr Ala Ala Asp Ala Ala Glu
 210 215 220

Gln Asp Gly Lys Lys Pro Glu Glu Ala Lys Asn Pro Ile Ala Ala Ala
 225 230 235 240

Ile Gly Asp Lys Asp Gly Gly Ala Glu Phe Gly Gln Asp Glu Met Lys
 245 250 255

Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Met Ala Lys
 260 265 270

Asp Gly Lys Phe Ala Val Lys
 275

<210> 6
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 6
Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Met
 1 5 10 15

Ala Lys Asp Gly Lys Phe Ala Val Lys
 20 25

10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

15

<400> 7
Ile Val Ala Ala Ile Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Ser Gly Lys Phe
 1 5 10 15

Ala

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

20

<400> 8
Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Met Val Leu Arg Gly Met
 1 5 10 15

Ala Lys Asp Gly Gln Phe Ala Leu Lys
 20 25

25

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

30

<400> 9
Asp Gly Glu Lys Glu Lys Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Marcador His

 <400> 10
His His His His His His
 10 **1** **5**

 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN Marcador His

 20 <400> 11
 catcatcatc atcatcat 18

 <210> 12
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN Marcador His
 30
 <400> 12
 catcatcatc atcatcac 18

 <210> 13
 <211> 18
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> ADN Marcador His

 <400> 13
 catcatcacc accatcat 18

 45 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> aa+

 <400> 14
Met Arg Gly Ser
 55 **1**

 <210> 15
 <211> 12
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADN aa+

<400> 15
 atgaggggat cc 12

5 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Marcador His 3

<400> 16
His His His His His His His His
1 5

15 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN Marcador His

25 <400> 17
 catcatcatc atcatcatca tcat 24

<210> 18
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> aa+ 1

35 <400> 18
Met Gly
1

40 <210> 19
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN aa+ 1

45 <400> 19
 atgggc 6

50 <210> 20
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 20

ES 2 427 407 T3

Lys Asn Asn Val Gly Gly Asp Asp Lys Lys Asp Thr Ala Ala Ser Ile
 1 5 10 15
 Phe Tyr Gln Ser Ile Ile Asn Leu Gly Asn Gly Phe Ile Glu Val Phe
 20 25 30
 Asn Ala Phe Ser Gly Leu Val Ala Asp Ala Phe Ser Lys Ala Asp Pro
 35 40 45
 Lys Lys Ser Asp Val Lys Thr Tyr Phe Asp Ser Ile Thr Lys Thr Leu
 50 55 60
 Lys Asp Thr Lys Thr Lys Leu Glu Asp Ile Ser Lys Glu Lys Thr Gly
 65 70 75 80
 Gly Glu Lys Thr Pro Ala Val Glu Gly Ile Ala Glu Val Val Lys Thr
 85 90 95
 Val Gly Glu Trp Leu Asp Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Lys Ala Ala Asp Gly Gly Gly Ser Asp Lys Ile Gly Asn Val Ala Ala
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ala Gly Ala Asp Lys Glu Ser Val Asn Gly Ile Ala Gly
 130 135 140
 Ala Ile Lys Gly Ile Val Glu Ala Ala Lys Lys Val Glu Gly Val Lys
 145 150 155 160
 Phe Ala Pro Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Asp Gly Asn Lys
 165 170 175
 Lys Ala Gly Lys Leu Phe Gly Thr Ala Ala Gly Ala Asp Ala Gly Asp
 180 185 190
 Val Lys Asp Ala Ala Ala Ala Val Gly Ala Val Ser Gly Glu Gln Ile
 195 200 205

ES 2 427 407 T3

Leu Asn Ala Ile Val Thr Ala Ala Gly Gln Ala Gly Gln Ala Gly Lys
 210 215 220

Lys Ala Asp Glu Ala Lys Asn Ala Ile Glu Ala Ala Ile Gly Ala Ala
 225 230 235 240

Gly Asp Ala Asp Phe Gly Asp Asp Ile Lys Lys Lys Asn Asp Gln Ile
 245 250 255

Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Asp Gly Lys Phe Ala
 260 265 270

Gly Ala Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Ile Ala Leu Arg
 275 280 285

Gly Met Ala Lys Asp Gly Lys Phe Ala Val Lys Asp Gly Glu Lys Glu
 290 295 300

Lys Ala Ile Val Ala Ala Ile Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Ser Gly
 305 310 315 320

Lys Phe Ala Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Met Val Leu
 325 330 335

Arg Gly Met Ala Lys Asp Gly Gln Phe Ala Leu Lys
 340 345

<210> 21
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 21
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Lys Asn Asn Val Gly Gly
 1 5 10 15

Asp Asp Lys Lys Asp Thr Ala Ala Ser Ile Phe Tyr Gln Ser Ile Ile
 20 25 30

Asn Leu Gly Asn Gly Phe Ile Glu Val Phe Asn Ala Phe Ser Gly Leu
 35 40 45

Val Ala Asp Ala Phe Ser Lys Ala Asp Pro Lys Lys Ser Asp Val Lys
 50 55 60

Thr Tyr Phe Asp Ser Ile Thr Lys Thr Leu Lys Asp Thr Lys Thr Lys
 65 70 75 80

Leu Glu Asp Ile Ser Lys Glu Lys Thr Gly Gly Glu Lys Thr Pro Ala
 85 90 95

ES 2 427 407 T3

Val Glu Gly Ile Ala Glu Val Val Lys Thr Val Gly Glu Trp Leu Asp
 100 105 110
 Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Gly Gly Gly Lys Ala Ala Asp Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Asp Lys Ile Gly Asn Val Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala
 130 135 140
 Asp Lys Glu Ser Val Asn Gly Ile Ala Gly Ala Ile Lys Gly Ile Val
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Lys Lys Val Glu Gly Val Lys Phe Ala Pro Lys Ala Ala
 165 170 175
 Ala Asp Ala Ala Ala Ala Asp Gly Asn Lys Lys Ala Gly Lys Leu Phe
 180 185 190
 Gly Thr Ala Ala Gly Ala Asp Ala Gly Asp Val Lys Asp Ala Ala Ala
 195 200 205
 Ala Val Gly Ala Val Ser Gly Glu Gln Ile Leu Asn Ala Ile Val Thr
 210 215 220
 Ala Ala Gly Gln Ala Gly Gln Ala Gly Lys Lys Ala Asp Glu Ala Lys
 225 230 235 240
 Asn Ala Ile Glu Ala Ala Ile Gly Ala Ala Gly Asp Ala Asp Phe Gly
 245 250 255
 Asp Asp Ile Lys Lys Lys Asn Asp Gln Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu
 260 265 270
 Arg Gly Val Ala Lys Asp Gly Lys Phe Ala Gly Ala Met Lys Lys Asp
 275 280 285
 Asp Gln Ile Ala Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Met Ala Lys Asp Gly
 290 295 300
 Lys Phe Ala Val Lys Asp Gly Glu Lys Glu Lys Ala Ile Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Ile Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Ser Gly Lys Phe Ala Met Lys Lys
 325 330 335
 Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Met Val Leu Arg Gly Met Ala Lys Asp
 340 345 350

Gly Gln Phe Ala Leu Lys
355

5 <210> 22
<211> 1077
<212> ADN
<213> Borrelia sp.

<400> 22
atgaggggat cccaccacca ccatcatcat aaaaataatg tcggcggcga tgacaaaaaa 60
gatactgctg ccagcatctt ctaccagtct attattaacc tgggtaacgg gttcattgaa 120
gtgtttaatg ccttttccgg gctggtggcc gacgcgttta gcaaagcaga tccgaaaaaa 180
tcagatgtca aaacttactt cgattcgatc acgaaaacac tgaaagatac caaaactaag 240
ctggaagata ttagcaaaga aaaaacgggc ggcgaaaaaa cgccagccgt tgaaggtatc 300
gccgaagtgc tgaaaaccgt gggagagtgg ctggatggcc tgattaaagc ggcggaaggg 360
ggcggcaaag cggcggatgg tggcggttcg gacaaaattg ggaatgtcgc tgcaggcggc 420
ggcgcggggc cgcacaagga aagtgtgaat ggaatcgcag gtgccattaa aggtatcgtg 480
gaagctgcaa aaaaggtgga aggtgtgaaa ttcgccccga aagctgcggc ggatgcagcc 540
gccgctgatg gtaacaaaaa agcaggcaaa ctgtttggta ccgcgccggg cgcagacgcg 600
ggagacgtga aagatgcagc cgctgcggtg ggggccgtga gcggtgaaca gattctgaat 660
gcgattgta cggcggcggg ccaggcaggc caggcgggga aaaaagctga tgaagcaaaa 720
aatgcgattg aagctgccat tgggtcggct ggcgatgcgg attttgggtg cgacattaaa 780
aagaaaaacg atcaaattgc ggcggcgtg gttctgcgcg gagttgctaa agacggcaaa 840
tttgccggcg ctatgaagaa agacgaccaa atcgcggcag ccattgcgct gcgcggcatg 900
gcgaaagacg gcaaatttgc ggtgaaagat ggcgaaaaag aaaaagcgat tgtggcggcg 960
atcgttctgc gcggtgttgc gaaaagcggc aaattcgcga tgaaaaaaga tgatcagatc 1020
gccgcagcga tggttctgcg tggatggcc aaagatggtc agtttgcctt gaaataa 1077

10 <210> 23
<211> 357
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

15 <400> 23
Met Gly His His His His His His His His Lys Asn Asn Val Gly Gly
1 5 10 15
Asp Asp Lys Lys Asp Thr Ala Ala Ser Ile Phe Tyr Gln Ser Ile Ile
20 25 30
Asn Leu Gly Asn Gly Phe Ile Glu Val Phe Asn Ala Phe Ser Gly Leu
35 40 45

ES 2 427 407 T3

Val Ala Asp Ala Phe Ser Lys Ala Asp Pro Lys Lys Ser Asp Val Lys
50 55 60

Thr Tyr Phe Asp Ser Ile Thr Lys Thr Leu Lys Asp Thr Lys Thr Lys
65 70 75 80

Leu Glu Asp Ile Ser Lys Glu Lys Thr Gly Gly Glu Lys Thr Pro Ala
85 90 95

Val Glu Gly Ile Ala Glu Val Val Lys Thr Val Gly Glu Trp Leu Asp
100 105 110

Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Gly Gly Gly Lys Ala Ala Asp Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Asp Lys Ile Gly Asn Val Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala
130 135 140

Asp Lys Glu Ser Val Asn Gly Ile Ala Gly Ala Ile Lys Gly Ile Val
145 150 155 160

Glu Ala Ala Lys Lys Val Glu Gly Val Lys Phe Ala Pro Lys Ala Ala
165 170 175

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Asp Gly Asn Lys Lys Ala Gly Lys Leu Phe
180 185 190

Gly Thr Ala Ala Gly Ala Asp Ala Gly Asp Val Lys Asp Ala Ala Ala
195 200 205

Ala Val Gly Ala Val Ser Gly Glu Gln Ile Leu Asn Ala Ile Val Thr
210 215 220

Ala Gly Gln Ala Gly Gln Ala Gly Lys Lys Ala Asp Glu Ala Lys Asn
225 230 235 240

Ala Ile Glu Ala Ala Ile Gly Ala Ala Gly Asp Ala Asp Phe Gly Asp
245 250 255

Asp Ile Lys Lys Lys Asn Asp Gln Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg
260 265 270

Gly Val Ala Lys Asp Gly Lys Phe Ala Gly Ala Met Lys Lys Asp Asp
275 280 285

Gln Ile Ala Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Met Ala Lys Asp Gly Lys
290 295 300

ES 2 427 407 T3

Phe Ala Val Lys Asp Gly Glu Lys Glu Lys Ala Ile Val Ala Ala Ile
 305 310 315 320

Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Ser Gly Lys Phe Ala Met Lys Lys Asp
 325 330 335

Asp Gln Ile Ala Ala Ala Met Val Leu Arg Gly Met Ala Lys Asp Gly
 340 345 350

Gln Phe Ala Leu Lys
 355

<210> 24
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 24
 atgggccatc atcatcatca tcatcatcat aaaaacaacg tgggcggcga tgataaaaa 60
 gataccgcgg cgagcatttt ttatcagagc attattaacc tgggcaacgg ctttattgaa 120
 gtgtttaacg cgtttagcgg cctggtggcg gatgcgttta gcaaagcggg tccgaaaaaa 180
 agcgatgtga aaacctatth tgatagcatt accaaaaccc tgaaagatac caaaacccaa 240
 ctggaagata ttagcaaaga aaaaaccggc ggcgaaaaaa ccccggcggg ggaaggcatt 300
 gcggaagtgg tgaaaaccgt gggcgaatgg ctggatggcc tgattaaagc ggcggaaggc 360
 ggcggcaaag cggcggatgg cggcggcagc gataaaattg gcaacgtggc ggcggggcggc 420
 ggcgcggggc cggataaaga aagcgtgaac ggcattgcgg gcgcgattaa aggcattgtg 480
 gaagcggcga aaaaagtggg aggcgtgaaa tttgcgccga aagcggcggc ggatgcggcg 540
 gcggcggatg gcaacaaaaa agcgggcaaa ctgtttggca ccgcggcggg cgcggatgcg 600
 ggcgatgtga aagatgcggc ggcggcgggt ggcgcgggtga gcggcgaaca gattctgaac 660
 gcgattgtga ccgcgggcca ggcgggcccag gcgggcaaaa aagcggatga agcgaaaaac 720
 gcgattgaag cggcatttgg cgcggcgggc gatgcccatt ttggcgatga tattaaaaaa 780
 aaaaacgac agattgcggc ggcgctggtg ctgcgcggcg tggcgaaaga tggcaaattt 840
 gcgggcgcga tgaaaaaaga tgatcagatt gcggcggcga ttgcgctgcg cggcatggcg 900
 aaagatggca aatttgcggg gaaagatggc gaaaaagaaa aagcattgtt ggcggcgatt 960
 gtgctgcgcg gcgtggcgaa aagcggcaaa tttgcgatga aaaaagatga tcagattgcg 1020
 gcggcgatgg tgctgcgcgg catggcgaaa gatggccagt ttgcgctgaa ataa 1074

10

<210> 25
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

15

<400> 25

ES 2 427 407 T3

Ser Leu Thr Gly Lys Ala Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Ile Thr
 1 5 10 15

Asn Glu Ile Glu Lys Ala Ile Lys Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val Lys
 20 25 30

Thr Asp Ala Phe Thr Glu Thr Gln Thr Gly Gly Lys Val Ala Gly Pro
 35 40 45

Lys Ile Arg Ala Ala Lys Ile Arg Val Ala Asp Leu Thr Ile Lys Phe
 50 55 60

Leu Glu Ala Thr Glu Glu Glu Thr Ile Thr Phe Lys Glu Asn Gly Ala
 65 70 75 80

Gly Glu Asp Glu Phe Ser Gly Ile Tyr Asp Leu Ile Leu Asn Ala Ala
 85 90 95

Lys Ala Val Glu Lys Ile Gly Met Lys Asp Met Thr Lys Thr Val Glu
 100 105 110

Glu Ala Ala Lys Glu Asn Pro Lys Thr Thr Ala Asn Gly Ile Ile Glu
 115 120 125

Ile Val Lys Val Met Lys Ala Lys Val Glu Asn Ile Lys Glu Lys Gln
 130 135 140

Thr Lys Asn Gln Lys
 145

<210> 26
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 26
 Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile
 1 5 10 15

Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Thr Asn Pro
 20 25 30

Ala Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys
 35 40 45

Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Thr
 50 55 60

10

Leu Val Leu Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Lys Ala Ile Gly Gln Lys
65 70 75 80

Ile Asp Asn Asn Asn Gly Leu Ala Ala Leu Asn Asn Gln Asn Gly Ser
85 90 95

Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Thr Glu Lys Leu
100 105 110

Ser Lys Leu Lys Asn Leu Glu Glu Leu Lys Thr Glu Ile Ala Lys Ala
115 120 125

Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala
130 135 140

Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile
145 150 155 160

Leu Lys Thr His Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp
165 170 175

Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu
180 185 190

Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro
195 200 205

Lys Lys Pro
210

<210> 27
<211> 164
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

5

<400> 27

Thr Gly Ala Thr Lys Ile Arg Leu Glu Arg Ser Ala Lys Asp Ile Thr
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Asp Ala Ile Lys Lys Asp Ala Ala Leu Lys Gly Val Asn
 20 25 30

Phe Asp Ala Phe Lys Asp Lys Lys Thr Gly Ser Gly Val Ser Glu Asn
 35 40 45

Pro Phe Ile Leu Glu Ala Lys Val Arg Ala Thr Thr Val Ala Glu Lys
 50 55 60

Phe Val Ile Ala Ile Glu Glu Glu Ala Thr Lys Leu Lys Glu Thr Gly
 65 70 75 80

Ser Ser Gly Glu Phe Ser Ala Met Tyr Asp Leu Met Phe Glu Val Ser
 85 90 95

Lys Pro Leu Gln Lys Leu Gly Ile Gln Glu Met Thr Lys Thr Val Ser
 100 105 110

Asp Ala Ala Glu Glu Asn Pro Pro Thr Thr Ala Gln Gly Val Leu Glu
 115 120 125

Ile Ala Lys Lys Met Arg Glu Lys Leu Gln Arg Val His Thr Lys Asn
 130 135 140

Tyr Cys Thr Leu Lys Lys Lys Glu Asn Ser Thr Phe Thr Asp Glu Lys
 145 150 155 160

Cys Lys Asn Asn

- 5 <210> 28
- <211> 185
- <212> PRT
- <213> Borrelia sp.

- 10 <400> 28

ES 2 427 407 T3

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

5 <210> 29
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

10 <400> 29

ES 2 427 407 T3

Thr Gly Glu Thr Lys Ile Arg Leu Glu Ser Ser Ala Gln Glu Ile Lys
1 5 10 15

Asp Glu Ile Asn Lys Ile Lys Ala Asn Ala Lys Lys Glu Gly Val Lys
20 25 30

Phe Glu Ala Phe Thr Asp Lys Gln Thr Gly Ser Lys Val Ser Glu Lys
35 40 45

Pro Glu Phe Ile Leu Lys Ala Lys Ile Lys Ala Ile Gln Val Ala Glu
50 55 60

Lys Phe Val Lys Ala Ile Lys Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Lys Ser
65 70 75 80

Gly Ser Ser Gly Ala Phe Ser Ala Met Tyr Asp Leu Met Leu Asp Val
85 90 95

Ser Lys Pro Leu Glu Glu Ile Gly Ile Gln Lys Met Thr Gly Thr Val
100 105 110

Thr Lys Glu Ala Glu Lys Thr Pro Pro Thr Thr Ala Glu Gly Ile Leu
115 120 125

Ala Ile Ala Gln Ala Met Glu Glu Lys Leu Asn Asn Val Asn Lys Lys
130 135 140

Gln Gln Asp Ala Leu Lys Asn Leu Glu Glu Lys Ala Asn Thr Ala Ala
145 150 155 160

Thr Thr

<210> 30

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 30

Ser Gly Thr Gly Lys Ala Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Ile Thr
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Asp Lys Ala Ile Lys Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Lys
 20 25 30

Leu Asn Glu Leu Glu Glu Asn Lys Thr Gly Ala Lys Lys Gly Gly Pro
 35 40 45

Gln Ile Arg Asp Ala Lys Ile Arg Val Ile Asn Leu Ser Val Lys Phe
 50 55 60

Leu Lys Glu Ile Glu Glu Glu Ala Asn Ile Leu Lys Asp Asn Val Gly
 65 70 75 80

Met Asn Lys Val Asp Lys Asp Gln Leu Leu Lys Asp Met Tyr Asp Leu
 85 90 95

Met Leu Asn Ala Ala Gly Ser Leu Gln Lys Leu Gly Leu Gln Glu Met
 100 105 110

Ile Lys Thr Val Thr Gln Ala Ala Glu Lys Thr Pro Pro Thr Thr Val
 115 120 125

Glu Gly Ile Leu Met Ile Ala Asn Thr Ile Glu Asp Lys Leu Lys Lys
 130 135 140

Ile Lys Gly Lys Gln Glu Thr Asn Lys Lys
 145 150

- <210> 31
- <211> 176
- <212> PRT
- <213> Borrelia sp.

5

<400> 31
 Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Val Ile Ser Lys Lys Ile
 1 5 10 15

Thr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu
 20 25 30

Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ser Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys

10

ES 2 427 407 T3

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

<210> 32
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 32

ES 2 427 407 T3

Met Ser Leu Thr Gly Lys Ala Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Ile
 1 5 10 15

Thr Asn Glu Ile Glu Lys Ala Ile Lys Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val
 20 25 30

Lys Thr Asp Ala Phe Thr Glu Thr Gln Thr Gly Gly Lys Val Ala Gly
 35 40 45

Pro Lys Ile Arg Ala Ala Lys Ile Arg Val Ala Asp Leu Thr Ile Lys
 50 55 60

Phe Leu Glu Ala Thr Glu Glu Glu Thr Ile Thr Phe Lys Glu Asn Gly
 65 70 75 80

Ala Gly Glu Asp Glu Phe Ser Gly Ile Tyr Asp Leu Ile Leu Asn Ala
 85 90 95

ES 2 427 407 T3

Ala Lys Ala Val Glu Lys Ile Gly Met Lys Asp Met Thr Lys Thr Val
100 105 110

Glu Glu Ala Ala Lys Glu Asn Pro Lys Thr Thr Ala Asn Gly Ile Ile
115 120 125

Glu Ile Val Lys Val Met Lys Ala Lys Val Glu Asn Ile Lys Glu Lys
130 135 140

Gln Thr Lys Asn Gln Lys Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met
145 150 155 160

Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly Asp
165 170 175

Ser Ala Ser Thr Asn Pro Ala Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu
180 185 190

Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val Leu Ala
195 200 205

Val Lys Glu Val Glu Thr Leu Val Leu Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys
210 215 220

Lys Ala Ile Gly Gln Lys Ile Asp Asn Asn Asn Gly Leu Ala Ala Leu
225 230 235 240

Asn Asn Gln Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr
245 250 255

Leu Ile Thr Glu Lys Leu Ser Lys Leu Lys Asn Leu Glu Glu Leu Lys
260 265 270

Thr Glu Ile Ala Lys Ala Lys Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Asn Lys
275 280 285

Leu Lys Ser Gly His Ala Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ala Thr Asp Asp
290 295 300

His Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr His Ala Thr Thr Asp Lys Gly
305 310 315 320

Ala Lys Glu Phe Lys Asp Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Ala Gln Val Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro
340 345 350

Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
355 360

ES 2 427 407 T3

<210> 33
 <211> 370
 <212> PRT
 5 <213> Borrelia sp.

<400> 33
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Ser Leu Thr Gly Lys Ala
 1 5 10 15
 Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Ile Thr Asn Glu Ile Glu Lys Ala
 20 25 30
 Ile Lys Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val Lys Thr Asp Ala Phe Thr Glu
 35 40 45
 Thr Gln Thr Gly Gly Lys Val Ala Gly Pro Lys Ile Arg Ala Ala Lys
 50 55 60
 Ile Arg Val Ala Asp Leu Thr Ile Lys Phe Leu Glu Ala Thr Glu Glu
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Thr Phe Lys Glu Asn Gly Ala Gly Glu Asp Glu Phe Ser
 85 90 95
 Gly Ile Tyr Asp Leu Ile Leu Asn Ala Ala Lys Ala Val Glu Lys Ile
 100 105 110
 Gly Met Lys Asp Met Thr Lys Thr Val Glu Glu Ala Ala Lys Glu Asn
 115 120 125
 Pro Lys Thr Thr Ala Asn Gly Ile Ile Glu Ile Val Lys Val Met Lys
 130 135 140
 Ala Lys Val Glu Asn Ile Lys Glu Lys Gln Thr Lys Asn Gln Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser
 165 170 175
 Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Thr Asn Pro Ala
 180 185 190
 Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile
 195 200 205
 Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Thr Leu
 210 215 220

Val Leu Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Lys Ala Ile Gly Gln Lys Ile
225 230 235 240

Asp Asn Asn Asn Gly Leu Ala Ala Leu Asn Asn Gln Asn Gly Ser Leu
245 250 255

Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Thr Glu Lys Leu Ser
260 265 270

Lys Leu Lys Asn Leu Glu Glu Leu Lys Thr Glu Ile Ala Lys Ala Lys
275 280 285

Lys Cys Ser Glu Glu Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala Asp
290 295 300

Leu Gly Lys Gln Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile Leu
305 310 315 320

Lys Thr His Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp Leu
325 330 335

Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu Thr
340 345 350

Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys
355 360 365

Lys Pro
370

<210> 34
<211> 350
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

5

<400> 34
Met Thr Gly Ala Thr Lys Ile Arg Leu Glu Arg Ser Ala Lys Asp Ile
1 5 10 15

Thr Asp Glu Ile Asp Ala Ile Lys Lys Asp Ala Ala Leu Lys Gly Val
20 25 30

Asn Phe Asp Ala Phe Lys Asp Lys Lys Thr Gly Ser Gly Val Ser Glu
35 40 45

Asn Pro Phe Ile Leu Glu Ala Lys Val Arg Ala Thr Thr Val Ala Glu
50 55 60

10

Lys Phe Val Ile Ala Ile Glu Glu Glu Ala Thr Lys Leu Lys Glu Thr
 65 70 75 80
 Gly Ser Ser Gly Glu Phe Ser Ala Met Tyr Asp Leu Met Phe Glu Val
 85 90 95
 Ser Lys Pro Leu Gln Lys Leu Gly Ile Gln Glu Met Thr Lys Thr Val
 100 105 110
 Ser Asp Ala Ala Glu Glu Asn Pro Pro Thr Thr Ala Gln Gly Val Leu
 115 120 125
 Glu Ile Ala Lys Lys Met Arg Glu Lys Leu Gln Arg Val His Thr Lys
 130 135 140
 Asn Tyr Cys Thr Leu Lys Lys Lys Glu Asn Ser Thr Phe Thr Asp Glu
 145 150 155 160
 Lys Cys Lys Asn Asn Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val
 165 170 175
 Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn
 180 185 190
 Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile
 195 200 205
 Asp Glu Ile Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile His Gln Asn Asn
 210 215 220
 Gly Leu Asp Thr Glu Asn Asn His Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala
 225 230 235 240
 Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn
 245 250 255
 Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys Lys Cys Ser Glu Thr
 260 265 270
 Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Ser Phe Gly Lys Glu
 275 280 285
 Gly Val Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly
 290 295 300
 Thr Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu Ser Val
 305 310 315 320
 Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys

ES 2 427 407 T3

325

330

335

Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 340 345 350

<210> 35
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 35
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Thr Gly Ala Thr Lys Ile
 1 5 10 15

Arg Leu Glu Arg Ser Ala Lys Asp Ile Thr Asp Glu Ile Asp Ala Ile
 20 25 30

Lys Lys Asp Ala Ala Leu Lys Gly Val Asn Phe Asp Ala Phe Lys Asp
 35 40 45

Lys Lys Thr Gly Ser Gly Val Ser Glu Asn Pro Phe Ile Leu Glu Ala
 50 55 60

Lys Val Arg Ala Thr Thr Val Ala Glu Lys Phe Val Ile Ala Ile Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Ala Thr Lys Leu Lys Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Phe Ser
 85 90 95

Ala Met Tyr Asp Leu Met Phe Glu Val Ser Lys Pro Leu Gln Lys Leu
 100 105 110

Gly Ile Gln Glu Met Thr Lys Thr Val Ser Asp Ala Ala Glu Glu Asn
 115 120 125

Pro Pro Thr Thr Ala Gln Gly Val Leu Glu Ile Ala Lys Lys Met Arg
 130 135 140

Glu Lys Leu Gln Arg Val His Thr Lys Asn Tyr Cys Thr Leu Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Glu Asn Ser Thr Phe Thr Asp Glu Lys Cys Lys Asn Asn Asn Thr
 165 170 175

Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu
 180 185 190

Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys
 195 200 205

10

ES 2 427 407 T3

Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Ile Ala Ala Lys Ala
 210 215 220

Ile Gly Lys Lys Ile His Gln Asn Asn Gly Leu Asp Thr Glu Asn Asn
 225 230 235 240

His Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile
 245 250 255

Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile
 260 265 270

Asp Ala Ala Lys Lys Cys Ser Glu Thr Phe Thr Asn Lys Leu Lys Glu
 275 280 285

Lys His Thr Asp Ser Phe Gly Lys Glu Gly Val Thr Asp Ala Asp Ala
 290 295 300

Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Glu
 305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu Ser Val Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala
 325 330 335

Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val
 340 345 350

Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 355

- <210> 36
- <211> 493
- 5 <212> PRT
- <213> Borrelia sp.

<400> 36
 Met Thr Gly Glu Thr Lys Ile Arg Leu Glu Ser Ser Ala Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Lys Asp Glu Ile Asn Lys Ile Lys Ala Asn Ala Lys Lys Glu Gly Val
 20 25 30

Lys Phe Glu Ala Phe Thr Asp Lys Gln Thr Gly Ser Lys Val Ser Glu
 35 40 45

Lys Pro Glu Phe Ile Leu Lys Ala Lys Ile Lys Ala Ile Gln Val Ala
 50 55 60

Glu Lys Phe Val Lys Ala Ile Lys Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Lys

ES 2 427 407 T3

65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Gly Ala Phe Ser Ala Met Tyr Asp Leu Met Leu Asp
85 90 95

Val Ser Lys Pro Leu Glu Glu Ile Gly Ile Gln Lys Met Thr Gly Thr
100 105 110

Val Thr Lys Glu Ala Glu Lys Thr Pro Pro Thr Thr Ala Glu Gly Ile
115 120 125

Leu Ala Ile Ala Gln Ala Met Glu Glu Lys Leu Asn Asn Val Asn Lys
130 135 140

Lys Gln Gln Asp Ala Leu Lys Asn Leu Glu Glu Lys Ala Asn Thr Ala
145 150 155 160

Ala Thr Thr Ser Gly Thr Gly Lys Ala Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys
165 170 175

Asp Ile Thr Asp Glu Ile Asp Lys Ala Ile Lys Glu Ala Ile Ala Asp
180 185 190

Gly Val Lys Leu Asn Glu Leu Glu Glu Asn Lys Thr Gly Ala Lys Lys
195 200 205

Gly Gly Pro Gln Ile Arg Asp Ala Lys Ile Arg Val Ile Asn Leu Ser
210 215 220

Val Lys Phe Leu Lys Glu Ile Glu Glu Glu Ala Asn Ile Leu Lys Asp
225 230 235 240

Asn Val Gly Met Asn Lys Val Asp Lys Asp Gln Leu Leu Lys Asp Met
245 250 255

Tyr Asp Leu Met Leu Asn Ala Ala Gly Ser Leu Gln Lys Leu Gly Leu
260 265 270

Gln Glu Met Ile Lys Thr Val Thr Gln Ala Ala Glu Lys Thr Pro Pro
275 280 285

Thr Thr Val Glu Gly Ile Leu Met Ile Ala Asn Thr Ile Glu Asp Lys
290 295 300

Leu Lys Lys Ile Lys Gly Lys Gln Glu Thr Asn Lys Lys Asp Glu Ser
305 310 315 320

Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Val Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser
325 330 335

Asn Ala Phe Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser
 340 345 350

Ile Asp Glu Leu Ser Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys Asn Asp Gly
 355 360 365

Thr Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu Ile Ala Gly Ala
 370 375 380

Tyr Glu Ile Ser Lys Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser Val Leu Asn Ser
 385 390 395 400

Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Lys Glu Ala Lys Asp Cys Ser Glu Lys
 405 410 415

Phe Thr Thr Lys Leu Lys Asp Ser His Ala Glu Leu Gly Ile Gln Ser
 420 425 430

Val Gln Asp Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Gly Thr
 435 440 445

Lys Asp Lys Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Leu Glu
 450 455 460

Ser Leu Ser Lys Ala Ala Gln Ala Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu
 465 470 475 480

Leu Thr Asn Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
 485 490

<210> 37
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 37
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Thr Gly Glu Thr Lys Ile
 1 5 10 15

Arg Leu Glu Ser Ser Ala Gln Glu Ile Lys Asp Glu Ile Asn Lys Ile
 20 25 30

Lys Ala Asn Ala Lys Lys Glu Gly Val Lys Phe Glu Ala Phe Thr Asp
 35 40 45

Lys Gln Thr Gly Ser Lys Val Ser Glu Lys Pro Glu Phe Ile Leu Lys
 50 55 60

10

ES 2 427 407 T3

Ala Lys Ile Lys Ala Ile Gln Val Ala Glu Lys Phe Val Lys Ala Ile
65 70 75 80

Lys Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Lys Ser Gly Ser Ser Gly Ala Phe
85 90 95

Ser Ala Met Tyr Asp Leu Met Leu Asp Val Ser Lys Pro Leu Glu Glu
100 105 110

Ile Gly Ile Gln Lys Met Thr Gly Thr Val Thr Lys Glu Ala Glu Lys
115 120 125

Thr Pro Pro Thr Thr Ala Glu Gly Ile Leu Ala Ile Ala Gln Ala Met
130 135 140

Glu Glu Lys Leu Asn Asn Val Asn Lys Lys Gln Gln Asp Ala Leu Lys
145 150 155 160

Asn Leu Glu Glu Lys Ala Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ser Gly Thr Gly
165 170 175

Lys Ala Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Ile Thr Asp Glu Ile Asp
180 185 190

Lys Ala Ile Lys Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Lys Leu Asn Glu Leu
195 200 205

Glu Glu Asn Lys Thr Gly Ala Lys Lys Gly Gly Pro Gln Ile Arg Asp
210 215 220

Ala Lys Ile Arg Val Ile Asn Leu Ser Val Lys Phe Leu Lys Glu Ile
225 230 235 240

Glu Glu Glu Ala Asn Ile Leu Lys Asp Asn Val Gly Met Asn Lys Val
245 250 255

Asp Lys Asp Gln Leu Leu Lys Asp Met Tyr Asp Leu Met Leu Asn Ala
260 265 270

Ala Gly Ser Leu Gln Lys Leu Gly Leu Gln Glu Met Ile Lys Thr Val
275 280 285

Thr Gln Ala Ala Glu Lys Thr Pro Pro Thr Thr Val Glu Gly Ile Leu
290 295 300

Met Ile Ala Asn Thr Ile Glu Asp Lys Leu Lys Lys Ile Lys Gly Lys
305 310 315 320

Gln Glu Thr Asn Lys Lys Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr

325

330

335

Val Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Leu Ala Val
340 345 350

Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ser Lys Ala
355 360 365

Ile Gly Lys Lys Ile Lys Asn Asp Gly Thr Leu Asp Asn Glu Ala Asn
370 375 380

Arg Asn Glu Ser Leu Ile Ala Gly Ala Tyr Glu Ile Ser Lys Leu Ile
385 390 395 400

Thr Gln Lys Leu Ser Val Leu Asn Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile
405 410 415

Lys Glu Ala Lys Asp Cys Ser Glu Lys Phe Thr Thr Lys Leu Lys Asp
420 425 430

Ser His Ala Glu Leu Gly Ile Gln Ser Val Gln Asp Asp Asn Ala Lys
435 440 445

Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Gly Thr Lys Asp Lys Gly Ala Lys Glu
450 455 460

Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Gln
465 470 475 480

Ala Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Asn Pro Val Val Ala
485 490 495

Glu Ser Pro Lys Lys Pro
500

- <210> 38
- <211> 506
- <212> PRT
- <213> Borrelia sp.

5

<400> 38
Met Arg Gly Ser His His His His His His Thr Gly Glu Thr Lys Ile
1 5 10 15

Arg Leu Glu Ser Ser Ala Gln Glu Ile Lys Asp Glu Ile Asn Lys Ile
20 25 30

Lys Ala Asn Ala Lys Lys Glu Gly Val Lys Phe Glu Ala Phe Thr Asp
35 40 45

ES 2 427 407 T3

Lys Gln Thr Gly Ser Lys Val Ser Glu Lys Pro Glu Phe Ile Leu Lys
 50 55 60

Ala Lys Ile Lys Ala Ile Gln Val Ala Glu Lys Phe Val Lys Ala Ile
 65 70 75 80

Lys Glu Glu Ala Glu Lys Leu Lys Lys Ser Gly Ser Ser Gly Ala Phe
 85 90 95

Ser Ala Met Tyr Asp Leu Met Leu Asp Val Ser Lys Pro Leu Glu Glu
 100 105 110

Ile Gly Ile Gln Lys Met Thr Gly Thr Val Thr Lys Glu Ala Glu Lys
 115 120 125

Thr Pro Pro Thr Thr Ala Glu Gly Ile Leu Ala Ile Ala Gln Ala Met
 130 135 140

Glu Glu Lys Leu Asn Asn Val Asn Lys Lys Gln Gln Asp Ala Leu Lys
 145 150 155 160

Asn Leu Glu Glu Lys Ala Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ser Gly Thr Gly
 165 170 175

Lys Ala Arg Leu Glu Ser Ser Val Lys Asp Ile Thr Asp Glu Ile Asp
 180 185 190

Lys Ala Ile Lys Glu Ala Ile Ala Asp Gly Val Lys Leu Asn Glu Leu
 195 200 205

Glu Glu Asn Lys Thr Gly Ala Lys Lys Gly Gly Pro Gln Ile Arg Asp
 210 215 220

Ala Lys Ile Arg Val Ile Asn Leu Ser Val Lys Phe Leu Lys Glu Ile
 225 230 235 240

Glu Glu Glu Ala Asn Ile Leu Lys Asp Asn Val Gly Met Asn Lys Val
 245 250 255

Asp Lys Asp Gln Leu Leu Lys Asp Met Tyr Asp Leu Met Leu Asn Ala
 260 265 270

Ala Gly Ser Leu Gln Lys Leu Gly Leu Gln Glu Met Ile Lys Thr Val
 275 280 285

Thr Gln Ala Ala Glu Lys Thr Pro Pro Thr Thr Val Glu Gly Ile Leu
 290 295 300

ES 2 427 407 T3

Met Ile Ala Asn Thr Ile Glu Asp Lys Leu Lys Lys Ile Lys Gly Lys
305 310 315 320

Gln Glu Thr Asn Lys Lys Gly Ser Gly Gly Asp Glu Ser Ala Lys Gly
325 330 335

Pro Asn Leu Thr Val Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe
340 345 350

Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu
355 360 365

Leu Ser Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys Asn Asp Gly Thr Leu Asp
370 375 380

Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu Ile Ala Gly Ala Tyr Glu Ile
385 390 395 400

Ser Lys Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser Val Leu Asn Ser Glu Glu Leu
405 410 415

Lys Glu Lys Ile Lys Glu Ala Lys Asp Cys Ser Glu Lys Phe Thr Thr
420 425 430

Lys Leu Lys Asp Ser His Ala Glu Leu Gly Ile Gln Ser Val Gln Asp
435 440 445

Asp Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Gly Thr Lys Asp Lys
450 455 460

Gly Ala Lys Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Leu Glu Ser Leu Ser
465 470 475 480

Lys Ala Ala Gln Ala Ala Leu Thr Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Asn
485 490 495

Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro
500 505

<210> 39
<211> 1086
<212> ADN
<213> Borrelia sp.

5

<400> 39
atgagcctga ccggcaaagc gcgtctggaa agcagcgtga aagatattac caacgaaatt 60
gaaaaagcga ttaaagaagc ggaagatgcg ggcgtgaaaa ccgatgcggt taccgaaacc 120
cagaccggcg gcaaagtggc gggcccgaaa attcgtgctg cgaaaattcg tgtggcggat 180
ctgaccatta aatttctgga agcgaccgaa gaagaaacca ttacctttaa agaaaatggc 240

ES 2 427 407 T3

gcgggcgaag atgaatttag cggcatttat gatctgattc tgaacgcggc gaaagcggtg 300
gaaaaaattg gcatgaaaga tatgaccaa accgtggaag aagcggcgaa agaaaatccg 360
aaaaccaccg cgaacggtat tattgaaatt gtgaaagtga tgaaagcgaa agtggaaaat 420
attaagaaa aacagaccaa aaaccagaaa aaaaaaaca ccctgagcgc gattctgatg 480
accctgtttc tgtttattag ctgcaacaac agcggcaaag gcggcgatag cgcgagcacc 540
aaccgcggcg atgaaagcgc gaaaggcccg aacctgaccg aaattagcaa aaaaatcacc 600
gatagcaacg cgtttgtgct ggcggtgaaa gaagtggaaa ccctggttct gagcattgat 660
gaactggcga aaaaagcgat tggccagaaa atcgataaca acaacggcct ggcggcgctg 720
aacaaccaga acggcagcct gctggcgggt gcgtatgcga ttagcaccct gattaccgaa 780
aaactgagca aactgaaaa cctggaagaa ctgaaaaccg aaatcgcgaa agcgaaaaaa 840
tgcagcgaag aattaccaa caaactgaaa agcggccatg cggatctggg caaacaggat 900
gcgaccgatg atcatgcgaa agcggcgatt ctgaaaacc atgcgaccac cgataaaggc 960
gcgaaagaat ttaaagacct gttcgaaaagc gtggaaggcc tgctgaaagc ggcgaggtg 1020
gcgctgacca acagcgtgaa agaactgacc agcccgggtg ttgcggaaag cccgaaaaaa 1080
ccgtaa 1086

- 5 <210> 40
- <211> 1113
- <212> ADN
- <213> Borrelia sp.

<400> 40
atgaggggat cccatcatca tcatcatcat agcctgaccg gcaaagcgcg tctggaaagc 60
agcgtgaaag atattaccaa cgaaattgaa aaagcgatta aagaagcggg agatgcggggc 120
gtgaaaaccg atgcgtttac cgaaaccag accggcggca aagtggcggg cccgaaaatt 180
cgtgcggcga aaattcgtgt ggcgatctg accattaat ttctggaagc gaccgaagaa 240
gaaaccatta cctttaaaga aaatggcgcg ggccaagatg aatttagcgg catttatgat 300
ctgattctga acgcgcgaa agcggtgga aaaattggca tgaaagatat gaccaaacc 360
gtggaagaag cggcgaaaga aaatccgaaa accaccgcga acggtattat tgaaattgtg 420
aaagtgatga aagcgaaagt ggaaaatatt aaagaaaaac agaccaaaaa ccagaaaaaa 480
aaaaacacc tgagcgcgat tctgatgacc ctgtttctgt ttattagctg caacaacagc 540
ggcaaaggcg gcgatagcgc gagcaccaac ccggcggatg aaagcgcgaa aggcccgaa 600
ctgaccgaaa ttagcaaaaa aatcaccgat agcaacgcgt ttgtgctggc ggtgaaagaa 660
gtggaaccct tggttctgag cattgatgaa ctggcgaaaa aagcgattgg ccagaaaatc 720
gataacaaca acggcctggc ggcgctgaac aaccagaacg gcagcctgct ggcggtgctg 780
10 tatgcgatta gcaccctgat taccgaaaa ctgagcaaac tgaaaaacct ggaagaactg 840

ES 2 427 407 T3

aaaaccgaaa tcgcgaaagc gaaaaaatgc agcgaagaat ttaccaacaa actgaaaagc 900
 ggccatgctg atctgggcaa acaggatgcg accgatgata atgcgaaagc ggcgattctg 960
 aaaacccatg cgaccaccga taaaggcgcg aaagaattta aagacctgtt cgaaagcgtg 1020
 gaaggcctgc tgaaagcggc gcaggtggcg ctgaccaaca gcgtgaaaga actgaccagc 1080
 ccggtggttg cggaaagccc gaaaaaaccc taa 1113

<210> 41
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 41
 atgaccggcg cgaccaaaat ccgcctggaa cgcagcgcga aagatatcac agatgaaatc 60
 gatgcgatca agaaagacgc ggcgctgaaa ggcgtcaact ttgatgcatt taaagataaa 120
 aagaccgggt ctggagttag cgagaatcca tttattctgg aagcgaaagt tcgtgctacg 180
 acggtggcag aaaaatttgt gattgcgatt gaagaagaag caacgaaact gaaagaaacc 240
 ggcagcagtg gcgaatttag tgcgatgtat gacctgatgt ttgaggtctc taaaccgctg 300
 cagaaactgg ggattcaaga aatgaccaag acggtatctg atgcagcggg agaaaacccg 360
 cctacgacgg cgcaaggcgt cctggaaatt gccaaagaaa tgccgcaaaa actgcaacgc 420
 gttcatacca aaaattattg cactctgaag aagaaagaga atagcacttt tacggatgaa 480
 aatgtaaaa ataataacac cagcgcgaac agcgcggatg aaagcgtgaa aggcccgaaac 540
 ctgaccgaaa ttagcaaaaa aatcaccgat agcaacgcgg tgctgctggc ggtgaaagaa 600
 gtggaagcgc tgctgagcag cattgatgaa attgcggcga aagcgattgg caaaaaaatc 660
 catcagaaca acggcctgga taccgaaaac aaccataacg gcagcctgct ggcgggtgcg 720
 tatgcgatta gcaccctgat taaacagaaa ctggatggcc tgaaaaacga aggcttaaaa 780
 gaaaaaattg atgcggcgaa aaaatgcagc gaaaccttca ccaacaaact gaaagaaaaa 840
 cataccgata gcttcggtaa agaaggcgtg accgacgcgg atgcgaaaga agcgattctg 900
 aaaaccaacg gcaccaaaac caaaggcgcg gaagaactgg gcaaactgtt tgaaagcgtg 960
 gaagttctga gcaaagcggc caaagaaatg ctggcgaaca gcgtgaaaga actgaccagc 1020
 ccggtggttg cagaatctcc gaaaaagccc taa 1053

10

<210> 42
 <211> 1080
 <212> ADN
 <213> Borrelia sp.

15

<400> 42
 atgaggggat cccatcatca tcatcatcac accggcgcga ccaaatccg cctggaacgc 60
 agcgcgaaag atatcacaga tgaaatcgat gcgatcaaga aagacgcggc gctgaaaggc 120

gtcaactttg atgcatttaa agataaaaag accgggtctg gagttagcga gaatccattt 180
 attctggaag cgaaagtctg tgctacgacg gtggcagaaa aatttgtgat tgcgattgaa 240
 gaagaagcaa cgaaactgaa agaaaccggc agcagtgggc aatttagtgc gatgtatgac 300
 ctgatgtttg aggtctctaa accgctgcag aaactgggga ttcaagaaat gaccaagacg 360
 gtatctgatg cagcgggaaga aaaccgcct acgacggcgc aaggcgtcct ggaaattgcc 420
 aagaaaatgc gcgaaaaact gcaacgcgtt catacctaaa attattgcac tctgaagaag 480
 aaagagaata gcacttttac ggatgaaaaa tgtaaaaata ataaccacag cgcgaaacagc 540
 gcggatgaaa gcgtgaaagg cccgaacctg accgaaatta gcaaaaaaat caccgatagc 600
 aacgcgggtg tgctggcggg gaaagaagtg gaagcgtgct tgagcagcat tgatgaaatt 660
 gcggcgaaaag cgattggcaa aaaaatccat cagaacaacg gcctggatac cgaaaacaac 720
 cataacggca gcctgctggc ggggtgcgtat gcgattagca ccctgattaa acagaaactg 780
 gatggcctga aaaacgaagg cttaaaagaa aaaattgatg cggcgaaaaa atgcagcgaa 840
 acctcacca acaaaactgaa agaaaaacat accgatagct tcggtaaaga aggcgtgacc 900
 gacgcggatg cgaaagaagc gattctgaaa accaacggca ccaaaaccaa aggcgcggaa 960
 gaactgggca aactgtttga aagcgtggaa gttctgagca aagcggccaa agaaatgctg 1020
 gcgaacagcg tgaaagaact gaccagcccg gtggtggcag aatctccgaa aaagccctaa 1080

<210> 43
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 43
 atgactggtg aaacgaaaat tcgtctggaa tcatccgctc aggagattaa agacgaaatc 60
 aacaaaatta aagcaaacgc caagaaagaa ggcgtgaagt ttgaagcgtt taccgataaa 120
 cagaccggca gcaaagtttc agaaaaaccg gagtttattc tgaaagccaa aattaaagcg 180
 atccaggttg cggaaaaatt cgtgaaagcg attaaagaag aagccgaaaa actgaaaaaa 240
 tctggttcga gcggcgcatt ttccgcaatg tatgatctga tgctggatgt aagcaaacgc 300
 ctggaagaga ttggcattca gaaaatgacc ggcactgtca caaaggaagc ggaaaaaaca 360
 ccgccaacca ctgcagaagg gattctggcg atcgcgccag cgatggaaga gaaactgaac 420
 aacgttaata aaaaacagca ggatgcactg aaaaacctgg aagagaaggc gaacaccgcg 480
 gcgactacgt cagggaccgg taaagcgcgt ctggaaagct cggtaaaaga tatcacagac 540
 gaaattgaca aagccatcaa agaagccatt gcagacggcg ttaaactgaa tgaactggaa 600
 gaaaataaaa ccggtgcgaa aaaaggtggc ccgcagattc gcgatgcgaa aatccgtgtg 660
 atcaacctga gcgttaaatt cctgaaagaa atcgaggagg aagcaaacat cctgaaggat 720
 aatgttggca tgaacaagggt agataaagat cagctgctga aagacatgta cgacctgatg 780

10

ES 2 427 407 T3

ctgaacgcgg ctggcagtct gcagaaactg ggtctgcagg aaatgatcaa aacggttacc 840
 caagctgcgg aaaaaacccc accgaccacg gttgaaggca ttctgatgat tgcaaacacc 900
 attgaagaca aactgaagaa aatcaaaggc aaacaggaaa caaacaaaaa agatgaaagc 960
 gcaaaaggcc cgaatctgac cgtcatttct aagaaaatta ccgattcaaa cgcgtttctg 1020
 ctggccgtga aagaggttga agccctgctg tcctcgattg atgaactgag caaagctatc 1080
 ggaaagaaaa ttaaaaatga tgggacgctg gataacgagg caaatcgcaa tgaaagcctg 1140
 attgcaggcg catatgaaat cagtaaaactg attacacaga aactgagtgt cctgaacagc 1200
 gaagaactga aagaaaaaat caaagaagcc aaagactggt cggaaaagtt tactaccaaa 1260
 ctgaaagact cgcattgctga actgggtatt cagtcagtgc aagatgataa tgcgaaaaaa 1320
 gcaattctga aaacgcacgg gacgaaagat aaaggtgcca aagagctgga agaactgttt 1380
 aaaagcctgg aatcgctgag taaagccgca caggccgcgc tgaccaatag cgtgaaggaa 1440
 ctgactaatc cgtttagtag agaatctccg aaaaagccgt aa 1482

<210> 44
 <211> 1509
 <212> ADN
 <213> Borrelia sp.

5

<400> 44
 atgaggggat cccatcatca ccaccatcat actggtgaaa cgaaaattcg tctggaatca 60
 tccgctcagg agattaaaga cgaaatcaac aaaattaaag caaacgcaa gaaagaaggc 120
 gtgaagtttg aagcgtttac cgataaacag accggcagca aagtttcaga aaaaccggag 180
 tttattctga aagccaaaat taaagcgatc caggttgccg aaaaattcgt gaaagcgatt 240
 aaagaagaag ccgaaaaact gaaaaaatct ggttcgagcg gcgcattttc cgcaatgtat 300
 gatctgatgc tggatgtaag caaaccgctg gaagagattg gcattcagaa aatgaccggc 360
 actgtcacia aggaagcggg aaaaacaccg ccaaccactg cagaagggat tctggcgatc 420
 gcccaggcga tggaaagagaa actgaacaac gttaataaaa aacagcagga tgcaactgaaa 480
 aacctggaag agaaggcgaa caccgcccgc actacgtcag ggaccggtaa agcgcgtctg 540
 gaaagctcgg taaaagatat cacagacgaa attgacaaag ccatcaaaga agccattgca 600
 gacggcgtaa aactgaatga actggaagaa aataaaaccg gtgcgaaaaa aggtggcccc 660
 cagattcgcg atgcgaaaat ccgtgtgatc aacctgagcg ttaaattcct gaaagaaatc 720
 gaggaggaag caaacatcct gaaggataat gttggcatga acaaggtaga taaagatcag 780
 ctgctgaaag acatgtacga cctgatgctg aacgcggctg gcagtctgca gaaactgggt 840
 ctgcaggaaa tgatcaaac ggttaccaa gctgcggaaa aaaccacc gaccacgggt 900
 gaaggcattc tgatgattgc aaacaccatt gaagacaaac tgaagaaaat caaaggcaaa 960
 caggaaacaa acaaaaaaga tgaaagcgca aaaggcccga atctgaccgt ctttctaag 1020

ES 2 427 407 T3

aaaattaccg attcaaacgc gtttctgctg gccgtgaaag aggttgaagc cctgctgtcc 1080
 tcgattgatg aactgagcaa agctatcgga aagaaaatta aaaatgatgg gacgctggat 1140
 aacgaggcaa atcgcaatga aagcctgatt gcaggcgc atgaaatcag taaactgatt 1200
 acacagaaac tgagtgtcct gaacagcgaa gaactgaaag aaaaaatcaa agaagccaaa 1260
 gactgttcgg aaaagtttac taccaaactg aaagactcgc atgctgaact gggatttcag 1320
 tcagtgcaag atgataatgc gaaaaaagca attctgaaaa cgcacgggac gaaagataaa 1380
 ggtgccaaag agctggaaga actgtttaaa agcctggaat cgctgagtaa agccgcacag 1440
 gccgcgctga ccaatagcgt gaaggaactg actaatccgg ttgtagcaga atctccgaaa 1500
 aagccgtaa 1509

5 <210> 45
 <211> 1521
 <212> ADN
 <213> Borrelia sp.

<400> 45
 atgaggggat cccatcatca ccaccatcat actggtgaaa cgaaaattcg tctggaatca 60
 tccgctcagg agattaaaga cgaaatcaac aaaattaaag caaacgccaa gaaagaaggc 120
 gtgaagtttg aagcgtttac cgataaacag accggcagca aagtttcaga aaaaccggag 180
 tttattctga aagccaaaat taaagcgatc caggttgccg aaaaattcgt gaaagcgatt 240
 aaagaagaag ccgaaaaact gaaaaaatct ggttcgagcg gcgcattttc cgcaatgtat 300
 gatctgatgc tggatgtaag caaaccgctg gaagagattg gcattcagaa aatgaccggc 360
 actgtcacia aggaagcggg aaaaacaccg ccaaccactg cagaagggat tctggcgatc 420
 gcccaggcga tggagagaa actgaacaac gtttaataaaa aacagcagga tgcaactgaaa 480
 aacctggaag agaaggcgaa caccgcggcg actacgtcag ggaccggtaa agcgcgtctg 540
 gaaagctcgg taaaagatat cacagacgaa attgacaaaag ccatcaaaga agccattgca 600
 gacggcgтта aactgaatga actggaagaa aataaaaccg gtgcgaaaaa aggtggcccg 660
 cagattcgcg atgcgaaaat ccgtgtgatc aacctgagcg ttaaattcct gaaagaaatc 720
 gaggaggaag caaacatcct gaaggataat gttggcatga acaaggtaga taaagatcag 780
 ctgctgaaag acatgtacga cctgatgctg aacgcggctg gcagtctgca gaaactgggt 840
 ctgcaggaaa tgatcaaac ggttaccbaa gctgcggaaa aaaccccacc gaccacgggt 900
 gaaggcattc tgatgattgc aacaccatt gaagacaaac tgaagaaaat caaaggcaaa 960
 caggaaacia acaaaaaagg ttccgggggt gatgaaagcg caaaaggccc gaatctgacc 1020
 gtcatttcta agaaaattac cgattcaaac gcgtttctgc tggccgtgaa agaggtttaa 1080
 gccctgctgt cctcgattga tgaactgagc aaagctatcg gaaagaaaat taaaatgat 1140
 10 gggacgctgg ataacgaggc aatcgcaat gaaagcctga ttgcaggcgc atatgaaatc 1200

ES 2 427 407 T3

agtaaactga ttacacagaa actgagtgtc ctgaacagcg aagaactgaa agaaaaaatc 1260
 aaagaagcca aagactgttc ggaaaagttt actaccaaac tgaaagactc gcatgctgaa 1320
 ctgggtattc agtcagtgca agatgataat gcgaaaaaag caattctgaa aacgcacggg 1380
 acgaaagata aaggtgccaa agagctggaa gaactgttta aaagcctgga atcgtgtggt 1440
 aaagccgcac aggccgcgct gaccaatagc gtgaaggaac tgactaatcc ggtttagca 1500
 gaatctccga aaaagccgta a 1521

5 <210> 46
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> aa+ 2
 <400> 46
Gly Ser Gly Gly
1

15 <210> 47
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN aa+ 2

<400> 47
 ggtccgggg gt 12

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Proteína quimérica de *Borrelia* que comprende al menos una secuencia del dominio extracelular de una proteína VlsE de una primera especie de *Borrelia* que corresponde a una cepa determinada y al menos una secuencia de una región IR6 de una proteína VlsE de una segunda especie de *Borrelia* o de la primera especie de *Borrelia* pero que corresponde a una cepa diferente de la de la primera especie, comprendiendo dicha proteína quimérica:
- 5
- la secuencia del dominio extracelular de la proteína VlsE de la primera especie de *Borrelia* que está compuesta de 5 regiones variables VR1, VR2, VR3, VR4 y VR5, y de 6 regiones invariables IR1, IR2, IR3, IR4, IR5 y IR6, y dicha al menos una secuencia del dominio extracelular se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5, o una variante de una de dichas secuencias SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 y 5, presentando dicha variante una identidad de al menos 50% con las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un inmunocomplejo con los anticuerpos producidos después de una infección por *Borrelia*, y
 - la al menos una secuencia de la región IR6 de la segunda especie de *Borrelia* o de la primera especie de *Borrelia* pero que corresponde a una cepa diferente de la de la primera especie, se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 o una variante de una de dichas secuencias SEQ ID NO 6, 7 y 8, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% con las SEQ ID NO 6, 7 y 8, respectivamente, con la condición de que la variante de dicha secuencia sea capaz de formar un inmunocomplejo con los anticuerpos producidos después de una infección por *Borrelia*.
- 15
- 2.- Proteína según la reivindicación 1, que además comprende una secuencia VR6 de una especie de *Borrelia* identificada en la SEQ ID NO: 9.
- 20
- 3.- Proteína según la reivindicación 1, que comprende:
- la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 1, presentando dicha variante una identidad de al menos 50% con la SEQ ID NO: 1,
 - la secuencia SEQ ID NO: 6 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 6, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% con la SEQ ID NO: 6,
 - la secuencia SEQ ID NO: 7 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 7, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% con la SEQ ID NO: 7, y
 - la secuencia SEQ ID NO: 8 o una variante de dicha secuencia SEQ ID NO: 8, presentando dicha variante una identidad de al menos 80% con la SEQ ID NO: 8.
- 25
- 4.- Proteína según la reivindicación 3, que comprende además la secuencia SEQ ID NO: 9.
- 30
- 5.- Proteína según la reivindicación 3, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, la secuencia SEQ ID NO: 6, la secuencia SEQ ID NO: 7 y la secuencia SEQ ID NO: 8.
- 6.- Proteína según la reivindicación 5, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9.
- 7.- Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- 35
- 8.- Ácido nucleico que codifica una proteína tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 9.- Casete de expresión que está funcionalmente en una célula derivada de un organismo procarionta o eucariota, que permite la expresión de un ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 8, situado bajo el control de los elementos necesarios para su expresión.
- 40
- 10.- Vector que comprende un casete de expresión, tal como se define en la reivindicación 9.
- 11.- Procedimiento para el diagnóstico in vitro de una borreliosis de Lyme en una muestra biológica, según el cual se pone en contacto la muestra biológica con al menos una proteína tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y se determina si hay formación de un inmunocomplejo entre dicha proteína y los anticuerpos de la muestra biológica.
- 45
- 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, en el que los anticuerpos de la muestra biológica son IgG y/o IgM.
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la formación del complejo inmunológico está determinada por la adición de al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada con cualquier marcador adecuado.
- 14.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la proteína está inmovilizada sobre un soporte sólido.
- 50

15.- Kit para el diagnóstico in vitro de una borreliosis de Lyme, que comprende al menos una proteína como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

16.- Kit según la reivindicación 15, que comprende al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada con cualquier marcador adecuado.