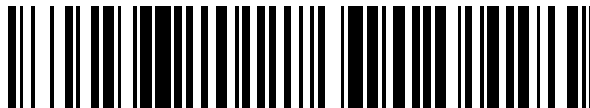


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 651**

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: **26.08.2010 E 10763756 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2470907**

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

30 Prioridad:

**28.08.2009 FR 0904093**

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

**30.09.2014**

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:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 500 651 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

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

Varias especies de borrelias, actualmente denominadas bajo el término de grupo burgdorferi o *Borrelia burgdorferi* sensu lato (que incluye *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y *B. afzelii*) están implicadas en esta infección. Estas especies son patógenas para el hombre.

En los Estados Unidos, la especie infecciosa implicada es *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. En Europa, a esta especie, se añaden *B. garinii* y *B. afzelii*. En Asia, las especies implicadas son *B. garinii* y *B. afzelii*.

En los Estados Unidos, hay declarados aproximadamente 10.000 casos anuales. En Europa, las tasas de incidencia varían en menos de 5 por 100.000.

La borreliosis de Lyme evoluciona pasando por tres fases distintas, desde la infección precoz hasta 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, denominada eritema migratorio (EM). En ausencia de tratamiento, la diseminación de la *Borrelia* por vía sanguínea se traduce algunas semanas más tarde en la aparición de artritis inflamatorias, de afecciones neurológicas (neuroborreliosis) y meníngeas, de manifestaciones cutáneas y cardiacas (fase II). Después de varios meses o años, la enfermedad evoluciona hacia una forma crónica atroficante, encefalopatía, encefalomiелitis y artritis crónica (Fase III).

Existe un tropismo orgánico particular de cada una de las especies de *Borrelia burgdorferi*. Si la primera fase de eritema migratorio está relacionada indistintamente a las tres especies, la evolución hacia una forma neurológica está asociada preferiblemente a la especie *B. garinii*, las artritis lo está más a *B-burgdorferi* sensu stricto, y la acrodermatitis crónica atroficante es específica de *B-afzelii*.

El parecido de los síntomas clínicos entre la borreliosis de Lyme y 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 en base a observaciones clínicas, si las pruebas de anamnesis están ausentes (picadura de garrapata o EM). La fase precoz de la enfermedad puede no ser aparente hasta el momento en el que alcanza fases clínicas muy avanzadas.

Es por ello que el diagnóstico de LB se basa en signos clínicos, pero también en la detección de los anticuerpos específicos de patógenos de *Borrelia burgdorferi* en el suero, generalmente por ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) o también EIA, IFA. Los anticuerpos IgM anti-*borrelia burgdorferi* aparecen en general algunos días o semanas después del comienzo de la infección y pueden persistir durante la evolución de la enfermedad. La respuesta IgG es más tardía. La mayoría de los pacientes tienen las IgG aproximadamente un mes después del comienzo de la infección activa y estas IgG pueden también persistir durante años después de la exposición inicial y de la resolución de los síntomas.

En Europa, la evaluación de la respuesta serológica es complicada debido a la existencia de tres especies patógenas y de la variabilidad inter-especies para los antígenos inmunodominantes principales. Los antígenos actualmente utilizados de forma rutinaria para la detección de las IgG e IgM de LB son unas muestras celulares tratadas con ultrasonidos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Los rendimientos de los ensayos serológicos con estos antígenos en términos de especificidad y de sensibilidad son muy variables. Así, debido a una especificidad insuficiente, que implica unas reactividades cruzadas con unos anticuerpos asociados a diferentes bacterias patógenas, en particular *Treponema pallidum* (agente etiológico de la sífilis), unas espiroquetas, *rickettsias*, *erchillia* o *Helicobacter pylori*, el diagnóstico de las muestras ensayadas positivas en ELISA debe ser confirmado por inmunotransferencia. La sensibilidad es también un factor importante. En efecto, *Borrelia burgdorferi* sensu lato expresa diferentes proteínas de superficie por adaptación a diversos microentornos, de manera que la diversidad genética y la expresión diferencial de los genes de *Borrelia burgdorferi* en los pacientes tienen unas implicaciones importantes para el desarrollo de ensayos serológicos de LB. La lipoproteína OspC (Outer-surface protein C) y la proteína DbpA (Decorin-binding protein A) pertenecen a estas proteínas. La DbpA aparece principalmente expresada en el mamífero después de la infección. Estas proteínas presentan una gran variabilidad de secuencias según las especies de *Borrelia burgdorferi* e inter-especies. Las proteínas DbpA son particularmente variables y se reparten en cuatro grupos: un grupo que corresponde a la geno especie *Borrelia afzelli*, otro grupo que corresponde a la geno especie *Borrelia* sensu stricto y dos grupos que corresponden a la geno especie *Borrelia burgdorferi garinii*.

La identidad de las secuencias de aminoácidos inter-especie entre las proteínas DbpA es sólo del 40-44%. Es del 54-72% para las proteínas OspC. El documento WO 00/78800 describe una combinación de proteínas que comprenden DbpA y OspC, y su utilización en un procedimiento de diagnóstico de una Borreliosis de Lyme.

5 Por lo tanto, es necesario desarrollar un kit que responda a los criterios de especificidad y de sensibilidad esperados y en particular que mejore la detección de las IgM, en términos de sensibilidad, en el caso de infección reciente.

10 La presente invención se propone resolver el conjunto de los inconvenientes del estado de la técnica, mediante nuevas proteínas recombinantes quiméricas, fácilmente sintetizables y purificables, y que presentan una fuerte inmunorreactividad frente a sueros de pacientes susceptibles de ser infectados por una o varias especies patógenas de *Borrelia burgdorferi*. Estas proteínas de fusión quiméricas permiten paliar los problemas de sensibilidad y de especificidad relacionados: con la presencia de varias especies patógenas de *Borrelia burgdorferi*, con la gran variabilidad de las secuencias de los antígenos de superficie de *Borrelia burgdorferi* y con la necesidad de utilizar varios antígenos representativos de las especies *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto y *B. afzelii* para elaborar un ensayo de diagnóstico de la borreliosis de Lyme basado al menos en la detección de los anticuerpos anti-OspC y anti-DbpA.

15 Las proteínas de fusión quiméricas de la invención permiten por otra parte resolver las dificultades encontradas para expresar ciertos antígenos en forma recombinante a un nivel elevado. En efecto, a pesar de un trabajo importante sobre la construcción de los genes para obtener una expresión optimizada de estos en *E. coli*, los inventores han mostrado por primera vez que las proteínas OspC están poco expresadas en forma recombinante en *E. coli*, mientras que de manera muy imprevisible, han encontrado que las proteínas DbpA podían ser expresadas en las mismas condiciones en forma soluble en condiciones no desnaturizantes y con unos rendimientos más elevados. La facilidad de expresión de las proteínas DbpA se ha explotado para crear unas proteínas quiméricas compuestas de DbpA y de OspC y los inventores han podido demostrar que las proteínas quiméricas estaban mejor expresadas que las proteínas OspC aisladas, lo que era completamente inesperado ya que no se ha descrito jamás, ni se ha sugerido, que las proteínas DbpA podían tener las propiedades de proteínas de fusión. Asimismo, a fin de mejorar los niveles de expresión, los inventores han concebido unas proteínas quiméricas DbpA-OspC utilizando las propiedades de fusión inesperadas de las proteínas DbpA para mejorar la expresión y la solubilidad de las proteínas quiméricas. En la construcción molecular para la expresión de una proteína quimérica de la invención, el gen que codifica para la proteína DbpA está integrado secuencia arriba del o de los que codifican para una o más proteínas OspC. En función de esta construcción molecular, la proteína quimérica de la invención presenta en su extremo N-terminal una secuencia que pertenece a una secuencia proteica DbpA, y en su extremo C-terminal una secuencia que pertenece a una secuencia proteica OspC. Este tipo de construcción, además del hecho de que permite facilitar y optimizar la expresión y la solubilidad de la proteína quimérica, presenta además otra ventaja, que es mejorar el reconocimiento de la quimérica por unos anticuerpos anti-Borrelia debido a la mejor presentación de estos de la región inmunodominante de la proteína OspC. Una ventaja suplementaria de las proteínas quiméricas de la invención es limitar el número de proteínas recombinantes en la constitución de un kit de diagnóstico de la Borreliosis de Lyme. Por otra parte, las propiedades de fusión de las proteínas DbpA hacen de ellas excelentes candidatas para la expresión de proteínas vacineas quiméricas DbpA-OspC para prevenir una infección por Borrelia. En consecuencia, las proteínas quiméricas de la invención son útiles como agente activo en una vacuna preventiva contra la borreliosis.

40 Asimismo, la presente invención tiene por objeto una proteína quimérica de fusión DbpA-OspC de Borrelia, no natural, de síntesis, es decir obtenida por ingeniería genética (proteína recombinante) o por síntesis peptídica, siendo dicha proteína seleccionada del grupo que consiste en:

45 (a) una proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende en su extremo N-terminal (o consiste en) la secuencia SEC ID nº 1, y en su extremo C-terminal la SEC ID nº 2, o una variante de dicha proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 1 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 2, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia, o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

50 (b) una proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende en su extremo N-terminal (o consiste en) la secuencia SEC ID nº 3, y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 4, o una variante de dicha proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 3 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 4, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

55 (c) una proteína, cuya secuencia en aminoácidos comprende en su extremo N-terminal (o consiste en) la secuencia SEC ID nº 5, y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 7, o una variante de dicha proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 5 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 7, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

60

5 (d) una proteína, cuya secuencia en aminoácidos comprende en su extremo N-terminal (o consiste en) la secuencia SEC ID nº 6, y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 7, o una variante de dicha proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 6 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 7, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

10 (e) una proteína, cuya secuencia en aminoácidos comprende en su extremo N-terminal (o consiste en) la secuencia SEC ID nº 5, la secuencia SEC ID nº 6 y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 7, o una variante de dicha proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 5, una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 6 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 7, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia; y

15 (f) una proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende (o consiste en) una secuencia seleccionada entre las SEC ID nºs 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

20 Cada una de las proteínas identificadas anteriormente comprende al menos una secuencia del dominio extracelular de una proteína DbpA de una especie de borrelia seleccionada entre *B. afzelii* (SEC ID nº 1), *B. burgdorferi* sensu lato (SEC ID nº 3) y *B. garinii* (grupo III: SEC ID nº 5) (grupo IV: SEC ID nº 6) o una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con dichas secuencias y al menos una secuencia de una proteína OspC de *B. afzelii* (SEC ID nº 2), *B. burgdorferi* sensu stricto (SEC ID nº 4) y *B. garinii* (SEC ID nº 7) o una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con dichas secuencias. Preferiblemente, la(s) secuencia(s) DbpA está(n) colocada(s) en el lado N-terminal de la proteína recombinante quimérica y la secuencia OspC está colocada del lado C-terminal de la proteína recombinante quimérica

25 Una secuencia de al menos 6 histidinas puede ser añadida a nivel del extremo N-terminal o C-terminal de la proteína quimérica para permitir su purificación sobre resina de metal-quelato. La secuencia de 6 histidinas, identificada en la SEC ID nº 22 está colocada preferiblemente en el lado N-terminal de la construcción. Esto se ilustra, a título de ejemplo, por las secuencias SEC ID nºs 9, 11, 13 y 14 que comprenden en el lado N-terminal una cola poly-His (6). La cola poly-His puede ser codificada por cualquiera de las secuencias identificadas en las SEC ID nºs 23, 24 y 25.

30 Unos aminoácidos adicionales pueden estar presentes secuencia arriba de la cola poly-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. Este es el caso, en particular, en las secuencias SEC ID nºs 9, 11, 13 y 14 que comprenden una unidad "MRGS" (SEC ID nº 26) secuencia arriba de la cola poly-His. La unidad "MRGS" está codificada por ATGAGGGGATCC (SEC ID nº 27).

35 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 anticuerpos potenciales a cada uno de los dominios. Es rica en aminoácidos Gly y Ser, aminoácidos descritos como que aportan una flexibilidad en la estructura terciaria de la proteína. Es asimismo posible introducir en una secuencia de interés codificante un brazo ADN (o linker) para favorecer la unión entre las secuencias que codifican dos proteínas de interés. Este es el caso en particular en la secuencia SEC ID nº 40 14 que comprende una unidad "GSGG" (SEC ID nº 28) codificada por la secuencia GGTTCCGGGGGT (SEC ID nº 29) que actúa como brazo de unión entre las proteínas DbpA grupo IV y OspC de *B. garinii*.

Las proteínas preferidas son identificadas en las SEC ID nºs 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14. Están respectivamente codificadas por las secuencias de ADN correspondientes identificadas en las SEC ID nºs 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21.

45 La invención tiene también por objeto las secuencias de ADN que codifican las proteínas tales como se han definido anteriormente y en particular las secuencias identificadas SEC ID nºs 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21.

La invención tiene asimismo por objeto un casete de expresión que es funcional en una célula derivada de un organismo procariota (por ejemplo *Escherichia coli*) o eucariota, tal como la levadura (por ejemplo *Pichia*, *Schizosaccharomyces*) que permite la expresión del ácido nucleico descrito anteriormente (ADN), cuando está colocada bajo el control de los elementos que permiten su expresión, así como el vector que comprende tal casete.

50 Las proteínas de la invención son utilizables en particular para el diagnóstico de una infección de Borrelia. Así, 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, de sangre, de plasma, etc.) según el cual se pone en contacto la muestra biológica con al menos una proteína tal como se ha definido antes, y se determina si hay formación de un complejo inmunológico 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 por cualquier marcador apropiado. Por marcador, se entiende un trazador capaz de generar una señal. Una lista no limitativa de estos trazadores comprende las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los cromóforos

5 como los compuestos fluorescentes, luminiscentes o colorantes; los grupos de densidad electrónica detectables por microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas como la conductividad, mediante los métodos de amperometría o de voltametría, o por unas mediciones de impedancia; los grupos detectables por unos métodos ópticos como la difracción, la resonancia plasmón de superficie, la variación de ángulo de contacto o por unos métodos físicos como la espectroscopía de fuerza atómica, el efecto túnel, etc.; las moléculas radioactivas como <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S o <sup>125</sup>I. Preferentemente, la o las proteína(s) está(n) inmovilizadas sobre un soporte sólido que puede ser el cono de un aparato Vidas<sup>®</sup>, el pocillo de una placa de microtitulación, un gel, una partícula, etc.

En un modo de realización de la invención, la muestra biológica se pone además en contacto con al menos una proteína quimérica VIsE, tal como se describe a continuación.

10 La proteína VIsE (surface expressed lipoprotein with Extensive antigenic Variation) es principalmente expresada *in vivo*, de manera transitoria y rápidamente después de la infección del hospedante. Es muy inmunogénica en el hospedante infectado, implicando la producción de IgG y de IgM. El locus de VIs 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 (VIsE). *In vivo*, se producen unas recombinaciones aleatorias entre casetes de expresión y casetes silenciosos durante la infección y son el origen de la variabilidad antigénica de VIsE. La proteína VIsE está compuesta de seis regiones variables VR1-VR6, situadas en la superficie de la proteína VIsE, espaciadas por regiones denominadas invariables IR1-IR6.

La proteína VIsE quimérica comprende (o consiste esencialmente en):

20 (i) al menos una secuencia seleccionada ente las secuencias identificadas en las SEC ID n<sup>os</sup> 30, 31, 32, 33 y 34 y las secuencias que presentan al menos el 50% de identidad, preferentemente el 60% o el 70% de identidad y ventajosamente al menos el 80% o el 85% de identidad con las SEC ID n<sup>o</sup> 30, 31, 32, 33 y 34, y

25 (ii) al menos una secuencia que comprende la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 35 o una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad, preferentemente al menos el 85% de identidad y ventajosamente al menos el 90% de identidad con la SEC ID n<sup>o</sup> 35, la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 36 o una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad, preferentemente al menos el 85% de identidad y ventajosamente al menos el 90% de identidad con la SEC ID n<sup>o</sup> 36, la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 37 o una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad, preferentemente al menos el 85% de identidad y ventajosamente al menos el 90% de identidad con la SEC ID n<sup>o</sup> 37, y facultativamente, la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 43. La proteína quimérica VIsE, preferentemente comprende la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 43.

30 Como se ha descrito anteriormente, se puede añadir una cola poli-histidina (x6) a nivel del extremo N-terminal de la proteína quimérica para permitir su purificación sobre resina de metal-quelato, así como unos aminoácidos adicionales secuencia arriba de la cola poly-his.

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

(i) la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 30 o una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad, preferentemente al menos el 60% o el 70% de identidad y ventajosamente al menos el 80 o el 85% de identidad con la SEC ID n<sup>o</sup> 30; y

35 (ii) la secuencia que comprende la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 35 o una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad, preferentemente al menos el 85% de identidad y ventajosamente al menos el 90% de identidad con las SEC ID n<sup>o</sup> 35, la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 36 o una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad, preferentemente al menos el 85% de identidad y ventajosamente al menos el 90% de identidad con las SEC ID n<sup>o</sup> 36, la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 37 o una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad, preferentemente al menos el 85% de identidad y ventajosamente al menos el 90% de identidad con la SEC ID n<sup>o</sup> 37, y la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 43.

La proteína quimérica preferida comprende (o consiste esencialmente en, o también consiste en):

(i) la secuencia SEC ID n<sup>o</sup> 30; y

(ii) la secuencia que comprende las secuencias SEC ID n<sup>os</sup> 35, 36, 37 y 43.

45 La proteína comprende o consiste en una secuencia identificada como la SEC ID n<sup>o</sup> 38

La SEC ID n<sup>o</sup> 30 corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VIsE de *B. garinii* (cepa pBi) separada de su secuencia señal (aa 1-19) y de la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6.

La SEC ID n<sup>o</sup> 31 corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VIsE de *B. garinii* (cepa pBr) separada de su secuencia señal y de la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6.

50 La SEC ID n<sup>o</sup> 32 corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VIsE de *B. garinii* (cepa pLi) separada de su secuencia señal y de la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6.

La SEC ID nº 33 corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. afzelii* (cepa pKo) separada de su secuencia señal y de la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6.

5 La SEC ID nº 34 corresponde a la secuencia del dominio extracelular de VlsE de *B. burgdorferi* sensu stricto (cepa B31) separada de su secuencia señal y de la región C-terminal de la proteína madura situada después del dominio IR6.

La SEC ID nº 35 corresponde a la secuencia del dominio IR6 de *B. burgdorferi* sensu stricto (cepa B31).

La SEC ID nº 36 corresponde a la secuencia del dominio IR6 de *B. afzelii* (cepa ACA-1).

La SEC ID nº 37 corresponde a la secuencia del dominio IR6 de *B. garinii* (cepa Ip90).

La SEC ID nº 43 corresponde a la secuencia de la región variable VR6 de *B. burgdorferi* sensu stricto (cepa B31).

10 La invención tiene también por objeto un equipo para el diagnóstico *in vitro* de una Borreliosis de Lyme que comprende al menos una proteína quimérica DbpA-OspC tal como se ha definido anteriormente, que comprende preferentemente al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada por cualquier marcador apropiado que responde a las definiciones dadas anteriormente. El equipo puede comprender además una proteína VlsE quimérica tal como se ha definido anteriormente.

15 Las proteínas de la invención son igualmente utilizables como ingrediente activo para la preparación de una composición vacunal para prevenir una infección por Borrelia. Asimismo, la presente invención tiene también por objeto una composición vacunal que comprende al menos una proteína tal como se ha definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Los ejemplos siguientes, se dan a título ilustrativo y no tienen carácter limitativo. Permiten entender mejor la invención. El orden de las secuencias que codifican las diferentes regiones epitópicas inmunodominantes de las proteínas recombinantes quiméricas puede ser eventualmente modificado. Los epítomos pueden también presentar unas variaciones con respecto a las secuencias descritas en los ejemplos según la especie de Borrelia burgdorferi y la o las cepas que representan. La longitud de las regiones de unión puede también ser modificada para mejorar la flexibilidad entre dos dominios. Finalmente, las regiones de fijación pueden ser insertadas dentro de las regiones de unión.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: preparación de construcciones plasmídicas que codifican para las proteínas recombinantes quiméricas DbpA-OspC.

30 Las secuencias de ADN que codifican para las diferentes secuencias DpbA y OspC descritas son identificadas en la tabla 1. Las secuencias de ADN se optimizaron para favorecer la expresión en *E. coli* utilizando GeneOptimizer™ y sintetizadas respectivamente por GenScript corporation (Scotch Plains, NJ, USA) o GeneArt GmbH Regensburg, Alemania).

Tabla 1: origen de las secuencias

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

35 Cada proteína recombinante quimérica comprende al menos una región epitópica que corresponde al dominio extracelular de una secuencia DbpA de Borrelia burgdorferi sensu stricto o *B. afzelii* o *B. garinii* y al menos una región epitópica que corresponde al dominio extracelular de una secuencia OspC de Borrelia burgdorferi sensu stricto o *B. afzelii* o *B. garinii*.

Las asociaciones de diferentes secuencias nucleotídicas que codifican para unas secuencias DbpA y/o OspC así como las modificaciones de secuencias nucleotídicas, tales como deleciones, adición de secuencia de unión o adición de secuencia linker se realizaron por ingeniería genética utilizando las técnicas de PCR bien conocidas por el experto en la materia y descritas por ejemplo en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

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

Se introdujo una secuencia poli-histidina (6xHis) en el lado N-terminal de cada proteína recombinante. Esta secuencia permite la purificación de las proteínas recombinantes sobre columna de afinidad de metal-quelato. Es una región de fijación sobre el gel Ni-NTA que permite facilitar posteriormente la etapa de purificación de la proteína recombinante quimérica. Este péptido HHHHHH (SEC ID nº 22) está codificado por las secuencias nucleotídicas CATCATCATCATCAT (SEC ID nº 23) o CATCATCATCATCAC (SEC ID nº 24) o CATCATCACCACATCAT (SEC ID nº 25) o por cualquier otra secuencia que codifica para la secuencia SEC ID nº 22. Esta región de fijación particular, que comprende una sucesión de histidina, permite en particular la fijación orientada de la proteína recombinante sobre un soporte constituido de sílice o de óxidos metálicos.

Tabla 2: construcciones plasmídicas y proteínas recombinantes

Características de las proteínas recombinantes			Características de las construcciones plasmídicas	
Nombre	N-terminal Tag	Secuencia <i>B. burgdorferi</i>	Vector parental	Sitio de inserción en el vector de la secuencia inserto
bLYM114 SEC ID nº 9	6 x His	<i>B. afzelii</i> strain PKo DbpA aa 2-150 + OspC aa 2-212	pMR78*	5'BamHI / 3'EcoRI
bLYM120 SEC ID nº 11	6 x His	<i>B. sensu stricto</i> strain B31 DbpA aa 28-192 + OspC aa 26-210	pMR78*	5'BamHI / 3'HindIII
bLYM121 SEC ID nº 14	6 x His	<i>B. garinii</i> DbpA III aa 25-187 strain 40 + DbpA IV aa 24-176 strain PBi + OspC aa 32-208 strain PEi	pMR78*	5'BamHI / 3'HindIII
* [2]				

Ejemplo 2: Expresión de las proteínas recombinantes bLYM114, bLYM120 y bLYM121 del ejemplo 1 y purificación.

Una construcción plasmídica que corresponde a una secuencia SEC ID nº 16, 18 ó 21 insertada en un vector de expresión (pMR) se utilizó para transformar una bacteria de *E. coli* (cepa BL21) según un protocolo clásico conocido por el experto en la materia. Las bacterias transformadas se seleccionaron gracias a su resistencia a la ampicilina llevada por el vector pMR.

Un clon de bacteria recombinante se seleccionó entonces para sembrar un pre-cultivo de 40 ml de medio 2xYT (triptona 16 g/l; extracto de levadura 10 g/l; NaCl 5 g/l, pH 7,0) que contiene 100 µg/ml de ampicilina. Después de 15 a 18 horas de incubación a 30°C bajo agitación a 250 rpm, este pre-cultivo se utilizó para sembrar 1 litro de medio 2xYT que contenía el 2% de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo se incubó a 30°C bajo agitación a 250 rpm hasta que la DO a 600 nm alcanzó 1,0/1,2. El cultivo se mantuvo durante 3 horas 30 minutos o 4 horas a 30°C añadiendo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM y se recogió por centrifugación a 6000 g durante 30 minutos. El residuo celular se almacenó a -60°C. Para la purificación, la biomasa húmeda se descongeló y se resuspendió en un tampón de lisis que contiene unos inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y de benzonasa nucleasa (Novagen) y se sometió a una ruptura celular a 1,6 kBar en un destructor de células (Constant System Ltd, Daventry, REINO UNIDO). El lisado se centrifugó después a 10,000 rpm durante 45 minutos a 2-8°C. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas solubles. Este sobrenadante se filtró sobre un filtro de 0,45 µ y se purificó por cromatografía de afinidad sobre una columna de quelación de metales (matrice nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA, Qiagen). Para ello, el sobrenadante se depositó (1 ml/min) a 18-25°C sobre una columna de 8 ml de gel Ni-NTA equilibrada en tampón A (véase la tabla 3). La columna se lavó después en tampón A, hasta obtener en salida

de columna una  $DO_{280nm}=0$ . La elución de la proteína recombinante se obtiene de un tampón B, según las indicaciones detalladas en la tabla 3, y la proteína purificada se dializó en casete de diálisis 10000 o 20000 MWCO (Slide-A-Lyser<sup>®</sup>, Pierce) contra un tampón de diálisis. Las condiciones de purificaciones sobre gel Ni-NTA son descritas en la tabla 3.

5 Tabla 3: purificación de las proteínas recombinantes

Proteína	bLYM114	bLYM120	bLYM121
	SEC ID nº 14	SEC ID nº 11	SEC ID nº 14
Tampón de lisis y de lavado	Tampón A <sup>1</sup>		
Tampón de elución	Tampón B <sup>2</sup>		
Etapas de elución 1	90% Tampón A + 10% Tampón B (4CV)	92% Tampón A + 8% Tampón B (4CV)	100 % Tampón B
Etapas de elución 2	100 % Tampón B	100 % Tampón B	NA
Rendimiento de purificación mg proteína/ g biomasa húmeda	12	13	20
Rendimiento de purificación mg proteína /L de cultivo	80	122	245
<sup>1</sup> fosfato sódico 50 mM, Imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,1%, Glicerol 5 %, pH = 7,8			
<sup>2</sup> fosfato sódico 50 mM, Imidazol 325 mM, NaCL 500 mM, Glicerol 5 %, pH = 7,5			

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

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

15 Ejemplo 3: detección de las IgG y de las IgM humanas con las proteínas recombinantes quiméricas mediante una técnica Immunotransferencia en línea

Cada proteína recombinante se depositó en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA) según el protocolo siguiente:

20 La concentración en proteína se ajusta a 1 mg/ml en PBS pH 7,2 y se diluye en PBS pH 7,2 adicionado de Tween 20 al 0,03% (dilución 1/200). La membrana PVDF se humidificó en metanol, se lavó en agua desmineralizada y se puso sobre un papel de transferencia húmedo. Una regla de plástico se sumergió en la dilución de proteínas y se fijó sobre la membrana PVDF. Después del depósito de las proteínas y del secado de las membranas, las membranas se cortaron verticalmente en bandas. Antes de usarlas, las bandas se incubaron con gelatina al 5% en TBS pH 7,5 durante 1 hora a 37°C. Los protocolos de inmunotransferencia se realizaron a temperatura ambiente, tal como se describe por Bretz A.G. *et al.* [3]. Las bandas se incubaron durante 2 horas con unos sueros humanos diluidos al 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 USA) diluidos al 1/1000 en TBS con gelatina al 1%. Después del lavado, las bandas se incubaron con el sustrato BCIP-NBT de la fosfatasa alcalina (KPL, Gaithersburg, MD, USA) durante 30 minutos, y después se lavaron en agua destilada y se secaron.

30 Panel de sueros ensayados

Los sueros humanos se recogieron a partir de pacientes de LB típicos bien definidos clínicamente, que correspondían a las diferentes fases de LB (22 con un eritema migratorio [EM], 5 con una carditis, 20 con una



5 neuroborreliosis [NB], 20 con artritis de Lyme [LA], 20 con una acrodermatitis crónica atrófica [ACA] y 10 con linfocitoma de cutis benigno [LCB]. Se han encontrado unas IgG anti-Lyme mediante inmunotransferencia, descrita anteriormente y utilizando unos lisados de células enteras [4], en los sueros de pacientes con LA, ACA y carditis. EM, NB y LCB se identificaron clínicamente, pero no se encontraron todos los sueros correspondientes positivos por inmunotransferencia casera [4], ni por los kits disponibles comercialmente (VIDAS<sup>®</sup> Lyme (biomérieux), Borrelia IgG, (Diasorin<sup>®</sup>) y Borrelia IgM (r-biopharm<sup>®</sup>). Por el contrario, todos los casos de NB incluidos en el estudio tenían unos anticuerpos detectables en el líquido cefalorraquídeo [LCR] (índice que se extiende de 2 a 27,1 por VIDAS<sup>®</sup> Lyme (biomérieux). La presencia de IgM se buscó sólo en los casos clínicos de fase I y II y no en las fases crónicas.

10 El grupo de control negativo consistía en 31 sueros anteriormente encontrado como 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, Valais, Suiza) con la proteína recombinante.

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

Los resultados se presentan en la tabla 4.

15 Tabla 4: Reactividad en inmunotransferencia en línea de los sueros humanos de pacientes con borreliosis de Lyme con 3 proteínas recombinantes quiméricas bLYM114 (SEC ID nº 9), bLYM120 (SEC ID nº 11) y bLYM121 (SEC ID nº 14)

Proteína	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
∑ 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[++]
Total de los positivos e intensidad de la reacción	66,7%					42,5%			
						28[+++] 20[++] 16[+]			
						1[+++] 14[++] 7[+]			

20 La especificidad es del 100% en base a 31 sueros procedentes de sujetos sanos determinados Lyme negativos por los ensayos comercializados estándares.

#### Detección de las IgG

25 Los resultados indican que las proteínas de fusión quiméricas recombinantes son unas herramientas de diagnóstico sensibles a todas las fases de la infección para las IgG y las IgM. Ponen en evidencia un efecto complementario de las tres proteínas recombinantes basadas respectivamente en secuencias de *Borrelia afzelii*, *B. sensu stricto* y *B. garinii* para la detección de las IgG. La utilización combinada de las tres proteínas recombinantes quiméricas permite en la fase I de la infección detectar unas IgG en 9 casos de los pacientes con un EM de 22 (es decir el 40,9% de sensibilidad).

#### Detección de las IgM

30 Unas IgM antiproteínas quiméricas se encontraron en 11 casos de 22 (es decir el 50% de sensibilidad). Por lo tanto, estas proteínas quiméricas detectan más frecuentemente las IgM que las IgG en los sueros de pacientes LB en las fases I. Los ensayos efectuados en los controles: inmunotransferencia casera [4], y el kit comercializado Borrelia

IgM (r-biopharm<sup>®</sup>) no detectan más los sueros IgM positivos. Además, 3 sueros encontrados negativos por el ensayo de inmunotransferencia y *Borrelia* IgM (r-biopharm<sup>®</sup>) son detectados por las tres proteínas quiméricas citadas en el ejemplo (3/3) o por una de las tres proteínas citadas en el ejemplo (1/3). La utilización combinada de las tres proteínas recombinantes permite mejorar, en la fase I de la infección, un 13,6% la sensibilidad de detección de las IgM.

Ejemplo 4: preparación de las construcciones plasmídicas que codifican para las proteínas recombinantes quiméricas VlsE.

Las secuencias de ADN que codifican las diferentes secuencias de la proteína son identificadas en la tabla 5.

Tabla 5: origen de las secuencias

proteína	Especies de <i>B. burgdorferi</i>		
	<i>B. sensu stricto</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
VlsE	-	-	*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)

Las secuencias se optimizaron para su expresión en *E. coli* utilizando GeneOptimizer<sup>™</sup> y se sintetizaron respectivamente por GenScript corporation (Scotch Plains, NJ, USA) o GeneArt GmbH (Regensburg, Alemania).

Se realizaron unas modificaciones complementarias en el ADN, deleciones o asociaciones de diferentes secuencias mediante la PCR por ingeniería genética utilizando las técnicas de la PCR bien conocidas por el experto en la materia y descritas por ejemplo en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989. Las secuencias de ADN se enlazaron en el vector de expresión pMR [2] o pET-3d (Novagen<sup>®</sup>). Las construcciones plasmídicas y las proteínas correspondientes citadas en ejemplo (bLYM110, bLYM125) están descritas en la tabla 6.

Tabla 6: Construcciones plasmídicas y proteínas correspondientes

Características de las proteínas recombinantes			Características de las construcciones plasmídicas	
nombre	N-terminal Tag	Secuencia <i>B. burgdorferi</i>	Vector parental	Sitio de inserción en el vector de la secuencia inserto
bLYM110 SEC ID nº 39	6 x His	vlsE <i>garrinii</i> pBi aa 20-293 + 3 IR6 [sensu stricto B21 aa 274-305 + <i>afzelii</i> ACA-1aa 172-188 + <i>garrinii</i> Ip90 aa 167-191]	pMR78	5' <i>Bam</i> HI / 3' <i>Hind</i> III
bLYM125 SEC ID nº 41	8 x His		pET-3d	5' <i>Nco</i> I / 3' <i>Bam</i> HI

Ejemplo 5: Expresión de las proteínas recombinantes del ejemplo 4 y purificación.

Se utilizó una construcción plasmídica descrita en el ejemplo 4 para transformar una bacteria *E. coli* (cepa BL21) según un protocolo clásico conocido por el experto en la materia. Las bacterias transformadas se seleccionaron gracias a su resistencia a la ampicilina llevada por el vector pMR o pET.

Después se seleccionó un clon de bacteria recombinante entonces para sembrar un pre-cultivo 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 horas de incubación a 30°C bajo agitación a 250 rpm, este pre-cultivo se utilizó 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 bajo agitación a 250 rpm hasta que la DO a 600 nm alcanzó 1,0/1,2. El cultivo se mantuvo durante 3 horas 30 minutos o 4 horas a 30°C añadiendo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM y se recogió por centrifugación a 6000 g durante 30 minutos. El residuo celular se almacenó a -60°C. Para la purificación, la biomasa húmeda se resuspendió en un tampón de lisis que contenía unos inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y de benzonasa nucleasa (Novagen)

5 y se sometió a una ruptura celular a 1,6 kBar en un destructor de células (Constant System Ltd, Daventry, REINO UNIDO). El lisado se centrifugó entonces a 10000 rpm durante 45 minutos a 2-8°C. Después de la filtración sobre un filtro de 0,22 µm, el sobrenadante se cargó sobre una columna NiNTA (Quiagen®) equilibrada en tampón de lisis. La resina se lavó entonces con el mismo tampón hasta que el A<sub>280nm</sub> alcanzó la línea de base. Se efectuó una elución con el tampón de elución y la proteína purificada se dializó sobre un casete Pierce de diálisis Slide-A-Lyser® 10000 o 20000 MWCO contra un tampón de diálisis. Las condiciones de las purificaciones sobre gel Ni-NTA son descritas en la tabla 7.

Tabla 7: purificación de las proteínas recombinantes

Proteína	bLYM110 SEC ID nº 39	bLYM125 SEC ID nº 41
Tampón de lisis y de lavado	Tampón A <sup>1</sup>	Tampón A <sup>1</sup> + Urea 2M
Tampón de elución	Tampón B <sup>2</sup>	Tampón B <sup>2</sup> modificado con 600 mM de imidazol
Etapas de elución 1	86% Tampón A + 14% Tampón B (4CV)	92% Tampón A + 8% Tampón B (4CV)
Etapas de elución 2	100 % Tampón B	100 % Tampón B
Rendimiento de purificación mg proteína /g biomasa húmeda	0,5	0,8
Rendimiento de purificación mg proteína /L de cultivo	8,7	17
<sup>1</sup> fosfato sódico 50 mM, Imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,1%, Glicerol 5%, pH = 7,8		
<sup>2</sup> fosfato sódico 50 mM, Imidazol 325 mM, NaCl 500 mM, Glicerol 5%, pH = 7,5		

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

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

Ejemplo 6: Detección de las IgG y de las IgM humanas con la proteína recombinante química bLYM110 del ejemplo 5 mediante una técnica Inmonotransferencia en línea

20 La proteína recombinante se ha depositado sobre una membrana de difluorouro de polivinilideno (PVDF, Immobilon, Millipore®, Vedford, Mass. USA) según el protocolo siguiente:

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

Panel de sueros ensayados

35 Los sueros humanos se recogieron a partir de pacientes de LB típicos bien definidos clínicamente que corresponden a las fases de LB (22 con un eritema migratorio [EM], 5 con una carditis, 20 con una neuroborreliosis [NB], 20 con artritis de Lyme [LA], 20 con una acrodermatitis crónica atrófica [ACA] y 10 con un linfocitoma de cutis benigno [LCB]. Se encontraron unas IgG anti-Lyme por inmunotransferencia, descrita anteriormente y utilizando unos lisados de células enteras [4], en los sueros de pacientes con LA, ACA y carditis. Las EM, NB y LCB se identificaron

clínicamente, pero no se encontraron todos los sueros correspondientes positivos por inmunotransferencia casera [4], ni por los kits disponibles comercialmente (VIDAS® Lyme (biomérieux), Borrelia IgG, (Diasorin®) y Borrelia IgM (r-biopharm®). Por el contrario, todos los casos de NB incluidos en el estudio tenían unos anticuerpos detectables en el líquido cefalorraquídeo [LCR] (índice que se extiende de 2 a 27,1).

5 El grupo de control negativo consistía en 31 sueros anteriormente encontrados como 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, Valais, Suiza) con la proteína recombinante. La intensidad de la reacción se evaluó de la siguiente manera: [+], [++], [+++], [-] o resultados equívocos. Los resultados equívocos se consideraron como negativos.

10 Los resultados son presentados en la tabla 8 siguiente

Tabla 8

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

Detección de las IgG

15 Los resultados indican que la proteína recombinante bLYM110 es un antígeno de diagnóstico altamente sensible a todas las fases de la infección para las IgG. En la fase I de la infección, las IgG se detectaron en 17 de 22 casos de pacientes con un EM (es decir, el 77,3% de sensibilidad). Cinco de los pacientes con EM que se encontraron negativos con la proteína recombinante lo eran también con la inmunotransferencia casera y con los kits disponibles en el comercio. Siete sueros EM encontrados positivos con la proteína recombinante no se detectaron por inmunotransferencia, lo que representa una mejora del 31,8% de la sensibilidad con la proteína recombinante.

20 En la fase primaria de la infección, en ausencia de enrojecimiento característico, el diagnóstico puede ser difícil, ya que las otras manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme no son específicas. Además, sólo 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 del 77% en los pacientes que presentan un EM.

Detección de las IgM

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

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

Esta validación se realiza en ensayo VIDAS® mediante la utilización:

30 1) de las proteínas quiméricas recombinantes bLYM114, bLYM120, bLYM121, obtenidas según los ejemplos 1, 2 para la detección de las IgM, y

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

5 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. La o las proteínas recombinantes se fijan sobre el cono. Después de una etapa de dilución, la muestra se aspira y se descarga varias veces en el interior del cono. Esto permite a las inmunoglobulinas anti-Lyme de la muestra unirse a las proteínas recombinantes. Los componentes no se han unido se eliminan por lavado. Un anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas conjugado con la fosfatasa alcalina (PAL) se incuba en el cono, en el que se fija a las inmunoglobulinas anti-Lyme. Las etapas de lavado eliminan el conjugado no fijado. Durante la última etapa de revelación, el sustrato de la fosfatasa alcalina (PAL), el 4-metil-umbeliferilfosfato, se hidroliza en 4-metil-umberiferona cuya fluorescencia emitida a 450 nm se mide. La intensidad de la fluorescencia se mide por 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 el VIDAS® y se expresan en RFV (Relative Fluorescent Value).

15 Se ensayaron así 255 sueros positivos (sueros equívocos + sueros positivos) y 298 sueros negativos (equívocos + negativos) con el sistema Vidas®.

Los conos Vidas® Lyme IgG son sensibilizados por 300 µl de solución que comprende las proteínas bLYM114, bLYM120 y bLYM125 de la invención a una concentración de 1 µg/ml cada una en una solución de sensibilización común.

20 En la primera etapa, los sueros se incuban durante 5,3 minutos para la formación de los complejos antígeno-anticuerpos. En la segunda etapa, unas anti-IgG humanas marcadas con PAL se incuban durante 5,3 minutos.

Los resultados son dados en índice en relación a un umbral de positividad situado a 135 RFV en el protocolo.

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

25 - entre los 298 sueros negativos ensayados, 284 son negativos y 14 son falsos positivos, lo que corresponde a una especificidad del 95,3%.

#### Referencias bibliográficas

1. Göttner G. *et al.*, Int. J. Microbiol. 293, Supl. 37, 172-173 (2004)

2. Arnaud N. *et al.*, Gene 1997; 199:149-156.

30 3. Bretz A.G., K. Ryffel, P. Hutter, E. Dayer y 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

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux

35 <120> Proteínas utilizadas para el diagnóstico de una borreliosis de Lyme

<130> Lyme DbpA-OspC PCT

<160> 43

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

40 <211> 149

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

<400> 1

ES 2 500 651 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> 2

<211> 211

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 2

ES 2 500 651 T3

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  
 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> 3

<211> 164

<212> PRT

5 <213> *Borrelia* sp.

<400> 3

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

ES 2 500 651 T3

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																

<210> 4

<211> 185

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 4

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								



ES 2 500 651 T3

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

<210> 5

<211> 162

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 5

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

ES 2 500 651 T3

			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> 6

<211> 154

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 6

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> 7

<211> 176

10 <212> PRT

ES 2 500 651 T3

<213> *Borrelia sp.*

<400> 7

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  
 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> 8

5 <211> 361

<212> PRT

<213> *Borrelia sp.*

<400> 8

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

ES 2 500 651 T3

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  
 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

ES 2 500 651 T3

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

<210> 9

<211> 370

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 9

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

# ES 2 500 651 T3

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> 10

<211> 350

<212> PRT

5 <213> *Borrelia* sp.

<400> 10

ES 2 500 651 T3

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

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

ES 2 500 651 T3

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  
 325 330 335

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

<210> 11

<211> 359

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 11

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



ES 2 500 651 T3

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  
 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> 12

<211> 493

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 12

ES 2 500 651 T3

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  
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



ES 2 500 651 T3

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

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

ES 2 500 651 T3

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> 14

<211> 506

<212> PRT

5 <213> *Borrelia* sp.

<400> 14

ES 2 500 651 T3

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

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

ES 2 500 651 T3

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 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> 15

<211> 1086

5 <212> ADN

<213> *Borrelia sp.*

ES 2 500 651 T3

<400> 15

```

atgagcctga cccgcaaagc gcgtctggaa agcagcgtga aagatattac caacgaaatt      60
gaaaaagcga ttaaagaagc ggaagatgcg ggcgtgaaaa ccgatgcggt taccgaaacc      120
cagaccggcg gcaaagtggc gggcccgaaa attcgtgctg cgaaaattcg tgtggcggat      180
ctgaccatta aatttctgga agcgaccgaa gaagaaacca ttaccttaa agaaaatggc      240
gcgggcgaag atgaatttag cggcatttat gatctgattc tgaacgcggc gaaagcggtg      300
gaaaaaattg gcatgaaaga tatgaccaa accgtggaag aagcggcgaa agaaaatccg      360
aaaaccaccg cgaacggtat tattgaaatt gtgaaagtga tgaaagcgaa agtggaaaat      420
attaaagaaa aacagaccaa aaaccagaaa aaaaaaaca ccctgagcgc gattctgatg      480
accctgttct tgtttattag ctgcaacaac agcggcaaag gcggcgatag cgcgagcacc      540
aaccggcgcg atgaaagcgc gaaaggcccg aacctgaccg aaattagcaa aaaaatcacc      600
gatagcaacg cgtttgtgct ggcggtgaaa gaagtggaaa ccctggttct gagcattgat      660
gaactggcga aaaaagcgat tggccagaaa atcgataaca acaacggcct ggcggcggctg      720
aacaaccaga acggcagcct gctggcgggt gcgtatgcga ttagcaccct gattaccgaa      780
aaactgagca aactgaaaaa cctggaagaa ctgaaaaccg aaatcgcgaa agcgaaaaaa      840
tgcagcgaag aatttaccaa caaactgaaa agcggccatg cggatctggg caaacaggat      900
gcgaccgatg atcatgcgaa agcggcgatt ctgaaaaccg atgcgaccac cgataaaggc      960
gcgaaagaat ttaaagacct gttcgaaagc gtggaaggcc tgctgaaagc ggcgcagggtg     1020
gcgctgacca acagcgtgaa agaactgacc agcccgtggt ttgcgaaag cccgaaaaaa     1080
ccgtaa                                                                                   1086

```

<210> 16

<211> 1113

5

<212> ADN

<213> *Borrelia sp.*

<400> 16

```

atgaggggat cccatcatca tcatcatcat agcctgaccg gcaaagcggc tctgaaagc      60
agcgtgaaag atattaccaa cgaaattgaa aaagcgatta aagaagcggg agatgcgggc      120
gtgaaaaccg atgcgtttac cgaaaccag accggcggca aagtggcggg cccgaaaatt      180
cgtgcggcga aaattcgtgt ggcggatctg accattaaat ttctggaagc gaccgaagaa      240
gaaaccatta cctttaaaga aaatggcggc ggccaagatg aatttagcgg catttatgat      300

```



ES 2 500 651 T3

ctgattctga acgcggcgaa agcgggtggaa aaaattggca tgaaagatat gacccaaaacc 360  
 gtggaagaag cggcgaaaga aaatccgaaa accaccgcga acggtattat tgaattgtg 420  
 aaagtgatga aagcgaaagt ggaaaatatt aaagaaaaac agaccaaaaa ccagaaaaaa 480  
 aaaaacaccc tgagcgcgat tctgatgacc ctgtttctgt ttattagctg caacaacagc 540  
 ggcaaaggcg gcgatagcgc gagcaccaac ccggcggatg aaagcgcgaa aggcccgaa 600  
 ctgaccgaaa ttagcaaaaa aatcaccgat agcaacgcgt ttgtgctggc ggtgaaagaa 660  
 gtggaaaccc tggttctgag cattgatgaa ctggcgaaaa aagcgattgg ccagaaaatc 720  
 gataacaaca acggcctggc ggcgctgaac aaccagaacg gcagcctgct ggcgggtgcg 780  
 tatgcgatta gcaccctgat taccgaaaaa ctgagcaaac tgaaaaacct ggaagaactg 840  
 aaaaccgaaa tcgcgaaagc gaaaaaatgc agcgaagaat ttaccaacaa actgaaaagc 900  
 ggccatgctg atctgggcaa acaggatgcg accgatgatc atgcgaaagc ggcgattctg 960  
 aaaaccatg cgaccaccga taaaggcgcg aaagaattta aagacctgtt cgaaaagcgtg 1020  
 gaaggcctgc tgaaagcggc gcaggtggcg ctgaccaaca gcgtgaaaga actgaccagc 1080  
 ccggtggtg cggaaagccc gaaaaaaccg taa 1113

<210> 17

<211> 1053

<212> ADN

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 17

atgaccggcg cgacccaaat ccgcctggaa cgcagcgcga aagatatcac agatgaaatc 60  
 gatgcatca agaaagacgc ggcgctgaaa ggcgtcaact ttgatgcatt taaagataaa 120  
 aagaccgggt ctggagttag cgagaatcca tttattctgg aagcgaaagt tcgtgctacg 180  
 acgggtggcag aaaaatttgt gattgcgatt gaagaagaag caacgaaact gaaagaaacc 240  
 ggcagcagtg gcgaatttag tgcgatgtat gacctgatgt ttgaggtctc taaaccgctg 300  
 cagaaactgg ggattcaaga aatgaccaag acggtatctg atgcagcggg aaaaaacccg 360  
 cctacgacgg cgcaaggcgt cctggaaatt gccaaagaaa tcgcgcaaaa actgcaacgc 420  
 gttcatacca aaaattattg cactctgaag aagaaagaga atagcacttt tacggatgaa 480  
 aaatgtaaaa ataataacac cagcgcgaac agcgcggatg aaagcgtgaa aggcccgaa 540  
 ctgaccgaaa ttagcaaaaa aatcaccgat agcaacgcgg tgctgctggc ggtgaaagaa 600  
 gtggaagcgc tgctgagcag cattgatgaa attgcggcga aagcgattgg caaaaaatc 660  
 catcagaaca acggcctgga taccgaaaac aaccataacg gcagcctgct ggcgggtgcg 720  
 tatgcgatta gcaccctgat taaacagaaa ctggatggcc tgaaaaacga aggcttaaaa 780  
 gaaaaaattg atgcggcgaa aaaatgcagc gaaaccttca ccaacaaact gaaagaaaa 840  
 cataccgata gcttcggtaa agaaggcgtg accgacgcgg atgcgaaaga agcgattctg 900

ES 2 500 651 T3

aaaaccaacg gcacccaaaac caaaggcgcg gaagaactgg gcaaactggt tgaaagcgtg 960  
 gaagttctga gcaaagcggc caaagaaatg ctggcgaaca gcgtgaaaga actgaccagc 1020  
 ccggtggtgg cagaatctcc gaaaagccc taa 1053

<210> 18

<211> 1080

<212> ADN

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 18

atgaggggat cccatcatca tcatcatcac accggcgcga ccaaaatccg cctggaacgc 60  
 agcgcgaaaag atatcacaga tgaaatcgat gcgatcaaga aagacgcggc gctgaaaggc 120  
 gtcaactttg atgcatthaa agataaaaag accgggtctg gagttagcga gaatccattt 180  
 attctggaag cgaaagtctg tgctacgacg gtggcagaaa aatttggat tgcgattgaa 240  
 gaagaagcaa cgaaactgaa agaaaaccggc agcagtggcg aatttagtgc gatgatgac 300  
 ctgatgtttg aggtctctaa accgctgcag aaactgggga ttcaagaaat gaccaagacg 360  
 gtatctgatg cagcgaaga aaaccgcct acgacggcgc aaggcgtcct ggaaattgcc 420  
 aagaaaatgc gcgaaaaact gcaacgcggt cataccaaaa attattgcac tctgaagaag 480  
 aaagagaata gcacttttac ggatgaaaaa tgtaaaaata ataaccaccag cgcgaaacgc 540  
 gcggatgaaa gcgtgaaagg cccgaacctg accgaaatta gcaaaaaaat caccgatagc 600  
 aacgcggtgc tgctggcggg gaaagaagtg gaagcgcctgc tgagcagcat tgatgaaatt 660  
 gcggcgaaaag cgattggcaa aaaaatccat cagaacaacg gcctggatac cgaaaaacaac 720  
 cataacggca gcctgctggc ggggtcgtat 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> 19

<211> 1482

<212> ADN

10

<213> *Borrelia sp.*

<400> 19

atgactggtg aaacgaaaat tcgtctggaa tcatccgctc aggagattaa agacgaaatc 60  
 aacaaaatta aagcaaacgc caagaaagaa ggcgtgaagt ttgaagcgtt taccgataaa 120  
 cagaccggca gcaaagtthc agaaaaaccg gagtttattc tgaaagccaa aattaaagcg 180  
 atccaggttg cggaaaaatt cgtgaaagcg attaaagaag aagccgaaaa actgaaaaaa 240  
 tctggttcga gcggcgcatt ttccgcaatg tatgatctga tgctggatgt aagcaaacgc 300

ES 2 500 651 T3

ctggaagaga ttggcattca gaaaatgacc ggcactgtca caaaggaagc ggaaaaaaca 360  
 ccgccaacca ctgcagaagg gattctggcg atcgcccagg cgatggaaga gaaactgaac 420  
 aacgtaata aaaaacagca ggatgcactg aaaaacctgg aagagaaggc gaacaccgcy 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  
 aatggttgca tgaacaaggt agataaagat cagctgctga aagacatgta cgacctgatg 780  
 ctgaacgcgg ctggcagtct gcagaaactg ggtctgcagg aatgatcaa 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 tgaagcctg 1140  
 attgcaggcg catatgaaat cagtaaactg attacacaga aactgagtgt cctgaacagc 1200  
 gaagaactga aagaaaaaat caaagaagcc aaagactggt cggaaaagtt tactaccaa 1260  
 ctgaaagact cgcatgctga actgggtatt cagtcagtgc aagatgataa tgcgaaaaaa 1320  
 gcaattctga aaacgcacgg gacgaaagat aaaggtgcca aagagctgga agaactgttt 1380  
 aaaagcctgg aatcgctgag taaagccgca caggccgcgc tgaccaatag cgtgaaggaa 1440  
 ctgactaatc cggttgtagc agaatctccg aaaaagccgt aa 1482

<210> 20

<211> 1509

<212> ADN

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 20

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 caaacggctg gaagagattg gcattcagaa aatgaccggc 360  
 actgtcacia aggaagcggg aaaaacaccg ccaaccactg cagaagggat tctggcgatc 420  
 gccagggcga tggaaagaaa actgaacaac gtaataaaaa aacagcagga tgcactgaaa 480  
 aacctggaag agaaggcgaa caccgcccgc actacgtcag ggaccggtaa agcgcgtctg 540

ES 2 500 651 T3

gaaagctcgg taaaagatat cacagacgaa attgacaaaag ccatcaaaga agccattgca 600  
 gacggcgтта aactgaatga actggaagaa aataaaaccg gtgcgaaaaa aggtggccccg 660  
 cagattcgcg atgcgaaaat ccgtgtgatc aacctgagcg ttaaattcct gaaagaaatc 720  
 gaggaggaag caaacatcct gaaggataat gttggcatga acaaggtaga taaagatcag 780  
 ctgctgaaag acatgtacga cctgatgctg aacgcggtcg gcagtctgca gaaactgggt 840  
 ctgcaggaaa tgatcaaaac gttacccaa gctgcggaaa aaaccccacc gaccacgggt 900  
 gaaggcattc tgatgattgc aaacaccatt gaagacaaac tgaagaaaat caaaggcaaa 960  
 caggaaacaa acaaaaaaga tgaagcgca aaaggcccga atctgaccgt catttctaag 1020  
 aaaattaccg attcaaacgc gtttctgctg gccgtgaaag aggttgaagc cctgctgtcc 1080  
 tcgattgatg aactgagcaa agctatcggg aagaaaatta aaaatgatgg gacgctggat 1140  
 aacgaggcaa atcgcaatga aagcctgatt gcaggcgcat 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 actgtttaa agcctggaat cgctgagtaa agccgcacag 1440  
 gccgcgctga ccaatagcgt gaaggaactg actaatccgg ttgtagcaga atctccgaaa 1500  
 aagccgtaa 1509

<210> 21

<211> 1521

<212> ADN

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 21

atgaggggat cccatcatca ccaccatcat actggtgaaa cgaaaattcg tctggaatca 60  
 tccgctcagg agattaaaga cgaaatcaac aaaattaaag caaacgcaa gaaagaaggc 120  
 gtgaagttg aagcgtttac cgataaacag accggcagca aagtttcaga aaaaccggag 180  
 tttattctga aagccaaaat taaagcgatc caggttgcgg aaaaattcgt gaaagcgatt 240  
 aaagaagaag ccgaaaaact gaaaaaatct ggttcgagcg gcgcattttc cgcaatgtat 300  
 gatctgatgc tggatgtaag caaaccgctg gaagagattg gcattcagaa aatgaccggc 360  
 actgtcacia aggaagcgga aaaaacaccg ccaaccactg cagaagggat tctggcgatc 420  
 gcccaggcga tggaagagaa actgaacaac gttaataaaa aacagcagga tgcaactgaaa 480  
 aacctggaag agaagcgcaa caccgcccgc actacgtcag ggaccggtaa agcgcgctcg 540  
 gaaagctcgg taaaagatat cacagacgaa attgacaaaag ccatcaaaga agccattgca 600  
 gacggcgтта aactgaatga actggaagaa aataaaaccg gtgcgaaaaa aggtggccccg 660  
 cagattcgcg atgcgaaaat ccgtgtgatc aacctgagcg ttaaattcct gaaagaaatc 720

ES 2 500 651 T3

gaggaggaag caaacatcct gaaggataat gttggcatga acaaggtaga taaagatcag 780  
 ctgctgaaag acatgtacga cctgatgctg aacgcggctg gcagtctgca gaaactgggt 840  
 ctgcaggaaa tgatcaaac ggttacccaa gctgcggaaa aaaccccacc gaccacggtt 900  
 gaaggcattc tgatgattgc aaacaccatt gaagacaaac tgaagaaaat caaaggcaaa 960  
 caggaaacaa acaaaaaagg ttccgggggt gatgaaagcg caaaaggccc gaatctgacc 1020  
 gtcatttcta agaaaattac cgattcaaac gcgtttctgc tggccgtgaa agaggttgaa 1080  
 gccctgctgt cctcgattga tgaactgagc aaagctatcg gaaagaaaat taaaaatgat 1140  
 gggacgctgg ataacgaggc aaatcgcaat gaaagcctga ttgcaggcgc atatgaaatc 1200  
 agtaaactga ttacacagaa actgagtgtc ctgaacagcg aagaactgaa agaaaaaatc 1260  
 aaagaagcca aagactgttc ggaaaagttt actaccaaac tgaagactc gcatgctgaa 1320  
 ctgggtattc agtcagtgca agatgataat gcgaaaaaag caattctgaa aacgcacggg 1380  
 acgaaagata aaggtgccaa agagctggaa gaactgttta aaagcctgga atcgctgagt 1440  
 aaagccgcac aggcccgct gaccaatagc gtgaaggaac tgactaatcc ggtttagca 1500  
 gaatctccga aaaagccgta a 1521

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Tag

<400> 22

His His His His His His  
 1 5

10 <210> 23

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Tag

<400> 23

catcatcatc atcatcat 18

<210> 24

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Tag

<400> 24  
catcatcatc atcatcac 18  
<210> 25  
<211> 18  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Tag  
<400> 25  
10 catcatcacc accatcat 18  
<210> 26  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> aa+  
<400> 26  
**Met Arg Gly Ser**  
**1**  
<210> 27  
20 <211> 12  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> aa+  
25 <400> 27  
atgaggggat cc 12  
<210> 28  
<211> 4  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> enlazador  
<400> 28  
**Gly Ser Gly Gly**  
**1**  
35 <210> 29  
<211> 12

# ES 2 500 651 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> enlazador

5 <400> 29

ggtccgggg gt 12

<210> 30

<211> 274

<212> PRT

10 <213> *Borrelia sp.*

<400> 30

ES 2 500 651 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  
 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> 31

<211> 280



ES 2 500 651 T3

<212> PRT

<213> *Borrelia sp.*

<400> 31

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

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

ES 2 500 651 T3

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

<210> 32

<211> 284

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 32

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

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

ES 2 500 651 T3

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> 33

<211> 279

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 33

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

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

ES 2 500 651 T3

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

<210> 34

<211> 279

<212> PRT

5 <213> *Borrelia* sp.

<400> 34

ES 2 500 651 T3

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> 35

<211> 25

5 <212> PRT

ES 2 500 651 T3

<213> *Borrelia sp.*

<400> 35

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

<210> 36

5 <211> 17

<212> PRT

<213> *Borrelia sp.*

<400> 36

Ile Val Ala Ala Ile Val Leu Arg Gly Val Ala Lys Ser Gly Lys Phe  
1 5 10 15

Ala

10 <210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> *Borrelia sp.*

<400> 37

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

15 <210> 38

<211> 348

<212> PRT

<213> *Borrelia sp.*

20 <400> 38

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

ES 2 500 651 T3

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

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

ES 2 500 651 T3

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> 39

<211> 358

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 39

Met Arg Gly Ser 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

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



ES 2 500 651 T3

```

                                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

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 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

```

<210> 40

<211> 1077

<212> ADN

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 40

```

atgaggggat cccaccacca ccatcatcat aaaaataatg tgggctggcgga tgacaaaaaa 60
gatactgctg ccagcatctt ctaccagtct attattaacc tgggtaacgg gttcattgaa 120
gtgtttaatg ccttttccgg gctggtggcc gacgcgttta gcaaagcaga tccgaaaaaa 180
tcagatgtca aaacttactt cgattcgatc acgaaaacac tgaaagatac caaaactaag 240

```

ES 2 500 651 T3

ctggaagata ttagcaaaga aaaaacgggc ggcgaaaaaa cgccagccgt tgaaggtatc 300  
 gccgaagtgc tgaaaaccgt gggagagtgg ctggatggcc tgattaaagc ggcggaaggg 360  
 ggcggcaaag cggcggatgg tggcggttcg gacaaaattg ggaatgtcgc tgcaggcggc 420  
 ggcgcgggcg ccgacaagga aagtgtgaat ggaatcgag gtgccattaa aggtatcgtg 480  
 gaagctgcaa aaaaggtgga aggtgtgaaa ttcgccccga aagctgcggc ggatgcagcc 540  
 gccgctgatg gtaacaaaaa agcaggcaaa ctgtttggtta ccgcggcggg cgcagacgcg 600  
 ggagacgtga aagatgcagc cgctgcggta ggggccgtga gcggtgaaca gattctgaat 660  
 gcgattgtta cggcggcggg ccaggcaggc caggcgggga aaaaagctga tgaagcaaaa 720  
 aatgcgattg aagctgccat tggctcggct ggcgatgcgg attttggtga cgacattaa 780  
 aagaaaaacg atcaaattgc ggcggcgtg gttctgcgcg gagttgctaa agacggcaaa 840  
 tttgccggcg ctatgaagaa agacgaccaa atcgcggcag ccattgcgct gcgcggcatg 900  
 gcgaaagacg gcaaatttgc ggtgaaagat ggcgaaaaag aaaaagcgat tgtggcggcg 960  
 atcgttctgc gcggtgttgc gaaaagcggg aaattcgcga tgaaaaaaga tgatcagatc 1020  
 gccgcagcga tggttctgcg tggtatggcc aaagatggtc agtttgcctt gaaataa 1077

<210> 41

<211> 357

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 41

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  
 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

ES 2 500 651 T3

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

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> 42

<211> 1074

<212> ADN

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 42

ES 2 500 651 T3

```

atggggccatc atcatcatca tcatcatcat aaaaacaacg tgggcggcga tgataaaaaa    60
gataccgcgg cgagcatttt ttatcagagc attattaacc tgggcaacgg ctttattgaa    120
gtgtttaacg cgtttagcgg cctggtggcg gatgcgttta gcaaagcggg tccgaaaaaa    180
agcgatgtga aaacctatth tgatagcatt accaaaaccg tgaaagatac caaaaccaa    240
ctggaagata ttagcaaaga aaaaaccggc ggcgaaaaaa ccccgcggtt ggaaggcatt    300
gcggaagtgg tgaaaaccgt gggcgaatgg ctggatggcc tgattaaagc ggcggaaggc    360
ggcggcaaa gggcggatgg cggcggcagc gataaaattg gcaacgtggc ggcggcggc    420
ggcgcggcgg cggataaaga aagcgtgaac ggcattgcgg gcgcgattaa aggcattgtg    480
gaagcggcga aaaaagtgga aggcgtgaaa tttgcgccga aagcggcggc ggtgcgggcg    540
gcggcggatg gcaacaaaaa agcgggcaaa ctgtttggca ccgcggcggg cgcgatgcg    600
ggcgatgtga aagatgcggc ggcggcggtg ggcgcggtga gcggcgaaca gattctgaac    660
gcgattgtga ccgcgggcca ggcgggcccag gcgggcaaaa aagcggatga agcgaaaac    720
gcgattgaag cggcgattgg cgcggcgggc gatgcgattt ttggcgatga tattaaaaaa    780
aaaaacgatc agattgcggc ggcgctggtg ctgcgcggcg ttggcgaaga tggcaaatth    840
gcgggcgcga tgaaaaaaga tgatcagatt gcggcggcga ttgcgctgcg cggcatggcg    900
aaagatggca aatttgcggg gaaagatggc gaaaaagaaa aagcatttgt ggcggcgatt    960
gtgctgcgcg gcgtggcgaa aagcggcaaa tttgcgatga aaaaagatga tcagattgcg    1020
gcggcgatgg tgctgcggcg catggcgaaa gatggccagt ttgcgctgaa ataa        1074

```

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Borrelia sp.*

<400> 43

**Asp Gly Glu Lys Glu Lys Ala**

**1**

**5**

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína quimérica de fusión DbpA-OspC de Borrelia, seleccionada del grupo que consiste en:

5 (a) una proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende en su extremo N-terminal, la secuencia SEC ID nº 1 y en su extremo C-terminal, la secuencia SEC ID nº 2 o una variante de dicha proteína cuya secuencia en aminoácidos comprende una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 1 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 2, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

10 (b) una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende en su extremo N-terminal la secuencia SEC ID nº 3 y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 4 o una variante de dicha proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 3 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 4, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

15 (c) una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende en su extremo N-terminal la secuencia SEC ID nº 5 y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 7 o una variante de dicha proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 5 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 7, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

20 (d) una proteína que comprende en su extremo N-terminal la secuencia SEC ID nº 6 y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 7 o una variante de dicha proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 6 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 7, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-borrelia;

25 (e) una proteína que comprende en su extremo N-terminal la secuencia SEC ID nº 5, la secuencia SEC ID nº 6 y en su extremo C-terminal la secuencia SEC ID nº 7 o una variante de dicha proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 5, una secuencia que presenta al menos el 40% de identidad con la SEC ID nº 6 y una secuencia que presenta al menos el 50% de identidad con la SEC ID nº 7, con la condición de que dicha variante sea capaz de formar un complejo inmunológico con unos anticuerpos producidos tras una infección por Borrelia o que dicha variante sea capaz de inducir a la producción de anticuerpos anti-Borrelia;

30 (f) una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia seleccionada entre las SEC ID nºs 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

35 2. Ácido nucleico que codifica para una proteína tal como se ha definido en la reivindicación 1.

3. Casete de expresión que es funcional en una célula derivada de un organismo procarionota o eucarionota, que permite la expresión de un ácido nucleico tal como se ha definido en la reivindicación 2, colocada bajo el control de los elementos necesarios para su expresión.

40 4. Vector que comprende un casete de expresión, tal como se define en la reivindicación 3.

5. 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 la reivindicación 1, y se determina si hay formación de un complejo inmunológico entre dicha proteína y unos anticuerpos de la muestra biológica.

45 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que los anticuerpos de la muestra biológica son unas IgG y/o unas IgM.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la formación del complejo inmunológico se determina por adición de al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada por cualquier marcador apropiado.

50 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la proteína está inmovilizada sobre un soporte sólido.

9. Equipo para el diagnóstico *in vitro* de una Borreliosis de Lyme que comprende al menos una proteína tal como se define en la reivindicación 1.

10. Equipo según la reivindicación 9, que comprende al menos una anti-inmunoglobulina humana marcada por

cualquier marcador apropiado.

11. Composición vacvínea que comprende al menos una proteína tal como se ha definido en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.