

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 883**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)  
**C07K 14/20** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12N 5/07** (2010.01)  
**C12N 15/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2013 PCT/EP2013/064403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2013 E 13734430 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2869839**

54 Título: **Fragments mutantes de OspA y métodos y usos relacionados con los mismos**

30 Prioridad:

**06.07.2012 US 201261668627 P**  
**14.03.2013 US 201313802991**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2018**

73 Titular/es:

**VALNEVA AUSTRIA GMBH (100.0%)**  
**Campus Vienna Biocenter 3**  
**1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**COMSTEDT, PÄR;**  
**GROHMANN, BRIGITTE;**  
**HANNER, MARKUS;**  
**LUNDBERG, URBAN;**  
**MEINKE, ANDREAS;**  
**REINISCH, CHRISTOPH;**  
**SCHLEGL, ROBERT;**  
**SCHÜLER, WOLFGANG y**  
**WIZEL, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 688 883 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

Fragmentos mutantes de OspA y métodos y usos relacionados con los mismos

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la prevención y tratamiento de la infección por *Borrelia*. Particularmente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un fragmento mutante de una proteína A de la superficie externa (OspA), un ácido nucleico que codifica la misma, una composición farmacéutica (particularmente para su uso como medicamento en un método para tratar o prevenir una infección por *Borrelia*) que comprende el polipéptido y/o el ácido nucleico.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La borreliosis de Lyme, o enfermedad de Lyme, es la enfermedad transmitida por garrapatas más común en Europa y América del Norte. La enfermedad es causada por la espiroqueta de tipo gram-negativo transmitida por artrópodos, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), y es una infección que puede afectar a múltiples órganos o tejidos, dando como resultado trastornos cutáneos, cardíacos, musculoesqueléticos y neurológicos. En la mayoría de los países, la borreliosis de Lyme no es una enfermedad de notificación obligatoria y no hay disponibles datos exactos relacionados con las tasas anuales de incidentes. En Estados Unidos, el agente causal es *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.) y la borreliosis de Lyme se localiza en estados del noreste, el Atlántico central y la región superior norcentral. En 2010, se notificaron en Estados Unidos un total de aproximadamente 30.000 casos de borreliosis de Lyme a los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). En Europa, *B. afzelii* y *B. garinii* son los principales agentes causales de la borreliosis de Lyme, así como *B. burgdorferi* s.s. y *B. bavariensis*, que contribuyen en menor grado, dependiendo de la ubicación geográfica. La prevalencia de la borreliosis de Lyme varía de manera considerable en distintos países europeos con un aumento generalizado de la prevalencia del oeste al este. En gran parte de Europa, la cantidad de casos informados de borreliosis de Lyme aumentó desde principios de los años 1990 (por ejemplo, República Checa, Estonia, Lituania; véase borreliosis de Lyme en Europa, informe de la OMS de 2006) y la distribución geográfica de los casos también se ha ampliado.

30 *Borrelia* pertenece a la familia *Spirochaetaceae*, la cual se subdivide en los géneros de importancia médica *Treponema*, *Leptospira* y *Borrelia*. *B. burgdorferi* s.l. es una bacteria con forma de espiral, vigorosamente mótil y gram-negativa, con una longitud de aproximadamente 10-20 µm y una anchura de 0,2-0,5 µm, que crece en condiciones microaerófilas. La pared celular espiroquetal consiste en una membrana citoplásmica rodeada por peptidoglucano y varios flagelos, y después por una membrana exterior asociada holgadamente.

La borreliosis de Lyme generalmente tiene lugar en fases caracterizadas por diferentes manifestaciones clínicas, con remisiones y exacerbaciones. La fase 1, infección temprana, consiste en una infección localizada de la piel, seguida en pocos días o semanas de la etapa 2, infección diseminada, y en meses a años después por la fase 3, infección persistente. No obstante, la infección es variable; algunos pacientes tienen únicamente infecciones cutáneas localizadas, mientras que otros presentan únicamente manifestaciones posteriores de la enfermedad, tal como artritis. Los diferentes síndromes clínicos de la borreliosis de Lyme también son causados mediante infección con diversas especies de *B. burgdorferi* s.l. *B. burgdorferi* s.s. causa más frecuentemente manifestaciones de las articulaciones (artritis) y problemas cardíacos, *B. afzelii* causa principalmente síntomas dérmicos (eritema migrans; EM y acrodermatitis crónica atrófica; ACA), mientras que *B. garinii* está implicado en la mayoría de los casos de neuroborreliosis.

50 Infección localizada - El síntoma más común de la fase 1 de una infección es eritema migrans, que ocurre en el 70-80 % de las personas infectadas. Esta lesión cutánea a menudo viene seguida de síntomas similares a la gripe, tales como mialgia, artralgia, dolor de cabeza y fiebre. Estos síntomas no específicos ocurren en el 50 % de los pacientes con eritema migrans.

55 Infección diseminada - Durante la fase 2, las bacterias se mueven hacia el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección a órganos y tejidos distales. Los síntomas neurológicos, cardiovasculares y artríticos que se producen en esta etapa incluyen meningitis, neuropatía craneal y artritis inflamatoria intermitente.

Infección persistente - La fase 3 de la infección es crónica y se produce de meses a años después de la picadura de garrapata. El síntoma más común en Norteamérica es la artritis reumatoide, causada por una infección con *B. burgdorferi* s.s. La infección persistente del sistema nervioso central con *B. garinii* causa síntomas neurológicos más

severos durante la fase 3 y una infección persistente de la piel con *B. afzelii* da como resultado acrodermatitis crónica atrófica.

En algunos grupos de riesgo, tales como granjeros, trabajadores forestales, senderistas, corredores, turistas, han aumentado las tasas de seroprevalencia y de incidencia de la enfermedad, así como en niños menores a 15 años y adultos entre 39 y 59 años, sin preferencia de género. Este aumento en la incidencia de la borreliosis de Lyme está vinculado a los cambios en los hábitats forestales, así como los factores sociales. Los cambios medioambientales, tal como la fragmentación de bosques, han llevado a una reducción brusca de depredadores roedores tales como zorros y aves de carroña, lo cual ha llevado a una disminución en la población de ratones, con un aumento posterior en la población de garrapatas. Más recientemente, la reforestación irregular ha aumentado la cantidad de venados y, por consiguiente, la cantidad de garrapatas. La expansión suburbana y el aumento del uso de superficies forestales para recreación tal como el camping y senderismo ha llevado a los seres humanos a tener mayor contacto con la mayor cantidad de vectores de *Borrelia* de garrapatas. Todos estos factores en conjunto han contribuido a una mayor distribución de *Borrelia* y una mayor incidencia de borreliosis de Lyme.

Los agentes antimicrobianos son el método principal de tratamiento de la infección por *Borrelia*. El antibiótico usado depende de la fase de la enfermedad, síntomas y las alergias del paciente a la medicación. La duración de la aplicación del antibiótico también depende de la fase de la enfermedad y la gravedad de los síntomas. La borreliosis de Lyme temprana típicamente se trata con tetraciclinas orales, tales como doxiciclina y penicilinas semisintéticas, tales como amoxicilina o penicilina V. Los trastornos artríticos y neurológicos se tratan con ceftriaxona o penicilina G intravenosa de dosis altas. Hasta el 30 % de los pacientes de borreliosis de Lyme no presentan los síntomas tempranos característicos o la infección con *Borrelia*, lo que hace que el diagnóstico y el tratamiento sean problemáticos. La aplicación del antibiótico puede ser prolongada (hasta varios meses) y a veces ineficaz y, por lo tanto, tema de debate en el campo de la *Borrelia*, especialmente durante las fases posteriores de la enfermedad. Incluso en el caso de tratamiento ineficaz de *Borrelia*, los pacientes pueden terminar con fatiga debilitante, dolor o síntomas neurológicos durante años, posteriormente denominados síndrome postratamiento de la enfermedad de Lyme. En general, el uso de antibióticos puede tener consecuencias no deseadas, tales como el desarrollo de resistencia a los microorganismos diana. Finalmente, la terapia antibiótica puede curar la borreliosis de Lyme de manera eficaz, pero no proporciona protección contra infecciones posteriores.

Se aprobó y se comercializó una vacuna monovalente basada en OspA de serotipo 1 (LYMERix™) en Estados Unidos para la prevención de la enfermedad de Lyme causada por *Borrelia burgdorferi* s.s. Sin embargo, la heterogeneidad en secuencias de OspA en diferentes serotipos en Europa y otros lugares descarta la protección eficaz con una vacuna basada en OspA de un único serotipo.

Pueden usarse moléculas quiméricas de OspA que comprenden la porción proximal de un serotipo de OspA, junto con la porción distal de otro serotipo de OspA, al mismo tiempo que conservan propiedades antigénicas de ambos polipéptidos precursores, en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Lyme o borreliosis (documentos WO2011/143617, WO2011/143623). Además, se ha informado sobre la introducción de residuos de cisteína para la inmovilización de fragmentos de OspA y el posterior análisis del mecanismo intramolecular de las subestructuras de proteínas (Hertadi et al., 2003, J. Mol. Biol. 333: 993-1002).

Actualmente, no hay un medicamento preventivo para la borreliosis de Lyme en el mercado y, por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un desarrollo de tal medicamento que pueda proporcionar una protección eficaz contra *Borrelia* y que esté presente en Estados Unidos, Europa y otros lugares, especialmente para el desarrollo de un medicamento que pueda proporcionar protección eficaz contra varios serotipos de *Borrelia* de manera simultánea.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende fragmentos mutantes de la proteína A de la superficie externa (OspA) de *Borrelia*, un ácido nucleico que codifica la misma, un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, y una célula huésped que comprende dicho vector como se define en las reivindicaciones. Además, la invención proporciona un proceso para producir dicho polipéptido y un proceso para producir una célula que expresa dicho polipéptido. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido, molécula de ácido nucleico, o vector (particularmente para su uso como una vacuna o en un método para el tratamiento o la prevención de una infección por *Borrelia*).

Los esfuerzos para desarrollar una vacuna de subunidad para la prevención de la borreliosis de Lyme se han enfocado en gran parte en el uso de la proteína A de la superficie externa (OspA) borrelial como antígeno. La

proteína OspA se expresa por *Borrelia* únicamente cuando está en los intestinos de la garrapata vector. Por lo tanto, los anticuerpos de OspA producidos mediante vacunación no combaten la infección en el cuerpo, sino que ingresan al intestino de la garrapata cuando consume la sangre. Allí, los anticuerpos neutralizan las espiroquetas y bloquean la migración de bacterias del intestino medio a las glándulas salivales de la garrapata, la ruta a través de la cual *Borrelia* se introduce en el huésped vertebrado. Por lo tanto, los anticuerpos específicos de OspA impiden la transmisión de *Borrelia* de la garrapata vector al huésped humano.

La forma lipídada de OspA de *B. burg dorferi* s.s., cepa ZS7, junto con hidróxido de aluminio, se desarrolló comercialmente como una vacuna contra *Borrelia* (LYMERix™) por SmithKline Beecham, ahora GlaxoSmithKline (GSK) para el mercado de Estados Unidos. Fueron necesarias tres dosis de LYMERix™ durante un período de un año para ofrecer una protección óptima. Después de las primeras dos dosis, la eficacia de la vacuna contra la borreliosis de Lyme fue del 49 %, y tras la tercera dosis fue del 76 %. Sin embargo, poco tiempo después de que LYMERix™ estuvo disponible en el mercado, se retiró de éste en 2002. Las razones citadas fueron asuntos de administración práctica de la vacuna, por ejemplo, la necesidad de inyecciones de refuerzo cada año o cada dos años, así como el coste relativamente alto de este enfoque preventivo en comparación con el tratamiento antibiótico de la infección temprana. Además, preocupaba que LYMERix™ pudiera desencadenar reacciones autoinmunitarias en un subgrupo de población debido a la homología de secuencia con la proteína humana, aunque esto nunca se probó. Además, esta vacuna no proporcionó protección cruzada contra otras especies clínicamente importantes de *Borrelia*.

Por consiguiente, en una realización, fue un objeto de la presente invención proporcionar una vacuna mejorada para la prevención de la borreliosis de Lyme. Preferiblemente, la vacuna se produce fácilmente mientras que brinda protección, es segura y más eficaz que las terapias existentes y/o proporciona protección contra más de una especie de *Borrelia*.

El problema subyacente de la presente invención se soluciona mediante un polipéptido que comprende un heterodímero que comprende dos fragmentos mutantes de una proteína A de la superficie externa (OspA), en donde cada fragmento mutante consiste en un dominio C-terminal de una proteína OspA de *Borrelia* y difiere del fragmento de tipo salvaje correspondiente al menos en la introducción de al menos un enlace disulfuro. Específicamente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende el polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186; o cualquier variante funcional de dicha secuencia de aminoácidos (i) con una identidad de secuencia de al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 %, mucho más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de SEQ ID NO: 186, y (ii) con una diferencia en la capacidad protectora ( $\Delta pc$ ) entre la variante funcional y el placebo (negativo) de control de al menos el 50 %, especialmente al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, incluso más preferiblemente el 90 %, incluso más preferiblemente 95 %, mucho más preferiblemente al menos el 95 %.

Sorprendentemente, se encontró que la introducción de al menos un enlace disulfuro en un fragmento mutante aumenta la capacidad protectora del polipéptido que comprende el fragmento mutante de OspA con respecto a un polipéptido que comprende el fragmento de OspA de tipo salvaje, como se muestra en un modelo *in vivo* de infección. Como se muestra en los Ejemplos, la introducción de al menos un enlace disulfuro en el fragmento C-terminal de OspA de *B. afzelii* aumentó su capacidad protectora con respecto al fragmento de OspA de tipo salvaje sin un enlace disulfuro. Las Tablas 2 y 3 proporcionan datos que demuestran la capacidad protectora de los fragmentos mutantes con un enlace disulfuro introducido ("S2D1-5") en comparación con el fragmento de OspA de tipo salvaje ("S2D0"), dado que una cantidad menor de animales se infectaron después de la inmunización con fragmentos mutantes de OspA en comparación con fragmentos de OspA de tipo salvaje. Algunos de los fragmentos mutantes de OspA ensayados proporcionaron una protección comparable a la otorgada por el antígeno de control positivo, la proteína OspA no lipídada de longitud completa.

## 50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un heterodímero que comprende dos fragmentos mutantes de una proteína A de la superficie externa (OspA), en donde cada fragmento mutante consiste en un dominio C-terminal de una OspA de *Borrelia* y difiere del fragmento de tipo salvaje correspondiente al menos en la introducción de al menos un enlace disulfuro. Específicamente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende el polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186; o cualquier variante funcional de dicha secuencia de aminoácidos (i) con una identidad de secuencia de al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 %, mucho más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de SEQ ID NO: 186, y (ii) con una

diferencia en la capacidad protectora ( $\Delta pc$ ) entre la variante funcional y el placebo (negativo) de control de al menos el 50 %, especialmente al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, incluso más preferiblemente el 90 %, incluso más preferiblemente 95 %, mucho más preferiblemente al menos el 95 %.

5 La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186 se denomina Lip-S1D1-S2D1 y comprende una proteína de fusión de heterodímero de un fragmento mutante de serotipo 1 de OspA y un fragmento mutante de serotipo 2 de OspA, teniendo cada fragmento un enlace disulfuro de tipo 1 (véase a continuación). Pueden estar presentes en el polipéptido uno o más fragmentos de OspA mutantes adicionales.

El término *B. burgdorferi* s.l. incluye al menos 13 especies de *Borrelia* (Tabla A-1). Estas especies se encuentran en diferentes regiones geográficas y viven en la naturaleza en ciclos enzoóticos que implican garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* (también llamado complejo *Ixodes persulcatus*) y una amplia gama de huéspedes animales. Cuatro especies de *Borrelia* son responsables de la mayoría de las infecciones en seres humanos: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bava riensis* y *B. garinii*. Otras tres especies, *B. lusitaniae*, *B. bissetii* y *B. spielmanii*, se han detectado ocasionalmente en seres humanos, pero su papel en la borreliosis de Lyme es incierto en la actualidad. Aún se informa de nuevas especies de *Borrelia*.

Tabla A-1.

Espe cie patógena (4)	Garrapata vector principal	Ubicación
<i>Borrelia burgdorferi</i> ( <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.)	<i>Ixodes scapularis</i>	Noreste/norte-centro de Estados Unidos
	<i>Ixodes pacificus</i>	Oeste de Estados Unidos
	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asia
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asia
	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
<i>Borrelia bavariensis</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asia
	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asia
	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
Espe cie mínimamente patógena o no patógena (9)	Garrapata vector principal	Ubicación
<i>Borrelia andersonii</i>	<i>Ixodes dentatus</i>	Este de Estados Unidos
<i>Borrelia bissetii</i>	<i>Ixodes spinipalpis</i>	Oeste de Estados Unidos
	<i>Ixodes pacificus</i>	
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa y Asia
	<i>Ixodes columnae</i>	
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	Japón
<i>Borrelia tanukii</i>	<i>Ixodes tanuki</i>	Japón
<i>Borrelia turdi</i>	<i>Ixodes turdus</i>	Japón
<i>Borrelia sinica</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	China

Según se detalló anteriormente, la proteína A de la superficie externa (OspA) de *Borrelia* es una lipoproteína inmunogénica abundante de *Borrelia* de interés particular dado su potencial como vacuna candidata. La OspA de *B. burgdorferi* s.l. es una lipoproteína básica que tiene una masa molecular de aproximadamente 30 kDa y está codificada en un plásmido lineal. Un aspecto importante de la proteína OspA es su lipidación N-terminal; es decir, el residuo de cisteína N-terminal se sustituye con ácidos grasos con una longitud de cadena de entre C14 y C19 con o sin dobles enlaces, una característica que potencia la inmunogenicidad de la proteína OspA. Se ha demostrado que los péptidos sintéticos poco inmunogénicos inducen respuestas mayores de anticuerpos al lipidarse; por ejemplo, al acoplarse covalentemente a Pam<sub>3</sub>Cys (Bessler y Jung, Research Immunology (1992) 143:548-552), una sustitución de ácidos grasos encontrada en el extremo amino de muchas lipoproteínas bacterianas que se sintetizan con una secuencia señal que especifica la unión lipídica. Adicionalmente, se mostró que el resto Pam<sub>3</sub>Cys potenciaba respuestas inmunitarias a OspA en ratones, parcialmente a través de su interacción con TLR-2 (Yoder, et al. (2003) Infection and Immunity 71:3894-3900). Por lo tanto, se esperaría que la lipidación de un fragmento C-terminal de OspA potenciara la inmunogenicidad y capacidad protectora del fragmento.

- El análisis de aislados de *B. burgdorferi* s.l. obtenidos en Norteamérica y Europa ha revelado que OspA tiene una variabilidad antigénica y que pueden definirse varios grupos distintos basándose en la serología. Se han observado mAb anti-OspA que se unen a determinantes antigénicos específicos N y C-terminales. Se ha usado cristalografía de rayos X y análisis por RMN para identificar dominios hipervariables con relevancia inmunológica en OspA y se ha mapeado el epítipo LA-2 con respecto a los aminoácidos C-terminales 203-257 (Ding et al., Mol. Biol. 302: 1153-64, 2000). Estudios anteriores han demostrado que la producción de anticuerpos contra el epítipo C-terminal LA-2 se correlaciona con la inmunidad protectora después de la vacunación con OspA (Van Hoecke et al. Vaccine (1996) 14(17-18):1620-6 y Steere et al., N Engl J Med (1998) 339:209-215). Se mostró que los anticuerpos contra LA-2 bloquean la transmisión de *Borrelia* de la garrapata al huésped (Golde et al., Infect Immun (1997) 65(3):882-889). Estos estudios sugirieron que la porción C-terminal de la proteína OspA puede ser suficiente para inducir la inmunidad protectora. Debería apreciarse que la secuencia de la porción C-terminal de OspA está menos conservada entre serotipos de *Borrelia* que la porción N-terminal (véase la Figura 1).
- Basándose en información de los estudios descritos anteriormente, junto con otros, se usaron en la presente invención formas truncadas de OspA que comprendían la porción C-terminal (también denominada en el presente documento "fragmento de OspA" o "monómero Estas formas truncadas de OspA probaron ser menos protectoras que le proteína OspA de longitud completa. De manera sorprendente, sin embargo, se encontró en el transcurso de la presente invención que la introducción de un enlace disulfuro en la forma truncada (también denominada en el presente documento "fragmento mutante de OspA" o "fragmento mutante") supera esta desventaja. Sin desear quedar limitado a un mecanismo específico, se considera que la mejora de la protección se debe a un aumento en la estabilidad del fragmento de OspA, como se muestra en ensayos que miden la estabilidad térmica.

Debido a su relevancia en el campo de la medicina, particularmente para seres humanos, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* y *B. garinii* son de interés particular. En este sentido, estas cuatro especies de *Borrelia* pueden clasificarse adicionalmente de acuerdo con sus serotipos de OspA, los cuales se han determinado mediante análisis con anticuerpos monoclonales específicos de la proteína OspA respectiva. Se muestran en la Tabla A-2 a continuación los serotipos 1-7, los cuales componen la mayoría de las infecciones por *Borrelia* en seres humanos, junto con sus tasas de prevalencia.

**Tabla A-2.** Designación de serotipo y prevalencia de *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* y *B. garinii*. Se serotipó *Borrelia* aislada de líquido cefalorraquídeo o piel de ser humano o de garrapatas vectores sondando lisados de células enteras con anticuerpos monoclonales de ratón, cada uno específico de un epítipo particular de OspA (como se describe por Wilske et al., J. of Clin Microbiol (1993) 31(2):340-350, y se presenta por Baxter Bioscience en "Climate change effect on ticks and tick-borne diseases", Bruselas, 06 de febrero de 2009).

<i>Borrelia</i> sp.	Serotipo de OspA definido por pruebas de mAb	Prevalencia en enfermedad humana	Cepa de origen para secuencia	Seq ID No:
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	11 %	B31	20
<i>B. afzelii</i>	2	63 %	K78	19
<i>B. garinii</i>	3	1,5 %	PBr	21
<i>B. bavariensis</i>	4	4 %	PBi	22
<i>B. garinii</i>	5	6 %	PHEi	23
<i>B. garinii</i>	6	13 %	DK29	24
<i>B. garinii</i>	7	0,5 %	T25	25

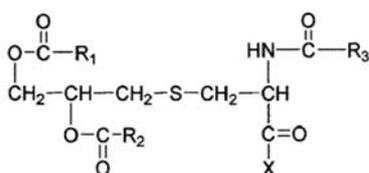
La estructura de la proteína OspA de la cepa de *B. burgdorferi* s.s. B31 se determinó por Li et al. (Proc Natl Acad Sci (1997) 94:3584-3589). Se compone por láminas  $\beta$  N-terminales (cepas  $\beta$  1 a 4) y centrales (cepas  $\beta$  5 a 14n [parte N-terminal]), lámina barril 1 (cepas  $\beta$  14c [parte C-terminal] a 16), lámina barril 2 (cepas  $\beta$  17 a 21) y una hélice  $\alpha$  C-terminal. El término "dominio C-terminal de OspA" o "dominio C-terminal" o "fragmento de tipo salvaje" o "porción C-terminal" con respecto a OspA como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva significará la secuencia de aminoácidos C-terminal de OspA, es decir, OspA que carece al menos de la lámina  $\beta$  N-terminal (incluyendo las cepas  $\beta$  1 a 4). En OspA de la cepa B31 de *B. burgdorferi* s.s., la lámina N-terminal consiste en los aminoácidos 17 a 70 (tras la escisión postraduccional del péptido señal de lipiación de 16 aa de longitud).

De acuerdo con la presente invención, el fragmento C-terminal de OspA también incluye una secuencia señal de lipiación en el extremo N, por ejemplo, secuencia señal de lipiación de los aminoácidos 1 a 16 de OspA (SEQ ID NO: 14) u OspB (SEQ ID NO: 15) de la cepa B31 de *B. burgdorferi* s.s., una secuencia señal de lipiación de *E. coli*, denominada en el presente documento "señal de lipiación lpp" (SEQ ID NO: 16), o cualquier otra secuencia señal,

por ejemplo, como se define a continuación.

La lipidación de una proteína con una secuencia señal de lipidación N-terminal, tal como las presentes en un polipéptido OspA naciente, se produce en el vector de expresión de *E. coli* mediante la acción por etapas de la diacilgliceril transferasa de las enzimas, peptidasa señal II y transacilasa, respectivamente. La primera etapa es la transferencia de un diacilglicérido al grupo sulfhidrilo de cisteína de la polipoproteína no modificada seguida de la escisión del péptido señal por la peptidasa señal II y, finalmente, la acilación del grupo α-amino de la cisteína N-terminal de la apolipoproteína. El resultado es la colocación de un lípido y un grupo glicerol sustituido con dos lípidos adicionales en el residuo de cisteína N-terminal del polipéptido. La secuencia señal de lipidación, que se elimina por escisión durante la lipidación, no está presente en la secuencia polipeptídica final.

De acuerdo con la presente invención, el fragmento mutante de OspA puede ser una proteína lipidada, también lipoproteína, en donde los restos lipídicos, junto con el grupo glicerol, también se denominan "Lip". De acuerdo con la invención, Lip comprende de uno a tres lípidos, tales como alquilo C<sub>14-20</sub> y/o alquenoilo C<sub>14-20</sub> unidos a un glicerol y la cisteína N-terminal del polipéptido de la invención o, preferiblemente, en donde Lip es un resto de la fórmula (I) a continuación,



Fórmula (I),

en la que uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> es alquilo o alquenoilo C<sub>14-20</sub>, y cada uno de los otros, independientemente, es alquilo C<sub>14-20</sub> o alquenoilo C<sub>14-20</sub>, y X es una secuencia de aminoácidos unida al residuo de cisteína que se muestra en la Fórmula (I). Más preferiblemente, Lip más la cisteína N-terminal del polipéptido es N-palmitoil-S-(2RS)-2,3-bis-(palmitoiloxi)propil cisteína (denominada en el presente documento "Pam<sub>3</sub>Cys") y está conectada mediante el carbonilo C de la cisteína de dicha secuencia de aminoácidos de la invención. En la Fórmula (I) anterior, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> serán restos de palmitoil y X es una secuencia de aminoácidos unida al residuo de cisteína.

De acuerdo con la presente invención, y a menos que se defina otra cosa, el dominio C-terminal de una OspA de una cepa distinta de la cepa B31 de *B. burgdorferi* s.s. se define por (i) carecer de al menos los aminoácidos 17 a 70 y/o (ii) carecer de al menos el dominio N-terminal homólogo a los aminoácidos 17 a 70 de OspA de B31 de *B. burgdorferi* s.s. Adicionalmente, el dominio C-terminal de OspA, de acuerdo con la presente invención, puede también carecer de porciones adicionales de la lámina central, como se define por Li y sus colaboradores (Li *et al.*, anteriormente), particularmente cepas adicionales, tales como las porciones de aminoácidos de los aminoácidos 17 a 82, 93, 105, 118 o 119, preferiblemente 17 a 129, más preferiblemente 1 a 125, 1 a 129 o 1 a 130 de cualquier *Borrelia*, particularmente B31 de *B. burgdorferi* s.s., o porciones homólogas de una proteína OspA de una *Borrelia* sp. distinta de B31 de *B. burgdorferi* s.s.

En el contexto de la presente invención, el dominio C-terminal de OspA también se denomina "fragmento OspA" o "fragmento de OspA".

El "fragmento mutante", en el contexto del polipéptido de la presente invención y como se utiliza a lo largo de la presente memoria descriptiva, significará el fragmento C-terminal de OspA, según se definió anteriormente, el cual difiere del fragmento de tipo salvaje en al menos dos cisteínas introducidas que pueden formar un enlace disulfuro. Sin limitarse a esa teoría, se asume que el enlace disulfuro estabiliza el fragmento en una conformación propicia para la inducción de la unión a anticuerpos. El pliegue del fragmento C-terminal de tipo salvaje de OspA muestra una estabilidad reducida de la temperatura en comparación con la proteína de longitud completa (Koide *et al.*, Structure-based Design of a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA, *J. Mol. Biol.* (2005) 350:290-299). Para la presente invención, la secuencia del dominio C-terminal de la OspA de la cepa B31 de *B. burgdorferi* s.s. se ha analizado *in silico* para determinar posiciones de puentes disulfuro introducidos que puedan potenciar la estabilidad del pliegue de este dominio C-terminal. Los resultados del análisis se han transferido a fragmentos homólogos de OspA de otras especies de *Borrelia* bajo la premisa de que el pliegue se conserva a través de las especies.

Típicamente, el enlace disulfuro puede introducirse insertando uno o más residuos de cisteína, en donde un enlace disulfuro (puente S-S) se forma entre los grupos tiol de dos residuos de cisteína. Únicamente es necesario introducir un residuo de cisteína si se forma un enlace disulfuro con un residuo de cisteína presente en el fragmento de tipo salvaje. Una o, preferiblemente, dos cisteínas pueden introducirse mediante adición o, preferiblemente, sustitución de aminoácidos.

El fragmento mutante de OspA puede también comprender mutaciones adicionales relativas al tipo salvaje. Según se ha detallado anteriormente, la estructura y el dominio superficial de OspA se conocen en la técnica. Por consiguiente, el fragmento mutante puede comprender mutaciones adicionales, particularmente en sitios que no se encuentran en la superficie de la proteína y/o no están involucrados en la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, no afectan a la capacidad antigénica. Estos pueden incluir una o más eliminaciones de aminoácidos, particularmente eliminaciones pequeñas (por ejemplo, hasta 10 aminoácidos), una o más adiciones de aminoácidos (particularmente en el extremo N o C), una o más sustituciones de aminoácidos, particularmente una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Los ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, pero sin limitación, las enumeradas a continuación:

Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln; Asn
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Cys	Ser	Ser	Thr
Gln	Asn	Thr	Ser
Glu	Asp	Trp	Tyr
His	Asn; Gln	Tyr	Trp; Phe
Ile	Leu, Val	Val	Ile; Leu

Las mutaciones preferidas incluyen cambios en porciones seleccionadas del fragmento, por ejemplo, en las que se modifica la secuencia con similitud de secuencia con respecto antígeno humano asociado a la función leucocitaria (hLFA-1), que existe en *B. burgdorferi* s.s., por ejemplo, se reemplaza por una secuencia homóloga de una proteína OspA de otra *Borrelia* sp. La lógica de esta modificación es disminuir el riesgo de la inducción de reacciones inmunológicas cruzadas con proteínas humanas. También es posible la adición de una secuencia señal para la lipidación en el fragmento final, o un fragmento intermedio, o la adición de una proteína marcadora (por ejemplo, para identificación o purificación).

En algunas realizaciones, el fragmento mutante de OspA tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un 60 %, preferiblemente al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con el fragmento de tipo salvaje. En otra realización, la secuencia difiere en un máximo del 10 %, un máximo del 9 %, un máximo del 8 %, un máximo del 7 %, un máximo del 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, mucho más preferiblemente un máximo del 1 % debido a una adición, eliminación o sustitución de secuencia.

La identidad, como se conoce en la técnica y como se usa en el presente documento, es la relación entre dos o más secuencias de polipéptidos, según se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, identidad también implica el grado de relación de secuencia entre las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, determinada por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La identidad puede calcularse fácilmente. Aunque existe una cantidad de métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos, el término se conoce bien por los expertos en la técnica (por ejemplo, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux, J. *et al.*, 1984), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. *et al.*, 1990).

En oposición al fragmento mutante de OspA, el "fragmento de tipo salvaje" en el contexto de la presente invención se refiere a un fragmento de una OspA de origen natural de *Borrelia*. El fragmento de tipo salvaje se obtiene mediante eliminaciones N-terminal, pero no comprende eliminaciones internas (salvo de secuencias señal, como se detalla en el presente documento) o mutaciones. Con relación al fragmento mutante de OspA, el fragmento de tipo salvaje consiste en una parte idéntica de la OspA (longitud idéntica y misma cepa de OspA, etc.) y difiere únicamente en la mutación o mutaciones detalladas anteriormente, particularmente en la introducción de al menos un enlace disulfuro o el reemplazo de una secuencia con homología humana, por ejemplo hLFA-1 (véase lo

anterior).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de la presente invención no comprende o consiste en el polipéptido de OspA de longitud completa que tiene al menos un enlace disulfuro  
5 introducido.

En una realización de la presente invención, el fragmento mutante de OspA puede diferir del fragmento respectivo de tipo salvaje únicamente en la introducción de al menos un, preferiblemente exactamente un, enlace disulfuro.

10 Un polipéptido es un polímero lineal único de aminoácidos unido mediante enlaces peptídicos, en algunos casos también por enlaces disulfuro. De acuerdo con la presente invención, el polipéptido también puede comprometer una o más modificaciones postraduccionales; es decir, un grupo funcional bioquímico adjunto, tal como un acetato, fosfato, lípido o carbohidrato adjunto, preferiblemente un lípido o lípidos adjuntos a la cisteína N-terminal, junto con un glicerol, más preferiblemente 1 a 3 restos alquilo o alquenoilo C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>, incluso más preferiblemente 1 a 3 grupos  
15 palmitoilo, mucho más preferiblemente tres grupos palmitoilo (Pam<sub>3</sub>).

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de la presente invención comprende el fragmento mutante de OspA como se define en las reivindicaciones. De acuerdo con la presente invención, no comprende (i) la lámina N-terminal según se ha definido anteriormente y (ii) opcionalmente una o más cepas adicionales de la lámina central  
20 según se ha definido anteriormente. Sin embargo, el polipéptido puede comprender una o más secuencias funcionales tales como una secuencia señal, por ejemplo, una secuencia señal de lipidación o una modificación postraducciona, tal como una lipidación.

En una realización adicional de la presente invención, el polipéptido de la presente invención consiste en (i) dos o  
25 más fragmentos mutantes de OspA, opcionalmente unidos por enlazadores, por ejemplo, como se define a continuación, y (ii) opcionalmente uno o más aminoácidos heterólogos a OspA, particularmente una secuencia señal, y (iii) opcionalmente una modificación postraducciona, tal como una lipidación.

El polipéptido de la presente invención tiene capacidad protectora. Como se ha detallado anteriormente, la  
30 introducción de un enlace disulfuro en el fragmento mutante de OspA aumenta la capacidad protectora del polipéptido con respecto a un polipéptido que comprende el fragmento respectivo sin el enlace o enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, la capacidad protectora aumenta en al menos el 10 %, más preferiblemente en al menos el 20 %, más preferiblemente en al menos el 30 %, más preferiblemente en al menos el 40 %, más preferiblemente en al menos el 50 %, más preferiblemente en al menos el 60 %, más preferiblemente en al menos el 70 %, más  
35 preferiblemente en al menos el 80 %, incluso más preferiblemente en al menos el 90 % con respecto a un polipéptido que comprende el fragmento respectivo sin el enlace o enlaces disulfuro.

El término capacidad protectora describe la capacidad de proteger un sujeto contra una infección por *Borrelia*. Con respecto al polipéptido de la invención, la capacidad protectora se refiere a la capacidad del polipéptido de inducir  
40 una respuesta inmunitaria que protege a un sujeto contra una infección por *Borrelia*. La capacidad protectora puede ensayarse administrando a un sujeto el polipéptido de manera que se induzca una reacción inmunitaria contra el polipéptido. Posteriormente, el sujeto puede exponerse a *Borrelia*. Se supervisa la reacción del sujeto a la infección. Particularmente, puede determinarse la presencia de *Borrelia* en el sujeto. Por ejemplo, el polipéptido es protector si no puede detectarse *Borrelia* en el sujeto. La presencia de *Borrelia* puede determinarse detectando ácidos nucleicos  
45 específicos de *Borrelia* (por ejemplo, mediante PCR) o anticuerpos específicos de *Borrelia* (por ejemplo, mediante ELISA o transferencia Western), o detectando la propia *Borrelia* (por ejemplo, cultivando órganos o tejidos en medio de cultivo y verificando la presencia de *Borrelia* con un microscopio). En particular, la capacidad protectora ("pc"), indicada como un porcentaje, para una dosis particular se define de la siguiente manera:

50 
$$pc (\%) = \frac{(\text{número de sujetos ensayados totales} - \text{número de sujetos infectados por } \textit{Borrelia})}{\text{número de sujetos ensayados totales}} \times 100$$

Las diferencias en la capacidad protectora ( $\Delta pc$ ) pueden determinarse mediante, por ejemplo, comparando la capacidad protectora (pc) de un fragmento mutante de OspA con uno o varios enlaces disulfuro (pc [con enlace]) con  
55 respecto a la capacidad protectora de un fragmento de OspA sin uno o más enlaces disulfuro (pc [sin enlace]). De acuerdo con la presente invención, los polipéptidos a comparar difieren únicamente en la introducción de al menos un enlace disulfuro. El cambio en la capacidad protectora ( $\Delta pc$ ) por la introducción del enlace o enlaces disulfuro se determina de la siguiente manera:

$$\Delta pc = (pc \text{ [muestra]} - pc \text{ [control]})$$

por ejemplo,  $\Delta pc = (pc \text{ [con enlace]} - pc \text{ [con/sin enlace]})$

Si  $\Delta pc$  es mayor de cero ( $>0$ ), asumiendo que todos los demás parámetros (por ejemplo, dosis y ensayo) son iguales, entonces la capacidad protectora de la muestra (por ejemplo, el fragmento mutante de OspA con uno o más enlaces disulfuro) es mejor que la capacidad protectora del control (por ejemplo, el fragmento de OspA sin uno o más enlaces disulfuro). Por el contrario, si  $\Delta pc$  es menor de cero ( $<0$ ), y asumiendo que todos los demás parámetros (por ejemplo, dosis y ensayo) son iguales, entonces la capacidad protectora de la muestra (por ejemplo, el fragmento mutante de OspA con uno o más enlaces disulfuro) es peor que la capacidad protectora de la comparación (por ejemplo, el fragmento de OspA sin uno o más enlaces disulfuro).

Preferiblemente, se evalúa la capacidad protectora del polipéptido de la presente invención mediante un ensayo de exposición *in vivo* en el que los ratones inmunizados con el polipéptido de la invención o con un placebo de control se exponen a *Borrelia* introducida en los sujetos inmunizados con una aguja hipodérmica (método de exposición con aguja) o mediante la introducción con una garrapata vector (método de exposición por garrapatas).

El método de exposición con aguja se realiza para la cepa de *Borrelia* deseada (por ejemplo, *B. burgdorferi*, cepa N40) mediante la introducción subcutánea de *Borrelia* en una dosis entre 20 y 50 veces la dosis infecciosa ( $ID_{50}$ ) a ratones inmunizados con dicho primer polipéptido del primer aspecto o de un placebo de control (negativo) adecuado, tal como un tampón o adyuvante en solitario y por la comparación de las tasas de infección en los ratones expuestos. La  $ID_{50}$  se define como la dosis a la que se infectan el 50 % de los ratones expuestos. La dosis de *Borrelia* se mide en cantidad de bacterias. La dosis de exposición puede variar en gran medida y depende de la cepa; por lo tanto, debe calificarse primero la virulencia de la cepa mediante experimentos de exposición para la determinación de la  $ID_{50}$ . Cuatro semanas después de la exposición por aguja, se recolecta sangre y tejidos para que los métodos de lectura determinen el estado infeccioso. Estos métodos de lectura pueden ser, por ejemplo, VIsE ELISA en sueros o qPCR en tejidos recolectados para la identificación de *Borrelia*, como se describe en el presente documento, u otros métodos.

El método de exposición por garrapata se lleva a cabo aplicando al menos una ninfa de garrapata (por ejemplo, *I. ricinus*) infectada con *Borrelia* (por ejemplo, *B. afzelii*, cepa IS1), a un ratón inmunizado con dicho primer polipéptido del primer aspecto; y (b) aplicando al menos una ninfa de garrapata infectada a un segundo ratón inmunizado con dicho segundo polipéptido del primer aspecto; y (c) comparando las tasas de infección en ambos ratones, generalmente seis semanas después de la exposición. Preferiblemente, el ensayo o prueba se realizan con un grupo de ratones por polipéptido a ensayar. En los Ejemplos también se describe y se ilustra una prueba adecuada. Puede realizarse una evaluación del estado infeccioso con VIsE ELISA en sueros o por qPCR en tejidos recolectados, o mediante otros métodos adecuados.

En una realización preferida de la presente invención, los productos de la invención tales como, por ejemplo, los polipéptidos de la invención que comprenden los fragmentos mutantes de OspA con uno o más enlaces disulfuro administrados 3 veces a un sujeto en una dosis de 30  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 10  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 5,0  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 1,0  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 0,3  $\mu\text{g}$ , o menos tienen una capacidad protectora del 50 % o más, preferiblemente del 60 % o más, más preferiblemente del 70 % o más, más preferiblemente del 80 % o más, más preferiblemente del 90 % o más, incluso más preferiblemente del 95 % o más, mucho más preferiblemente del 99 % o más. En una realización, la capacidad protectora se evalúa en un método de exposición *in vivo*, preferiblemente un método de exposición por garrapatas, más preferiblemente un método de exposición por aguja, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos. Se ha observado, de manera sorprendente, que la inmunización con un fragmento mutante de OspA de un serotipo puede proporcionar protección cruzada contra otros serotipos (Ejemplo 4, Tabla 4). Basándose en este hallazgo, se podría anticipar que la dosis del polipéptido de la presente invención podría incluso reducirse adicionalmente.

En una realización preferida, la diferencia en la capacidad protectora ( $\Delta pc$ ) entre los polipéptidos de la invención que comprenden los fragmentos mutantes de OspA con uno o más enlaces disulfuro y el placebo de control (negativo) es al menos del 50 %, especialmente al menos del 60 %, preferiblemente al menos del 70 %, más preferiblemente al menos del 80 %, incluso más preferiblemente del 90 %, incluso más preferiblemente del 95 %, mucho más preferiblemente al menos del 95 %, al administrarse 3 veces a un sujeto en una dosis de 30  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 10  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 5,0  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 1,0  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 0,3  $\mu\text{g}$  o inferior.

En una realización preferida de la presente invención, el dominio C-terminal se define como un fragmento que consiste en al menos los 150 aminoácidos C-terminal de la proteína OspA. En una realización, el dominio C-terminal

tiene entre 140 y 152 aminoácidos de longitud. En una realización adicional, el dominio C-terminal consiste en no más de los últimos 152 aminoácidos de la proteína OspA, preferiblemente los últimos 151 aminoácidos, más preferiblemente los últimos 150 aminoácidos. En una realización alternativa, el dominio C-terminal consiste en no menos de los últimos 140 aminoácidos de la proteína OspA, preferiblemente los últimos 141 aminoácidos, 5 preferiblemente los últimos 142 aminoácidos, más preferiblemente los últimos 143 aminoácidos. Los últimos aminoácidos de la proteína OspA se definen en el presente documento como la secuencia de aminoácidos más contigua al extremo C de la proteína OspA.

En otra realización, el dominio C-terminal de una proteína OspA de *Borrelia* comprende, esencialmente consiste en o 10 consiste en (i) los aminoácidos de la posición 126, 131 o 130 a la posición 273 de la OspA de *B. afzelii*, cepa K78, o (ii) el dominio homólogo a los aminoácidos de OspA de una cepa de *Borrelia* distinta de *B. afzelii*, cepa K78.

El polipéptido de la presente invención puede comprender, consistir esencialmente o consistir en (i) dos o más de 15 estos fragmentos mutantes, opcionalmente unidos por enlazadores, por ejemplo, como se define a continuación y (ii) opcionalmente uno o más aminoácidos heterólogos a OspA, particularmente una secuencia señal o sitio para una modificación postraduccional tal como lipidación, y (iii) opcionalmente una modificación postraduccional, tal como una lipidación.

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de la presente invención puede comprender o esencialmente 20 consiste en o consiste en los elementos descritos en el presente documento, particularmente los dos o más fragmentos mutantes de OspA y opcionalmente uno o más elementos adicionales tales como un dominio homólogo, un péptido enlazador, una secuencia señal o un sitio para la lipidación. "Esencialmente consiste" en este contexto significa que el elemento o elementos pueden tener cambios menores de aminoácidos con respecto a las secuencias anteriores, tales como adiciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, preferiblemente 25 relacionadas con un máximo del 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o el 1 % de los aminoácidos de los elementos definidos en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, se introduce al menos un enlace disulfuro en un fragmento de OspA. Esto se puede conseguir preferiblemente mediante la introducción al fragmento de al menos 1 o 2 cisteínas, particularmente 30 2 cisteínas, con el fin de permitir la formación del al menos un enlace disulfuro. Únicamente puede introducirse una cisteína si hay otra cisteína disponible en el fragmento para un enlace disulfuro. No obstante, preferiblemente se introducen dos cisteínas. La una o más cisteínas se introducen mediante una adición o sustitución de aminoácidos, preferiblemente mediante sustitución. En el caso de la adición, la cisteína se inserta en la secuencia de aminoácidos entre dos aminoácidos, mientras que en el caso de la sustitución, se reemplaza un aminoácido con la cisteína.

35 La OspA puede ser de cualquier cepa de *Borrelia*, particularmente de las especificadas en el presente documento, tales como *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdii* o *B. sinica*, *B. bavariensis*, preferiblemente de *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* o *B. garinii*. Preferiblemente, la OspA es de *B. afzelii*, particularmente la cepa K78, serotipo 2 de OspA 40 (SEQ ID NO: 19); *B. burgdorferi* s.s., particularmente la cepa B31, serotipo 1 de OspA (SEQ ID NO: 20); *B. garinii*, particularmente la cepa PBr, serotipo 3 de OspA (SEQ ID NO: 21); *B. bavariensis*, particularmente la cepa PBI, serotipo 4 de OspA (SEQ ID NO: 22); *B. garinii*, particularmente la cepa PHei, serotipo 5 de OspA (SEQ ID NO: 23); *B. garinii*, particularmente la cepa DK29, serotipo 6 de OspA (SEQ ID NO: 24) o *B. garinii*, particularmente la cepa T25, serotipo 7 de OspA (SEQ ID NO: 25). Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas OspA (longitud 45 completa) se proporcionan a continuación.

**Tabla A-3. Números de acceso de secuencias de Ospa de las cepas seleccionadas de especies de *Borrelia*.** Abreviaturas: **Baf** = *Borrelia afzelii*, **Bbu** = *Borrelia burgdorferi* s.s., **Bga** = *Borrelia garinii*, **Bsp** = *Borrelia spielmanii*, **Bbi** = *Borrelia bissetii*, **Bva** = *Borrelia valaisiana*, **Btu** = *Borrelia turicatae*, **Bdu** = *Borrelia duttonii*, **Blu** = *Borrelia lusitanae*, **Bja** = *Borrelia japonica*, **gb** = GenBank, **emb** = EMBL, **tr** = UniProt/Swissprot, **sp** = UniProt/Swissprot, **prf** = Fundación de investigación de proteínas, **dbj** = Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ), **pdb** = Banco de datos de proteínas, **db** = Banco de datos de datos

Cepa del organismo	db versión de acceso	Organismo_Cepa	db versión de acceso	Organismo_Cepa	db versión de acceso
Bbu_156a (serotipo 1)	gb ACL33776.1	Bbu_K48	emb CAA44492.1	Bga_Mng4702	gb ABF29559.1
Baf_K78 (serotipo 2)	emb CAA49828.1	Bbu_N40	gb ACS94765.1	Bga_N34	emb CAB64763.1
Bga_PBr (serotipo 3)	emb CAA56549.1	Bbu_POA3N6.1	sp POA3N6.1	Bga_Nov1006	gb ACD02016.1
Bga_PBi (serotipo 4)	emb CAA56550.1	Bbu_PBo	emb CAA56468.1	Bga_Nov105	gb ABF29551.1
Bbu_PHei (serotipo 5)	tr Q06228	Bbu_PBre	emb CAA59742.1	Bga_Nov14506	gb ACD02013.1
Bbu_DK29 (serotipo 6)	emb CAA45010.1	Bbu_PHei	emb CAA56544.1	Bga_Nov14606	gb ACD02017.1
Bga_T25 (serotipo 7)	emb CAA56547.1	Bbu_PKa	emb CAA56467.1	Bga_Nov2005	gb ABF29553.1
Baf_ACA-1	gb ACJ73559.1	Bbu_PKo	emb CAA46550.1	Bga_Nov2006	gb ACD02018.1
Baf_K78	(secuenciada)	Bbu_Poti_B1	emb CAB64754.1	Bga_Nov3305	gb ABF29554.1
Baf_Khab_625	gb AAR96311.1	Bbu_Poti_B2	emb CAB64755.1	Bga_Nov405	gb ABF29552.1
Baf_Khab2-Sakh	gb AAP94134.1	Bbu_Poti_B3	emb CAB64756.1	Bga_Nov7006	gb ACD02014.1
Baf_Khab470	gb AAO91923.1	Bbu_PTro	emb CAA56471.1	Bga_Nov9906	gb ACD02015.1
Baf_Khab505	gb AAO91925.1	Bbu_PWudl	emb CAA56469.1	Bga_PBi	gb AAT93773.1
Baf_LU192	(secuenciada, parcial)	Bbu_PWudl/6	emb CAA56470.1	Bga_PBr	emb CAA56549.1
Baf_Mng3602	gb ABF29573.1	Bbu_PWudll	emb CAA56546.1	Bga_QIHLH6	gb ABF29564.1
Baf_Mng4302	gb ABF29574.1	Bbu_Q04851.1	sp Q04851.1	Bga_T25	emb CAA56547.1
Baf_Mng6702	gb ABF29578.1	Bbu_Q04968.1	sp Q04968.1	Bga_TIsI	emb CAA59727.1
Baf_Mng702	gb ABF29572.1	Bbu_Q09086.1	sp Q09086.1	Bga_TN	emb CAA56545.1
Baf_Nov1105	gb ABF29569.1	Bbu_Q09087.1	sp Q09087.1	Bga_Tom1003	gb ABF29564.1
Baf_Nov11506	gb ACD02019.1	Bbu_Q44738	tr Q44738	Bga_Tom1805	gb ABF29567.1
Baf_Nov3005	gb ABF29570.1	Bbu_Q44956	emb CAA56937.1	Bga_Tom203	gb ABF29562.1
Baf_POA3N7.1	sp POA3N7.1	Bbu_Q44962	dbj BAO06133.1	Bga_Tom2903	gb ABF29565.1
Baf_PHO	emb CAA59724.1	Bbu_Q45039	emb CAR95556.1	Bga_Tom3005	gb ABF29568.1
Baf_PKo	gb ABH02138.1	Bbu_Q45040	tr Q45040	Bga_Tom303	gb ABF29563.1
Baf_PLe	emb CAA59970.1	Bbu_S-1-10	gb AAB96354.1	Bga_Tom3101	gb ABF29557.1
Baf_PLJ7	emb CAA59725.1	Bbu_T.R.O.	emb CAA46549.1	Bga_Tom3803	gb ABF29566.1
Baf_PLud	emb CAA59726.1	Bbu_T255	emb CAA59730.1	Bga_Tom5102	gb ABF29560.1
Baf_Tom1103	gb ABF29581.1	Bbu_UK	emb CAB64758.1	Bga_Tom5202	gb ABF29561.1

Baf_Tom1303	gb ABF29582.1	Bbu_VS116	emb CAB64757.1	Bga_Tom7105	gb ABF29556.1
Baf_Tom1503	gb ABF29583.1	Bbu_VS461	emb CAA82329.1	Bga_VS100	emb CAB64765.1
Baf_Tom2303	gb ABF29584.1	Bbu_WI91-23	ref ZP_03091138.1	Bga_VS307	emb CAB64764.1
Baf_Tom2403	gb ABF29585.1	Bbu_ZQ1	emb CAA01704.1	Bga_WABSou	emb CAA59728.1
Baf_Tom2504	gb ABF29577.1	Bbu_ZS7	gb ACK74228.1	Bja_Cow611	emb CAB64759.1
Baf_Tom2803	gb ABF29586.1	Bga_EgVir-1	gb ABF29555.1	Bja_F63	emb CAB64760.1
Baf_Tom3401	gb ABF29571.1	Bga_Fat04	ref ZP_03328706.1	Bja_HO14	emb CAB64762.1
Baf_Tom3703	gb ABF29587.1	Bga_FujiP2	gb AA92301.1	Bja_IKA2	emb CAB64761.1
Baf_Tom4703	gb ABF29588.1	Bga_IP90	emb CAJ75754.1	Blu_A8D057	gb ABR22627.1
Baf_Tom5403	gb ABF29575.1	Bga_IP90	emb CAJ75754.1	Blu_A8D060	gb ABR22625.1
Baf_Tom603	gb ABF29579.1	Bga_JEM1	gb AAB81567.1	Blu_A8D075	gb ABR22628.1
Baf_Tom6303	gb ABF29576.1	Bga_JEM2	gb AAB81569.1	Blu_A8D079	gb ABR22629.1
Baf_Tom703	gb ABF29580.1	Bga_JEM3	gb AAB81571.1	Blu_ABR22624.1	gb ABR22624.1
Baf_XJ23	gb AAB95225.1	Bga_JEM4	dbj BAA19222.1	Blu_ABR22626.1	gb ABR22626.1
Bbu_118a	ref ZP_02720644.1	Bga_JEM5	gb AAB81573.1	Bsp_A14S	gb AAD16455.1
Bbu_156a	gb ACL33776.1	Bga_JEM6	gb AAB81575.1	Btu_Ya501	dbj BAA32513.1
Bbu_19857	emb CAA48196.1	Bga_JEM7	gb AAB81577.1	Bva_AR-2	gb AAF00571.1
Bbu_2005348A	prf 2005348A	Bga_JEM8	gb AAB81579.1	Bva_M19	gb AAF00573.1
Bbu_2005348B	prf 2005348B	Bga_Khab3155	gb AAR96310.1	Bva_M49	gb AAF00574.1
Bbu_297	emb CAA59729.1	Bga_Khab550	gb AAR96306.1	Bva_M52	gb AAF00575.1
Bbu_29805	ref ZP_03092996.1	Bga_Khab616	gb AAR96307.1	Bva_M53	gb AAF00576.1
Bbu_64b	ref ZP_03097520.1	Bga_Khab648	gb AAR96308.1	Bva_M7	gb AAF00572.1
Bbu_72a	ref ZP_02724465.1	Bga_Khab722	gb AAR96309.1	Bva_Q9RM88	emb CAB66150.1
Bbu_80a	ref ZP_03088001.1	Bga_Khab23	gb AAP94125.1	Bva_QLZSP1	gb ACA13516.1
Bbu_94a	ref ZP_02725946.1	Bga_Khab24	gb AAP94126.1	Bva_QSDS4	gb ACA13517.1
Bbu_AAB23809.1	gb AAB23809.1	Bga_Khab31	gb AAP94127.1	Bva_QSYSP3	gb ACA13518.1
Bbu_AAB23810.1	gb AAB23810.1	Bga_Khab31a	gb AAP94128.1	Bva_QSYSP4	gb ACA13519.1
Bbu_B29	gb AAA18508.1	Bga_Khab-466	gb AAP94129.1	Bva_QTMP2	gb ACA13520.1
Bbu_B31	gb AAC66260.1	Bga_Khab489	gb AAP94130.1	Bva_QX-S13	gb ACA13521.1
Bbu_Bol26	ref ZP_02531917.1	Bga_Khab5-Sakh	gb AAO91932.1	Bva_UK	gb AAF00570.1
Bbu_C-1-11	gb AAB96351.1	Bga_Khab506	gb AAP94132.1	Bva_VS116	gb AAF00569.1
Bbu_CA-11.2a_1	ref ZP_03094587.1	Bga_Khab516	gb AAP94133.1	Bsp_10MT	dbj BAA32516.1
Bbu_CA-11.2a_2	ref ZP_03094587.1	Bga_Khab721	gb AAP94131.1	Bsp_5MT	dbj BAA32515.1

Bbu_CA-11.2a_CA-112a	ref ZP_03094587.1	Bga_Khab2119	gb AAO91928.1	Bsp_Am501	dbj BAA32514.1
Bbu_CAA00316.1	emb CAA00316.1	Bga_Khab2559	gb AAO91929.1	Bsp_LV5	gb AAB96353.1
Bbu_CAA42842.1	emb CAA42842.1	Bga_Khab2560	gb AAO91930.1	Bsp_PAnz	emb CAJ43585.1
Bbu_CAA44258.1	emb CAA44258.1	Bga_Khab2594	gb AAO91931.1	Bsp_PHaP_PHaP	emb CAJ43582.1
Bbu_CAR95597.1	emb CAR95597.1	Bga_Khab430	gb AAO91919.1	Bsp_PJes	emb CAJ43586.1
Bbu_DK1	gb AAA22955.1	Bga_Khab448	gb AAO91920.1	Bsp_PMai	emb CAJ43584.1
Bbu_DK29	emb CAA45010.1	Bga_Khab457	gb AAO91921.1	Bsp_PMew	emb CAJ43583.1
Bbu_DK6_Danish_isolate	emb CAA58601.1	Bga_Khab468	gb AAO91922.1	Bsp_PSigll	emb CAJ43581.1
Bbu_G2	gb AAA88846.1	Bga_Khab492	gb AAO91924.1	Bsp_SV1	ref ZP_03095680.1
Bbu_G25	emb CAA82328.1	Bga_Khab511	gb AAO91926.1	Bbi_25015	gb AAB21761.1
Bbu_H.E.	emb CAA46551.1	Bga_Khab560	gb AAO91927.1	Bbi_DN127	emb CAB64766.1
Bbu_HB19	gb AAC18776.1	Bga_LV4	gb AAB96352.1	Bbi_Q09087.1	gb AAB21761.1

El enlace disulfuro puede formarse entre cisteínas que se han introducido en cualquier posición del fragmento de OspA, lo que permite o soporta el pliegue adecuado del fragmento. Pueden seleccionarse las posiciones, como se ha detallado anteriormente, basándose en la estructura conocida de la OspA. El polipéptido puede contener al menos un enlace disulfuro entre cualquiera de las posiciones 182 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 269 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 1); cualquiera de las posiciones 182 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 272 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 2); cualquiera de las posiciones 244 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 259 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 3); cualquiera de las posiciones 141 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 241 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 4); cualquiera de las posiciones 165 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 265 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 5); cualquiera de las posiciones 185 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 272 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 6); cualquiera de las posiciones 199 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 223 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 7); cualquiera de las posiciones 243 +/-3 y cualquiera de las posiciones 262 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 8); cualquiera de las posiciones 184 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 204 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 9); cualquiera de las posiciones 201 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 214 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 10); cualquiera de las posiciones 246 +/-3 y cualquiera de las posiciones 259 +/- 3 (enlace disulfuro de tipo 11); y/o cualquiera de las posiciones 167 +/- 3 y cualquiera de las posiciones 178 +/-3 (enlace disulfuro de tipo 12) de una *B. afzelii*, particularmente OspA de serotipo 2 de *B. afzelii* K78, o los aminoácidos homólogos de una OspA de una *Borrelia sp. distinta de B. afzelii*, tal como *B. burgdorferi* s.s., particularmente la cepa B31, serotipo 1; *B. garinii*, particularmente la cepa PBr, serotipo 3; *B. bavariensis*, particularmente la cepa PBi, serotipo 4; *B. garinii*, particularmente la cepa PHei, serotipo 5; *B. garinii*, particularmente la cepa DK29, serotipo 6, o *B. garinii*, particularmente la cepa T25, serotipo 7.

El polipéptido puede contener el al menos un enlace disulfuro entre cualquiera de las posiciones 182 y 269 (enlace disulfuro de tipo 1); posiciones 182 y 272 (enlace disulfuro de tipo 2); posiciones 244 y 259 (enlace disulfuro de tipo 3); posiciones 141 y 241 (enlace disulfuro de tipo 4); posiciones 165 y 265 (enlace disulfuro de tipo 5); posiciones 185 y 272 (enlace disulfuro de tipo 6); posiciones 199 y 223 (enlace disulfuro de tipo 7); posiciones 243 y 262 (enlace disulfuro de tipo 8); posiciones 184 y 204 (enlace disulfuro de tipo 9); posiciones 201 y 214 (enlace disulfuro de tipo 10); posiciones 246 y 259 (enlace disulfuro de tipo 11); y/o las posiciones 167 y 178 (enlace disulfuro de tipo 12) de una *B. afzelii*, particularmente OspA de serotipo 2 de *B. afzelii* K78, o los aminoácidos homólogos de una OspA de una *Borrelia* distinta de *B. afzelii*, tal como *B. burgdorferi* s.s., particularmente la cepa B31, serotipo 1; *B. garinii*, particularmente la cepa PBr, serotipo 3; *B. bavariensis*, particularmente la cepa PBi, serotipo 4; *B. garinii*, particularmente la cepa PHei, serotipo 5; *B. garinii*, particularmente la cepa DK29, serotipo 6, o *B. garinii*, particularmente la cepa T25, serotipo 7.

**Tabla A-4.** Tipos de enlace disulfuro con nomenclatura y la posición de las sustituciones de cisteína en la proteína OspA de serotipo 2.

Tipo de enlace disulfuro	Nomenclatura	Posición de las cisteínas en OspA de serotipo 2 de <i>B. afzelii</i> K78
secuencia de tipo salvaje	D0	Sin sustituciones de cisteína
1	D1	182 y 269
2	D2	182 y 272
3	D3	244 y 259
4	D4	141 y 241
5	D5	165 y 265
6	D6	185 y 272
7	D7	199 y 223
8	D8	243 y 262
9	D9	184 y 204
10	D10	201 y 214
11	D11	246 y 259
12	D12	167 y 178

Son incluso más preferidos los enlaces disulfuro de tipos 1 a 5, especialmente los enlaces disulfuro de tipos 1 a 4.

Se aprecia que:

- La posición 182 +/- 3 es una abreviatura para la posición 179, 180, 181, 182, 183, 184 o 185, preferiblemente 182.
- La posición 269 +/- 3 es una abreviatura para la posición 266, 267, 268, 269, 270, 271 o 272, preferiblemente 269.
- La posición 272 +/- 3 es una abreviatura para la posición 269, 270, 271, 272, 273, 274 o 275,

- preferiblemente 272.
- La posición 244 +/- 3 es una abreviatura para la posición 241, 242, 243, 244, 245, 246 o 247, preferiblemente 244.
- 5 La posición 259 +/- 3 es una abreviatura para la posición 256, 257, 258, 259, 260, 261 o 262, preferiblemente 259.
- La posición 141 +/- 3 es una abreviatura para la posición 138, 139, 140, 141, 142, 143 o 144, preferiblemente 141.
- La posición 241 +/- 3 es una abreviatura para la posición 238, 239, 240, 241, 242, 243 o 244, preferiblemente 241.
- 10 La posición 165 +/- 3 es una abreviatura para la posición 162, 163, 164, 165, 166, 167 o 168, preferiblemente 165.
- La posición 265 +/- 3 es una abreviatura para la posición 262, 263, 264, 265, 266, 267 o 268, preferiblemente 265.
- 15 La posición 185 +/- 3 es una abreviatura para la posición 182, 183, 184, 185, 186, 187 o 188, preferiblemente 185.
- La posición 199 +/- 3 es una abreviatura para la posición 196, 197, 198, 199, 200, 201 o 202, preferiblemente 199.
- La posición 223 +/- 3 es una abreviatura para la posición 220, 221, 222, 223, 224, 225 o 226, preferiblemente 223.
- 20 La posición 243 +/- 3 es una abreviatura para la posición 240, 241, 242, 243, 244, 245 o 246, preferiblemente 143.
- La posición 262 +/- 3 es una abreviatura para la posición 259, 260, 261, 262, 263, 264 o 265, preferiblemente 262.
- 25 La posición 184 +/- 3 es una abreviatura para la posición 181, 182, 183, 184, 185, 186 o 187, preferiblemente 184.
- La posición 204 +/- 3 es una abreviatura para la posición 201, 202, 203, 204, 205, 206 o 207, preferiblemente 204.
- La posición 201 +/- 3 es una abreviatura para la posición 198, 199, 200, 201, 202, 203 o 204, preferiblemente 201.
- 30 La posición 214 +/- 3 es una abreviatura para la posición 211, 212, 213, 214, 215, 216 o 217, preferiblemente 214.
- La posición 246 +/- 3 es una abreviatura para la posición 243, 244, 245, 246, 247, 248 o 249, preferiblemente 246.
- 35 La posición 167 +/- 3 es una abreviatura para la posición 164, 165, 166, 167, 168, 169 o 170, preferiblemente 167.
- La posición 178 +/- 3 es una abreviatura para la posición 175, 176, 177, 178, 179, 180 o 181, preferiblemente 178.

Se describen fragmentos mutantes derivados de los aminoácidos de la posición 126, 130 o 131 a la posición 273 de la secuencia de tipo salvaje de la OspA de *B. afzelii* cepa K78, serotipo 2 (SEQ ID NO: 18) y que difieren solamente en la introducción de al menos un enlace disulfuro, particularmente en donde el al menos un enlace disulfuro está entre las posiciones 182 y 269 (enlace disulfuro de tipo 1); posiciones 182 y 272 (enlace disulfuro de tipo 2); posiciones 244 y 259 (enlace disulfuro de tipo 3); posiciones 141 y 241 (enlace disulfuro de tipo 4); posiciones 165 y 265 (enlace disulfuro de tipo 5); posiciones 185 y 272 (enlace disulfuro de tipo 6); posiciones 199 y 223 (enlace disulfuro de tipo 7); posiciones 243 y 262 (enlace disulfuro de tipo 8); posiciones 184 y 204 (enlace disulfuro de tipo 9); posiciones 201 y 214 (enlace disulfuro de tipo 10); posiciones 246 y 259 (enlace disulfuro de tipo 11); y/o las posiciones 167 y 178 (enlace disulfuro de tipo 12), o los fragmentos homólogos y posiciones de una OspA de una *Borrelia sp.* distinta de *B. afzelii*, tal como *B. burgdorferi* s.s., particularmente la cepa B31, serotipo 1; *B. garinii*, particularmente la cepa PBr, serotipo 3; *B. bavariensis*, particularmente la cepa PBI, serotipo 4; *B. garinii*, particularmente la cepa PHei, serotipo 5; *B. garinii*, particularmente la cepa DK29, serotipo 6, o *B. garinii*, particularmente la cepa T25, serotipo 7.

El fragmento mutante puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias con SEQ ID NOs: 2 a 13, en donde las cisteínas no se reemplazan. Se han proporcionado anteriormente detalles adicionales sobre mutaciones e identidad de secuencia.

Como se ha detallado anteriormente, el polipéptido de la presente invención puede comprender secuencias señal. Se ha mostrado que la lipídación confiere propiedades de adyuvante a OspA. Por consiguiente, las formas lipidadas del polipéptido de la invención o polipéptidos que comprenden una señal de lipídación son preferidos. En una realización preferida, el polipéptido de la presente invención comprende una señal de lipídación, preferiblemente una señal de lipídación de una proteína de la superficie externa, OspA o OspB de *Borrelia* (SEQ ID NOs: 14 y 15, respectivamente) o más preferiblemente una secuencia señal de lipídación lpp de *E. coli* (SEQ ID NO: 16). El fragmento de OspA de la invención que comprende una señal de lipídación, se lipida durante el procesamiento, y el péptido señal de lipídación se elimina por escisión. Por lo tanto, el péptido señal ya no está presente en la proteína lipidada madura.

Las proteínas lipidadas de acuerdo con la presente invención se marcan con "Lip" en el extremo N para indicar la adición de 3 grupos ácidos grasos y un glicerol al polipéptido (véase la Fig. 4). Las señales de lipídación adecuadas, como se han descrito anteriormente, incluyen MKKYLLGIGLILALIA (SEQ ID NO: 14), MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 15) y MKATKLVLGAVILGSTLLAG (SEQ ID NO: 16). Dado que los restos lipídicos y un glicerol están unidos al residuo de cisteína N-terminal, que está presente en la proteína OspA de tipo salvaje de longitud completa, los fragmentos C-terminal de OspA para la lipídación pueden comprender adicionalmente un péptido que comprende un residuo de cisteína seguido de aminoácidos adicionales, mencionados en el presente documento como "péptido de lipídación" o "LP" (véanse las Figs. 1 y 2). Por ejemplo, las secuencias tales como CSS o CKQN (SEQ ID NO: 211) inmediatamente C-terminales con respecto a la secuencia señal de lipídación proporcionan un residuo de cisteína N-terminal para la lipídación, después de la escisión del péptido señal de lipídación. Los péptidos lipidados que contienen cisteína están presentes en el polipéptido lipidado final de la invención.

Se ha encontrado con la proteína OspA de *B. burgdorferi* s.s. comprende una secuencia con la capacidad de unirse a un receptor de linfocitos T que también tiene la capacidad de unirse a un antígeno humano asociado a función leucocitaria (hLFA-1) (mencionada en el presente documento como "secuencia de tipo hLFA-1"). La similitud de esta región de OspA con hLFA-1 puede dar como resultado una respuesta inmunitaria con reactividad cruzada después de la administración de OspA de *B. burgdorferi* s.s. a un sujeto humano y puede inducir enfermedades autoinmunitarias, particularmente artritis autoinmune, en sujetos susceptibles. Por consiguiente, en una realización preferida, el polipéptido de la presente invención no comprende una secuencia con capacidad de unión al receptor de linfocitos T que tiene una capacidad de unión al antígeno humano asociado con la función leucocitaria (hLFA-1) y, particularmente, no comprende la secuencia de aminoácidos GYVLEGLTAE (SEQ ID NO: 17). Para este fin, la secuencia de tipo hLFA-1, particularmente la secuencia de aminoácidos GYVLEGLTAE (SEQ ID NO: 17), puede reemplazarse con una secuencia homóloga de una proteína OspA de otra *Borrelia* sp., particularmente con NFTLEGLKVAND (SEQ ID NO: 18).

El polipéptido que comprende al menos un enlace disulfuro establece esencialmente la misma capacidad protectora con dicho polipéptido contra una infección por *Borrelia* en relación con al menos una de las proteínas OspA de longitud completa de tipo salvaje derivadas de al menos una cepa de *Borrelia*, particularmente *B. afzelii* K78, OspA de serotipo 2 (SEQ ID NO: 19); *B. burgdorferi* s.s., particularmente la cepa B31, serotipo 1 (SEQ ID NO: 20); *B. garinii*, particularmente la cepa PBr, serotipo 3 (SEQ ID NO: 21); *B. bavar iensis*, particularmente la cepa PBI, serotipo 4 (SEQ ID NO: 22); *B. garinii*, particularmente la cepa PHei, serotipo 5 (SEQ ID NO: 23); *B. garinii*, particularmente la cepa DK29, serotipo 6 (SEQ ID NO: 24), o *B. garinii*, particularmente la cepa T25, serotipo 7 (SEQ ID NO: 25).

Para proporcionar protección cruzada contra diferentes de especies de *Borrelia* o serotipos de OspA, es deseable el desarrollo de una vacuna multivalente. Como se ha detallado anteriormente, el polipéptido del primer aspecto comprende al menos dos fragmentos mutantes de dos serotipos de *Borrelia* diferentes, como se ha definido anteriormente. También se divulgan polipéptidos que comprenden al menos dos fragmentos mutantes de OspA que se seleccionan del grupo que consiste en

- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 2;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 3;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 4;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 5;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 6;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 7;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 8;
- fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 y fragmento con enlace disulfuro de tipo 9;



particularmente en donde

- 5 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 10 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 15 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 20 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 4 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 25 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 5 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 30 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 35 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 7 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 40 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 8 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 45 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 9 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 50 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 10 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11, en donde las cisteínas no se reemplazan;
- 55 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 11 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12, en donde las cisteínas no se reemplazan; y/o
- 50 - el fragmento con enlace disulfuro de tipo 12 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, más preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13, en donde las cisteínas no se reemplazan.

Cabe destacar que se han proporcionado anteriormente detalles adicionales sobre mutaciones e identidad de secuencia.

55

**Tabla A-5.** Nomenclatura y SEQ ID NOs. de heterodímeros de fragmentos mutantes de OspA, no lipidados y lipidados, descritos en la presente invención.

Heterodímero de fragmento mutante de OspA*	SEQ ID NO:	Heterodímero de fragmento mutante de OspA lipidado*	SEQ ID NO:
S1D4-S2D4	43	Lip-S1D4-S2D4	185
S1D1-S2D1	47	Lip-S1D1-S2D1	186
S3D4-S4D4	51	Lip-S3D4-S4D4	187
S3D1-S4D1	55	Lip-S3D1-S4D1	188
S5D4-S6D4	59	Lip-S5D4-S6D4	189
S5D1-S6D1	63	Lip-S5D1-S6D1	190
S2D4-S1D4	67	Lip-S2D4-S1D4	191
S2D1-S1D1	71	Lip-S2D1-S1D1	192
S4D4-S3D4	75	Lip-S4D4-S3D4	193
S4D1-S3D1	79	Lip-S4D1-S3D1	194
S6D4-S5D4	83	Lip-S6D4-S5D4	195
S6D1-S5D1	87	Lip-S6D1-S5D1	196
S1D4-S2D1	91	Lip-S1D4-S2D1	197
S1D1-S2D4	95	Lip-S1D1-S2D4	198
S3D4-S4D1	99	Lip-S3D4-S4D1	199
S3D1-S4D4	103	Lip-S3D1-S4D4	200
S5D4-S6D1	107	Lip-S5D4-S6D1	201
S5D1-S6D4	111	Lip-S5D1-S6D4	202
S2D4-S1D1	115	Lip-S2D4-S1D1	203
S2D1-S1D4	119	Lip-S2D1-S1D4	204
S4D4-S3D1	123	Lip-S4D4-S3D1	205
S4D1-S3D4	127	Lip-S4D1-S3D4	206
S6D4-S5D1	131	Lip-S6D4-S5D1	207
S6D1-S5D4	135	Lip-S6D1-S5D4	208

\*S = Serotipo (1-6) (véanse la Tabla A-2); D = Tipo de enlace disulfuro (véase la Tabla A-4); Lip = lipidados: la adición N-terminal de glicerol y residuos de ácidos grasos.

El polipéptido de acuerdo con el primer aspecto puede comprender al menos dos o tres fragmentos mutantes que están conectados a través de uno o más enlazadores. Un enlazador es una secuencia de aminoácidos bastante corta empleada para conectar dos fragmentos. Debería ser diseñada para evitar cualquier impacto negativo en los fragmentos, su interacción en los sujetos a tratar o vacunar, o sobre su capacidad protectora. Se prefieren los enlazadores cortos de como máximo 21 aminoácidos, particularmente como máximo 15 aminoácidos, especialmente como máximo 12 u 8 aminoácidos. Más preferiblemente, el uno o más enlazadores están compuestos por aminoácidos pequeños para reducir o minimizar las interacciones con los fragmentos, tales como glicina, serina y alanina. Los ejemplos de enlazadores preferidos incluyen enlazadores que comprenden o que consiste en poliG, tales como (G)<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 36) (G)<sub>12</sub> (SEQ ID NO: 37), GAGA (SEQ ID NO: 38), (GAGA)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39), (GAGA)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40), (GGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 41), o (GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 42). Un enlazador más preferido es el enlazador peptídico "LN1", una fusión de dos regiones de bucle separadas de la mitad N-terminal de OspA de *B. burgdorferi* s.s., cepa B31 (aa 65-74 y aa 42-53, con un intercambio de aminoácidos en la posición 53 de D53S) que tiene la siguiente secuencia: GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS (SEQ ID NO: 184).

En otra realización preferida, el polipéptido de acuerdo con el primer aspecto comprende un polipéptido con un tamaño total de un máximo de 500 aminoácidos, que comprende dos o tres diferentes fragmentos mutantes, como se define en el primer aspecto; o un polipéptido que consiste esencialmente en dos o tres fragmentos mutantes diferentes, uno o dos enlazadores y, opcionalmente, una cisteína N-terminal; y/o un polipéptido que consiste esencialmente en dos o tres fragmentos mutantes diferentes, una extensión N-terminal del fragmento consiste en un máximo de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos, preferiblemente un máximo de 10, 9, 8, 7 o 6 aminoácidos, todavía más preferiblemente un máximo de 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos, en donde la extensión N-terminal está ubicada directamente junto al extremo N a partir del fragmento en la OspA de *Borrelia* respectiva y, opcionalmente, una cisteína N-terminal. La cisteína N-terminal puede ir seguida opcionalmente de un enlazador peptídico corto de 1-10 aminoácidos de longitud, y preferiblemente adopta la forma de un péptido CSS N-terminal o un péptido CKQN (SEQ ID NO: 211).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con el primer aspecto.

La invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Para los fines de la invención, el término "ácido(s) nucleico(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o

polidesoxirribonucleótido, que puede ser un ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado, incluidas las regiones/formas monocatenarias y bicatenarias.

El término "ácido nucleico que codifica un polipéptido", como se usa en el presente documento, comprende 5 polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un péptido o polipéptido de la invención. El término también incluye polinucleótidos que incluyen una región continua individual o regiones discontinuas que codifican el péptido o polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos mediante fagos integrados, una secuencia de inserción integrada, una secuencia integrada de vector, una secuencia integrada de transposones, o debido a la edición de ARN o reorganización de ADN genómico) junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias 10 codificantes y/o no codificantes.

Los expertos en la técnica apreciarán, como resultado de la degeneración del código genético, que hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de 15 estos polinucleótidos poseen una similitud mínima a la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural (es decir, de origen natural). No obstante, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente por la presente invención, por ejemplo, los polinucleótidos que están optimizados para la selección de codones humanos y/o de primate y/o de *E. coli*.

Las secuencias que codifican un polipéptido deseado pueden sintetizarse, en su totalidad o en parte, usando 20 métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M. H. et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. págs. 215-223 (1980), Horn et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. págs. 225-232 (1980)). Como alternativa, la propia proteína puede producirse usando métodos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o una porción de la misma. Por ejemplo, la síntesis peptídica puede realizarse usando diversas técnicas de fase sólida (Roberge et al., Science 269:202-204 (1995)) y la síntesis automática se puede lograr, por ejemplo, usando el 25 sintetizador de péptidos ASI 431 A (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

Además, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención se pueden modificar genéticamente usando métodos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias que codifican polipéptidos con una 30 diversidad de razones, incluyendo, pero sin limitación, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto genético. Por ejemplo, se puede utilizar la transposición de ADN mediante fragmentación aleatoria, y reagrupación por PCR de fragmentos genéticos y oligonucleótidos sintéticos para modificar genéticamente las secuencias de nucleótidos. Además, puede utilizarse mutagénesis dirigida al sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glucosilación, cambiar la preferencia de codones, producir 35 variantes de corte y empalme, o introducir mutaciones, etc.

En un aspecto adicional de la invención, la presente invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención unido a un promotor inducible, de manera que cuando el promotor es inducido, se expresa un polipéptido codificado por el ácido nucleico. En una realización preferida, el vector es pET28b(+).

40 Un aspecto adicional de la invención comprende dicho vector, en el que el promotor inducible se activa mediante la adición de una cantidad suficiente de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) preferiblemente al medio de cultivo. Opcionalmente, éste está a una concentración de entre 0,1 y 10 mM, 0,1 y 5 mM, 0,1 y 2,5 mM, 0,2 y 10 mM, 0,2 y 5 mM, 0,2 y 2,5 mM, 0,4 y 10 mM, 1 y 10 mM, 1 y 5 mM, 2,5 y 10 mM, 2,5 y 5 mM, 5 y 10 mM. Como alternativa, el promotor puede ser inducido mediante un cambio en la temperatura o el pH.

45 La molécula de ácido nucleico, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier molécula de ácido ribonucleico o molécula de ácido desoxirribonucleico, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por lo tanto, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico, como se usa en el presente documento, se refiere a al menos ADN monocatenario o bicatenario, moléculas híbridas que comprenden ADN y 50 ARN que pueden ser de monocatenario, o más comúnmente, bicatenario, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Como se usa en el presente documento, el término molécula de ácido nucleico incluye moléculas de ADN o ARN, como se ha descrito anteriormente, que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, las moléculas de ADN o ARN con esqueletos modificados para la estabilidad o por otros motivos son "moléculas de ácido nucleico", con el significado previsto para este término en el presente documento. Además, las especies de 55 ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tal como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solamente dos ejemplos, también son moléculas de ácido nucleico, como se define en el presente documento. Se apreciará que se ha realizado una gran diversidad de modificaciones a las moléculas de ADN y ARN que tienen varios fines útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término molécula de ácido nucleico, como se usa en el presente documento, comprende dichas formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de

moléculas de ácido nucleico, así como formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células simples y complejas, entre otras. El término ácido nucleico también incluye moléculas de ácido nucleico cortas a menudo mencionadas como oligonucleótidos. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se usan en el presente documento de manera intercambiable.

5

Los ácidos nucleicos, de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse químicamente. Como alternativa, los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de *Borrelia* y modificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Lo mismo se aplica a los polipéptidos de acuerdo con la presente invención.

10 Además, el ácido nucleico de la presente invención puede unirse de manera funcional utilizando técnicas estándar, tales como clonación, a cualquier secuencia deseada, ya sea una secuencia reguladora de *Borrelia* o una secuencia reguladora heteróloga, secuencia líder heteróloga, secuencia marcadora heteróloga, o una secuencia codificante heteróloga para crear un gen de fusión.

15 Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido por medio de técnicas de síntesis química o mediante una combinación de las mismas. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la cadena codificante, también conocida como cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, también mencionada como cadena antisentido.

20

El ácido nucleico de la presente invención puede estar compuesto por un vector o en una célula. El vector puede comprender el ácido nucleico mencionado anteriormente de tal manera que el vector sea replicable y pueda expresar la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos en una célula huésped.

25 Para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención, las células huésped pueden modificarse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o ácido nucleico de la invención. La introducción de un ácido nucleico en la célula huésped puede realizarse mediante los métodos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tal como Davis, et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tal como, transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, conjugación, transducción, carga de raspado, introducción balística e infección.

35 Los ejemplos representativos de huéspedes adecuados incluyen células bacterianas gram negativas, tales como células de *E. coli*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Franciscella*, *Helicobacter*, *hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*. En una realización, la célula huésped es una célula de *Escherichia coli*. En una realización preferida, la célula huésped es una célula de *E. coli* BL21 (DE3) o una célula de *E. coli* BL21 Star™ (DE3).

40

Como alternativa, pueden también usarse células bacterianas gram positivas. Puede usarse una gran diversidad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. En una realización, el vector se deriva de plásmidos bacterianos. Generalmente, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un huésped pueden usarse para la expresión en este sentido. La secuencia de ADN adecuada puede insertarse en un sistema de expresión mediante cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, las expuestas en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (anteriormente).

45

50 En una realización de la presente invención, las células se cultivan a presión selectiva, tal como en presencia de antibióticos, preferiblemente kanamicina. En otra realización, las células se cultivan en ausencia de antibióticos.

Puede usarse una gran diversidad de vectores de expresión para expresar los polipéptidos de acuerdo con la presente invención. Generalmente, cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar ácidos nucleicos para expresar un polipéptido en un huésped puede usarse para la expresión en este sentido. De acuerdo con este aspecto de la invención, el vector puede ser, por ejemplo, un vector de plásmido, un vector de fagos monocatenario o bicatenario, o un vector viral de ADN o ARN monocatenario o bicatenario. Los plásmidos de partida divulgados en el presente documento están disponibles comercialmente, disponibles públicamente o pueden ser construidos a partir de plásmidos disponibles mediante la aplicación de rutina de procedimientos publicados bien conocidos. Entre los vectores preferidos, en determinados aspectos, están aquellos para la expresión de moléculas de ácido nucleico

55

y los polipéptidos de acuerdo con la presente invención. Pueden usarse construcciones de ácido nucleico en células huésped de una manera convencional para producir el producto genético codificado por la secuencia recombinante. Como alternativa, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden producirse sintéticamente mediante sintetizadores de péptidos convencionales.

5

Además, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende este vector. Los ejemplos representativos de células huésped adecuadas incluyen bacterias, tales como estreptococos y estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; hongos, tales como levadura y *Aspergillus*; células de insectos, tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de mamífero, tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 o

10

células de melanoma de Bowes; y células vegetales. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir dichas proteínas usando ARN derivado de la construcción de ADN de la presente invención.

Para poder expresar la secuencia de aminoácidos deseada de manera práctica mediante la introducción del vector de acuerdo con la presente invención en una célula huésped, el vector puede contener, además de la secuencia de

15

ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, otras secuencias para controlar la expresión (por ejemplo, secuencias promotoras, secuencias de terminación y secuencias potenciadoras) y marcadores genéticos para seleccionar microorganismos, células de insecto, células de cultivo animales, o similares (por ejemplo, genes de resistencia a la neomicina y genes de resistencia a la kanamicina). Además, el vector puede contener la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en una forma repetida (por ejemplo, en tándem). El vector

20

puede construirse basándose en procedimientos y maneras que se usan convencionalmente en el campo de la ingeniería genética.

Las células huésped pueden cultivarse en un medio adecuado, y la proteína de acuerdo con la presente invención puede obtenerse a partir del producto de cultivo. La proteína de acuerdo con la presente invención puede

25

recuperarse del medio de cultivo y purificarse de la manera convencional.

El problema que subyacente de la presente invención se resuelve adicionalmente mediante un método para producir un polipéptido, como se ha definido anteriormente, caracterizado por las siguientes etapas:

30

- a) introducir un vector que codifica el polipéptido en una célula huésped,
- b) cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido,
- c) homogeneizar dicha célula huésped, y
- d) someter el homogenado de la célula huésped a etapas de purificación.

35

Como alternativa, el polipéptido como se ha definido anteriormente, puede producirse por un método caracterizado por las siguientes etapas:

40

- a) introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en un vector,
- b) introducir dicho vector en una célula huésped,
- c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la expresión de polipéptidos,
- d) homogeneizar dicha célula huésped,
- e) enriquecer el polipéptido en la fase lipídica mediante separación de fases, y
- f) purificar adicionalmente sobre una columna de filtración en gel.

45

También se divulga un método para producir un polipéptido como se ha definido anteriormente, caracterizado por las siguientes etapas:

50

- a) introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en un vector,
- b) introducir dicho vector en una célula huésped,
- c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la expresión de polipéptidos,
- d) homogeneizar dicha célula huésped,
- e) enriquecer el polipéptido en la fase lipídica mediante separación de fases,
- g) purificar sobre una columna de filtración en gel, y
- h) opcionalmente, procesar adicionalmente sobre una columna de intercambio de tampón.

55

Se divulga en el presente documento un anticuerpo, o al menos una parte eficaz del mismo, que se une específicamente a al menos una parte selectiva de un polipéptido, como se ha definido anteriormente.

El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

La parte eficaz comprende un fragmento Fab, un fragmento F(ab), un fragmento F(ab)N, un fragmento F(ab)<sub>2</sub> o un fragmento F<sub>v</sub>.

5 El anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

El anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

10 Los anticuerpos pueden unirse específicamente a la porción de fragmento mutante de OspA de los polipéptidos de la invención, pero no a los polipéptidos de fragmento de OspA de tipo salvaje correspondientes. El anticuerpo puede unirse específicamente al enlace disulfuro del fragmento mutante de OspA.

15 El término "especificidad" se refiere a la cantidad de tipos diferentes de antígenos o determinantes antigénicos a los cuales se puede unir una molécula particular de unión a antígenos o molécula de proteína de unión a antígenos (tal como un Nanocuerpo o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión al antígeno ( $K_D$ ), es una medida para la potencia de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al antígeno en la proteína de unión a antígenos: cuanto menor sea el valor de  $K_D$ , más potente será la potencia de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (como alternativa, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad ( $K_A$ ), que es  $1/K_D$ ).

20 Como será evidente para un experto (por ejemplo, en base a la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad puede determinarse de una manera conocida *per se*, dependiendo del antígeno específico de interés. La avidéz es la medida de la potencia de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un anticuerpo o una parte eficaz del mismo de la invención) y un antígeno pertinente. La avidéz se relaciona tanto con la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión al antígeno en la molécula de unión a antígeno y la cantidad de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión a antígeno. Típicamente, las proteínas de unión a antígeno (tal como un anticuerpo o una parte eficaz del mismo de la invención) se unirán a su antígeno con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos, y preferiblemente  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos, y más preferiblemente  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (es decir, con una constante de asociación ( $K_A$ ) de  $10^5$  a  $10^{12}$  litros/moles o más, y preferiblemente  $10^7$  a  $10^{12}$  litros/moles o más y más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{12}$  litros/moles). Cualquier valor de  $K_D$  mayor de  $10^4$  moles/litro (o cualquier valor de  $K_A$  menor de  $10^4$  M<sup>-1</sup>) litros/moles se considera generalmente como indicación de unión no específica. Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tal como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos de enzimas (EIA) y ensayos de competición tipo sándwich, y las variantes diferentes de los mismos conocidas en la técnica, así como las demás técnicas mencionadas en el presente documento.

40 La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, como será evidente para un experto en la técnica. Los métodos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, las técnicas mencionadas en el presente documento. A este respecto, será también evidente que puede no ser posible medir las constantes de disociación de más de  $10^{-4}$  moles/litro o  $10^{-3}$  moles/litro (por ejemplo, de  $10^{-2}$  moles/litro). Opcionalmente, será evidente también para el experto en la técnica que la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse en base a la constante de asociación (real o aparente) ( $K_A$ ), por medio de la relación [ $K_D = 1/K_A$ ].

50 La afinidad representa la potencia o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se proporciona comúnmente por la  $K_D$ , o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación,  $K_A$ , que equivale a  $1/K_D$  y tiene unidades de (mol/litro)<sup>-1</sup> (o M<sup>-1</sup>). En la presente memoria descriptiva, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas (tales como una secuencia de aminoácidos, Nanocuerpo o polipéptido de la invención y su diana pretendida) se expresará principalmente en términos del valor de  $K_D$  de su interacción; será evidente para el experto en la técnica que, a la vista de la relación  $K_A = 1/K_D$ , especificar la potencia de la interacción molecular mediante su valor de  $K_D$  también puede usarse para calcular el valor de  $K_A$  correspondiente. El valor de  $K_D$  también caracteriza la potencia de una interacción molecular en un sentido termodinámico, ya que se relaciona con la energía libre ( $\Delta G$ ) de unión mediante la relación ya conocida  $\Delta G = RT \cdot \ln(K_D)$  (de manera equivalente  $\Delta G = -RT \cdot \ln(K_A)$ ), donde R equivale a la constante de gas, T equivale a la temperatura absoluta, y ln representa el logaritmo natural.

Las  $K_D$  para interacciones biológicas que se consideran significativas (por ejemplo, específicas) están típicamente en el intervalo de  $10^{-10}$  M (0,1 nM) a  $10^{-5}$  M (10000 nM). Cuando mayor sea la interacción, menor será su  $K_D$ .

- 5 La  $K_D$  del anticuerpo puede estar entre  $10^{-12}$  M y  $10^{-5}$  M, preferiblemente es menor de  $10^{-6}$ , preferiblemente menor de  $10^{-7}$ , preferiblemente menor de  $10^{-8}$  M, preferiblemente menor de  $10^{-9}$  M, más preferiblemente menor de  $10^{-10}$  M, incluso más preferiblemente menor de  $10^{-11}$  M, mucho más preferiblemente menor de  $10^{-12}$  M.

- 10 La  $K_D$  también puede expresarse como la relación de la constante de la tasa de disociación de un complejo, representada como  $k_{off}$ , con respecto a la tasa de su asociación, representada  $k_{on}$  (de manera que  $K_D = k_{off}/k_{on}$  y  $K_A = k_{on}/k_{off}$ ). La tasa de disociación  $k_{off}$  tiene las unidades  $s^{-1}$  (donde s es la notación para la unidad internacional de segundo). La tasa de asociación  $k_{on}$  tiene las unidades  $M^{-1} s^{-1}$ . La tasa de asociación puede variar entre  $10^2 M^{-1} s^{-1}$  a aproximadamente  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , que se acerca a la constante de tasa de asociación limitada por difusión para interacciones moleculares. La tasa de disociación se refiere a la semivida de una interacción molecular dada  
15 mediante la relación  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$ . La tasa de disociación puede variar entre  $10^{-6} s^{-1}$  (complejo casi irreversible con una  $t_{1/2}$  de múltiples días) a  $1 s^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0,69$  s).

- 20 La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse mediante diferentes técnicas conocidas *per se*, tal como la técnica de biosensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) ya conocida (véase, por ejemplo, Ober et al., Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001) donde una molécula se inmoviliza en el chip del biosensor y la otra molécula se pasa sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo, lo que produce mediciones de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y, por lo tanto, valores de  $K_D$  (o  $K_A$ ). Esto puede realizarse, por ejemplo, usando los instrumentos BIACORE ya conocidos.

- 25 También será evidente para el experto en la técnica que la  $K_D$  medida puede corresponder a la  $K_D$  aparente si el proceso de medición de alguna manera influye en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo, mediante artefactos relacionados con el recubrimiento en el biosensor de una molécula. También puede medirse una  $K_D$  aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En dicha situación, la afinidad medida puede verse afectada por la avidéz de la interacción por las dos moléculas.

- 30 Otro enfoque que puede usarse para evaluar la afinidad es un procedimiento de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) de 2 etapas de Friguet et al. (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985). Este método establece una medición de equilibrio de unión de fase en solución y evita los posibles artefactos relacionados con la adsorción de una de las moléculas en un soporte, tal como plástico.

- 35 Sin embargo, la medición precisa de la  $K_D$  puede requerir mucho trabajo; por lo tanto, los valores de  $K_D$  aparente a menudo se determinan para evaluar la potencia de unión de dos moléculas. Cabe destacar que siempre que las mediciones se realicen de una manera consistente (por ejemplo, al mantener las condiciones de ensayo inalteradas), las mediciones de  $K_D$  aparente pueden usarse como una aproximación de la  $K_D$  verdadera y, por lo tanto, en el presente documento  $K_D$  y  $K_D$  aparente deberían tratarse como de igual importancia o relevancia.

- 40 Finalmente, cabe destacar que en muchas situaciones el científico experimentado puede considerar conveniente la determinación de la afinidad de unión en relación con alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la potencia de unión entre moléculas A y B, se puede usar, por ejemplo, una molécula de referencia C que se sabe que se une a B y que está marcada de manera adecuada con un grupo fluoróforo o cromóforo u otro resto químico, tal como biotina para la fácil detección por medio de ELISA o citometría de flujo u otro formato (el fluoróforo para la detección por fluorescencia, el cromóforo para la detección de absorción de luz, la biotina para la detección por ELISA mediada por estreptavidina). Típicamente, la molécula de referencia C se mantiene a una concentración fija y la concentración de A varía para una concentración o cantidad de B dada. Como resultado, se obtiene un valor de  
50 concentración inhibitoria  $(IC)_{50}$  correspondiente a la concentración de A a la que la señal medida para C en ausencia de A disminuye a la mitad. Siempre que se conozca  $K_{D, ref}$ , la  $K_D$  de la molécula de referencia, así como la concentración total  $C_{ref}$  de la molécula de referencia, la  $K_D$  aparente para la interacción A-B puede obtenerse a partir de la siguiente fórmula:  $K_D = IC_{50}/(1 + C_{ref}/K_{D, ref})$ . Ha de apreciarse que si  $C_{ref} \ll K_{D, ref}$ ,  $K_D \approx IC_{50}$ . Siempre que la medición de la  $IC_{50}$  se realice de una manera consistente (por ejemplo, manteniendo la  $C_{ref}$  fija) para los aglutinantes  
55 que se están comparando, la potencia o estabilidad de una interacción molecular puede evaluarse mediante la  $IC_{50}$  y esta medición se considera como equivalente a la  $K_D$  o a la  $K_D$  aparente a lo largo de este texto.

También se describe una línea celular de hibridoma, que produce un anticuerpo como se ha definido anteriormente.

El anticuerpo como se ha definido anteriormente, puede producirse por un método caracterizado por las siguientes etapas:

- 5 a) iniciar una respuesta inmune en un animal no humano mediante la administración de un polipéptido, como se ha definido anteriormente, a dicho animal,  
 b) extraer fluido corporal que contiene anticuerpo de dicho animal, y  
 c) producir el anticuerpo sometiendo dicho fluido corporal que contiene anticuerpo a etapas posteriores de purificación

10 o mediante las siguientes etapas:

- 15 a) iniciar una respuesta inmune en un animal no humano mediante la administración de un polipéptido, como se ha definido anteriormente, a dicho animal,  
 b) extraer el bazo o células esplénicas de dicho animal,  
 c) producir células de hibridoma de dicho bazo o células esplénicas,  
 d) seleccionar y clonar células de hibridoma específicas para dicho polipéptido,  
 e) producir el anticuerpo mediante cultivo de dichas células de hibridoma clonadas, y  
 f) opcionalmente realizar etapas adicionales de purificación.

20 También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, como se ha definido anteriormente.

La descripción divulga un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se ha definido anteriormente, para el tratamiento o prevención de una infección con 25 especies de *Borrelia*, más preferiblemente especies patógenas de *Borrelia* como se divulga en el presente documento, que comprenden, más preferiblemente, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* y *B. garinii*.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve en otro aspecto mediante el uso de un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o 30 prevención de infecciones con especies de *Borrelia*, más preferiblemente especies patógenas de *Borrelia* como se divulga en el presente documento, que comprenden, más preferiblemente, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* y *B. garinii*.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido 35 de acuerdo con el primer aspecto y/o el ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto. La composición farmacéutica puede contener, opcionalmente, cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tales como sustancias tamponantes, estabilizadores u otros principios activos, especialmente ingredientes conocidos relacionados con la producción de vacunas y/o composiciones farmacéuticas. Preferiblemente, la composición farmacéutica se utiliza como un medicamento, particularmente como una vacuna o para la prevención o tratamiento 40 de una infección causada por especies de *Borrelia*, más preferiblemente especies patógenas de *Borrelia* como se divulga en el presente documento, que comprenden, más preferiblemente, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* y *B. garinii*, y/u otros patógenos contra los cuales se han incluido los antígenos en la vacuna.

En una realización, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante. La elección de un 45 adyuvante adecuado a mezclar con toxinas bacterianas o conjugados realizados usando los procesos de la invención se encuentra en el conocimiento del experto en la técnica. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también pueden ser otras sales metálicas tales como las de calcio, magnesio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos derivados de manera aniónica o catiónica, o polifosfacenos. En una realización preferida, la 50 composición farmacéutica se forma como adyuvante con hidróxido de aluminio.

En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende además una sustancia inmunoestimulante, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en polímeros policatiónicos, especialmente péptidos policatiónicos, oligodesoxinucleótidos inmunoestimulantes (ODN), especialmente oligo(dIdC)<sub>13</sub> (SEQ ID NO: 32), 55 péptidos que contienen al menos dos motivos LysLeuLys, especialmente el péptido KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 33), compuestos neuroactivos, especialmente la hormona de crecimiento humana, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, adyuvante completo o incompleto de Freund, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la sustancia inmunoestimulante es una combinación de un polímero policatiónico y desoxinucleótidos inmunoestimulantes o de un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys y desoxinucleótidos

inmunoestimulantes, preferiblemente una combinación de KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 33) y oligo(dIdC)<sub>13</sub> (SEQ ID NO: 32). Más preferiblemente, dicho péptido policatiónico es poliarginina.

5 En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende fosfato de sodio, cloruro de sodio, L-metionina, sacarosa y Tween-20 a un pH de 6,7 +/- 0,2. Preferiblemente, la composición farmacéutica también comprende hidróxido de aluminio, preferiblemente en una concentración del 0,15 %.

10 En una realización, la formulación comprende fosfato de sodio entre 5 mM y 50 mM, cloruro de sodio entre 100 y 200 mM, L-metionina entre 5 mM y 25 mM, sacarosa entre el 2,5 % y el 10 %, Tween 20 entre el 0,01 % y el 0,1 % e hidróxido de aluminio entre el 0,1 % y el 0,2 % (p/v). Más preferiblemente, la formulación comprende fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, L-metionina 10 mM, sacarosa al 5 %, Tween 20 al 0,05 % e hidróxido de aluminio al 0,15 % (p/v) a pH 6,7 ± 0,2. Aun más preferiblemente, la formulación comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres heterodímeros mutantes de OspA (uno de los cuales es el polipéptido de acuerdo con la invención).

15 En una realización, la composición farmacéutica comprende 3 heterodímeros (uno de los cuales es el polipéptido de la invención), preferiblemente Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 186), Lip-S4D1-S3D1 (SEQ ID NO: 194) y Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 190). Preferiblemente, los tres heterodímeros se mezclan en una relación molar de 1:2:1, 1:3:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:2:2, 1:2:3, 1:3:2, 1:3:3, 2:1:1, 2:1:2, 2:1:3, 2:2:3, 2:2:1, 2:3:1, 2:3:2, 2:3:3, 3:1:1, 3:1:2, 3:1:3, 3:2:1, 3:2:2, 3:2:3, 3:3:1, 3:3:2, mucho más preferiblemente 1:1:1.

20 En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende dos heterodímeros (uno de los cuales es el polipéptido de la invención), preferiblemente Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 186) y Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 190), Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 186) y Lip-S4D1-S3D1 (SEQ ID NO: 194) o Lip-S4D1-S3D1 (SEQ ID NO: 194) y Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 190) en una relación molar de 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 2:3, 3:2, preferiblemente 1:1.

25 En una realización, la composición farmacéutica o vacuna de la invención comprende además al menos un antígeno adicional (mencionado en el presente documento de manera genérica como "vacuna de combinación"). En una realización preferida, el al menos un antígeno adicional se deriva de una especie de *Borrelia* causando borreliosis de Lyme. En diversos aspectos, el al menos un antígeno adicional se deriva de otro patógeno, preferiblemente un patógeno transmitido por garrapatas. En un aspecto adicional, el patógeno causa la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, ehrlichiosis granulocítica humana (HGE), fiebre sennetsu, ehrlichiosis monocítica humana (HME), anaplasmosis, fiebre botonosa, *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, erupción asociada a garrapatas del sur (STARI), fiebre manchada por *Rickettsia*, rickettsiosis 364D, fiebre manchada africana, fiebre reincidente, tularemia, fiebre de Colorado por garrapatas, encefalitis transmitida por garrapatas (TBE, también conocida como FSME),  
30 fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre Q, fiebre hemorrágica de Omsk, enfermedad de la selva de Kyasanur, encefalitis de Powassan, enfermedad del virus Heartland o babesiosis. En un aspecto adicional, la enfermedad es encefalitis japonesa.

40 En una realización adicional, el al menos un antígeno adicional se deriva de un patógeno transmitido por vector, preferiblemente transmitido por garrapatas, seleccionado del grupo que comprende *Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia turicatae*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Coxiella burnetii* y *Borrelia lonestari*, virus de encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV, también conocida como virus FSME), virus de la fiebre de Colorado transmitida por garrapatas (CTFV), virus de la fiebre hemorrágica de  
45 Crimea-Congo (CCHFV), virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV), virus de la encefalitis japonesa (JEV) y *Babesia* spp.

50 En otro aspecto, una vacuna de combinación de la invención comprende cualquier composición de vacuna analizada en el presente documento en combinación con al menos una segunda composición de vacuna. En algunos aspectos, la segunda composición de vacuna protege contra una enfermedad transmitida por vector, preferiblemente una enfermedad transmitida por garrapatas. En diversos aspectos, la segunda composición de vacuna tiene un programa de inmunización por estaciones compatible con la inmunización contra la infección por *Borrelia* o borreliosis de Lyme. En otros aspectos, las vacunas de combinación son útiles en la prevención de múltiples enfermedades para su uso en ubicaciones geográficas donde son prevalentes estas enfermedades.

55 En un aspecto, la segunda composición de vacuna es una vacuna seleccionada del grupo que consiste en una vacuna contra la encefalitis transmitida por garrapatas, una vacuna contra la encefalitis japonesa y una vacuna contra la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. En un aspecto preferido, la composición de vacuna es FSME-IMMUN® (Baxter), Encepur® (Novartis Vaccines), EnceVir® (Microgen NPO) o TBE Moscow Vaccine® (Chumakov

Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences). En otro aspecto preferido, la composición de vacuna es IXIARO®/JESPECT® (Valneva SE), JEEV® (Biological E, Ltd.) o IMOJEV® (Sanofi Pasteur).

- 5 Se proporciona adicionalmente una vacuna que comprende la composición farmacéutica, esta vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, el excipiente es L-metionina.

- 10 La invención también incluye composiciones inmunogénicas. En algunos aspectos, una composición inmunogénica de la invención comprende cualquiera de las composiciones analizadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En diversos aspectos, la composición inmunogénica tiene la propiedad de inducir la producción de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína A de la superficie externa (OspA). En ciertos aspectos, la composición inmunogénica tiene la propiedad de inducir la producción de un anticuerpo que se une específicamente a *Borrelia*. En aspectos particulares, la composición inmunogénica tiene la propiedad de inducir  
15 la producción de un anticuerpo que neutraliza a *Borrelia*. En algunos aspectos, el anticuerpo es producido por un animal. En aspectos adicionales, el animal es un mamífero. Incluso en aspectos adicionales, el mamífero es un ser humano.

- 20 Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse para proteger a un mamífero susceptible a infección por *Borrelia* o tratar a un mamífero con infección por *Borrelia*, mediante la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o una mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración a través de mucosas al tracto oral/alimenticio, respiratorio o genitourinario. Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una única dosis, los componentes de la misma pueden  
25 coadministrarse también en conjunto al mismo tiempo o en diferentes momentos.

- Se proporciona un kit de vacunación que comprende un vial que contiene una composición farmacéutica de la invención, opcionalmente de forma liofilizada, y que comprende además un vial que contiene un adyuvante como se describe en el presente documento. Se prevé que en este aspecto de la invención el adyuvante se usará para  
30 reconstruir la composición inmunogénica liofilizada. En un aspecto adicional, la composición farmacéutica de la invención puede premezclarse en un vial, preferiblemente en una jeringa.

- La descripción proporciona un método para la prevención o tratamiento de la infección por *Borrelia* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición farmacéutica, vacuna o kit de la invención. Se  
35 proporciona un método para la prevención o tratamiento de episodios primarios y/o recurrentes de la infección por *Borrelia* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición farmacéutica, vacuna o kit de la invención.

- Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento  
40 o prevención de la enfermedad de *Borrelia*. En una realización se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por *Borrelia*.

- También se describe el uso de la composición farmacéutica, vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección por *Borrelia*. En una realización se proporciona una  
45 composición farmacéutica de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección por *Borrelia*.

- La descripción proporciona métodos para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto. En diversos aspectos, dichos métodos comprenden la etapa de administrar cualquiera de las composiciones inmunogénicas o  
50 composiciones de vacuna analizadas en el presente documento al sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunológica. En ciertos aspectos, la respuesta inmunológica comprende la producción de un anticuerpo anti-OspA.

- La descripción proporciona métodos para la prevención o tratamiento de una infección por *Borrelia* o borreliosis de  
55 Lyme en un sujeto. En diversos aspectos, dichos métodos comprenden la etapa de administrar cualquiera de las composiciones de vacuna analizadas en el presente documento o cualquiera de las vacunas de combinación analizadas en el presente documento al sujeto en una cantidad eficaz para la prevención o tratamiento de la infección por *Borrelia* o borreliosis de Lyme.

La descripción proporciona usos de polipéptidos, ácidos nucleicos, anticuerpos, composiciones farmacéuticas o vacunas de la invención para la preparación de medicamentos. También se proporcionan en la presente invención otros aspectos relacionados.

- 5 Los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento pretenden ser reemplazables opcionalmente por los inventores con los términos "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso. El término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" implicarán la inclusión de un compuesto o composición indicada (por ejemplo, ácido nucleico, 10 polipéptido, anticuerpo) o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no implicará la exclusión de ningún otro compuesto, composición, etapa o grupo de los mismos. La abreviatura "e.g." deriva del latín *exempli gratia* y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto, la abreviatura "e.g." es sinónimo de la expresión "por ejemplo".
- 15 Las realizaciones de la presente relacionadas con "composiciones de vacuna" de la invención se pueden aplicar también a realizaciones relacionadas con "composiciones farmacéuticas" de la invención y viceversa.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación.

- 20 Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

- 25 Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o 30 polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas proporcionadas con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, pueden ser aproximadas.

- 35 Un vehículo o excipiente preferible para los polipéptidos de acuerdo con la presente invención en sus distintas realizaciones, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es un compuesto inmunoestimulante tal como un adyuvante para una estimulación adicional de la respuesta inmunitaria al polipéptido de acuerdo con la presente invención o una molécula codificante de ácido nucleico de la misma.

Los adyuvantes que pueden usarse en composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación:

- 40 A. Composiciones que contienen minerales

- 45 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc., o mezclas de diferentes compuestos minerales, adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica.

- 50 Un adyuvante útil de fosfato de aluminio es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de  $PO_4/Al$  entre 0,84 y 0,92. Otro adyuvante útil a base de aluminio es  $ASO_4$ , una combinación de hidróxido de aluminio + lípido monofosforilado A (MPL).

B. Emulsiones en aceite

- 55 Las composiciones de emulsiones en aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno en agua, tales como MF59 (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 %, formulado en partículas submicrométricas con un microfluidizador), AS03 (escualeno, DL- $\alpha$ -tocoferol y Tween 80) y AF03 (escualeno, Montane® 80 y Eumulgon® B1 PH). También pueden utilizarse el adyuvante completo de Freund

(CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Las emulsiones útiles de aceite en agua típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, donde el uno o más aceites o tensioactivos son biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión generalmente tienen menos de 1 µm de diámetro y se llega a estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Son preferidas las gotas con un tamaño menor de 220 nm, dado que pueden someterse a esterilización de filtro.

La emulsión puede comprender aceites tales como aquellos de una fuente animal (tal como un pez) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. Los ejemplos de aceite de frutos secos son aceite de maní, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles. Puede utilizarse el aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido del grano de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más disponible, pero puede utilizarse también el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale y similares. Pueden prepararse ésteres de carbono 6-10 de ácidos grasos de glicerol y 1,2-propanodiol, mientras que no tienen un origen natural en los aceites de semillas, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados, partiendo de los aceites de semillas y frutos secos. Las grasas y aceites de leche de mamíferos son metabolizables y pueden usarse, por lo tanto, en la práctica de esta invención. Se conocen en la técnica los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables, los cuales pueden recuperarse rápidamente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena, tal como espermaceti, son ejemplos de varios de los aceites de pescado que pueden utilizarse en el presente documento. Una cantidad de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de 5-carbono isopreno y generalmente se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado e insaturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que se prefiere particularmente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales o pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Pueden utilizarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15, y más preferiblemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (denominados comúnmente Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), a la venta con el nombre comercial DOWF AX™, tales como copolímeros de bloque lineales EO/PO; octoxinolos, que pueden variar en la cantidad de grupos de etoxi de repetición (oxi-1,2-etanodiol), siendo octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) de interés particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como fostatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tal como Tergitol™ serie NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como SPAN), tal como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para su inclusión en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol, tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tal como Tween 80) del 0,01 al 1 %, en particular aproximadamente el 0,1 %; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tal como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) del 0,1 al 20 %, preferiblemente del 0,1 al 10 %, y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente al 0,5 %.

Preferiblemente, sustancialmente todas (por ejemplo, al menos el 90 % en número) las gotas de aceite tienen un diámetro de menos de 1 µm, por ejemplo, <750 nm, <500 nm, <400 nm, <300 nm, <250 nm, <220 nm, <200 nm, o

inferior. Una emulsión submicrométrica útil específica consiste en escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones se convierten en el 4,3 % de escualeno, el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,48 % de Span 85. La emulsión de MF59 incluye, de manera ventajosa, iones de citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.

#### C. Formulaciones de saponina

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glucósidos de esteroides y glucósidos triterpenoides que se encuentran en el tronco, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. Se ha estudiado extensivamente la saponina del tronco del árbol de la Quillaja saponaria Molina como adyuvante. La saponina también puede obtenerse en el mercado a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tal como QS21, así como formulaciones de lípidos, tal como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado mediante HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide, tal como colesterol.

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden utilizarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Los ISCOM típicamente incluyen también un fosfolípido tales como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QS7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergentes adicionales.

#### D. Virosomas y partículas pseudovíricas

Los virosomas y las partículas pseudovíricas (VLP) también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Generalmente son no patógenos, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral natural. Las proteínas virales pueden producirse o aislarse de virus completos de manera recombinante. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas de cápside o nucleares), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de la fiebre aftosa, Retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos Q $\beta$  (tales como proteínas de cubierta), fagos GA, fagos fr, fagos AP205 y Ty (tal como la proteína pi del retrotransposón Ty).

#### E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos (LPS) enterobacterianos, derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas de ADP-ribosilante y derivados desintoxicados de las mismas.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen el lípido monofosforilado (MPL) A y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla del lípido monofosforilado A 3 des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse de manera estéril a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m. Otros derivados no tóxicos de LPS incluyen miméticos de lípido A de monofosforilo, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 y el dímero de fosfolípido sintético, E6020.

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). Los ARN y oligonucleótidos bicatenarios que contienen secuencias palíndromas o poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. La secuencia de CpG puede estar dirigida a TLR9, tales como los

motivos GTCGTT o TTCGTT. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune de Th1, tal como un ODN de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN de CpG-B. Preferiblemente, el CpG es un ODN de CpG-A.

5 Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden estar unidas por sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC31®. Por lo tanto, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluye al menos un (y  
10 preferiblemente múltiples) motivos Cpl (es decir, una citosina unida a una inosina para formar un dinucleótido), y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluye al menos una (y preferiblemente múltiples) secuencias tripeptídicas Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia de 26-mer 5'-(dIdC)<sub>13</sub>-3' (SEQ ID NO: 32). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de 11-mer KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 33).

15 Los compuestos policatiónicos derivados de fuentes naturales incluyen HIV-REV o HIV-TAT (péptidos catiónicos derivados, péptidos antenapedia, quitosano u otros derivados de quitina) u otros péptidos derivados de estos péptidos o proteínas mediante producción bioquímica o recombinante. Otros compuestos policatiónicos preferidos son la catelina o sustancias relacionadas o derivadas de la catelina. Por ejemplo, la catelina de ratón es un péptido  
20 que tiene la secuencia de aminoácidos NH<sub>2</sub>-RLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVQPPE-COOH (SEQ ID NO: 31). Las sustancias relacionadas o derivadas de catelina contienen la totalidad o partes de la secuencia de catelina con al menos 15-20 residuos de aminoácidos. Los derivados pueden incluir la sustitución o modificación de los aminoácidos naturales por aminoácidos que no están entre los 20 aminoácidos estándar. Además, pueden introducirse residuos catiónicos adicionales en dichas moléculas de catelina. Se prefiere que estas moléculas de  
25 catelina se combinen con el antígeno. Sorprendentemente, estas moléculas de catelina han resultado ser eficaces también como un adyuvante para un antígeno sin la adición de adyuvantes adicionales. Por lo tanto, es posible usar dichas moléculas de catelina como adyuvantes eficaces en formulaciones de vacuna con o sin sustancias adicionales de activación inmunitaria.

30 Las toxinas bacterianas ADP-ribosilantes y derivados desintoxicados de las mismas pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), *Vibrio cholerae* (toxina del cólera "CT"), o *Bordetella pertussis* (toxina Pertussis "PT"). Se conoce el uso de toxinas ADP-ribosilantes desintoxicadas como adyuvantes mucosos y adyuvantes parenterales. Preferiblemente, la toxina o toxoide se encuentra en la forma de una holotoxina, que comprende subunidades tanto A como B. Preferiblemente,  
35 la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferiblemente, la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72, LT-G192 o dmLT. Un mutante útil de CT es CT-E29H.

#### F. Inmunomoduladores humanos

40 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es IL-12.

#### 45 G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas esterificadas de ácido hialurónico o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También  
50 pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención.

#### H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, una  
55 partícula de ~100 nm a ~150 μm de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 μm de diámetro, y mucho más preferiblemente de ~500 nm a ~10 μm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no son tóxicos (por ejemplo, un poli(ácido α-hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, un poli(láctido-co-glicólido) etc.), en donde se prefiere poli(láctido-co-glicólido), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada

positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

#### I. Liposomas

- 5 Se conocen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes.

#### J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno.

- 10 Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol, así como tensioactivos de alquil éteres o ésteres de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol. Los éteres de polioxietileno se seleccionan del siguiente grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, y polioxietileno-23-lauril éter.

15

#### K. Péptidos de muramilo

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-

- 20 acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanil-2-(1'-2'-dipalmitoil-5n-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

#### L. Compuestos de imidazoquinolona.

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención

- 25 incluyen Imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M").

La invención puede comprender también combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente.

- 30 Preferiblemente, el compuesto inmunoestimulante en la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo de sustancias policatiónicas, especialmente péptidos policatiónicos, moléculas de ácidos nucleicos inmunoestimulantes, preferiblemente desoxinucleótidos inmunoestimulantes, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, MF59, sales de aluminio, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, compuestos neuroactivos, especialmente la hormona de crecimiento humana, o combinaciones de los

35 mismos.

Se prefiere particularmente el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio, y los antígenos generalmente se adsorben en estas sales.

- 40 Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos cualquiera de los siguientes compuestos o combinaciones de los mismos: las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención en sus distintas realizaciones, el vector de acuerdo con la presente invención, las células de acuerdo con la presente invención y el anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Con respecto a esto, cualquiera de estos
- 45 compuestos puede emplearse en combinación con uno o más vehículos estériles o no estériles para su uso con células, tejidos u organismos, tal como un vehículo farmacéutico adecuado para su administración a un sujeto. Dichos vehículos pueden incluir, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

- 50 En una realización, la composición farmacéutica comprende un estabilizador. El término "estabilizador" se refiere a una sustancia o excipiente de vacuna que protege la composición inmunogénica de la vacuna de condiciones adversas, tales como aquellas que se producen durante el calentamiento o la congelación, y/o prolonga la estabilidad o semivida de la composición inmunogénica en una condición o estado estable e inmunogénico. Los ejemplos de estabilizadores incluyen, pero sin limitación, azúcares, tales como sacarosa, lactosa y manosa;
- 55 alcoholes de azúcar, tal como manitol; aminoácidos, tales como glicina o ácido glutámico; y proteínas, tales como albúmina sérica humana o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas de cualquier manera eficaz y conveniente, incluyendo, por ejemplo, administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal,

intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal o intradérmica, entre otras En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea o intramuscular, más preferiblemente intramuscular.

- 5 En terapia o como un profiláctico, el agente activo de la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo, como una dispersión acuosa estéril, preferiblemente isotónica.

- 10 Como alternativa, la composición, preferiblemente la composición farmacéutica, puede formularse para administración tópica, por ejemplo, en forma de ungüentos, cremas, lociones, ungüentos para los ojos, gotas para los ojos, gotas para los oídos, enjuague bucal, apósitos y suturas impregnados y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales adecuados, incluyendo, por ejemplo, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, y emolientes en ungüentos y cremas. Dichas formulaciones tópicas pueden contener también vehículos convencionales compatibles, por ejemplo, bases de cremas o ungüentos, y etanol u alcohol oleílico para lociones.
- 15 Dichos vehículos pueden constituir de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 98 % en peso de la formulación; más usualmente constituirán hasta aproximadamente el 80 % en peso de la formulación.

- Además de la terapia descrita anteriormente, las composiciones de esta invención pueden utilizarse generalmente como un agente de tratamiento de heridas para evitar la adhesión de bacterias a las proteínas de matriz expuestas en el tejido de la herida y para uso profiláctico en tratamientos dentales como una alternativa a, o junto con, la profilaxis antibiótica.
- 20

- En una realización preferida, la composición farmacéutica es una composición de vacuna. Preferiblemente, dicha composición de vacuna se encuentra, convenientemente, en forma inyectable. Pueden emplearse adyuvantes convencionales para potenciar la respuesta inmunitaria. Una dosis unitaria adecuada para la vacunación con un antígeno de proteína es, para adultos, entre 0,02 µg y 3 µg de antígeno por kg de peso corporal, y para niños, entre 0,2 y 10 µg de antígeno por kg de peso corporal, y dicha dosis se administra preferiblemente de 1 a 3 veces en intervalos de 2 a 24 semanas.
- 25

- 30 En el intervalo de dosis indicado, no se esperan efectos toxicológicos adversos con los compuestos de la invención, lo cual impediría su administración a individuos adecuados.

- La descripción divulga kits que comprenden una o más formulaciones farmacéuticas para su administración a un sujeto, envasadas de forma que facilite su uso para la administración a sujetos. En una realización preferida, los kits comprenden la formulación en un volumen final de 2 ml, más preferiblemente en un volumen final de 1 ml.
- 35

- Los kits pueden usarse para producir una única dosis unitaria de administración. En diversos aspectos, cada kit contiene tanto un primer recipiente con una proteína seca como un segundo recipiente con una formulación acuosa. Se incluyen también dentro del alcance de esta invención los kits que contienen jeringas precargadas con cámara individual y múltiple (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).
- 40

- En otra realización, tal kit incluye una formulación farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o péptido terapéutico), envasada en un recipiente tal como una botella o frasco sellados, con una etiqueta pegada al recipiente o incluida en el paquete que describe el uso del compuesto o composición para poner en práctica el método. En una realización, la formulación farmacéutica se envasa en el recipiente de forma que la cantidad de espacio vacío en el recipiente (por ejemplo, la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del recipiente) sea muy pequeño. Preferiblemente, la cantidad de espacio vacío es insignificante (es decir, casi nula).
- 45

- 50 En un aspecto, el kit contiene un primer recipiente que tiene una composición de proteína o péptido terapéutica y un segundo recipiente que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición En un aspecto, la formulación farmacéutica se envasa en una forma de dosificación unitaria. El kit incluye además, opcionalmente, un dispositivo adecuado para la administración de la formulación farmacéutica de acuerdo con una vía específica de administración. En algunos aspectos, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de las formulaciones farmacéuticas.
- 55

La composición farmacéutica puede contener una gama de antígenos diferentes. Los ejemplos de antígenos son organismos atenuados o eliminados en su totalidad, subfracciones de estos organismos, proteínas o, en su forma más simple, péptidos. Los antígenos también pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario en la forma de

proteínas o péptidos glucosilados y pueden también ser, o contener, polisacáridos o lípidos. Pueden utilizarse péptidos cortos, dado que los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen antígenos en forma de péptidos cortos, usualmente de 8-11 aminoácidos de longitud, junto con un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos B pueden reconocer epítomos lineales de 4 a 5 aminoácidos, así como estructuras tridimensionales (epítomos conformacionales).

En una realización preferida, la composición farmacéutica del tercer aspecto comprende adicionalmente un antígeno reactivo al suero hiperinmune contra una proteína de *Borrelia* o un fragmento activo o variante del mismo, tales como, por ejemplo, los antígenos, fragmentos y variantes que se describen en el documento WO 2008/031133.

10

De acuerdo con la invención, la composición farmacéutica de acuerdo con un tercer aspecto puede utilizarse como un medicamento, particularmente como una vacuna, particularmente en relación con particularmente una enfermedad o patología que está causada por, vinculada a, o asociada con *Borrelia*.

15 La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse como un medicamento, particularmente como una vacuna, particularmente en relación con una enfermedad o patología que está causada, vinculada a, o asociada con *Borrelia*, más preferiblemente cualquier especie patogénica de *Borrelia*, y más preferiblemente para su uso en un método para el tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia*, particularmente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* o *B. sinica*, preferiblemente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* o *B. garinii*.

Con respecto a esto, debería observarse que las distintas especies de *Borrelia*, inclusive *B. burgdorferi* s.l., comprenden varias especies y cepas que incluyen las divulgadas en el presente documento. Una enfermedad 25 relacionada, causada o asociada con la infección bacteriana a prevenir y/o tratar de acuerdo con la presente invención incluye la borreliosis de Lyme (enfermedad de Lyme). Se incorporan en el presente documento por referencia aspectos, síntomas, fases y subgrupos adicionales de la borreliosis de Lyme, así como grupos específicos de pacientes que padecen dicha enfermedad como también se divulga en el presente documento, incluyendo en la parte introductoria. Más específicamente, la borreliosis de Lyme generalmente tiene lugar en fases, con remisión y 30 exacerbaciones con diferentes manifestaciones clínicas en cada fase. La fase 1 de infección temprana consiste en una infección localizada de la piel, seguida en pocos días o semanas de la etapa 2, infección diseminada, y en meses a años después por la fase 3, infección persistente. No obstante, la infección es variable; algunos pacientes tienen únicamente infecciones cutáneas localizadas, mientras que otros presentan únicamente manifestaciones posteriores de la enfermedad, tal como artritis.

35

Se describe adicionalmente un método para el tratamiento o la prevención de una infección por *Borrelia* en un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con el tercer aspecto.

40 El término "sujeto" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, a quien se proporciona un tratamiento o un método de acuerdo con la presente invención. Para el tratamiento de esas infecciones, afecciones o patologías que son específicas de un animal específico, tal como un paciente humano, el término paciente se refiere a ese animal específico. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano; sin embargo, el uso médico de la composición puede incluir también 45 animales tales como aves, incluyendo gallinas, pavos, patos o gansos, ganado tal como caballos, vacas u ovejas, o animales de compañía tales como perros o gatos.

La expresión "cantidad eficaz" se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva para describir una cantidad de la presente composición farmacéutica que puede usarse para inducir un resultado previsto al utilizarse en el método de 50 la presente invención. En varios aspectos de la presente invención, el término cantidad eficaz se usa junto con el tratamiento o prevención. En otros aspectos, el término cantidad eficaz simplemente se refiere a una cantidad de un agente que produce un resultado que se observa como beneficioso o útil, inclusive en métodos de acuerdo con la presente invención, donde se busca el tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia*.

55 El término cantidad eficaz con respecto a los compuestos y composiciones descritos en el presente documento se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva para describir esa cantidad del compuesto de acuerdo con la presente invención que se administra a un paciente mamífero, especialmente un paciente humano, que padece una enfermedad asociada a *Borrelia*, para reducir o inhibir la infección por *Borrelia*.

El método para inmunizar a un sujeto comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica del tercer aspecto de la presente invención.

- El método comprende inducir una respuesta inmunológica en un individuo mediante terapia génica o de otra forma, mediante la administración de un polipéptido o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención *in vivo* a fin de estimular una respuesta inmunológica para producir anticuerpos o una respuesta mediada por células de linfocitos T, ya sean linfocitos T productores de citocinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho individuo de la enfermedad, aunque esa enfermedad ya se haya establecido en el individuo.
- 10 Los productos de la presente invención, particularmente los polipéptidos y ácidos nucleicos, se proporcionan preferiblemente de forma aislada y pueden purificarse hasta la homogeneidad. El término "aislado", como se usa en el presente documento, significa separado "por la mano del hombre" de su estado natural; es decir, si ocurre de manera natural, se ha cambiado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de origen natural o un polipéptido presente de manera natural en un organismo vivo en su estado natural no está "aislado", pero la misma molécula o polipéptido de ácido nucleico separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según el término que se emplea en el presente documento. Como parte del aislamiento o después del mismo, dichas moléculas de ácido nucleico pueden unirse a otras moléculas de ácido nucleico, tales como moléculas de ADN, para la mutagénesis, para formar genes de fusión y para propagación o expresión en un huésped, por ejemplo. Las moléculas aisladas de ácido nucleico, solas o unidas a otras moléculas de ácido nucleico tales como vectores, pueden introducirse en células huésped, en cultivo o en organismos completos. Introducidas en células huésped en cultivo o en organismos completos, dichas moléculas de ADN aún se encontrarían aisladas, según se utiliza el término en el presente documento, dado que no estarían en su forma o entorno natural. De forma similar, las moléculas y polipéptidos de ácido nucleico pueden aparecer en una composición, tales como formulaciones de medio, soluciones para la introducción de polipéptidos o moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, en células, composiciones o soluciones para reacciones químicas o enzimáticas, por ejemplo, que no son composiciones de origen natural, y quedan en las mismas moléculas o polipéptidos aislados de ácido nucleico dentro del significado de ese término empleado en el presente documento.

La invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos en particular descritos en el presente documento, dado que pueden variar. Además, la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, las palabras "comprender", "contener" e "incluir" deben interpretarse de forma inclusiva y no de forma exclusiva.

A menos que se defina otra cosa, toda expresión técnica y científica, y cualquier acrónimo usado en el presente documento, tiene el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica en el campo de la invención. Aunque en la práctica de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los métodos y materiales preferidos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes Figuras, Tablas, Ejemplos y la Lista de secuencias, de los cuales pueden tomarse características, realizaciones y ventajas adicionales. Como tales, las modificaciones específicas analizadas no deben interpretarse como limitaciones del alcance de la invención. Será evidente para el experto en la técnica que pueden realizarse diversas equivalencias, cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención, y debe entenderse que dichas realizaciones equivalentes se incluyen en el presente documento.

En relación con la presente invención

- La **Fig. 1** muestra el alineamiento de aminoácidos de los serotipos 1-6 de OspA de *Borrelia*.  
 La **Fig. 2** muestra esquemáticamente la producción de heterodímeros de fragmentos mutantes de OspA de acuerdo con la presente invención.  
 La **Fig. 3** representa esquemáticamente los componentes polipeptídicos de una posible composición farmacéutica de la presente invención que comprenden tres heterodímeros mutantes de OspA diferentes, una "vacuna de combinación".  
 La **Fig. 4** muestra la estructura química de Pam<sub>3</sub>Cys, un ejemplo de una cisteína de ácido graso sustituido, tal como se encontraría en el extremo N de polipéptidos lipidados de la presente invención.  
 La **Fig. 5** muestra la unión de anticuerpos de ratones inmunizados con polipéptidos del heterodímero del

fragmento mutante de OspA a la superficie celular de *Borrelia* de los serotipos 1-6 de OspA.

La **Tabla 1** muestra la estabilidad térmica del plegamiento de fragmentos mutantes del serotipo 2 de OspA con los tipos de enlace disulfuro de D1 a D5 (para la nomenclatura, véase la Tabla A-4) en comparación con el fragmento de tipo salvaje del serotipo 2 de OspA sin enlaces disulfuro (D0).

5 La **Tabla 2** muestra la protección de los ratones de la infección por *B. afzelii* (cepa IS1) mediante el método de exposición por garrapatas tras la inmunización con fragmentos mutantes del serotipo 2 de OspA con los tipos de enlace disulfuro D1 a D5 (para la nomenclatura véase la tabla A-4), incluyendo grupos de control de ratones inmunizados con PBS, OspA de longitud completa o el fragmento de tipo salvaje del serotipo 2 de OspA (S2D0-His).

10 La **Tabla 3** muestra la protección de los ratones de la infección por *B. afzelii* (cepa IS1) mediante el método de exposición por garrapatas tras la inmunización con fragmentos mutantes lipidados del serotipo 2 de OspA con los tipos de enlace disulfuro D1, D3 y D4 (Lip-S2D1-His, Lip-S2D3-His y Lip-S2D4-His), incluyendo grupos de control de ratones inmunizados con PBS o proteína OspA de longitud completa.

15 La **Tabla 4** muestra la capacidad protectora de los heterodímeros mutantes de OspA de la invención en modelos de exposición *in vivo* de *Borrelia*. Se inmunizó a los ratones con Lip-S1D1-S2D1-His, Lip-S4D1-S3D1-His, Lip-S4D1-S3D1 o Lip-S5D1-S6D1-His y se expusieron al serotipo indicado de OspA de *Borrelia* mediante métodos de exposición por aguja o por garrapata, según se indicó. El grupo de control en cada experimento se inmunizó con un adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> en solitario.

20 La **Tabla 5** muestra la capacidad protectora de la vacuna de combinación de la invención contra la exposición *in vivo* de *Borrelia* de serotipo 1 de OspA (cepa N40 en el método de exposición por aguja) y *Borrelia* de serotipo 2 de OspA (cepa IS1 en el método de exposición por garrapatas). Se inmunizó a los ratones con los tres antígenos LipS1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 y Lip-S5D1-S6D1 juntos en una relación 1:1:1 (vacuna de combinación) o con los antígenos de control indicados y se expusieron a *Borrelia* mediante métodos de exposición por aguja o garrapata, según se indicó. El grupo de control en cada experimento se inmunizó con un adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> en solitario.

Las figuras y tablas a las que puede hacerse referencia en la memoria descriptiva se describen a continuación en mayor detalle.

30 **Fig. 1** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los serotipos de OspA uno a seis. El alineamiento ilustra que la porción N-terminal asociada con la membrana de la proteína tiene una secuencia de aminoácidos más altamente conservada que la porción C-terminal más expuesta.

**Fig. 2** Producción de un heterodímero de OspA mutante de la invención que comprende fragmentos mutantes C-terminal de OspA a partir de dos serotipos diferentes de OspA de *Borrelia* sp. **(A)** Representación esquemática de un ácido nucleico que codifica un heterodímero mutante lipidado de OspA. Los componentes, de 5' a 3', comprenden las secuencias codificantes para una secuencia señal de lipidación (señal Lip), un péptido que contiene una cisteína pequeña para la lipidación N-terminal (péptido de lipidación = LP), un fragmento mutante C-terminal de OspA con dos cisteínas no naturales, un péptido enlazador corto (LN1), seguido de un segundo fragmento mutante C-terminal de OspA con dos cisteínas no nativas. **(B)** El polipéptido heterodímero de OspA mutante intermedio comprende el producto naciente directamente después de la traducción de ácido nucleico. Desde el extremo N al extremo C, este polipéptido consiste en una secuencia señal de lipidación (señal Lip), un péptido que contiene cisteína para lipidación (LP), un fragmento mutante de OspA con un enlace disulfuro no nativo, un péptido enlazador corto (LN1), seguido de un segundo fragmento mutante de OspA con un enlace disulfuro no nativo. **(C)** El polipéptido heterodímero mutante de OspA lipidado final después de la modificación postraducciona. El heterodímero, desde el extremo N al extremo C, consiste en un péptido corto que contiene cisteína con la cisteína N-terminal lipitada (indicada con "Lip"), un fragmento mutante de OspA estabilizado por un enlace disulfuro, un péptido enlazador (LN1), y un segundo fragmento mutante de OspA estabilizado por un enlace disulfuro. La secuencia señal de lipidación se escinde durante la modificación postraducciona del polipéptido, como se muestra.

50 **Fig. 3** Un ejemplo de una composición farmacéutica preferida de acuerdo con la presente invención. Están presentes en la composición tres heterodímeros mutantes de OspA, comprendiendo cada uno fragmentos mutados de OspA de dos serotipos distintos de OspA de *Borrelia*, y juntos proporcionan antígenos de OspA de seis serotipos diferentes de OspA de *Borrelia*. Tal composición farmacéutica permite la inmunización simultánea contra seis serotipos de *Borrelia*.

**Fig. 4** Ilustración de la estructura química de Pam<sub>3</sub>Cys, un ejemplo de una sustitución de ácidos grasos de la cisteína N-terminal de la proteína OspA de tipo salvaje de longitud completa, así como heterodímeros y monómeros del fragmento mutante de OspA lipidado de la invención. Durante la modificación postraducciona de polipéptidos o

proteína OspA de longitud completa de la invención, la secuencia señal de lipidación N-terminal se elimina por escisión y los ácidos grasos, más comúnmente tres restos palmitoilo ("Pam<sub>3</sub>"), se unen enzimáticamente y covalentemente al residuo de cisteína N-terminal (el átomo de azufre, "S", se indica por medio de una flecha). Los residuos restantes de la cadena de polipéptidos, que están ubicados hacia el extremo C respecto al residuo Pam<sub>3</sub>Cys se representan por "Xn" (modificado a partir de Bouchon, et al. (1997) Analytical Biochemistry 246: 52-61.)

**Fig. 5** Unión de anticuerpos a partir de ratones inmunizados con respecto a la superficie celular de espiroquetas de *Borrelia*. Los ratones se inmunizaron tres veces con 1 µg de cada uno de los antígenos indicados: Proteínas OspA de longitud completa marcadas con His y lipidadas de los serotipos de OspA 1-6; Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 o Lip-S5D1-S6D1 en solitario, o Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 y Lip-S5D1-S6D1 juntas en una relación 1:1:1 ("vacuna de combinación") en intervalos de dos semanas y se recogieron los sueros una semana después de la última dosis. Se ensayaron varias diluciones de sueros para determinar la unión a la superficie celular de *Borrelia* por medio de tinción celular y citometría de flujo. Los valores de intensidad fluorescente observados en la tinción con sueros recogidos de los ratones de control inmunizados con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> en solitario se extrajeron para estimar la unión no específica. (Las *Borrelia* usadas fueron: *B. burgdorferi*, OspA de serotipo 1, cepa N40; *B. afzelii*, OspA de serotipo 2, cepa "C"; *B. garinii*, OspA de serotipo 3, cepa "D"; *B. bavariensis*, OspA de serotipo 4, cepa Fin; *B. garinii*, OspA de serotipo 5, cepa "E"; *B. garinii*, OspA de serotipo 6, cepa "B").

**Tabla 1. Estabilidad térmica de fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 no lipidados, marcados con His de *B. afzelii* K78 con ubicación diferente de enlaces disulfuro.** Los fragmentos mutantes de OspA serotipo 2 con diferentes tipos de enlace de cisteína (véase la Tabla A-4) se solubilizaron en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 8,0) y se ensayaron para determinar la estabilidad térmica en comparación con el fragmento de tipo salvaje de OspA de serotipo 2 (S2D0). La presencia de un enlace disulfuro dio como resultado un aumento de la temperatura de fusión en comparación con el fragmento de tipo salvaje de OspA de serotipo 2.

Fragmento mutante de OspA de serotipo 2	SEQ ID NO:	Temperatura de fusión (°C)
S2D0-His*	1	47,6
S2D1-His	2	70,4
S2D2-His	3	54,6
S2D3-His	4	58,6
S2D4-His	5	58,4
S2D5-His	6	53,8

\*véanse las Tablas A-4 y A-5 para la nomenclatura.

**Tabla 2. Capacidad protectora de las dosis decrecientes de fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 no lipidados marcados con His contra la infección por *B. afzelii* (serotipo 2) mediante el método de exposición por garrapata.** Cinco fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 no lipidados y marcados con His se ensayaron para determinar la capacidad protectora en dos dosis diferentes (30 µg y 5 µg) y se compararon con el fragmento de OspA de serotipo 2 de tipo salvaje. Los grupos de ratones inmunizados con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo o con OspA de serotipo 2 de longitud completa no lipidada sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Todos los antígenos estaban marcados con His y no lipidados. Los datos presentados combinan los resultados de varios experimentos realizados en condiciones idénticas.

Inmunógeno	Exposición por garrapatas (OspA de serotipo 2: <i>B. afzelii</i> , cepa IS1)	3 x 30 µg (11 experimentos)	3 x 5 µg (4 experimentos)
		Infectados/total	Infectados/total
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	Garrapata (OspA-ST2)	58/62	20/23
OspA K78-His de longitud completa (SEQ ID NO: 209)	Garrapata (OspA-ST2)	1/72	1/25
S2D0-His (SEQ ID NO: 1)	Garrapata (OspA-ST2)	15/20	8/16
S2D1-His (SEQ ID NO: 2)	Garrapata (OspA-ST2)	1/26	1/25
S2D2-His (SEQ ID NO: 3)	Garrapata (OspA-ST2)	0/26	4/26
S2D3-His (SEQ ID NO: 4)	Garrapata (OspA-ST2)	0/34	1/21
S2D4-His (SEQ ID NO: 5)	Garrapata (OspA-ST2)	2/30	4/27
S2D5-His (SEQ ID NO: 6)	Garrapata (OspA-ST2)	5/35	2/11

**Tabla 3. Capacidad protectora de las dosis decrecientes de fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 lipidados marcados con His contra la infección por *B. afzelii* mediante el método de exposición por garrapata.** Se evaluaron tres fragmentos mutantes marcados con His lipidados de OspA de serotipo 2 con diferentes

tipos de enlace disulfuro para determinar la capacidad protectora con tres dosis diferentes (3,0 µg, 1,0 µg y 0,3 µg). Los grupos de ratones inmunizados con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo o con OspA de serotipo 2 de longitud completa no lipídada sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Los datos presentados combinan los resultados de varios experimentos realizados en condiciones idénticas.

Inmunógeno	Exposición por garrapatas (OspA de serotipo 2: <i>B. afzelii</i> , cepa IS1)	3 x 3,0 µg (5 experimentos)	3 x 1,0 µg (5 experimentos)	3 x 0,3 µg (4 experimentos)
		Infectados/total	Infectados/total	Infectados/total
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> solo (control para todas las dosis)	Garrapata (OspA-ST2)	58/59	-	-
OspA K78-His de longitud completa (SEQ ID NO: 209)	Garrapata (OspA-ST2)	0/14	0/21	1/20
Lip-S2D1-His (SEQ ID NO: 141)	Garrapata (OspA-ST2)	0/17	5/31	1/29
Lip-S2D3-His (SEQ ID NO: 143)	Garrapata (OspA-ST2)	1/15	1/12	5/19
Lip-S2D4-His (SEQ ID NO: 144)	Garrapata (OspA-ST2)	0/8	0/25	0/34

5

**Tabla 4. Capacidad protectora de heterodímeros mutantes de OspA de la invención contra exposición a *Borrelia in vivo* a través de métodos de exposición por aguja o garrapatas.** Se inmunizaron grupos de ratones tres veces en intervalos de dos semanas con las dosis indicadas de heterodímero de OspA o adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo. Los inmunógenos usados fueron Lip-S1D1-S2D1-His (expuesto a OspA-ST1 de *Borrelia*, Experimentos 1-3), Lip-S1D1-S2D1-His, Lip-S4D1-S3D1-His y Lip-S5D1-S6D1-His, por separado (expuestos a OspA-ST2 de *Borrelia*, Experimentos 4-6), Lip-S4D1-S3D1 (expuesto a OspA-ST4 de *Borrelia*, Experimentos 7 y 8) y Lip-S5D1-S6D1-His (expuesto a OspA-ST5 de *Borrelia*, Experimentos 9 y 10; expuesto a OspA-ST6 de *Borrelia*, Experimentos 11 y 12). Se expuso a los ratones inmunizados durante dos semanas después de la última inmunización a través de los modelos de exposición por aguja o garrapatas, según se indicó.

10

Inmunógeno	Dosis	Exposición por aguja (OspA-serotipo 1: <i>B. burgdorferi</i> s.s., cepa N40)	Infectados/Total		
			Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Lip-S1D1-S2D1-His (SEQ ID NO: 49)	3 x 5,0 µg	Aguja (OspA-ST1)	0/10***	0/9***	4/10**
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Aguja (OspA-ST1)	10/10	8/10	10/10
Inmunógeno	Dosis	Exposición por garrapatas (OspA-serotipo 2: <i>B. afzelii</i> , cepa IS1)	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
Lip-S1D1-S2D1-His (SEQ ID NO: 49)	3 x 2,0 µg	Garrapata (OspA-ST2)	0/10***	0/9***	0/6***
Lip-S4D1-S3D1-His (SEQ ID NO: 81)	3 x 2,0 µg	Garrapata (OspA-ST2)	0/9***	2/7*	0/6***
Lip-S5D1-S6D1-His (SEQ ID NO: 65)	3 x 2,0 µg	Garrapata (OspA-ST2)	0/7***	0/9***	0/6***
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Garrapata (OspA-ST2)	9/9	8/8	7/7
Inmunógeno	Dosis	Exposición por aguja (OspA-serotipo 4: <i>B. bavariensis</i> , cepa Scf)	Exp. 7	Exp. 8	
Lip-S4D1-S3D1 (Seq ID No: 194)	3 x 5,0 µg	Aguja (OspA-ST4)	2/10**	1/10***	-
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Aguja (OspA-ST4)	9/10	9/10	-
Inmunógeno	Dosis	Exposición por aguja (OspA-serotipo 5: <i>B. garinii</i> )	Exp. 9	Exp. 10	
Lip-SSD1-S6D1-His (SEQ ID NO: 65)	3 x 5,0 µg	Aguja (OspA-ST5)	1/10	2/10	-

Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Aguja (ST5)	6/10	6/10	-
<b>Inmunógeno</b>	<b>Dosis</b>	<b>Exposición por aguja (OspA-serotipo 6: <i>B. garinii</i>)</b>	<b>Exp. 11</b>	<b>Exp. 12</b>	
Lip-S5D1-S6D1-His (SEQ ID NO: 65)	3 x 5,0 µg	Aguja (OspA-ST6)	2/10**	2/10***	-
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Aguja (OspA-ST6)	9/10	10/10	-
<i>Valor de p:</i> prueba exacta de Fisher, dos colas. *significativo (<0,05), **muy significativo (<0,01), ***extremadamente significativo (<0,001)					

5 **Tabla 5. Capacidad protectora de la vacuna de combinación de heterodímero de OspA mutante de la invención contra exposición a OspA de serotipo 1 y serotipo 2 de *Borrelia*.** Se inmunizaron grupos de ratones tres veces con las dosis indicadas de inmunógeno o adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo en intervalos de dos semanas. Los inmunógenos usados fueron una combinación 1:1:1 de los heterodímeros mutantes de OspA LipS1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 y Lip-S5D1-S6D1 (vacuna de combinación), Lip-S1D1-S2D1, Lip-OspA1-His y OspA ST1/ST2 quimérica. Los ratones inmunizados se expusieron dos semanas después de la última inmunización a través del método de exposición por garrapatas (ST2, Experimentos 13 y 14) o el método de exposición por aguja (ST1, Experimentos 15 y 16).

Inmunógeno	Dosis	Exposición por garrapatas (OspA-serotipo 2: <i>B. afzelii</i> , cepa IS1)	Infectados/Total	
			Exp. 13	Exp. 14
Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 186)	3 x 5,0 µg	Garrapata (OspA-ST2)	0/6***	0/7**
Vacuna de combinación:				
Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID No: 186)	3 x 5,0 µg	Garrapata (OspA-ST2)	0/9***	0/6**
Lip-S4D1-S3D1 (Seq ID No: 194)	3 x 5,0 µg			
Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID No: 190)	3 x 5,0 µg			
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Garrapata (OspA-ST2)	7/7	6/7
Inmunógeno	Dosis	Exposición por aguja (OspA-serotipo 1: <i>B. burgdorferi</i> s.s., cepa ZS7)	Exp. 15	Exp. 16
Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID No: 186)	3 x 1,0 µg	Aguja (OspA-ST1)	0/10***	0/10***
Lip-OspA1-His (Seq ID No: 210)	3 x 1,0 µg	Aguja (OspA-ST1)	0/10***	0/10***
OspA ST1/ST2 quimérica (Seq ID No: 212)	3 x 1,0 µg	Aguja (OspA-ST1)	0/10***	0/10***
Vacuna de combinación:				
Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID No: 186)	3 x 1,0 µg	Aguja (OspA-ST1)	0/10***	0/10***
Lip-S4D1-S3D1 (Seq ID No: 194)	3 x 1,0 µg			
Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID No: 190)	3 x 1,0 µg			
Adyuvante de Al(OH) <sub>3</sub> en solitario	-	Aguja (OspA-ST1)	10/10	10/10
<i>Valor de p:</i> prueba exacta de Fisher, dos colas. *significativo (<0,05), **muy significativo (<0,01), ***extremadamente significativo (<0,001)				

### Ejemplos

10

#### Ejemplo 1. Evaluación de la estabilidad térmica de fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2

##### Procedimientos experimentales

15 *Estabilidad térmica*

Las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de los monómeros de fragmento mutante no lipidado de OspA de serotipo 2 se determinaron mediante el ensayo de cambio térmico basado en fluorescencia descrito por Pantoliano, et al. (J. Biomol Screen 6:429-440 (2001)). La tinción con tinte fluorescente en gel de proteína SYPRO® Orange (proporcionado como un concentrado de 5000x en DMSO por Sigma, Estados Unidos) se usó para controlar el despliegue de proteínas. En cada pocillo, se combinaron 7,5  $\mu$ l de SYPRO® Orange (diluido a 1:1000 a partir de la solución madre) y 17,5  $\mu$ l de una solución de proteína (1  $\mu$ g o 2  $\mu$ g) en tampón. Las muestras de proteína se calentaron desde 25 °C a 95 °C a una velocidad de 0,2 °C/10 s en el sistema de detección en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Estados Unidos) y se controlaron los cambios fluorescentes. La intensidad de fluorescencia se midió con longitudes de onda con excitación y emisión de 490 y 575 nm, respectivamente. Se determinó la  $T_m$  usando el programa Bio-Rad CFX Manager 2.0. Los valores de  $T_m$  de los fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 marcados con His no lipidados se midieron en cuatro sistemas de tampón diferentes: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 9,0); Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 8,0); PBS (pH 7,4); y HEPES 25 mM, NaCl 150 mM (pH 6,5), usando el fragmento de tipo salvaje no lipidado de OspA de serotipo 2 (S2D0) como control.

## 15 **Resultados**

En todos los casos, los fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 con un enlace de cisteína introducido tuvieron una  $T_m$  mayor que el fragmento de tipo salvaje de OspA de serotipo 2 (S2D0) (véase la Tabla 1). La  $T_m$  se ensayó en cuatro sistemas de tampón diferentes con resultados similares (los datos para proteínas disueltas en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 8,0) se muestran en la Tabla 1), lo que indica que la estabilidad de las proteínas es similar en un amplio intervalo de pH. Este resultado respalda la hipótesis de que el enlace disulfuro introducido estabiliza el fragmento de OspA.

## 25 **Ejemplo 2 . Evaluación de la capacidad protectora de monómeros de fragmento mutante no lipidado marcado con His de OspA de serotipo 2 en el método de exposición por garrapatas (ST2, *B. afzelii*)**

### **Procedimientos experimentales**

#### 30 *Clonación y expresión de proteínas recombinantes*

El fragmento de tipo salvaje de OspA de serotipo 2, así como los fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 con enlaces de cisteína de tipos 1-5 (SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente), se sometieron a optimización por codones para la expresión de *E. coli* por GenScript, Estados Unidos. Los fragmentos mutantes no lipidados de OspA de serotipo 2 se marcaron con His en el extremo C con fines de purificación. Los fragmentos génicos se clonaron en el vector pET28b(+) (Novagen, Estados Unidos), un vector que contenía un casete de resistencia a kanamicina, así como un promotor T7. Los monómeros se expresaron en células BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Estados Unidos) a 37 °C mediante la adición de IPTG. Las células se recogieron después de 4 horas mediante centrifugación y el sedimento se almacenó a -70 °C durante hasta 12 meses antes de su procesamiento adicional.

#### 40 *Purificación de proteínas de monómeros de fragmentos no lipidados marcados con His de tipo salvaje y mutantes de OspA*

Las células se alteraron mecánicamente mediante homogeneización a alta presión y la fracción soluble que contenía los fragmentos marcados con His de OspA se aplicó a una columna de Ni-sepharose (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow; GE Healthcare, Reino Unido) y los fragmentos marcados con His de OspA se eluyeron en un gradiente de imidazol (0-250 mM). Las fracciones agrupadas se purificaron adicionalmente sobre una columna de filtración en gel (Superdex 200, GE Healthcare) seguido de una columna de intercambio de tampón (Sephadex G-25, GE Healthcare). Se agruparon picos de fragmentos marcados con His de OspA basándose en la columna analítica de exclusión por tamaño y cromatografía de fase inversa. Después de la filtración estéril, las proteínas purificadas se almacenaron a -20 °C hasta su formulación.

#### *Inmunización de ratones*

55 Se usaron ratones hembra C3H/HeN ( $H-2^k$ ) para todos los estudios (Harlan, Italia). Antes de cada exposición, se extrajo sangre de grupos de cinco ratones de 8 semanas de edad a través de la vena de la cola y se prepararon y se agruparon los sueros preinmunizados. Se ensayaron cinco proteínas de fragmento mutante no lipidado de OspA serotipo 2 (S2D1-5, SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente), en quince experimentos separados. Se administraron tres inmunizaciones subcutáneas (s.c.) de 100  $\mu$ l, a intervalos de dos semanas. Las dosis usadas

fueron de 30 y 5 µg de la proteína respectiva, ensayadas en 11 y 4 experimentos respectivamente. Todas las formulaciones incluían hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) a una concentración final del 0,15 %. Una semana después de la tercera inmunización, se recogió sangre y se prepararon sueros hiperinmunizados. En cada experimento, se incluyó un grupo inyectado con PBS formulado con Al(OH)<sub>3</sub> como control negativo, y un grupo de ratones se inmunizó con S2D0, el fragmento de tipo salvaje C-terminal de OspA a partir de la cepa K78 de *B. afzelii* (SEQ ID NO: 1). Otro grupo inmunizado con una proteína OspA de tipo salvaje no lipídada de longitud completa de *B. afzelii*, cepa K78 (SEQ ID NO: 209), también formulada con Al(OH)<sub>3</sub> al 0,15 %, se incluyó como control positivo en cada estudio animal. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la ley austriaca (BGB1 Nr. 501/1989) y aprobada por "Magistratsabteilung 58".

10

*Exposición por garrapatas de ratones inmunizados y recolección de sueros y tejidos (también mencionado en el presente documento como "método de exposición por garrapatas")*

La exposición por garrapatas de ratones inmunizados se realizó dos semanas después de la última inmunización. Para exponer a los ratones inmunizados a *B. afzelii*, se eliminó el pelo del lomo de cada ratón con crema Veet® (Reckitt Benckiser, Reino Unido) y se pegó un recipiente pequeño y ventilado a la piel con pegamento instantáneo (Pattex, Alemania). Posteriormente, se aplicaron dos ninfas por ratón de *I. ricinus* infectadas con *B. afzelii*, cepa IS1, y se les permitió acoplarse y alimentarse completamente. El estado de la alimentación se controló a diario para cada garrapata individual y se incluyeron en la lectura final solamente los ratones donde se recogió al menos una garrapata completamente alimentada. No se hizo distinción entre los ratones donde se recogieron una o dos garrapatas completamente alimentadas.

Seis semanas después de la aplicación de garrapatas, se recogió la sangre mediante hemorragia orbital y los sueros finales se prepararon y usaron para análisis por VIsE ELISA para determinar el estado de infección. Después, los ratones entonces se sacrificaron mediante dislocación cervical y se recogió una oreja de cada ratón, se extrajo el ADN y se sometió a análisis por PCR anidada para identificar *Borrelia* en el tejido.

*Lectura de infección*

Solamente se incluyeron en la lectura final del experimento los ratones en los que las garrapatas aplicadas se alimentaron completamente y pudieron recogerse. Los ratones se sacrificaron 6 semanas después de la aplicación de garrapatas y se recogieron los órganos, así como los sueros finales. La lectura de infección final se basó en dos análisis diferentes (PCR anidada dirigida al espaciador intergénico 16S-23S y VIsE (IR6) ELISA como se describen en detalle a continuación).

35

*PCR anidada dirigida al espaciador intergénico 16S-23S*

Se sometió una oreja de cada ratón a extracción y purificación de ADN usando el kit de sangre y tejido DNeasy (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la siguiente modificación. Cada oreja de dígito durante una noche a 60 °C en proteinasa K recombinante, grado PCR (Roche, 14-22 mg/ml). El ADN se eluyó en 50 µl de agua estéril desionizada y se almacenó a -20 °C hasta su análisis adicional. Como control negativo, se incluyó una columna de purificación vacía en cada extracción y purificación de ADN, y el eluato se sometió a PCR anidada. Todos los extractos de ADN se cribaron para determinar la presencia de ADN de *Borrelia* por un procedimiento de PCR anidada, que comprendía 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s usando los cebadores; Directo 5'-GTATGTTTAGTGAGGGGGGTG-3' (SEQ ID NO: 26) e Inverso 5'-GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG-3' (SEQ ID NO: 27). Del volumen de reacción de 10 µl, se usó 1 µl como plantilla para la reacción de PCR anidada. La etapa de PCR anidada comprendía 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s usando los cebadores; Directo anidado 5'-AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG-3' (SEQ ID NO: 28) e inverso anidado 5'-GTCTGATAAACCTGAGGTCGGA-3' (SEQ ID NO: 29). Del volumen final de reacción, se separaron 5 µl en un gel de agarosa al 1 % que contenía bromuro de etidio y se visualizaron las bandas en luz UV.

En cada análisis por PCR, el ADN purificado de un cultivo con crecimiento *in vitro* de cepa K78 de *B. afzelii* se usó como una plantilla de control positivo. Además, se usó PBS en lugar de ADN extraído como control negativo. Se separaron cinco microlitros del producto final en un gel de agarosa al 1 % que contenía bromuro de etidio y se visualizaron las bandas en luz UV.

*ELISA con la región invariable 6 (IR6) de la proteína de secuencia E variable de tipo proteína principal (VIsE)*

Se usó un péptido 25-mer biotilado (MKKDDQIAAMVLRGMAKDGQFALK) (SEQ ID NO: 30) derivado de la secuencia de la cepa IP90 de *B. garinii* para el análisis (Liang FT, et al. (1999) J Immunol. 163:5566-73). Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos precubiertas con estreptavidina (Nunc, Dinamarca) con 100 µl/pocillo (1 µg/ml) de péptido biotilado en PBS complementado con Tween 20 al 0,1 % (PBS/0,1T). Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C. Después del recubrimiento con el péptido, las placas se lavaron una vez con PBS/0,1T. Las placas se bloquearon entonces durante una hora a temperatura ambiente (TA) con 100 µl/pocillo de PBS + BSA al 2 %, antes del lavado de nuevo con PBS/0,1T. Se evaluó la reactividad después de la exposición de los sueros al péptido con diluciones de 1:200, 1:400 y 1:800 en PBS + BSA al 1 %. Las placas se incubaron durante 90 min a TA antes de lavarlas tres veces con PBS/0,1T. Cada pocillo recibió entonces 50 µl de 1,3 µg/ml de IgG anti-ratón policlonal de conejo conjugada con HRP (Dako, Dinamarca) en PBS + BSA al 1 %. Las placas se incubaron entonces durante 1 h a TA. Después de tres lavados con PBS/0,1T, se añadió ABTS (50 µl/pocillo) como sustrato (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se dejó que se desarrollara color durante 30 min. Se midió la absorbancia a 405 nm. Todos los sueros se ensayaron por duplicado; los controles negativos incluían PBS en lugar de sueros, así como placas no recubiertas con el péptido. Los sueros de ratones que se mostró que eran positivos por cultivo para la infección por *B. afzelii* se usaron como controles positivos.

### Resultados

#### Niveles de protección en el método de exposición por garrapatas

Se observaron niveles elevados de protección para los cinco fragmentos estabilizados de OspA de *B. afzelii* con ambas dosis ensayadas (30 µg y 5 µg, véase la Tabla 2). Las tasas elevadas de infección en el grupo de control con PBS indican que las garrapatas se infectaron con frecuencia alta. Adicionalmente, el control positivo, OspA de longitud completa no lipídada de la cepa K78 de *B. afzelii*, fue muy protectora. Estos grupos de control juntos indican la fiabilidad elevada de la lectura experimental.

Los resultados de protección a partir de experimentos que ensayan las dosis de 30 µg (11 experimentos en total) y las dosis de 5 µg (4 experimentos en total) se resumen en la Tabla 2. Los dos métodos empleados para verificar la infección, concretamente, VisE ELISA y PCR anidada, dieron resultados prácticamente idénticos (datos no mostrados), lo que demuestra la robustez de estos métodos de lectura para evaluar la infección en el método de exposición por garrapatas.

**Ejemplo 3. Evaluación de la capacidad protectora de monómeros del fragmento mutante lipídado marcado con His de OspA de serotipo 2 contra exposición a *Borrelia in vivo* a través del método por exposición por garrapatas (ST2, *B. afzelii*)**

#### Procedimientos experimentales

##### Clonación y expresión de proteínas de fragmento mutante de OspA lipídado marcado con His

Los fragmentos mutantes de OspA de serotipo 2 con enlaces de cisteína de tipos 1, 3 y 4 (SEQ ID NOs: 141, 143 y 144, respectivamente) se modificaron mediante la adición de una secuencia señal de lipídación derivada de OspA (SEQ ID NO: 14) y seguida directamente C-terminal por un péptido CKQN (SEQ ID NO: 211) para proporcionar una cisteína N-terminal para la lipídación. Todos los fragmentos mutantes de OspA se marcaron con histidina en el extremo C con fines de purificación. Los fragmentos génicos se clonaron en el vector pET28b(+) (Novagen), un vector que contenía un casete de resistencia a kanamicina, así como un promotor T7. Los monómeros lipíados se expresaron en células BL21 Star™(DE3) (Invitrogen) y después de la inducción por IPTG, la temperatura de crecimiento de las células disminuyó de 37 °C a 25 °C para promover el procesamiento postraduccional eficaz de las proteínas. Las células se recogieron después de 4 horas mediante centrifugación y el sedimento se almacenó a -70 °C durante hasta 12 meses antes de su procesamiento adicional.

##### Purificación de proteínas de monómeros de fragmentos lipíados marcados con His de tipo salvaje y mutantes de OspA

Las células se alteraron mecánicamente mediante homogeneización a alta presión y los polipéptidos de monómero de fragmento marcado con His lipídado de OspA se enriquecieron en la fase lipídica mediante separación de fases, usando Triton X-114 como detergente. Posteriormente, la fase detergente diluida (20 a 30 veces) se aplicó a una columna de Ni-sepharose (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow; GE Healthcare) y los fragmentos de OspA lipíados marcados con His se eluyeron mediante elución de gradiente de imidazol (0-250 mM). Las fracciones agrupadas se

purificaron adicionalmente sobre una columna de filtración en gel (Superdex 200, GE Healthcare) seguido de una columna de intercambio de tampón (Sephadex G-25, GE Healthcare). Se agruparon picos de fragmentos marcados con His lipidados de OspA basándose en la columna analítica de exclusión por tamaño y cromatografía de fase inversa. Después de la filtración estéril, las proteínas purificadas se almacenaron a -20 °C hasta su formulación.

5

#### *Inmunización de ratones*

Se expresaron y se purificaron tres proteínas OspA mutantes lipidadas (Lip-S2D1-His, Lip-S2D3-His y Lip-S2D4-His) como se ha descrito anteriormente. Se realizaron estudios de protección *in vivo* como se describe en el Ejemplo 2, usando adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo y OspA no lipidadada de longitud completa de serotipo 2 como control negativo y positivo, respectivamente. Todos los inmunógenos se formularon con Al(OH)<sub>3</sub> al 0,15 %. Se inyectaron los ratones por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con formulaciones que contenían 3,0 µg, 1,0 µg o 0,3 µg de antígeno y se expusieron a garrapatas infectadas con *B. afzelii* (cepa IS1) dos semanas después de la inmunización. Los ratones se sacrificaron seis semanas después de la exposición por garrapatas y se evaluó la infección.

15

#### **Resultados**

##### *Niveles de protección en el método de exposición por garrapatas*

20

Los tres fragmentos mutantes de OspA lipidados confirieron niveles muy elevados de protección a la exposición a *B. afzelii*, incluso con la dosis más pequeña evaluada (Tabla 3). Las tasas de infección en los ratones inmunizados con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo fueron elevadas, lo que indica que las garrapatas estaban infectadas a una frecuencia elevada. El antígeno de control positivo, OspA de longitud completa no lipidadada de la cepa K78 de *B. afzelii* también fue muy protector. Juntos, estos grupos de control indican la fiabilidad elevada del método de infección y, por lo tanto, proporcionan una credibilidad elevada con respecto a los resultados observados después de la inmunización con los fragmentos mutantes lipidados de OspA.

25

#### **Ejemplo 4 . E valuación de la pro tectora de he terodímeros mutante s de Os pA d e la in vención c ontra exposición a *Borrelia in vivo* a través de métodos de exposición por aguja o garrapatas.**

30

#### **Procedimientos experimentales**

##### *Clonación y expresión de heterodímeros de fragmento mutante de OspA lipidado marcado con His*

35

Los monómeros de fragmentos mutantes de OspA de *B. burgdorferi* s.s. cepa B31, *B. afzelii* cepa K78, *B. garinii* cepa PBr, *B. bavariensis* cepa PBi, *B. garinii* cepa PHEi y *B. garinii* cepa DK29 se optimizaron por codones para la expresión de *E. coli* por GenScript, Estados Unidos. El epitopo de tipo hLFA-1 (aa 164-174, SEQ ID NO: 17) de la OspA de *B. burgdorferi* s.s. cepa B31 se reemplazó por una secuencia de tipo no hLFA NFTLEGKVAND de la cepa K78 de *B. afzelii* (SEQ ID NO: 18). La secuencia señal de lipidación añadida a los heterodímeros de fragmento mutante de OspA se derivó a partir de lipoproteína (Lpp) de membrana extrema principal de *E. coli*, y fue seguida directamente C-terminal por un péptido CSS para proporcionar una cisteína N-terminal para la lipidación. Los heterodímeros de fragmento mutante de OspA se generaron mediante la fusión de diferentes monómeros de fragmento mutante de OspA como se ha descrito anteriormente a través de una secuencia de enlazador de 21 aminoácidos, que se originan a partir de dos regiones de bucle separadas de la mitad N-terminal de OspA de la cepa B31 de *B. burgdorferi* s.s. ("LN1"; aa 65-74 y aa 42-53 con un intercambio de aminoácidos de D53S, SEQ ID NO: 184). Los heterodímeros se construyeron con una etiqueta de His con fines de purificación. Los fragmentos génicos se clonaron en el vector pET28b(+) (Novagen), un vector que contenía un casete de resistencia a kanamicina, así como un promotor T7. Las lipoproteínas de los heterodímeros estabilizados se expresaron en células BL21 Star™(DE3) (Invitrogen) y después de la inducción por IPTG, la temperatura de crecimiento de las células disminuyó de 37 °C a 25 °C para promover el procesamiento postraducciona eficaz de las proteínas. Las células se recogieron después de 4 horas mediante centrifugación y el sedimento se almacenó a -70 °C durante hasta 12 meses antes de su procesamiento adicional.

45

50

##### *Purificación de heterodímeros de fragmento mutante de OspA lipidado marcado con His*

55

Las células se alteraron mecánicamente mediante homogeneización a alta presión y los heterodímeros de fragmento mutante marcado con His lipidado de OspA se enriquecieron en la fase lipídica mediante separación de fases, usando Triton X-114 como detergente. Posteriormente, la fase detergente diluida (20 a 30 veces) se aplicó a una

columna de Ni-sepharose (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow; GE Healthcare) y los heterodímeros de OspA lipidados marcados con His se eluyeron mediante elución de gradiente de imidazol (0-250 mM). Las fracciones agrupadas se purificaron adicionalmente sobre una columna de filtración en gel (Superdex 200, GE Healthcare) seguido de una columna de intercambio de tampón (Sephadex G-25, GE Healthcare). Se agruparon los picos de heterodímeros mutantes marcados con His lipidados de OspA basándose en la columna analítica de exclusión por tamaño y cromatografía de fase inversa. Después de la filtración estéril, los heterodímeros purificados se almacenaron a -20 °C hasta su formulación.

#### Clonación y expresión de heterodímeros de fragmento mutante de OspA lipidado no marcado con His

Las construcciones hechas como se ha descrito anteriormente se usaron para la generación de construcciones sin una etiqueta de His, mediante la introducción de un codón de terminación mediante amplificación por PCR. Los fragmentos génicos se clonaron en el vector pET28b(+) (Merck Millipore), un vector que contenía un casete de resistencia a kanamicina, así como un promotor T7. Las lipoproteínas de los heterodímeros estabilizados se expresaron en células BL21 Star™(DE3) (Invitrogen) y después de la inducción por IPTG, la temperatura de crecimiento de las células disminuyó de 37 °C a 25 °C para promover el procesamiento postraduccional eficaz de las proteínas. Las células se recogieron después de 4 horas mediante centrifugación y el sedimento se almacenó a -70 °C durante hasta 12 meses antes de su procesamiento adicional.

#### Purificación de heterodímeros de fragmento mutante de OspA lipidado no marcado con His

Las células se alteraron mecánicamente mediante homogeneización a alta presión y los heterodímeros de fragmento mutante lipidado de OspA se enriquecieron en la fase lipídica mediante separación de fases, usando Triton X-114 como detergente. Posteriormente, la fase de detergente diluido se sometió a cromatografía de intercambio aniónico ejecutada en modo sin unión. El flujo resultante se cargó en una columna de hidroxipatita (Bio-Rad) y las proteínas lipidadas se eluyeron a partir de una columna mediante un gradiente de sal no lineal. El eluato se sometió a purificación adicional sobre una columna de DEAE-Sepharose (GE Healthcare) en modo sin unión, seguida de columna de filtración en gel (Superdex 200, GE Healthcare) para el intercambio de tampón. Se agruparon los picos de heterodímeros mutantes lipidados de OspA basándose en la columna analítica de exclusión por tamaño y SDS-PAGE. Después de la filtración estéril, los heterodímeros purificados se almacenaron a -20 °C hasta su formulación.

#### Inmunización de ratones

Se usaron ratones C3H/HeN hembra (Janvier, Francia) para todos los estudios. Antes de cada exposición, se extrajo sangre de grupos de diez ratones de 8 semanas de edad a través de la vena facial y se prepararon y se agruparon los sueros preinmunizados. Se administraron tres inmunizaciones subcutáneas (s.c.) de 100 µl cada una, a intervalos de dos semanas. Cada dosis contenía la cantidad de inmunógeno indicada en la Tabla 4 (dosis), formulada con hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) a una concentración final del 0,15 %. Una semana después de la tercera inmunización, se recogió sangre de la vena facial y se prepararon sueros hiperinmunizados. En cada experimento, un grupo inmunizado con Al(OH)<sub>3</sub> solo se incluyó como control negativo. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la ley austriaca (BGB1 Nr. 501/1989) y aprobada por "Magistratsabteilung 58".

#### Exposición por garrapatas de ratones inmunizados y recolección de sueros y tejidos (también mencionado en el presente documento como "método de exposición por garrapatas")

Para exponer a los ratones inmunizados a *B. afzelii*, se eliminó el pelo del lomo de cada ratón con crema Veet® (Reckitt Benckiser) y se pegó un recipiente pequeño y ventilado a la piel con pegamento instantáneo (Pattex). Posteriormente, se aplicaron dos ninfas por ratón de *I. ricinus* infectadas con *B. afzelii*, cepa IS1, y se les permitió acoplarse y alimentarse hasta que se dilataron por completo y se cayeron. El estado de la alimentación se controló a diario para cada garrapata individual y se incluyeron en la lectura final solamente los ratones de los que se recogió al menos una garrapata completamente alimentada.

#### Exposición por aguja de ratones inmunizados con *Borrelia* cultivada in vitro

Dos semanas después de la última inmunización, se expuso por vía s.c. a los ratones con *Borrelia* diluida en 100 µl de medio de crecimiento de *Borrelia* (BSK II). Las dosis de exposición dependieron de la cepa, donde la virulencia de las cepas individuales se evaluó mediante experimentos de exposición para la determinación de la ID<sub>50</sub>. Las dosis empleadas para los experimentos de exposición por aguja variaron de 20 a 50 veces la ID<sub>50</sub>.

*Sacrificio de ratones y recolección de material*

5 Cuatro semanas después de la exposición por aguja con la *Borrelia* spp. indicada, o seis semanas después de la exposición por garrapatas con *B. afzelii*, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se recogió la sangre mediante hemorragia orbital y los sueros finales se prepararon y usaron para VIsE ELISA para determinar el estado de infección. Además, se recogió una oreja de cada ratón, y se extrajo el ADN y se sometió a PCR cuantitativa (qPCR) para la identificación de *Borrelia*. La lectura de infección final se basó en dos análisis diferentes (VIsE ELISA y qPCR dirigida a recA).

10

*ELISA con región invariable 6 (IR6) de VIsE*

Se usó un péptido 25-mer biotinilado (MKKDDQIAAAMVLRGMAKDGQFALK) derivado de la secuencia de la cepa IP90 de *B. garinii* para el análisis (Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT. An immunodominant conserved region within the variable domain of VIsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. J Immunol. 1999;163:5566-73). Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos precubiertas con estreptavidina (Nunc) con 100 µl/pocillo (1 µg/ml) de péptido en PBS complementado con Tween al 0,1 % (PBS/0,1T). Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C. Después del recubrimiento con el péptido, las placas se lavaron una vez con PBS/0,1T. Las placas se bloquearon entonces durante una hora a temperatura ambiente (TA) con 100 µl/pocillo de PBS + BSA al 2 %, antes del lavado de nuevo con PBS/0,1T. Se evaluó la reactividad después de la exposición de los sueros al péptido con diluciones de 1:200, 1:400 y 1:800 en PBS + BSA al 1 %. Las placas se incubaron durante 90 min a TA antes de lavarlas tres veces con PBS/0,1T. Cada pocillo recibió entonces 50 µl de 1,3 µg/ml de IgG anti-ratón policlonal de conejo conjugada con HRP (Dako) en PBS + BSA al 1 %. Las placas se incubaron entonces durante 1 h a TA. Después de tres lavados con PBS/0,1T, se añadió ABTS (50 µl/pocillo) como sustrato (Sigma-Aldrich) y se dejó que se desarrollara color durante 30 min. Se midió la absorbancia a 405 nm. Todos los sueros se ensayaron por duplicado. Los controles negativos incluían PBS en lugar de sueros, así como placas no recubiertas con el péptido. Los sueros de ratones que se mostró que eran positivos por cultivo para la infección por *B. afzelii* se usaron como controles positivos.

*qPCR dirigida a recA*

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos para el gen *recA* de manera que pudieran ser usados en qPCR para identificar todas las especies relevantes de *Borrelia* que causan borreliosis de Lyme (directo: CATGCTCTTGATCCTGTTTA, inverso: CCCATTTCTCCATCTATCTC). El fragmento de *recA* se clonó a partir de la cepa N40 de *B. burgdorferi* s.s. en pET28b(+), para usarse como estándar para cada reacción. El ADN cromosómico extraído de las orejas de ratón se diluyó 1:8 en agua para reducir los efectos de matriz observados con el ADN no diluido. Se preparó una mezcla maestra que consistía en 10 µl de SSoAdvanced™ SYBR® Green Supermix, 0,3 µl de cada cebador (10 µM), y 7,4 µl de agua para cada experimento. Se mezclaron dieciocho µl de mezcla maestra con 2 µl del extracto de ADN diluido de cada vejiga u oreja en placas de microtitulación, y se amplificó el ADN usando el sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Estados Unidos). Se desnaturalizó el ADN durante 3 minutos a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 30 segundos a 55 °C. Después de la amplificación, el ADN se preparó para el análisis de la curva de fusión mediante desnaturalización por 30 segundos a 95 °C seguido de 2 minutos a 55 °C. El análisis de la curva de fusión se realizó mediante una incubación de 5 segundos a 55 °C, con un aumento de 0,5 °C por ciclo, y 5 segundos a 95 °C. En cada placa, se incluyeron cuatro controles no plantilla (NTC), así como una curva estándar por duplicado con las cantidades de copia de plantilla en el intervalo de 10 a 10.000.

**Resultados**

50 Se ensayaron los heterodímeros del fragmento mutante lipidado de OspA para determinar su capacidad protectora en doce experimentos separados. Se expuso a los ratones a *B. burgdorferi* s.s., cepa N40, OspA de serotipo 1 (ST1, exposición por aguja) o *B. afzelii* cepa IS1, OspA de serotipo 2 (ST2, exposición por garrapata) en tres experimentos cada vez o *B. bavariensis*, cepa Scf, OspA de serotipo 4 (ST4, exposición por aguja), *B. garinii*, cepa "A", OspA de serotipo 5 (ST5, exposición por aguja) o *B. garinii*, cepa "B", OspA de serotipo 6 (ST6, exposición por aguja) en dos experimentos cada vez. En todos los experimentos, un grupo de ratones inmunizados con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo sirvió como grupo de control negativo. Para la exposición por garrapatas, se aplicaron 1-2 garrapatas por ratón y únicamente los ratones de los cuales una garrapata se alimentó hasta la dilatación total se incluyeron en la lectura final. Sin embargo, no se realizó distinción entre los ratones de los cuales se recogieron una o dos garrapatas completamente alimentadas. Los datos de protección de los doce experimentos se resumen en la Tabla 4.

El heterodímero de OspA marcado con His lipidado (Lip-S1D1-S2D1-His) mostró una protección elevada estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher de dos colas) en la totalidad de los seis experimentos tanto contra la exposición al serotipo 1 de OspA como al serotipo 2 de OspA, en comparación con el grupo de control negativo. Sorprendentemente, la inmunización con Lip-S4D1-S3D1-His y Lip-S5D1-S6D1-His también confirió una capacidad protectora elevada contra la exposición al serotipo 2 de OspA (Experimentos 4-6), lo que indica que puede haber un efecto de protección cruzada de inmunización con otros serotipos de los fragmentos mutantes de OspA. Además, la inmunización con Lip-S4D1-S3D1 confirió una protección estadísticamente significativa contra exposición por aguja con el serotipo 4 de OspA de *Borrelia* (Experimentos 7 y 8). Finalmente, la inmunización con Lip-S5D1-S6D1-His confirió protección contra exposición por aguja tanto con el serotipo 5 de OspA (Experimentos 9 y 10) y el serotipo 6 de OspA (Experimentos 11 y 12). El estado infeccioso de cada ratón se determinó usando VIsE ELISA en combinación con qPCR de *recA*. Se consideró que un ratón estaba infectado cuando al menos uno de los métodos daba un resultado positivo.

En conclusión, la inmunización con polipéptidos del heterodímero del fragmento mutante de OspA de la invención confiere protección contra los serotipos de *Borrelia* ensayados y también puede proporcionar protección cruzada en algunos casos.

El heterodímero de OspA marcado con His lipidado (Lip-S1D1-S2D1-His) mostró una protección elevada estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher de dos colas) en la totalidad de los seis experimentos tanto contra la exposición al serotipo 1 de OspA como al serotipo 2 de OspA, en comparación con el grupo de control negativo. Sorprendentemente, la inmunización con Lip-S4D1-S3D1-His y Lip-S5D1-S6D1-His también confirió una capacidad protectora elevada contra la exposición al serotipo 2 de OspA (Experimentos 4-6), lo que indica que puede haber un efecto de protección cruzada de inmunización con otros serotipos de los fragmentos mutantes de OspA. Además, la inmunización con Lip-S4D1-S3D1 confirió una protección estadísticamente significativa contra exposición por aguja con el serotipo 4 de OspA de *Borrelia* (Experimentos 7 y 8). Finalmente, la inmunización con Lip-S5D1-S6D1-His confirió protección contra exposición por aguja tanto con el serotipo 5 de OspA (Experimentos 9 y 10) y el serotipo 6 de OspA (Experimentos 11 y 12). El estado infeccioso de cada ratón se determinó usando VIsE ELISA en combinación con qPCR de *recA*. Se consideró que un ratón estaba infectado cuando al menos uno de los métodos daba un resultado positivo.

En conclusión, la inmunización con polipéptidos del heterodímero del fragmento mutante de OspA de la invención confiere protección contra los serotipos de *Borrelia* ensayados y también puede proporcionar protección cruzada en algunos casos.

**Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad protectora de una vacuna de combinación 1:1:1 de los heterodímeros mutantes de OspA de la invención contra la exposición *in vivo* de OspA de serotipo 1 y serotipo 2 de *Borrelia* a través de los métodos de exposición por aguja o por garrapatas**

#### **Procedimientos experimentales**

##### *Inmunización de ratones*

Se usaron ratones C3H/HeN hembra (Janvier, Francia) para todos los estudios. Antes de cada exposición, se extrajo sangre de grupos de diez ratones de 8 semanas de edad a través de la vena facial y se prepararon y se agruparon los sueros preinmunizados. Se administraron tres inmunizaciones s.c. de 100 µl cada una, a intervalos de dos semanas. Los grupos de ratones se inmunizaron con la vacuna de combinación que consistía en 1 µg de cada uno de Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 y Lip-S5D1-S6D1. Otros tres antígenos a base de OspA se incluyeron en los experimentos de exposición: Lip-OspA1-His (serotipo 1 de longitud completa, OspA, lipidado y marcado con his), OspA ST1/ST2\* quimérica lipitada y Lip-S1D1-S2D1 solo. El control negativo (placebo) fue adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo. Todos los antígenos se formularon en PBS con hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) a una concentración final del 0,15 %.

\*(OspA ST1/ST2 quimérica (SEQ ID NO: 212) es una quimera de OspA que consiste en los primeros 10 aminoácidos de la porción N-terminal de OspB (cepa B31), los aminoácidos 11-200 de serotipo 1 de OspA, fusionados con los últimos 201-255 aminoácidos de la porción C-terminal de serotipo 2 de OspA y en donde la secuencia de tipo hLFA-1 del serotipo 1 de OspA (146-170) se reemplaza con la secuencia homóloga de un serotipo 2 de OspA. La secuencia de OspA de serotipo 2 va seguida de dos aminoácidos que se añaden debido al sitio de clonación (XhoI) más adelante del codón de terminación en el vector).

Una semana después de la tercera inmunización, se recogió sangre de la vena facial y se prepararon sueros hiperinmunizados. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la ley austriaca (BGB1 Nr. 501/1989) y aprobada por "Magistratsabteilung 58".

#### 5 Exposición por aguja de ratones inmunizados con *Borrelia* cultivada *in vitro*

Dos semanas después de la última inmunización, se expuso por vía s.c. a los ratones con espiroquetas de *Borrelia* diluida en 100 µl de medio de crecimiento (BSKII). Las dosis de exposición dependieron de la cepa, donde la virulencia de las cepas individuales se evaluó mediante experimentos de exposición para la determinación de la ID<sub>50</sub>.

10 Las dosis empleadas para los experimentos de exposición por aguja variaron de 20 a 50 veces la ID<sub>50</sub>. Cuatro semanas después de la exposición por aguja, los ratones se sacrificaron, y se recogió sangre y tejidos para que los métodos de lectura determinaran el estado infeccioso.

15 *Exposición por garrapatas de ratones inmunizados y recolección de sueros y tejidos (también mencionado en el presente documento como "método de exposición por garrapatas")*

Para exponer a los ratones inmunizados a *B. afzelii*, se eliminó el pelo del lomo de cada ratón con crema Veet® (Reckitt Benckiser, Reino Unido) y se pegó un recipiente pequeño y ventilado a la piel con pegamento instantáneo (Pattex, Alemania). Posteriormente, se aplicaron dos ninfas por ratón de *I. ricinus* infectadas con *B. afzelii*, cepa IS1, y se les permitió acoplarse y alimentarse hasta que se dilataron por completo y se cayeron. El estado de la alimentación se controló para cada garrapata individual y se incluyeron en la lectura final solamente los ratones donde se recogió al menos una garrapata completamente alimentada.

#### Resultados

25

Los heterodímeros de fragmento mutante de OspA lipidado que no estaban marcados con His se combinaron a una relación 1:1:1 y se ensayaron para determinar la capacidad protectora contra exposición a *Borrelia*. Los ratones inmunizados se expusieron a *B. afzelii* (ST2, cepa IS1, exposición por garrapatas) o con *B. burgdorferi* s.s. (ST1, cepa ZS7, exposición por aguja) en dos experimentos cada vez. Otros antígenos a base de OspA incluían Lip-S1D1-S2D2 en los cuatro experimentos y Lip-OspA-His y OspA ST1/ST2 quimérica lipidada en los Experimentos 15 y 16.

30 Un grupo de ratones inmunizados con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo sirvió como grupo de control negativo en cada experimento. Para la exposición por garrapatas, se aplicaron 1-2 garrapatas por ratón y únicamente los ratones de los cuales una garrapata se alimentó hasta la dilatación total se incluyeron en la lectura final. Sin embargo, no se hizo distinción entre los ratones de los cuales se recogieron una o dos garrapatas completamente alimentadas. Los datos de protección de los cuatro experimentos se resumen en la Tabla 5.

La vacuna de combinación que contenía tres heterodímeros de fragmento mutante de OspA lipidado a una relación 1:1:1 confirió protección estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher de dos colas) en los cuatro experimentos de exposición en comparación con el grupo de control negativo. El estado infeccioso de cada ratón se determinó usando VisE ELISA en combinación con qPCR de *recA*. Se consideró que un ratón estaba infectado cuando al menos uno de los métodos daba un resultado positivo.

40

#### Ejemplo 6 Unión de anticuerpos de sueros de ratones inmunizados con heterodímeros de fragmento mutante de OspA a la superficie celular de *Borrelia*

45

##### Procedimientos experimentales

##### Inmunización de ratones

50 Se usaron ratones C3H/HeN hembra para todos los estudios. Antes de cada exposición, se extrajo sangre de grupos de veinte ratones de 8 semanas de edad a través de la vena facial y se prepararon y se agruparon los sueros preinmunizados. Se administraron tres inmunizaciones s.c. de 100 µl cada una, a intervalos de dos semanas. Cada dosis contenía 1 µg de cada una de las proteínas respectivas: Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 y Lip-S5D1-S6D1 (vacuna de combinación), o 1 µg de proteína OspA lipidada de longitud completa (ST1-ST6 como se indica) o 1 µg de heterodímero de OspA solo (Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 o Lip-S5D1-S6D1, como se indica) en adyuvante con hidróxido de aluminio a una concentración final del 0,15 %. El control negativo (placebo) fue adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub> solo. Una semana después de la tercera inmunización, se recogió sangre de la vena facial y se prepararon sueros hiperinmunizados. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la ley austriaca (BGB1 Nr. 501/1989) y aprobada por "Magistratsabteilung 58".

55

*Citometría de flujo para evaluar la unión a Borrelia*

Se mezclaron espiroquetas ( $1 \times 10^6$ ) con un volumen igual de paraformaldehído al 4 % y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos (Nunc) durante 5 minutos a 2.000 g y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron con 150  $\mu$ l de HBSS con BSA al 2 % (HBSS-B), se centrifugaron como anteriormente y se desechó el sobrenadante. Los sueros de ratón se inactivaron con calor incubándolos a 56 °C durante 35 minutos. Los sueros inactivados con calor se diluyeron en HBSS-B y se filtraron de manera estéril mediante centrifugación a 4.000 g durante 3 minutos usando filtros de tubo de centrifuga Costar spin-10 X (0,22  $\mu$ m, Corning, Estados Unidos). Las espiroquetas se disolvieron en 100  $\mu$ l de suero y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa se centrifugó durante 15 minutos a 2.000 g y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con 150  $\mu$ l de HBSS-B y entonces se disolvieron en 100  $\mu$ l de HBSS-B. Se añadió un microlitro de anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra conjugado con PE, Beckman Coulter, Estados Unidos) a las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos en la oscuridad. Las espiroquetas se lavaron una vez con 150  $\mu$ l de HBSS-B y después de disolvieron en 200  $\mu$ l de HBSS que contenía 2,5  $\mu$ m de tinte de ADN SYTO-17 y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las espiroquetas teñidas se sedimentaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 2.000 g y posteriormente se disolvieron en 200  $\mu$ l de HBSS. Las espiroquetas marcadas se midieron en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter), y se controlaron para verificar eventos positivos a SYTO-17. Los valores obtenidos con sueros del grupo inmunizado con placebo se restaron de los valores observados con sueros de los grupos inmunizados con heterodímero para controlar la unión no específica.

**Resultados**

La unión de anticuerpos a partir de suero de ratón hiper inmunizados se observó en el caso de diferentes *Borrelias* que expresaban los seis serotipos de OspA, lo que indica que los anticuerpos generados en respuesta a todos los antígenos son funcionalmente activos y pueden unirse a OspA natural *in situ*. La intensidad de fluorescencia fue lineal durante un intervalo prolongado de diluciones de suero. Para la mayoría de los serotipos de OspA, se observó que la intensidad de fluorescencia con sueros generados por heterodímeros era similar a la intensidad de fluorescencia observada con sueros generados con OspA lipídada de longitud completa.

**Ejemplo 7 Estudios de formulación**

Se realizaron estudios relacionados con la formulación de la vacuna de combinación de la invención para optimizar la estabilidad. Se ensayaron diferentes tipos de tampones y estabilizadores a diversas concentraciones, en combinación con hidróxido de aluminio y antígeno. Se determinó una formulación óptica de 40  $\mu$ g/ml de cada uno de tres heterodímeros (120  $\mu$ g de proteína total), fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, L-metionina 10 mM, sacarosa al 5 %, Tween 20 al 0,05 % (polisorbato 20) e hidróxido de aluminio al 0,15 % (p/v) a pH 6,7  $\pm$  0,2.#

**40 SECUENCIAS**

SEQ ID NO: 1

S2D0-His: aminoácidos de las posiciones 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2, secuencia de tipo salvaje, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE

45 LKNALKGLEHHHHHH

SEQ ID NO: 2

S2D1-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 (aa 182 y 269), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE

50 LCNALKGLEHHHHHH

SEQ ID NO: 3

S2D2-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 2 (aa 182 y 272), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNAC~~K~~GLEHHHHHH

SEQ ID NO: 4

S2D3-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 3 (aa 244 y 259), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDE  
LKNALKGLEHHHHHH

5

SEQ ID NO: 5

S2D4-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 (aa 141 y 241), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALKGLEHHHHHH

10

SEQ ID NO: 6

S2D5-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 5 (aa 165 y 265), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKCDE  
LKNALKGLEHHHHHH

SEQ ID NO: 7

S2D6-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 6 (aa 185 y 272), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTCTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNACKGLEHHHHHH

15

SEQ ID NO: 8

S2D7-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 7 (aa 199 y 223), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
CALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTCTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALKGLEHHHHHH

20

SEQ ID NO: 9

S2D8-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 8 (aa 243 y 262), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTCTVQKYDSAGTNLEGTAVECKTLD  
ELKNALKGLEHHHHHH

25

SEQ ID NO: 10

S2D9-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 9 (aa 184 y 204), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGCVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDCNNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALKGLEHHHHHH

30

SEQ ID NO: 11

S2D10-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 10 (aa 201 y 214), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VACNDTNTTQATKKTCAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALKGLEHHHHHH

SEQ ID NO: 12

S2D11-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 11 (aa 246 y 259), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVCKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDE  
LKNALKGLEHHHHHH

35

SEQ ID NO: 13

S2D12-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 12 (aa 167 y 178), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTCEGKVANDKVTCEVKEGTVTLSKEIAKSGEV  
TVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
ELKNALKGLEHHHHHH

40

SEQ ID NO: 14  
 Señal de lipidación de OspA de *Borrelia*  
 MKKYLLGIGLILALIA

5 SEQ ID NO: 15  
 Señal de lipidación de OspB de *Borrelia*  
 MRLIGFALALALIG  
 SEQ ID NO: 16  
 Señal de lipidación lpp de *E. coli*  
 MKATKLVLGAVILGSTLLAG

10 SEQ ID NO: 17  
 secuencia de tipo hLFA-1 de *B. burgdorferi* s.s. cepa B31  
 GYVLEGLTAE  
 SEQ ID NO: 18  
 Secuencia de tipo no hLFA-1 de *B. afzelii* cepa K78

15 NFTLEGLKVAND  
 SEQ ID NO: 19  
*B. afzelii* (cepa K78; OspA de serotipo 2)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVDKIELKGTSDK  
 DNGSGVLEGTKDDKSKAKLTIADDLSKTTFFELFKEDGKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGELSAKT  
 MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGLKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDT  
 NTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 20

20 *B. burgdorferi* s.s. (cepa B31, OspA de serotipo 1)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSK  
 NNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIIT  
 RADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYVLEGLTAEKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDS  
 SAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVAEITKLDEIKNALK  
 SEQ ID NO: 21

*B. garinii* (cepa PBr, OspA de serotipo 3)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSK  
 KNSGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIKEDGKTLVSRKVNSKDKSSTEEKFNKDKGLSEKV  
 VTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGLTLDGGETKLVTEGTVTLSKNISKSGEITVALNDT  
 ETPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK  
 SEQ ID NO: 22

25 *B. bavariensis* (cepa PBi, OspA de serotipo 4)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSMATVDEKLELKGTSK  
 KNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFEIKEDGKTLVSKKVNKDKSSTEEKFNKDKGLSEKTL  
 RANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGLTADKTTLVKTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNST  
 QATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 23

*B. garinii* (cepa PHei, OspA de serotipo 5)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSK  
 KNSGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKGEISEKTIV  
 RANGTRLEYTDIKSDGTGKAKEVLKDFLEGLTADGKTTLVKTEGTVTLSKNISKSGEITVALDDTDS  
 SGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK  
 SEQ ID NO: 24

30 *B. garinii* (cepa DK29, OspA de serotipo 6)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATVDEKLELKGTSK  
 NNGSGTLEGEKTDKSKVKSTIADDLSQTKFEIKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNKDKGETSEKTIV  
 RANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGLTADGKTTLVKTEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDT  
 TRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK  
 SEQ ID NO: 25

35 *B. garinii* (cepa T25, OspA de serotipo 7)  
 MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVDEKLELKGTSK  
 NNGSGVLEGVKAAKSKAKLTIADDLSQTKFEIKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNKDKGLSEKVV  
 TRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGLTADGETKLTVEAGTVTLSKNISESGEITVELKDETE  
 TTPADKKSSTWDSKTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSVAEIKDLAELKAALK  
 SEQ ID NO: 26

Cebador directo  
 GTATGTTTAGTGAGGGGGGTG

40 SEQ ID NO: 27

Cebador inverso  
 GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG  
 SEQ ID NO: 28  
 Cebador directo anidado  
 5 AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG  
 SEQ ID NO: 29  
 Cebador anidado inverso  
 GTCTGATAAACCTGAGGTCCGA  
 SEQ ID NO: 30  
 10 péptido 25 mer  
 MKKDDQIAAAMVLRGMAKDGQFALK  
 SEQ ID NO: 31  
 Catelina de ratón  
 RLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVQPPE  
 15 SEQ ID NO: 32  
 5'-(dIdC)<sub>13</sub>-3'  
 dIdC  
 SEQ ID NO: 33  
 péptido KLK  
 20 KLKLLLLLKLK  
 SEQ ID NO: 34  
*B. afzelii* (cepa K78, serotipo 2), OspA aa 126-273  
 FNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAK  
 SGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEI  
 KTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 35  
 25 *B. afzelii* (cepa K78, serotipo 2), OspA aa 131-273  
 ELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
 VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
 LKNALK  
 SEQ ID NO: 36  
 enlazador peptídico  
 30 GGGGGGGG  
 SEQ ID NO: 37  
 enlazador peptídico  
 GGGGGGGGGGGG  
 SEQ ID NO: 38  
 enlazador peptídico  
 35 GAGA  
 SEQ ID NO: 39  
 enlazador peptídico  
 GAGAGAGA  
 SEQ ID NO: 40  
 enlazador peptídico  
 GAGAGAGAGAGA  
 SEQ ID NO: 41  
 enlazador peptídico  
 GGGSGGGS  
 45 SEQ ID NO: 42  
 enlazador peptídico  
 GGGSGGGS  
 SEQ ID NO: 43  
 50 S1D4-S2D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA serotipos 1 y 2 ambos con enlace disulfuro  
 de tipo 4, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de  
 tipo no hLFA-1

NFTLEGKVAND  
 FNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGKISDGSKGAKKEVLKNFTLEGKVANDKTTLLVVKEGTVTLKSNISKS  
 GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEIT  
 KLDEIKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMTRCCTGKLEYTEMKSDGTGKAKE  
 VLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLKSKIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNS  
 KKTTLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 44

5 Lip-S1D4-S2D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de OspA de serotipos 1 y 2 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND  
 ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGGCGCACCCGTCT  
 GGAATACACCCGGCATTAAATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGA

GCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAAAAGACGGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAAA  
 AAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACG  
 GTACCAAAGTGAAGGCTCTGCGGTGAAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAAGTGAATAT  
 ACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCCGTAAAGCGAAAAGATTCTGAAAAACTTTACCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAATGACAAAGTCAACCTGGAAGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAGA  
 AATTGCAAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAG  
 AAAACCGGCGCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTAAACAGCAAGAAAACCA  
 CGCAGCTGGTCTTCACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCAA  
 CCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA  
 SEQ ID NO: 45

10 Lip-S1D4-S2D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 1 y 2 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGKISDGSKGAKKEVLKNFTLEGKVANDKTTLLVVKEGTVTLK  
 NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEG  
 SAVEITKLDEIKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMTRCCTGKLEYTEMKSDGT  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLKSKIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
 TISVNSKKTTLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 46

15 Lip-S1D4-S2D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 1 y 2 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ÁTGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGGCGCACCCGTCT  
 GGAATACACCCGGCATTAAATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAAAAGACGGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAAA  
 AAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACG  
 GTACCAAAGTGAAGGCTCTGCGGTGAAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAAGTGAATAT  
 ACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCCGTAAAGCGAAAAGATTCTGAAAAACTTTACCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAATGACAAAGTCAACCTGGAAGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAGA  
 AATTGCAAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAG  
 AAAACCGGCGCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTAAACAGCAAGAAAACCA  
 CGCAGCTGGTCTTCACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCAA  
 CCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCCTC  
 GAGCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 47

20 S1D1-S2D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por

la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND  
 FNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVVKCGTVTLKSNISKS  
 GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEIT  
 KLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKE  
 VLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLSKEIAKSGEVTVLNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNS  
 KKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCLNALK  
 SEQ ID NO: 48

5 Lip-S1D1-S2D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCCGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAGAAAACCGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAG  
 AAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGG  
 TACCAAAGTGAAGGCTCCGCTGTGGAAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAG  
 GTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 AACGAAAAGGCGAAGTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAAAGTGAATATA  
 CGGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAGCGAAAGAAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGG  
 CAAAGTCGCCAATGACAAAGTACCCTGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAGAA  
 ATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGA  
 AAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACAC  
 GCAGCTGGTCTTACCAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAAC  
 CTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA  
 SEQ ID NO: 49

10 Lip-S1D1-S2D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVVKCGTVTLK  
 NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEG  
 SAVEITKLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGT  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLSKEIAKSGEVTVLNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
 TISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCLNALKGLEHHHHHH  
 SEQ ID NO: 50

15 Lip-S1D1-S2D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCCGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAGAAAACCGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAG  
 AAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGG  
 TACCAAAGTGAAGGCTCCGCTGTGGAAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAG  
 GTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 AACGAAAAGGCGAAGTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAAAGTGAATATA  
 CGGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAGCGAAAGAAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGG  
 CAAAGTCGCCAATGACAAAGTACCCTGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAGAA  
 ATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGA  
 AAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACAC  
 GCAGCTGGTCTTACCAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAAC  
 CTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCCTCG  
 AGCACCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 51

20 S3D4-S4D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1

FNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTEGTVLSKNIS  
KSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPA

EIKDLAELKAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAK  
EVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWKWSNTSTLTISVN  
SKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK  
SEQ ID NO: 52

- 5 Lip-S3D4-S4D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 3 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCGCT  
GGAATACACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCC  
CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG  
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCC  
GGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCG  
CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTACCAGAAAGATGCACGATCACCGTGACGAACTATAATCGTG  
CCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCAC  
TGAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTA  
CTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGTCGGAAAAAACCTCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCGCTG  
GAATACACGGAAATCAAGTCCGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTC  
TGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGA  
GCAAACATATTCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCG  
ACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAAGTCAACTCGAAAA  
GACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGGTA  
CCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGAAATCAAAAACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAG  
SEQ ID NO: 53

- 10 Lip-S3D4-S4D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHH)

LipCSSFNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTEGTVL  
SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALE  
GSPAIEIKDLAELKAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGT  
GKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWKWSNTSTL  
TISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 54

- 15 Lip-S3D4-S4D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCGCT  
GGAATACACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCC  
CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG  
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCC  
GGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCG  
CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTACCAGAAAGATGCACGATCACCGTGACGAACTATAATCGTG  
CCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCAC  
TGAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTA  
CTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGTCGGAAAAAACCTCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCGCTG  
GAATACACGGAAATCAAGTCCGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTC  
TGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGA  
GCAAACATATTCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCG  
ACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAAGTCAACTCGAAAA  
GACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGGTA  
CCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGAAATCAAAAACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAGGG  
TCTCGAGCACCACCACCACCAC  
SEQ ID NO: 55

- 20 S3D1-S4D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 3 y 4 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNEKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTVTLKSNIS  
 KSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA  
 EIKDLAELCAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAK  
 EVLKDFALEGLAADKTTLLKVTCTVVLKSHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWKDSNTSTLTISVN  
 SKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLNALK  
 SEQ ID NO: 56

Lip-S3D1-S4D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 3 y 4 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

5

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAGAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCT  
 GGAATACACGGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCC  
 CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACG  
 CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCC  
 GGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAATCG  
 CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTACCAGAAAGAAAACACGATCACCGTGACAGAACTATAATCGTGC  
 CGGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACT  
 GAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTAC  
 TCATTCAACGCTAAAGGTGAAGTGAAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCTGG  
 AATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGTCTG  
 GAAGTACCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGC  
 AAACATATTCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAAC  
 CAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAAGTCAACTCGAAAAAGA  
 CCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACC  
 AACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAACCCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAG  
 SEQ ID NO: 57

Lip-S3D1-S4D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 3 y 4 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

10

LipCSSFNEKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTVTL  
 SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALE  
 GSPAEIKDLAELCAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGT  
 GKAKEVLKDFALEGLAADKTTLLKVTCTVVLKSHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWKDSNTSTL  
 TISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 58

Lip-S3D1-S4D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 3 y 4 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

15

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAGAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCT  
 GGAATACACGGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCC  
 CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACG  
 CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCC  
 GGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAATCG  
 CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTACCAGAAAGAAAACACGATCACCGTGACAGAACTATAATCGTGC  
 CGGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACT  
 GAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTAC  
 TCATTCAACGCTAAAGGTGAAGTGAAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCTGG  
 AATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGTCTG  
 GAAGTACCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGC  
 AAACATATTCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAAC  
 CAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAAGTCAACTCGAAAAAGA  
 CCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACC  
 AACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAACCCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAGGGTC

TCGAGCACCACCACCACCACCAC

SEQ ID NO: 59

20

S5D4-S6D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 5 y 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1

FNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVTEGTVLTKNLSKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEKGAVEITTLKELKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVTEGTVLTKNLSKSGEITVALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEKGAVEITTLKELKNALK  
SEQ ID NO: 60

Lip-S5D4-S6D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 5 y 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

5  
ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAACCATTGTGCGTGCGTGCGTGGCACCCGTCT  
GGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
TGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGC  
TGTCACAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
CAACAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAAACTATGATAGCGCAG  
GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
GGTACTAGTGACAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
CAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTCCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATAC  
ACGGATATCAAGTCGGATGGTTCCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAG  
GTACCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAA  
AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTAC  
GAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACTCCCAGAAA  
ACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGGGGCA  
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
SEQ ID NO: 61

Lip-S5D4-S6D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero OspA de serotipos 5 y 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

10  
LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVTEGTVLTKNLSKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEKGAVEITTLKELKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVTEGTVLTKNLSKSGEITVALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEKGAVEITTLKELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 62

Lip-S5D4-S6D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero OspA de serotipos 5 y 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

15  
ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAACCATTGTGCGTGCGTGCGTGGCACCCGTCT  
GGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
TGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGC  
TGTCACAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
CAACAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAAACTATGATAGCGCAG  
GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
GGTACTAGTGACAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
CAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTCCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATAC  
ACGGATATCAAGTCGGATGGTTCCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAG  
GTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAA

AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTAC  
GAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACTCCCAGAAA  
ACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGGGGCA  
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAAGG  
TCTCGAGCACCACCACCACCAC  
SEQ ID NO: 63

20  
S5D1-S6D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVTLKSNISKS  
 GEITVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITT  
 LKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVL  
 KDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQ  
 KTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK  
 SEQ ID NO: 64

Lip-S5D1-S6D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

5

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
 TGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGC  
 TGTCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
 CAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
 AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAG  
 GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATA  
 TACGGACATTAATCGGACGGCAGCGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAA  
 GGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCA  
 AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTA  
 CGAAAAAGACCGGTAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACTCCCAGAA  
 AACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGC  
 ACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 SEQ ID NO: 65

Lip-S5D1-S6D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

10

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVTLK  
 KNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK  
 AVEITTLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGK  
 AKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTIS  
 VNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 66

Lip-S5D1-S6D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

15

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
 TGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGC  
 TGTCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
 CAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
 AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAG  
 GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT

CAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATA  
 TACGGACATTAATCGGACGGCAGCGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAA  
 GGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCA  
 AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTA  
 CGAAAAAGACCGGTAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACTCCCAGAA  
 AACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGC  
 ACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 GTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 67

20

S2D4-S1D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1

NFTLEGKVAND

FNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAK  
SGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEI  
KTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV  
LKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSK  
KTKDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK

SEQ ID NO: 68

Lip-S2D4-S1D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

5

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACT  
GGAATATACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCAGGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
TGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTC  
AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
ACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGA  
AAACCACGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGG  
TACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAACCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA  
GGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
CAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGCTGGAATAC  
ACCGGCATTAATCGGATGGCAGCGGCAAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG  
GCAAAGTCGCAAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
CATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAA  
AAGACGGCAGCTTGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCAAAAAGACCA  
AAGATCTGGTCTTACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAA  
ACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAA

SEQ ID NO: 69

Lip-S2D4-S1D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

10

LipCSSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVT  
SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLE  
GTAVEIKTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGIKSDGS  
GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTL  
TITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALKGLEHHHHHH

SEQ ID NO: 70

Lip-S2D4-S1D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

15

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACT

20

GGAATATACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCAGGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
TGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTC  
AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
ACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGA  
AAACCACGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGG  
TACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAACCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA  
GGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
CAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGCTGGAATAC  
ACCGGCATTAATCGGATGGCAGCGGCAAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG  
GCAAAGTCGCAAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
CATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAA  
AAGACGGCAGCTTGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCAAAAAGACCA  
AAGATCTGGTCTTACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAA  
ACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAAGGTCTC  
GAGCACCACCACCACCAC

SEQ ID NO: 71

S2D1-S1D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace

disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND  
 FNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAK  
 SGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDITVQKYDSAGTNLEGTAVEI  
 KTLDELICNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIIRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEV  
 LKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSK  
 KTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALK  
 SEQ ID NO: 72

5 Lip-S2D1-S1D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGGCGAAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAA  
 GGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCAGGTAAGCGAAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
 TGGAAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTC  
 AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
 ACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGA  
 AAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCCTGCAGAAATACGACAGTGCGGG  
 TACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAACCCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA  
 GGCCTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
 CATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGAACTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAG  
 AAAACCGCAGCTTGAAGTCAAGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAAACCA  
 AAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAAACCCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAA  
 CTGGAAGGCTCCGCTGTGGAAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAA

10 SEQ ID NO: 73

Lip-S2D1-S1D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVT  
 LSKIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDITVQKYDSAGTNLE  
 GTAVEIKTLDELICNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIIRADGTRLEYTGKSDGS  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTL  
 TITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALKGLEHHHHHHH

15 SEQ ID NO: 74

Lip-S2D1-S1D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

20 ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGGCGAAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAA  
 GGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCAGGTAAGCGAAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
 TGGAAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTC  
 AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
 ACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGA  
 AAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCCTGCAGAAATACGACAGTGCGGG  
 TACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAACCCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA  
 GGCCTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
 CATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGAACTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAG  
 AAAACCGCAGCTTGAAGTCAAGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAAACCA  
 AAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAAACCCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAA  
 CTGGAAGGCTCCGCTGTGGAAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAAAGGTCTCG  
 AGCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 75

S4D4-S3D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1  
 FNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGLTAAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNS  
 GEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIK  
 TLDELKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEV  
 LKGFALLEGTLTDGGETKLVTEGTVTLSKNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNS  
 QKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGPAAIKDLAELKAALK  
 SEQ ID NO: 76

5 Lip-S4D4-S3D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1  
 ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGCTAAAGGTGAAGTGTGCGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCAGCCCGCCT  
 GGAATACACGCGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCT  
 CTGGAAGGTACCCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTG  
 AGCAAACATATCCGAACCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGC  
 GACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAA  
 AAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGG  
 TACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAACCCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAG  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 TAACGATAAGGGCAAACGCTGCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCAGCCCGCTGGAATAC  
 ACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAG  
 GTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAA  
 AACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACACGCCGCTGAC  
 AAAAAGACCGGCGAATGGAAGAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAAGTTCGCAGAAAC  
 CGAAGCAACTGGTCTTACCAAAGAATGCACGATCACCGTGACAGAACTATAATCGTGCCGGAAT  
 GCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAA  
 SEQ ID NO: 77

10 Lip-S4D4-S3D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)  
 LipCSSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGLTAAADKTTLVTEGTVVLSK  
 HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGN  
 AVEIKTLDELKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSG  
 KAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLVTEGTVTLSKNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLT  
 ISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGPAAIKDLAELKAALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 78

15 Lip-S4D4-S3D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)  
 ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGCTAAAGGTGAAGTGTGCGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCAGCCCGCCT  
 GGAATACACGCGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCT  
 CTGGAAGGTACCCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTG  
 AGCAAACATATCCGAACCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGC  
 GACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAA  
 AAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGG  
 TACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAACCCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAG  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 TAACGATAAGGGCAAACGCTGCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCAGCCCGCTGGAATAC  
 ACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAG  
 GTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAA  
 AACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACACGCCGCTGAC  
 AAAAAGACCGGCGAATGGAAGAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAAGTTCGCAGAAAC  
 CGAAGCAACTGGTCTTACCAAAGAATGCACGATCACCGTGACAGAACTATAATCGTGCCGGAAT  
 GCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGT  
 CTCGAGCACACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 79

20 S4D1-S3D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1



FNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILK  
 SGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEI  
 TTLKELKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEV  
 LKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRN  
 KTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK  
 SEQ ID NO: 84

Lip-S6D4-S5D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

5 ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTGCGCCTGTGGCACCCGCCT  
 GGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACG  
 CTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT  
 CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGC  
 GTGCTACGAAAAAGACCGGTAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTC  
 CCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTG  
 CGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCT  
 GAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACT  
 CATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAAAACATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGCTGGA  
 ATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGG  
 AAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGCTGT  
 CCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAA  
 CAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAA

ACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTA  
 CCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAA  
 SEQ ID NO: 85

10 Lip-S6D4-S5D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVVL  
 SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLE  
 KAVEITTLKELKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTG  
 KAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLT  
 SKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKGLEHHHHHH  
 SEQ ID NO: 86

15 Lip-S6D4-S5D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTGCGCCTGTGGCACCCGCCT  
 GGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACG  
 CTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT  
 CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGC  
 GTGCTACGAAAAAGACCGGTAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTC  
 CCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTG  
 CGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCT  
 GAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACT  
 CATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAAAACATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGCTGGA  
 ATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGG  
 AAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGCTGT  
 CCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAA  
 CAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAA  
 ACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTA  
 CCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGG  
 TCTCGAGCACCCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 87

20 S6D1-S5D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILK  
SGEITAAALDDSDTTRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEI  
TTLKELCNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEV  
LKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNISKSGETVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRT  
KTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK  
SEQ ID NO: 88

Lip-S6D1-S5D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

5

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCC  
TGGAATATACGGACATTAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTAC  
GCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGT  
TCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACG  
CGTGCTACGAAAAAGACCGGTAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACT  
CCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTCCACCAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGT  
GCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTC  
TGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTAC  
TCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCTGG  
AATACCCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTG

GAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCCTTACGCTG  
TCCAAAAACATTAGTAAGTCCGCGCAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCA  
ACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAA  
ACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTA  
CCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
SEQ ID NO: 89

10

Lip-S6D1-S5D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH) LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILKSGEITAAALDDSDTTRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNISKSGETVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 90

15

Lip-S6D1-S5D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCC  
TGGAATATACGGACATTAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTAC  
GCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGT  
TCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACG  
CGTGCTACGAAAAAGACCGGTAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACT  
CCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTCCACCAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGT  
GCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTC  
TGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTAC  
TCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCTGG  
AATACCCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTG  
GAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCCTTACGCTG  
TCCAAAAACATTAGTAAGTCCGCGCAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCA  
ACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAA  
ACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTA  
CCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAAGGT  
CTCGAGCACCAACCACCACCAC  
SEQ ID NO: 91

20

S1D4-S2D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND,

FNEKGEVSEKIITRACGTRLEYGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKS  
 GEVSVELNDTDSSAATKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEIT  
 KLDEIKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKE  
 VLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSSEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNS  
 KTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCLNALK  
 SEQ ID NO: 92

5 Lip-S1D4-S2D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCT  
 GGAATACACCGGCATTAATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAAAAGACGGCAGCTTGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAAA  
 AAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACG

GTACCAAACCTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAACGCGCACCAAACTGGAATAT  
 ACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCCGGTAAAGCGAAAAGAAAGTTCTGAAAACTTTACCCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAGA  
 AATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAG  
 AAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACCA  
 CGCAGCTGGTCTTCACCAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCAGGATACCAA  
 CCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAAACCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA  
 SEQ ID NO: 93

10 Lip-S1D4-S2D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSK  
 NISKSGEVSVELNDTDSSAATKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEG  
 SAVEITKLDEIKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGT  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSSEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
 TISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCLNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 94

15 Lip-S1D4-S2D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCT  
 GGAATACACCGGCATTAATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAAAAGACGGCAGCTTGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAAA  
 AAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACG  
 GTACCAAACCTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAACGCGCACCAAACTGGAATAT  
 ACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCCGGTAAAGCGAAAAGAAAGTTCTGAAAACTTTACCCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAGA  
 AATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAG  
 AAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACCA  
 CGCAGCTGGTCTTCACCAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCAGGATACCAA  
 CCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAAACCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCCTC  
 GAGCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 95

20 S1D1-S2D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1 y

OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

FNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKS  
 GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEIT  
 KLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKE  
 VLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNS  
 KKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 96

5 Lip-S1D1-S2D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATAACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAGAAAACCGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAG  
 AAAACCAAAGATCTGGTCTTACGAAAAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGG  
 TACCAAAGTGAAGGCTCCGCTGTGGAAATCACGAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAG  
 GTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 AACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACTGGAATATA  
 CGGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAGCGAAAAGAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGG  
 CAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAGAA  
 ATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGA  
 AAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAACCCAC  
 GCAGCTGGTCTTACCAAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGGGGTACCAAC  
 CTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAACCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA  
 SEQ ID NO: 97

10 Lip-S1D1-S2D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSK  
 NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEG  
 SAVEITKLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGT  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
 TISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDLDELKNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 98

15 Lip-S1D1-S2D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACC  
 CTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGA  
 GCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATAACCGACAGCTCTGCGGC  
 CACCAAGAAAACCGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAG  
 AAAACCAAAGATCTGGTCTTACGAAAAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGG  
 TACCAAAGTGAAGGCTCCGCTGTGGAAATCACGAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAG  
 GTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 AACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACTGGAATATA  
 CGGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAGCGAAAAGAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGG  
 CAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAGAA  
 ATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGA  
 AAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAACCCAC  
 GCAGCTGGTCTTACCAAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGGGGTACCAAC  
 CTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAACCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCCTCG  
 AGCACCACCACCACCACCAC

SEQ ID NO: 99

S3D4-S4D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTEGTVLSKNIS  
 KSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTIKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPA  
 EIKDLAELKAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAK  
 EVLKDFALEGLAADKTTLVKTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVN  
 SKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLNALK

5

SEQ ID NO: 100

Lip-S3D4-S4D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipídación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCGCT  
 GGAATACACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTCTGAAAGGCTTTGCC  
 CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG  
 CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCCAGCC  
 GGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCG  
 CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTG  
 CCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGTCAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCAC  
 TGAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTA  
 CTCATTCAACGCTAAAGGTGAACGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTGCTG  
 GAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCT  
 GGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGTTCTGAG  
 CAAACATATTCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAA  
 CCAAAAAGACGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAAGTCAACTCGAAAAA  
 GACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCA  
 CCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAACCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAG

10

SEQ ID NO: 101

Lip-S3D4-S4D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipídación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTEGTVLS  
 KSNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTIKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALE  
 GSPAIEIKDLAELKAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGT  
 GKAKEVLKDFALEGLAADKTTLVKTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTL  
 TISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLNALKGLEHHHHHHH

15

SEQ ID NO: 102

Lip-S3D4-S4D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipídación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCGCT  
 GGAATACACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTCTGAAAGGCTTTGCC  
 CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG  
 CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCCGCACTGAATGATACCGAAACCCAGCC  
 GGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCG  
 CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTG  
 CCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGTCAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCAC  
 TGAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTA  
 CTCATTCAACGCTAAAGGTGAACGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTGCTG  
 GAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCT  
 GGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGTTCTGAG  
 CAAACATATTCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAA  
 CCAAAAAGACGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAAGTCAACTCGAAAAA  
 GACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCA  
 CCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAACCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAGGG  
 TCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

20

SEQ ID NO: 103

S3D1-S4D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1 y

OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1  
 FNEKGKLSKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTGTVLSKNIS  
 KSGETVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA

EIKDLAELCAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAK  
 EVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWKWSNTSTLTISVN  
 SKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 104

5

Lip-S3D1-S4D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCT  
 GGAATACACGGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCC  
 CTGGAAGGTACCCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCCGTTACG  
 CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTTCGCACTGAATGATACCGAAAACCGCC  
 GGCTGACAAAAAGACCCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCG  
 CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGC  
 CGGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACT  
 GAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTAC  
 TCATTCAACGCTAAAGGTGAACCTGTCGGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGG  
 AATACACGGAAATCAAGTCCGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCT  
 GGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGAG  
 CAAACATATCCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCGA  
 CCAAAAAGACGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAACTCGAAAAA  
 GACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCGCGCAGGTA  
 CCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAAAACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAG  
 SEQ ID NO: 105

10

Lip-S3D1-S4D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGKLSKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTGTVLSKNISKSGETVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA  
 EIKDLAELCAALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWKWSNTSTLTISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
 SEQ ID NO: 106

15

Lip-S3D1-S4D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCT  
 GGAATACACGGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCC  
 CTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCCGTTACG  
 CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTTCGCACTGAATGATACCGAAAACCGCC  
 GGCTGACAAAAAGACCCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCG  
 CAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGC  
 CGGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACT  
 GAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTAC  
 TCATTCAACGCTAAAGGTGAACCTGTCGGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGG  
 AATACACGGAAATCAAGTCCGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCT  
 GGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGAG  
 CAAACATATCCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCGA  
 CCAAAAAGACGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAACTCGAAAAA  
 GACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCGCGCAGGTA  
 CCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAAAACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAGGG  
 TCTCGAGCACCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 107

20

S5D4-S6D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLKSNISKS  
 GEITVALDDTDSSGNKKSJWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITT  
 LKELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVL  
 KDFTLLEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQ  
 KTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK  
 SEQ ID NO: 108

5 Lip-S5D4-S6D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAAACCATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGTCT  
 GGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
 TGGAAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGC  
 TGTCAAAAACATTAGTAAGTCCGCGCGAAATCACGGTGCACCCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
 CAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
 AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAAAATATGATAGCGCAG  
 GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATA  
 TACGGACATTAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAA  
 GGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCA  
 AAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTA  
 CGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCAGAA  
 AACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGC  
 ACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 SEQ ID NO: 109

10 Lip-S5D4-S6D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLK  
 KNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSJWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGK  
 AVEITTLKELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGK  
 AKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSTSTLTIS  
 VNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHH  
 SEQ ID NO: 110

15 Lip-S5D4-S6D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAAACCATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGTCT  
 GGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
 TGGAAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGC  
 TGTCAAAAACATTAGTAAGTCCGCGCGAAATCACGGTGCACCCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
 CAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
 AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAAAATATGATAGCGCAG  
 GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATA  
 TACGGACATTAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAA  
 GGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCA  
 AAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTA  
 CGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCAGAA  
 AACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGC

20 ACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 GTCTCGAGCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 111

S5D1-S6D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1

FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTTLKVTCGTVTLSKNISKS  
 GEITVALDDTDSSGNKKSQWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITT  
 LKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVL  
 KDFTLLEGTLAADGKTTTLKVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDSDTTRATKKTGWKDSKTSTLTISVNSQ  
 KTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK  
 SEQ ID NO: 112

5 Lip-S5D1-S6D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
 TGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCCTTACGC  
 TGTCAAAAACATTAGTAAGTCCGCGCAAATCACGGTCCGCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
 CAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
 AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAG  
 GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAAACGATTGTTCCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATAC  
 ACGGATATCAAGTCCGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACGCTGGAAG  
 GTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAA  
 AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTAC  
 GAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAA  
 ACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGGGGCA  
 CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
 SEQ ID NO: 113

10 Lip-S5D1-S6D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTTLKVTCGTVTLS  
 KNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK  
 AVEITTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGK  
 AKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTTLKVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDSDTTRATKKTGWKDSKTSTLTIS  
 VNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 114

15 Lip-S5D1-S6D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCT  
 GGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGC  
 TGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCCTTACGC  
 TGTCAAAAACATTAGTAAGTCCGCGCAAATCACGGTCCGCTGGATGACACCGATAGCTCTGG  
 CAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACG  
 AAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAG  
 GTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTCTGAAA  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAAACGATTGTTCCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATAC  
 ACGGATATCAAGTCCGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACGCTGGAAG  
 GTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAA

AAAAATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTAC  
 GAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAA  
 ACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGGGGCA  
 CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAAGG  
 TCTCGAGCACCACCACCACCAC

20 SEQ ID NO: 115  
 S2D4-S1D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

FNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAK  
 SGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEI  
 KTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKISDGSKAKEV  
 LKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSK  
 KTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALK  
 SEQ ID NO: 116

5 Lip-S2D4-S1D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAA  
 GGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACCAGGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
 TGGAAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTC  
 AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
 ACCAAGAAAACCGGCGCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTAAACAGCAAGA  
 AAACCACGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCAGGG  
 TACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAACCCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA  
 GGCCTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
 CATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGAACTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAG  
 AAAACCGCAGCTTGAACCTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAACCA  
 AAGATCTGGTCTTACGAAAGAAAAACCCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAA  
 CTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAACTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAA  
 SEQ ID NO: 117

10 Lip-S2D4-S1D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVL  
 SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLE  
 GTAVEIKTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKISDGS  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTL  
 TITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALKGLEHHHHHH  
 SEQ ID NO: 118

15 Lip-S2D4-S1D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAA  
 GGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACCAGGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
 TGGAAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTC  
 AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG

20 ACCAAGAAAACCGGCGCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTAAACAGCAAGA  
 AAACCACGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCAGGG  
 TACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAACCCCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA  
 GGCCTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
 CATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGAACTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAG  
 AAAACCGCAGCTTGAACCTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAACCA  
 AAGATCTGGTCTTACGAAAGAAAAACCCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAA  
 CTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAACTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAAGGTCTCG  
 AGCACCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 119

S2D1-S1D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND  
 FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNTFLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAK  
 SGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEI  
 KTLDEL CNALKGTS DKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKII TRACGTRLEYTG IKS DGS GKAKEV  
 LKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSK  
 KTKDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK  
 SEQ ID NO: 120

5

Lip-S2D1-S1D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAA  
 GGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACC GGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
 TGGAAAGCAAAGTCGCCAATGACAAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTC  
 AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
 ACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGA  
 AAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCCTGTCAGAAATACGACAGTGC  
 TACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAACCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA  
 GGCCTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGGCGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACCGGCATTAAATCGGATGGCAGCGGCAAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
 CATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAA  
 AAGACGGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCAAAAAGACCA  
 AAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACCCTGTCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAA  
 ACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCAGGAACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAA  
 SEQ ID NO: 121

10

Lip-S2D1-S1D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

15

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNTFLEGKVANDKVTLEVKCGTVT  
 SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLE  
 GTAVEIKTLDEL CNALKGTS DKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKII TRACGTRLEYTG IKS DGS  
 GKAKEVLKNTFLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTL  
 TITVNSKTKDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 122

Lip-S2D1-S1D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHHH)

20

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAA  
 GGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACC GGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCC  
 TGGAAAGCAAAGTCGCCAATGACAAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTC  
 AAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCG  
 ACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGA  
 AAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCCTGTCAGAAATACGACAGTGC  
 TACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAACCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA  
 GGCCTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 CAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGGCGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACCGGCATTAAATCGGATGGCAGCGGCAAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG  
 GCAAAGTCGCAAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAA  
 CATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAA  
 AAGACGGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCAAAAAGACCA  
 AAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACCCTGTCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAA  
 ACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCAGGAACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAAGGTCTC  
 GAGCACCACCACCACCACCAC

SEQ ID NO: 123

S4D4-S3D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNAKGELSEKILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLLKVTEGTVVLSKHIPNS  
 GEITVELNDSNSTQATKKTGKWDNSTSTLTISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNVEIK  
 TLDELKNALKGTSDKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEV  
 LKGFALGTLTDGGETKLVTCGTVTLKSNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNS  
 QKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

5

SEQ ID NO: 124

Lip-S4D4-S3D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGCTAAAGGTGAAGTGTGCGGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCAGCCT  
 GGAATACACGGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCT  
 CTGGAAGGTACCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTG  
 AGCAAAACATATCCGAACCTCTGGTAAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGC  
 GACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAACTCGAAA  
 AAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGG  
 TACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAG  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 TAACGATAAGGGCAAACCTGTGCGAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACGGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAG  
 GTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAA  
 AACATTAGCAAGTCTGGTAAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGAC  
 AAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAAGTCCGAGAAAC  
 CGAAGCAACTGGTCTTACCAAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAAT  
 GCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAA

10

SEQ ID NO: 125

Lip-S4D4-S3D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNAKGELSEKILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLLKVTEGTVVLSK  
 HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDNSTSTLTISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGN  
 AVEIKTLDELKNALKGTSDKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSG

15

KAKEVLKGFALGTLTDGGETKLVTCGTVTLKSNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLT  
 ISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALKGLEHHHHHHH

SEQ ID NO: 126

Lip-S4D4-S3D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

20

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGCTAAAGGTGAAGTGTGCGGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCAGCCT  
 GGAATACACGGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCT  
 CTGGAAGGTACCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTG  
 AGCAAAACATATCCGAACCTCTGGTAAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGC  
 GACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAACTCGAAA  
 AAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGG  
 TACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAG  
 GGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 TAACGATAAGGGCAAACCTGTGCGAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCTGGAATAC  
 ACGGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAG  
 GTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAA  
 AACATTAGCAAGTCTGGTAAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGAC  
 AAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAAGTCCGAGAAAC  
 CGAAGCAACTGGTCTTACCAAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAAT  
 GCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAAGGT  
 CTCGAGCACCACCACCACCACCAC

SEQ ID NO: 127

S4D1-S3D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1  
 FNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGLAADKTTLVKTCGTVVLSKHIPNS  
 GEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIK  
 TLDELNALKGTSDKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEV  
 LKGFALLEGTLTDGGETKLVTEGTVTLKSNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNS  
 QKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK  
 SEQ ID NO: 128

5 Lip-S4D1-S3D4\_nt: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCT  
 GGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCT  
 CTGGAAGGTACCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCCGTTGTTCTG  
 AGCAAAACATATCCGAACCTCTGGTGAATCACCCTTGAAGTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGC  
 AACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAACTCGAAAA  
 AGACCAAAAATATTGTGTTACGGAAGGAAGATACGATCACCCTTCAAAAATATGACTCCGCGGGC  
 ACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTGCAAATCAAACCCCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGG  
 GCTACTAGTACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 AACGATAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACA  
 CCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAG  
 GTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAA  
 AACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGAC  
 AAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAAGTCCGAGAAAC  
 CGAAGCAACTGGTCTTCCACCAAAGAATGCACGATCACCCTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAA  
 TCTCTGGAAGGCTCCCGGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAA  
 SEQ ID NO: 129

10 Lip-S4D1-S3D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)  
 LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGLAADKTTLVKTCGTVVLSK  
 HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGN  
 AVEIKTLDELNALKGTSDKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSG  
 KAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLVTEGTVTLKSNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLT  
 ISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALKGLEHHHHHHH  
 SEQ ID NO: 130

15 Lip-S4D1-S3D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCT  
 GGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCT  
 CTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCCGTTGTTCTG  
 AGCAAAACATATCCGAACCTCTGGTGAATCACCCTTGAAGTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGC  
 AACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAACTCGAAAA  
 AGACCAAAAATATTGTGTTACGGAAGGAAGATACGATCACCCTTCAAAAATATGACTCCGCGGGC  
 ACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTGCAAATCAAACCCCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGG  
 GCTACTAGTACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATT  
 AACGATAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACA  
 CCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAG  
 GTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAA  
 AAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGAC  
 AAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAAGTCCGAGAAAC  
 CGAAGCAACTGGTCTTCCACCAAAGAATGCACGATCACCCTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAA  
 TCTCTGGAAGGCTCCCGGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGG  
 CTCGAGCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 131

20 S6D4-S5D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1, secuencia enlazadora LN1

FNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILK  
 SGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEI  
 TTLKELKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEV  
 LKDFLEGLAADGKTTLVTCGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNR  
 KTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK  
 SEQ ID NO: 132

5 Lip-S6D4-S5D1\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTGCGCCTGTGGCACCCGCT  
 GGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACG  
 CTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT  
 CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGC  
 GTGCTACGAAAAAGACCGGTAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACTC  
 CCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTG  
 CGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCT  
 GAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACT  
 CATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGA  
 ATACACCGACATCAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGG  
 AAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGT  
 CCAAAAAACATTAGTAAAGTCGGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAA  
 CAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTACGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAAA  
 CCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAGGTAC  
 CAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAA  
 SEQ ID NO: 133

10 Lip-S6D4-S5D1\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGLAADGKTTLVTEGTVVL  
 SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLE  
 GKAVEITTLKELKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTG  
 KAKEVLKDFLEGLAADGKTTLVTCGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTI  
 SKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHH  
 SEQ ID NO: 134

15 Lip-S6D4-S5D1\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
 CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTGCGCCTGTGGCACCCGCT  
 GGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACG  
 CTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT  
 CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGC  
 GTGCTACGAAAAAGACCGGTAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACTC  
 CCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTG  
 CGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCT  
 GAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACT  
 CATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGA  
 ATACACCGACATCAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGG  
 AAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGT  
 CCAAAAAACATTAGTAAAGTCGGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAA  
 CAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTACGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAAA  
 CCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAGGTAC  
 CAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTC  
 TCGAGCACCACCACCACCAC  
 SEQ ID NO: 135

20 S6D1-S5D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4, secuencia enlazadora LN1

FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILK  
SGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEI  
TTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEV  
LKDFLEGTLAADGKTTLVKTEGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNR  
KTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK  
SEQ ID NO: 136

Lip-S6D1-S5D4\_nt: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1

5 ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCC  
TGGAATATACGGACATTAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTAC  
GCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGT  
TCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACG  
CGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACT  
CCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGT  
GCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTC  
TGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTAC  
TCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAAAACATTGTGCGTGCGTGTTGGCACCCGCTCTGG  
AATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTG  
GAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCCTTACGCTG  
TCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCCGCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCA  
ACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAA  
AACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAAACTATGATAGCGCAGGT

ACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAA  
SEQ ID NO: 137

10 Lip-S6D1-S5D4\_His\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVKTEGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKGLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 138

15 Lip-S6D1-S5D4\_His\_nt: Secuencia codificante para proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4, señal de lipidación lpp de *E. coli*, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCT  
CAAGCTTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCC  
TGGAATATACGGACATTAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTAC  
GCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGT  
TCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACG  
CGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGCAACT  
CCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGT  
GCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGTGTAATGCTC  
TGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTAC  
TCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAAAACATTGTGCGTGCGTGTTGGCACCCGCTCTGG  
AATATACCGACATCAAGAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTG  
GAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCCTTACGCTG  
TCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCCGCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCA  
ACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAA  
AACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAAACTATGATAGCGCAGGT  
ACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAAGTGAAGAATGCTCTGAAAG  
GTCTCGAGCACCCACCACCACCAC

20 SEQ ID NO: 140

Lip-S2D0-His: aminoácidos de las posiciones 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2, secuencia de tipo salvaje, CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 141

Lip-S2D1-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 (aa 182 y 2 CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 142

Lip-S2D2-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 2 (aa 182 y 272 CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNAKCGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 143

Lip-S2D3-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 3 (aa 141 y 241), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTC  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 144

Lip-S2D4-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 (aa 165 y 265), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 145

Lip-S2D5-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 5 (aa 165 y 241), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNCTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTCDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 146

Lip-S2D6-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 6 (aa 185 y 272), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTCVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNAKCGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 147

Lip-S2D7-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 7 (aa 199 y 223 CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTCTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 148

Lip-S2D8-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 8 (aa 243 y 262), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTCTVQKYDSAGTNLEGTA  
AVECKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 149

Lip-S2D9-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 9 (aa 184 y 204), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGCVLSKEI  
AKSGEVTVALNDCTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHH  
SEQ ID NO: 150

Lip-S2D10-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 10 (aa 201 y 214), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH))

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVA~~C~~NDTNTTQATKKT~~C~~AWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 151

Lip-S2D11-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 11 (aa 246 y 259), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITV~~C~~QKYDSAGTNLEGTC  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 152

Lip-S2D12-His: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 12 (aa 167 y 178), CKQN N-terminal para la adición de lípidos, etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFT~~C~~EGKVANDKVT~~C~~EVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 153

Lip-S2D0: aminoácidos de las posiciones 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2, secuencia de tipo salvaje, CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK  
SEQ ID NO: 154

Lip-S2D1: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 (aa 182 y 269), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEV~~K~~CGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDEL~~C~~NALK  
SEQ ID NO: 155

Lip-S2D2: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 2 (aa 182 y 272), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEV~~K~~CGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKN~~A~~CK  
SEQ ID NO: 156

Lip-S2D3: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 3 (aa 244 y 259), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTI~~C~~VQKYDSAGTNLEGTC  
VEIKTLDELKNALK  
SEQ ID NO: 157

Lip-S2D4: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 (aa 141 y 241), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRE~~C~~GTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQ~~C~~TITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK  
SEQ ID NO: 158

Lip-S2D5: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 5 (aa 165 y 265), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKN~~C~~TLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIK~~C~~DELKNALK  
SEQ ID NO: 159

Lip-S2D6: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 6 (aa 185 y 272), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTC~~S~~LSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKN~~A~~CK  
SEQ ID NO: 160

Lip-S2D7: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 7 (aa 199 y 223), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK  
SEQ ID NO: 161

Lip-S2D8: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 8 (aa 243 y 262 CKQN N-terminal para la adición de lípidos)

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
AVECKTLDELKNALK

5

SEQ ID NO: 162

Lip-S2D9: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 9 (aa 184 y 204), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK

10

SEQ ID NO: 163

Lip-S2D10: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 10 (aa 201 y 214), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEI  
AKSGEVTVAÇNDTNTTQATKKTCAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK

15

SEQ ID NO: 164

Lip-S2D11: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 11 (aa 246 y 259), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVCKYDSAGTNLEGTC  
VEIKTLDELKNALK

20

SEQ ID NO: 165

Lip-S2D12: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 12 (aa 167 y 178), CKQN N-terminal para la adición de lípidos

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTCEGKVANDKVTCEVKEGTVTLSKEI  
AKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 166

S2D0: aminoácidos de las posiciones 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2, secuencia de tipo salvaje

ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK

25

SEQ ID NO: 167

S2D1: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 (aa 182 y 269)

ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNALK

30

SEQ ID NO: 168

S2D2: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 2 (aa 182 y 272)

ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA  
VEIKTLDELKNACK

35

SEQ ID NO: 169

S2D3: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 3 (aa 244 y 259)

ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDE  
LKNALK

SEQ ID NO: 170

S2D4: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 (aa 141 y 241)

40

ELSAK<sup>1</sup>MTRE<sup>2</sup>CGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQ<sup>3</sup>CTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALK

SEQ ID NO: 171

S2D5: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 5 (aa 165 y 265)

ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKN<sup>4</sup>CTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIK<sup>5</sup>T<sup>6</sup>DE  
LKNALK

5

SEQ ID NO: 172

S2D6: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 6 (aa 185 y 272)

ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEG<sup>7</sup>T<sup>8</sup>CTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKN<sup>9</sup>A<sup>10</sup>CK

10

SEQ ID NO: 173

S2D7: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 7 (aa 199 y 223)

ELSAK<sup>11</sup>MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
<sup>12</sup>CA<sup>13</sup>LN<sup>14</sup>DTNTTQATKKKGAWDSKTST<sup>15</sup>CTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALK

15

SEQ ID NO: 174

S2D8: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 8 (aa 243 y 262)

ELSAK<sup>16</sup>MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDT<sup>17</sup>CTVQKYDSAGTNLEGTAVE<sup>18</sup>CK<sup>19</sup>TL<sup>20</sup>LD  
ELKNALK

20

SEQ ID NO: 175

S2D9: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 9 (aa 184 y 204)

ELSAK<sup>21</sup>MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEG<sup>22</sup>CVTLSKEIAKSGEVT  
VALND<sup>23</sup>C<sup>24</sup>N<sup>25</sup>TTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALK

SEQ ID NO: 176

S2D10: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 10 (aa 201 y 214)

ELSAK<sup>26</sup>MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VA<sup>27</sup>C<sup>28</sup>NDTNTTQATKK<sup>29</sup>CA<sup>30</sup>WDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
LKNALK

25

SEQ ID NO: 177

S2D11: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 11 (aa 246 y 259)

ELSAK<sup>31</sup>MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVT  
VALNDTNTTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITV<sup>32</sup>CKYDSAGTNLEGT<sup>33</sup>CV<sup>34</sup>EIKTLDE  
LKNALK

30

SEQ ID NO: 178

S2D12: aa 131-273 de *Borrelia afzelii* cepa K78, OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 12 (aa 167 y 17)

ELSAK<sup>35</sup>MTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFT<sup>36</sup>CEGKVANDKVT<sup>37</sup>CEVKEGTVTLSKEIAKSGEV  
TVALNDTNTTQATKKKGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDE  
ELKNALK

35

SEQ ID NO: 179

*B. burgdorferi* s.s. (cepa B31, serotipo 1), OspA\_aa 126-273 con reemplazo de la secuencia de tipo hLFA de OspA de serotipo 1

FNEK<sup>38</sup>GEVSEKIITRADGTRLEYTG<sup>39</sup>IKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKS  
GEVSVELNDTSSAATKKA<sup>40</sup>AWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS<sup>41</sup>AVEIT  
KLDEIKNALK

SEQ ID NO: 180

*B. garinii* (cepa PBr, serotipo 3), OspA\_aa 126-274

FNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGEGTVLSKNIS  
KSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA  
EIKDLAELKAALK

SEQ ID NO: 181

*B. bavariensis* (cepa PBi, serotipo 4), OspA\_aa 126-273

FNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNS  
GEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIK  
TLDELKNALK

5 SEQ ID NO: 182

*B. garinii* (cepa PHei, serotipo 5), OspA\_aa 126-273

FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLKVTEGTVLSKNISKS  
GEITVALDDTDSSGNKSGTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITT  
LKELKNALK

SEQ ID NO: 183

*B. garinii* (cepa DK29, serotipo 6), OspA\_aa 126-274

FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLKVTEGTVVLSKNILK  
SGEITAALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEI  
TTLKELKNALK

10 SEQ ID NO: 184

Enlazador peptídico LN1 construido a partir de dos regiones bucle separadas de la mitad N-terminal de  
OspA de *B. burgdorferi* s.s. cepa B31 (aa 65-74 y aa 42-53, intercambio de aminoácidos en la posición 53:  
D53S) GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS

15 SEQ ID NO: 185

Lip-S1D4-S2D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 1 y 2 ambos con enlace  
disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de  
OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND

LipCSSFNEKGEVSEKIIIRACGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVLTSK  
NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEG  
SAVEITKLDEIKNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGT

20

GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
TISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 186

Lip-S1D1-S2D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 y OspA de serotipo 2 con  
enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174  
de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-  
terminal

25

LipCSSFNEKGEVSEKIIIRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVLTSK  
NISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEG  
SAVEITKLDEICNALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGT  
GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVLTSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
TISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 187

Lip-S3D4-S4D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 y OspA de serotipo 4 con  
enlace disulfuro de tipo 4 CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación  
N-terminal

30

LipCSSFNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGEGTVL  
SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALE  
GSPAIEIKDLAELKAALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGT  
GKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTL  
TISVNSKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 188

Lip-S3D1-S4D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 3 y 4 ambos con enlace  
disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-  
terminal

35

LipCSSFNEKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCGTVL  
SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALE  
GSPAIEIKDLAELCAALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGT  
GKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTL  
TISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 189

Lip-S5D4-S6D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 5 y 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLS  
KNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGK  
AVEITTLKELKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGK  
AKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTIS  
VNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK

5

SEQ ID NO: 190

Lip-S5D1-S6D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVTLS  
KNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK  
AVEITTLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGK  
AKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTIS  
VNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK

10

SEQ ID NO: 191

Lip-S2D4-S1D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVTLS  
KNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK  
AVEITTLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGK  
AKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTIS  
VNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK

15

SEQ ID NO: 192

Lip-S2D1-S1D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 2 y 1 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVTLS  
KNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK  
AVEITTLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGK  
AKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTIS  
VNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK

20

SEQ ID NO: 193

Lip-S4D4-S3D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSK  
HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGN  
AVEIKTLDELKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSG  
KAKEVLKGFALGTLTDGGETKLVTEGTVVLSKNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLT  
ISKNSQPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK

25

SEQ ID NO: 194

Lip-S4D1-S3D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 4 y 3 ambos con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTCGTVVLSK  
HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGN  
AVEIKTLDELKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSG  
KAKEVLKGFALGTLTDGGETKLVTCGTVVLSKNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLT  
ISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

30

SEQ ID NO: 195

Lip-S6D4-S5D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

35

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVVL  
 SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLE  
 GKAVEITTLKELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTG  
 KAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVTLKSNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTI  
 SKNRTKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEKAVEITTLKELKNALK  
 SEQ ID NO: 196

Lip-S6D1-S5D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipos 6 y 5 ambos con enlace  
 disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-  
 terminal

5

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTCGTVVL  
 SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLE  
 GKAVEITTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKT  
 GKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTCGTVTLKSNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTL  
 TISKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEKAVEITTLKELCNALK  
 SEQ ID NO: 197

Lip-S1D4-S2D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo  
 4 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia  
 enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1  
 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal

10

LipCSSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVKCGTVTLK  
 NISKSGETVVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEG  
 SAVEITKLDEIKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGT  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLKSKIEAKSGEITVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
 TISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 198

Lip-S1D1-S2D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo  
 1 y OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia  
 enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1  
 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal

15

LipCSSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVKCGTVTLK  
 NISKSGETVVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEG  
 SAVEITKLDEICNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGT  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLKSKIEAKSGEITVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTL  
 TISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 199

Lip-S3D4-S4D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo  
 4 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia  
 enlazadora LN1, lipidación N-terminal,

20

LipCSSFNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTEGTVTL  
 SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALE  
 GSPAEIKDLAELKAALGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGT  
 GKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTL  
 TISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 200

Lip-S3D1-S4D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo  
 1 y OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia  
 enlazadora LN1, lipidación N-terminal

25

LipCSSFNEKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCGTVTL  
 SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALE  
 GSPAEIKDLAELCAALGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGT  
 GKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTL  
 TISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK  
 SEQ ID NO: 201

Lip-S5D4-S6D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo  
 4 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia  
 enlazadora LN1, lipidación N-terminal

30

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLS  
 KNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSSTWDSSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGK  
 AVEITTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGK  
 AKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSTSTLTIS  
 VNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK  
 SEQ ID NO: 202

Lip-S5D1-S6D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTCGTVTLS  
 KNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSSTWDSSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK  
 AVEITTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGK  
 AKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSTSTLTIS  
 VNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK  
 SEQ ID NO: 203

Lip-S2D4-S1D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTL  
 SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLE  
 GTAVEIKTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGKSDGS

GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVKCGTVLTKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTL  
 TITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALK  
 SEQ ID NO: 204

Lip-S2D1-S1D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 1 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, aa 164-174 de OspA de serotipo 1 con reemplazo por la secuencia de tipo no hLFA-1 NFTLEGKVAND, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTL  
 SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLE  
 GTAVEIKTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGKSDGS  
 GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVLTKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTL  
 TITVNSKKTDLVFTKECTITVQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK  
 SEQ ID NO: 205

Lip-S4D4-S3D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSK  
 HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGN  
 AVEIKTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSG  
 KAKEVLKGFALGTLTDGGETKLVTCGTVLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLT  
 ISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK  
 SEQ ID NO: 206

Lip-S4D1-S3D4\_aa: Secuencia codificante para proteínas de fusión de heterodímeros intermedios y finales de OspA de serotipo 4 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTCGTVVLSK  
 HIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGN  
 AVEIKTLDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSG  
 KAKEVLKGFALGTLTDGGETKLVTEGTVLTKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLT  
 ISKNSQPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELKAALK  
 SEQ ID NO: 207

Lip-S6D4-S5D1\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 4 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal,

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVKTEGTVVL  
SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLE  
GKAVEITTLKELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTG  
KAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVKTCGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTI  
SKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEKAVEITTLKELCNALK  
SEQ ID NO: 208

Lip-S6D1-S5D4\_aa: Proteína de fusión de heterodímero de OspA de serotipo 6 con enlace disulfuro de tipo 1 y OspA de serotipo 5 con enlace disulfuro de tipo 4, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia enlazadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVKTCGTVVL  
SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLE  
GKAVEITTLKELCNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKT  
GKAKEVLKDFLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLKSNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTL  
TISKNRTKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEKAVEITTLKELCNALK  
SEQ ID NO: 209

*B. afzelii* (cepa K78; OspA de serotipo 2) aa 17-273, secuencia señal de lipidación eliminada (aa 1-16: MKKYLLGIGLILALIA), etiqueta His C-terminal (GLEHHHHHH)

CKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLKATVDKIELKGTSDKDNNGSGVLEGTKDDK  
SKAKLTIADDLSKTTFFELFKEDGKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMK  
SDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDS  
KTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 210

*B. burgdorferi* (OspA de serotipo 1, cepa ZS7) aa 17-273, secuencia señal de lipidación eliminada (aa 1-16: MKKYLLGIGLILALIA), etiqueta His C-terminal (LEHHHHHH)

CSSFQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVK  
ADKSKVKLISDDLQTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSKDKSSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGI  
KSDGSGKAKEVLKGYVLEGTLTAEKTTLVKEGTVTLKSNISKSGEVSVLNDTDSSAATKKTAAWNS  
GTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDLEIKNALKLEHHHHHHH  
SEQ ID NO: 211

Péptido que contiene cisteína de OspA

CKQN

SEQ ID NO: 212

OspA quimérica de serotipo1/Serotipo2, lipidación N-terminal

LipCAQKGAESIGSVSVSDLPGEMKVLVSKEKDKNGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKTNK  
SKVKLTISDDLQTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSKDKSSSTEEKFNEKGEVSEKIITMADGTRLEYTGIKS  
DGTGKAKYVLKNFTLEGKVANDKTTLEVKEGTVLSMNISKSGEVSVLNDTDSSAATKKTAAWNSK  
TSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKLE  
SEQ ID NO: 213

aminoácidos de las posiciones 126-274 de *B. garinii* cepa T25, OspA de serotipo 7

FNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGETKLTVEAGTVTLKSNISE  
SGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSPA  
KDLEALKALK  
SEQ ID NO: 214

Cebador oligonucleotídico directo para el gen RecA de *Borrelia*  
CATGCTCTTGATCCTGTTTA

SEQ ID NO: 215

Etiqueta de histidina

GLEHHHHHHH

SEQ ID NO: 216

Cebador oligonucleotídico inverso para el gen RecA de *Borrelia*

CCCATTCTCCATCTATCTC

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende el polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186; o cualquier variante funcional de dicha secuencia de aminoácidos
- 5 - con una identidad de secuencia de al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 %, mucho más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de SEQ ID NO: 186, y
- 10 - con una diferencia en la capacidad protectora ( $\Delta pc$ ) entre la variante funcional y el placebo (negativo) de control de al menos el 50 %, especialmente al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, incluso más preferiblemente el 90 %, incluso más preferiblemente 95 %, mucho más preferiblemente al menos el 95 %.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 186).
- 15 3. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
- 20 5. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3 o el vector como se define en la reivindicación 4, en el que dicha célula huésped es preferiblemente *E. coli*.
6. Un proceso para producir una célula que expresa el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende transformar o transfectar una célula huésped adecuada con el vector de acuerdo con la
- 25 reivindicación 4.
7. Un método para producir el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por las siguientes etapas:
- 30 a) introducir un vector que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en una célula huésped,
- b) cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido,
- c) homogeneizar dicha célula huésped, y
- 35 d) someter el homogenado de la célula huésped a etapas de purificación.
8. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y/o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende L-metionina.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende además al menos un antígeno adicional derivado de una especie de *Borrelia* que causa la borreliosis de Lyme.
- 45 11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que comprende además al menos un antígeno adicional, en la que el antígeno adicional es de un patógeno transmitido por garrapatas, en donde el patógeno transmitido por garrapatas se selecciona del grupo que comprende *Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia miyaotoi*, *Borrelia turicatae*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia parkeri*, *Franziska tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Coxiella burnetii* y *Borrelia burgdorferi*, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), virus de la fiebre de Colorado transmitida por garrapatas (CTFV), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV), virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur (KFDV), virus Powassan, virus Heartland, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV) y *Babesia* spp.
- 50 12. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizada por que** comprende además una sustancia inmunoestimulante, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en polímeros policatiónicos, especialmente péptidos policatiónicos, oligodesoxinucleótidos inmunoestimulantes (ODN), especialmente oligo(dIdC)<sub>13</sub> (SEQ ID NO: 32), péptidos que contienen al menos dos motivos LysLeuLys,
- 55

especialmente el péptido KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 33), compuestos neuroactivos, especialmente la hormona de crecimiento humana, hidróxido de aluminio, o fosfato de aluminio, adyuvante completo o incompleto de Freund, o combinaciones de los mismos.

- 5 13. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que dicha composición farmacéutica es una vacuna.
14. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 para su uso como un medicamento, particularmente como una vacuna.
- 10 15. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 para su uso en un método para el tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia*, particularmente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* o *B. sinica*,  
15 preferiblemente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* o *B. garinii*.

Figura 1

ST3 (17-274)	(1)	CKQVSSLDERKNSVSDLPGGMKVIVSKERKDKGKYSILMAIVKLELKGTSDKNGSGVL	60
ST1 (17-273)	(1)	CKQVSSLDERKNSVSDLPGEMKVIYSKERKDKGVDIATVDKLELKGTSDKNGSGVL	
ST4 (17-273)	(1)	CKQVSSLDERKNSVSDLPGEMKVIYSKERKDKGKYSILMAIVDKLELKGTSDKNGSGVL	
ST5 (17-273)	(1)	CKQVSSLDERKNSVSDLPGGMKVIVSKERKDKGKYSILMAIVKLELKGTSDKNGSGVL	
ST6 (17-274)	(1)	CKQVSSLDERKNSVSDLPGGMTVIYSKERKDKGYSIFATVDKLELKGTSDKNGSGVL	
ST2 (17-273)	(1)	CKQVSSLDERKNSAIVDLPGEMKVIYSKERKDKGYSILKAVDKLELKGTSDKNGSGVL	
<b>Consenso</b>			61
ST3 (17-274)	(61)	EGEKADSKAKLITISODINQITTEIFKEDGKTLVSRKVNKDKSSTEKFNDRGKLEKV	120
ST1 (17-273)	(61)	EGVKADSKKVLITISDLGQITTEIFKEDGKTLVSKKVTSKDKSSTEKFNKGEVSEKI	
ST4 (17-273)	(61)	EGEKDSKAKLITISEDLSKITEIFKEDGKTLVSKKVNKDKSIEKFNKAGELSEKI	
ST5 (17-273)	(61)	EGEKTKSKKALITIAEDLSKITEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSTEKFNKGEISEKI	
ST6 (17-274)	(61)	EGEKTKSKKASTIADDSKITEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSTEKFNKGEISEKI	
ST2 (17-273)	(61)	EGEKTKSKKALITIAEDLSKITEIFKEDGKTLVSKKVSRRDKTSDIEMFNKGELEAKT	
<b>Consenso</b>			121
ST3 (17-274)	(121)	VTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVILKGALEGLIDGGEIKLIVTEGTVILSKNISKSG	180
ST1 (17-273)	(121)	ITRADGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVILKGVLEGLITAE-KITLVKKEGTVILSKNISKSG	
ST4 (17-273)	(121)	ILRANGTRLEYTEIKSDGIGKAKEVILKFALEGLITAAAD-KITLVKTEGTVILSKHIPNSG	
ST5 (17-273)	(121)	IVRANGTRLEYTEIKSBKIGKAKEVILKDFLEGLITAAADGKITLVKTEGTVILSKNISKSG	
ST6 (17-274)	(121)	IVRANGTRLEYTEIKSDGSGKAKEVILKDFLEGLITAAADGKITLVKTEGTVILSKNISKSG	
ST2 (17-273)	(121)	ITRENGTRLEYTEIKSDGIGKAKEVILKFTLEGLIAND-KVTLKVEGTVILSKELAKSG	
<b>Consenso</b>			181
ST3 (17-274)	(181)	EITVALNDEITPADKKTIGEKEDTSTLITISKNSQPKQVFKENTITIVQYDSAGTNL	240
ST1 (17-273)	(180)	EVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLITIVNSKTKTKQVFKENTITIVQYDSAGTNL	
ST4 (17-273)	(180)	EITVELNDSNTQATKKTGKWDNSTLITIVNSKTKNIVEFKEDTITIVQYDSAGTNL	
ST5 (17-273)	(181)	EITVALDIDSS-ENKKSIGTWDGKSTLITIVNSKTKTKQVFKEDTITIVQYDSAGTNL	
ST6 (17-274)	(181)	EITVALDIDSDITRAKTKTKGWDKSTLITIVNSKTKNIVEFKEDTITIVQYDSAGTNL	
ST2 (17-273)	(180)	EITVALNDEITQATKKTIGADSKTSTLITIVNSKTKTKQVFKENTITIVQYDSAGTNL	
<b>Consenso</b>			241
ST3 (17-274)	(241)	EGSPAEIKDIAELKALIK	258
ST1 (17-273)	(240)	EGSAVEIKDIELKALIK	
ST4 (17-273)	(240)	EGNAVEIKDIELKALIK	
ST5 (17-273)	(240)	EGKAVEIKDIELKALIK	
ST6 (17-274)	(241)	EGKAVEIKDIELKALIK	
ST2 (17-273)	(240)	EGTAVEIKDIELKALIK	
<b>Consenso</b>			(241) EGSAVEIKDIELKALIK

**Figura 2**

**A. Ácido nucleico que codifica un polipéptido de heterodímero mutante de OspA**

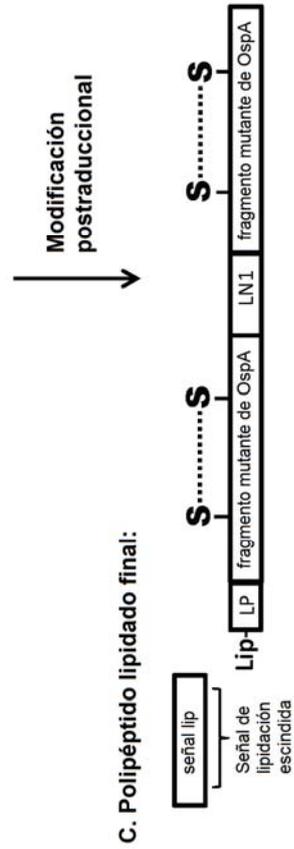
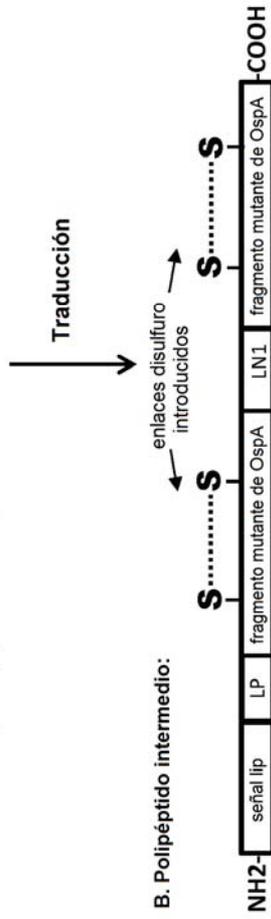
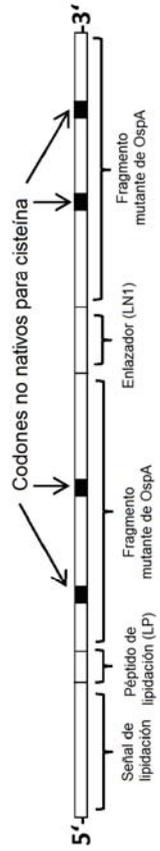


Figura 3

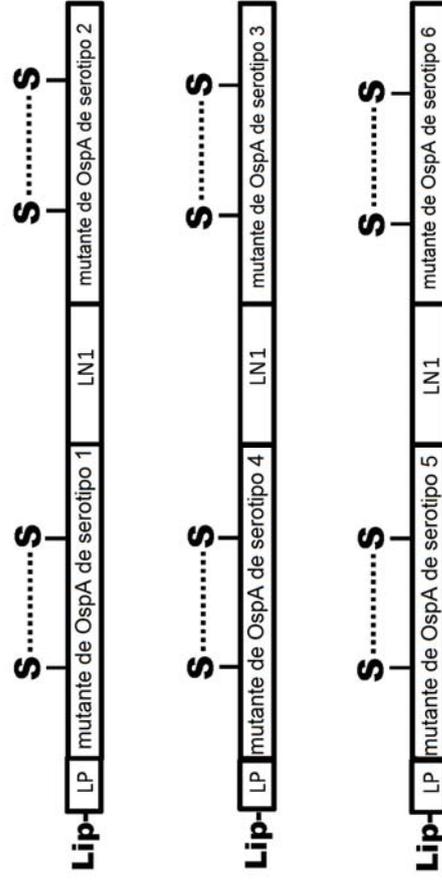


Figura 4

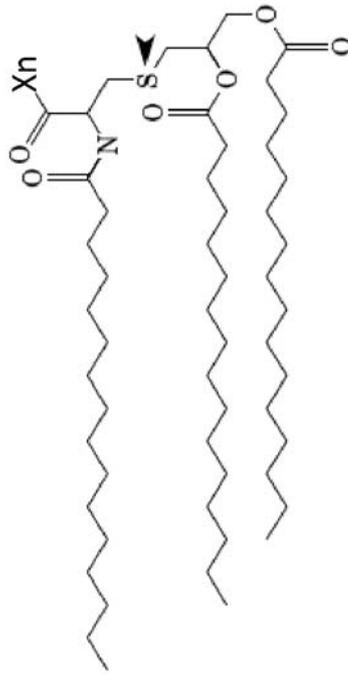


Figura 5

