

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 812**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/20** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/US2013/024370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13743514 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2809348**

54 Título: **Péptidos de diagnóstico para la enfermedad de Lyme**

30 Prioridad:

**01.02.2012 US 201261593605 P**  
**07.08.2012 US 201261680583 P**  
**25.09.2012 US 201261705344 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2019**

73 Titular/es:

**BIOPEPTIDES CORPORATION (100.0%)**  
**18 Woodhull Road**  
**East Setauket, NY 11733, US**

72 Inventor/es:

**DATTWYLER, RAYMOND, J. y**  
**ARNABOLDI, PAUL, M.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 699 812 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

Péptidos de diagnóstico para la enfermedad de Lyme

- 5 Esta solicitud es una Etapa Nacional de la Solicitud Internacional N.º PCT/US2013/024370, presentada el 1 de febrero de 2013, que reivindica el beneficio de las fechas de presentación de las solicitudes provisionales de Estados Unidos n.º 61/593.605, presentada el 1 de febrero de 2012; n.º 61/680.583, presentada el 7 de agosto de 2012; n.º 61/705.344, presentada el 25 de septiembre de 2012.
- 10 Esta solicitud se realizó con el apoyo del gobierno de EE. UU. (NIH-NIAID, número de concesión 1R44 AI07092). Por lo tanto, el gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

### Listado de secuencias

- 15 La presente solicitud de patente contiene un Listado de secuencias que se ha enviado a través de EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el 11 de marzo de 2013, se denomina 64557-343983\_SL.txt y tiene un tamaño de 96.530 bytes.

### Campo de la invención

- 20 Esta invención se refiere, por ejemplo, a agentes y métodos para diagnosticar la enfermedad de Lyme.

### Información general

- 25 La enfermedad de Lyme (a veces referida en el presente documento como EL o borreliosis de Lyme) es una enfermedad común transmitida por vectores que es un problema importante de salud pública. La enfermedad se transmite por la picadura de varias especies de garrapatas Ixodes que llevan el agente etiológico, una bacteria *Borrelia* patógena (una espiroqueta). Los organismos del grupo *Borrelia burgdorferi* sensu lato pertenecen a la familia *Spirochaetaceae*, género *Borrelia*. Hay por lo menos 11 especies en el complejo de *B. burgdorferi* y un número desconocido pero grande de subcepas. Al menos tres genoespecies del grupo *Borrelia burgdorferi* sensu lato han sido identificadas como patógenos: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelli*, y *B. garinii*. Además, otras especies de *Borrelia* han sido implicadas como agentes patógenos causantes. El principal reservorio de la infección en los Estados Unidos es el ratón de patas blancas, y la infección se puede transmitir a muchas especies de mamíferos, incluidas otras formas de vida silvestre, *por ejemplo*, ardillas del este, y perros, gatos y seres humanos.

- 35 Clínicamente, la enfermedad de Lyme es una enfermedad progresiva con una amplia gama de manifestaciones. El diagnóstico precoz y el tratamiento es crítico para prevenir la progresión. La infección diseminada tardía se puede asociar con daño permanente en los sistemas nervioso y musculoesquelético. A diferencia de la mayoría de las enfermedades bacterianas que se pueden definir microbiológicamente por observación directa o cultivo del patógeno, *B. burgdorferi* es difícil de cultivar u observar en muestras clínicas. Por lo tanto, la enfermedad de Lyme se define indirectamente. El eritema migratorio (EM) es el marcador clásico de esta infección en etapas tempranas. Sin embargo, no todos los pacientes infectados con *Borrelia* patógena desarrollan EM. En ausencia de EM, la base actual para el diagnóstico es la demostración de una respuesta de anticuerpos contra una *Borrelia* patógena en un entorno clínico adecuado.

- 45 El documento US 2006/194267 A1 desvela métodos y un kit para el diagnóstico de enfermedades transmitidas por garrapatas.

- Desafortunadamente, los ensayos serológicos actuales para dichos anticuerpos sufren de baja sensibilidad y especificidad, especialmente en la enfermedad temprana. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, de sus siglas en inglés) actualmente recomiendan que para que un paciente sea considerado seropositivo, deben ser positivos dos análisis: un análisis inicial, como un ELISA, IFA o un ensayo de flujo lateral, seguido de un análisis confirmatorio, como una transferencia western. Este enfoque es costoso y puede demorar el diagnóstico durante una semana o más, pero es necesario debido a la escasa especificidad de los análisis iniciales más utilizados comúnmente. Existe la necesidad de un método de diagnóstico simple, sensible y específico para la detección de la enfermedad de Lyme, *por ejemplo*, en los primeros tiempos después de la infección.

### Descripción de los dibujos

- 60 La **Figura 1A** muestra datos representativos que demuestran la unión mejorada del suero de pacientes con enfermedad de Lyme al péptido de SEQ ID NO: 8 en comparación con el suero de individuos sanos (sueros normales) o pacientes con sífilis (sueros RPR+). El panel superior demuestra la unión del suero en varias diluciones diferentes. El panel inferior izquierdo compara la unión del anticuerpo de los sueros de pacientes individuales al 50 % del título de unión al suero máximo, que es la dilución del suero a la cual la absorbancia de una curva de unión particular (como se muestra en el panel superior) alcanza el 50 % de la absorbancia máxima registrada para esa curva. El panel inferior derecho compara los valores de absorbancia generados mediante la

unión del anticuerpo de sueros de pacientes individuales en una sola dilución (1:100). Los datos se generaron utilizando técnicas ELISA estándar y un anticuerpo secundario anti-IgG e IgM humanas de cabra para detectar la unión del anticuerpo sérico.

La **Figura 1B** muestra datos representativos que demuestran la unión mejorada del suero de pacientes con enfermedad de Lyme al péptido de SEQ ID NO: 11 en comparación con el suero de individuos sanos (sueros normales) o pacientes con sífilis (sueros RPR+). El panel superior muestra la unión media del anticuerpo sérico a varias diluciones diferentes (n = 10 pacientes/grupo). El panel inferior izquierdo compara la unión del anticuerpo de los sueros de pacientes individuales al 50 % del título de unión al suero máximo, que es la dilución del suero a la cual la absorbancia de una curva de unión particular (como se muestra en el panel superior) alcanza el 50 % de la absorbancia máxima registrada para esa curva. El panel inferior derecho compara los valores de absorbancia generados mediante la unión del anticuerpo de sueros de pacientes individuales en una sola dilución (1:100). Los datos se generaron utilizando técnicas ELISA estándar y un anticuerpo secundario anti-IgG e IgM humanas de cabra para detectar la unión del anticuerpo sérico. Se han generado datos similares para todos los péptidos discutidos en esta aplicación.

La **Figura 2** muestra datos representativos que comparan la capacidad media de unión a péptidos de anticuerpos séricos de pacientes con enfermedad de Lyme, individuos sanos (sueros normales) o pacientes con sífilis (sueros RPR+) en varias diluciones de suero diferentes (n = 10 pacientes/grupo). Los datos se generaron utilizando técnicas ELISA estándar y un anticuerpo secundario anti-IgG e IgM humanas de cabra para detectar la unión del anticuerpo sérico. Se han generado datos similares para todos los péptidos discutidos en esta aplicación.

La **Figura 3** muestra datos representativos que comparan los valores de absorbancia generados por la unión del anticuerpo de sueros de pacientes individuales en una sola dilución (1:100). Los datos se generaron utilizando técnicas ELISA estándar y un anticuerpo secundario anti-IgG e IgM humanas de cabra para detectar la unión del anticuerpo sérico. Se han generado datos similares para todos los péptidos discutidos en esta aplicación.

La **Figura 4** muestra datos representativos que comparan la unión del anticuerpo de sueros de pacientes individuales al 50 % del título de unión al suero máximo, que es la dilución del suero a la cual la absorbancia de una curva de unión particular (como se muestra en el panel superior) alcanza el 50 % de la absorbancia máxima registrada para esa curva. Los datos se generaron utilizando técnicas ELISA estándar y un anticuerpo secundario anti-IgG e IgM humanas de cabra para detectar la unión del anticuerpo sérico. Se han generado datos similares para todos los péptidos discutidos en esta aplicación.

La **Figura 5** muestra los anticuerpos IgG e IgM específicos para péptidos OspC en suero de pacientes con enfermedad de Lyme. Se confirmó que el suero de pacientes con enfermedad de Lyme era positivo para anticuerpos *anti-Borrelia* utilizando tiras de transferencia Western disponibles comercialmente antes de la incubación con péptidos OspC (10 µg/ml) en un ELISA. La unión del anticuerpo se detectó utilizando un anticuerpo policlonal anti-IgG e IgM humanas de cabra marcado con HRP (específico de la cadena γ y µ). Los paneles superiores muestran una dosis de titulación de los sueros de pacientes con enfermedad de Lyme (n = 10) y el suero de control sano (sueros normales, n = 10) en placas de 96 pocillos recubiertas con el péptido OspC. Los datos se indican como absorbancia media ± DE. Los paneles inferiores representan la unión del suero de pacientes con enfermedad de Lyme y controles sanos (sueros normales) en una sola dilución de 1:100. Los datos se indican como absorbancia a 450nm-570nm, la línea representa la media ± DE. OspC 1 (Lyme n = 20, normal n = 10), OspC 18 (Lyme n = 20 y normal n = 10), OspC 30 (Lyme n = 17, normal n = 10). Los paneles superior e inferior son experimentos diferentes, realizados en días diferentes, con diferentes muestras de pacientes. \* p < 0,05 por prueba de Mann-Whitney.

La **Figura 6** muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de diferentes tipos de OspC que representan las regiones correspondientes a OspC1, OspC 30 y PepC10. Las secuencias se alinearon utilizando un banco de trabajo CLC y se recortaron para mostrar solo las regiones correspondientes a los péptidos de interés. En varios ejemplos, las secuencias completas para los tipos de OspC que contienen los tres péptidos no estaban disponibles. Cuando fue posible, se alinearon múltiples secuencias parciales para ese tipo de OspC, que representan la presencia o ausencia de una secuencia peptídica particular. \* = secuencia parcial. \*\* = secuencia parcial utilizada para el mapeo de epítomos. Los identificadores de secuencia de los péptidos, que se leen desde la parte superior a la parte inferior de la figura, son, respectivamente, en orden de aparición, las SEQ ID NO 217-236.

La **Figura 7** muestra una comparación de OspC1 y PepC10 en la detección de anticuerpos IgM e IgG en suero de pacientes con enfermedad de Lyme temprana. Se incubaron el suero de pacientes con enfermedad de Lyme temprana (eritema migratorio +), controles sanos, pacientes con artritis reumatoide (AR) o pacientes con sífilis (RPR+) en placas recubiertas con OspC1 o PepC10 (10 µg/ml) en un ELISA. Se detectaron IgM (a) e IgG (b) en suero utilizando anticuerpos anti-cadena µ o anti-cadena γ de cabra marcados con HRP, respectivamente. La línea discontinua representa 3 DE de la media de los controles sanos incubados con OspC 1; la línea de puntos representa 3 DE de la media de controles sanos incubados con PepC10. Las líneas se superponen en a. Los datos se indican como absorbancia a 450nm-570nm. Lyme (n = 98), Normal (n = 48), AR (n = 48), Sífilis (n = 39).

La **Figura 8** muestra las regiones antigénicas y las secuencias de péptidos en la secuencia de longitud completa de OppA-2. Los péptidos individuales, en el orden de aparición de izquierda a derecha, se representan, respectivamente, como las SEQ ID NOS: 10, 215, 53, 260, 47, 45 y 216.

La **Figura 9** muestra que los epítomos lineales de OppA2 se conservan entre las especies de *Borrelia* patógenas. Las secuencias, que se muestran desde la parte superior a la parte inferior de la figura, se representan, respectivamente, en orden de aparición, mediante las SEQ ID NOS 11 y 237-245.

La **Figura 10** muestra que los epítomos lineales de OppA2 se conservan entre las especies de *Borrelia* patógenas. Las secuencias, que se muestran desde la parte superior a la parte inferior de la figura, se representan mediante las SEQ ID NOS 45 y 246-254, respectivamente, en orden de aparición.

La **Figura 11** muestra los ELISA con péptidos sintéticos individuales para la detección de anticuerpos IgG e IgM en humanos. Detección de anticuerpos con péptidos sintéticos mediante ensayo ELISA utilizando sueros de controles normales (n = 45), EM en la primera presentación (n = 104), artritis reumatoide (n = 30) y sífilis (n = 26). Se utilizaron 500 nanogramos/pocillo de cada péptido (panel A a G). \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001; ns = no significativo.

La **Figura 12** muestra los ELISA con péptidos sintéticos individuales para la detección de anticuerpos IgG e IgM en humanos. Detección de anticuerpos con péptidos sintéticos mediante un ensayo ELISA que utiliza sueros de sueros de la enfermedad de Lyme positivos a PCR de la piel y negativos en hemocultivo, día 0 y día 30 (n = 13 cada uno), sueros de sueros de la enfermedad de Lyme positivos a PCR de la piel y positivos en hemocultivo (n = 10 y n = 16, respectivamente) y controles sanos (n = 45). Se utilizaron 500 nanogramos/pocillo de cada péptido (panel A a G). \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001; ns = no significativo.

**DESCRIPCIÓN**

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Los presentes inventores, mediante la utilización de una estrategia de mapeo de epítomos finamente detallada, han identificado al menos 22 péptidos que pueden reconocer específica y eficazmente anticuerpos contra una *Borrelia* patógena que se desarrollan en un sujeto infectado con un patógeno del grupo *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Los péptidos identificados por los inventores proceden de la especie patógena norteamericana de *B. burgdorferi*, *B. burgdorferi* sensu stricto. Los péptidos que se discuten en la presente solicitud están representados por las SEQ ID NO: 1-28 y 41-47, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1**

Nombre de la proteína/ posición en la proteína	Secuencia
p66 (516-530)	FEDAMKLGALYLDY (SEQ ID NO:1)
p66 (576-590)	LIRFTTISLGWDSNN (SEQ ID NO:2)
RecA (231-245)	KFYSSLRLEVRKIEQ (SEQ ID NO:3)
LA-7 (91-110)	IPSKENAKLIVYFYDENVYAG (SEQ ID NO:4)
LA-7 (91-105)	IPSKENAKLIVYFYD (SEQ ID NO:5)
LA-7 (96-110)	NAKLIVYFYDENVYAG (SEQ ID NO:6)
OspC-tipo A (66-85)	KNEGLKEKIDAAKCCSETFT (SEQ ID NO:7)
OspC-tipo K (11-30)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO:8)
OspC-tipo K (146-160)	AKKAILITDAAKDKG (SEQ ID NO:9)
OppA (11-25)	IFFLTFLCCNNKERK (SEQ ID NO:10)
OppA (191-225)	YGQNWTPENMVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNNK (SEQ ID NO:11)
OppA (276-290)	SDYYSSAVNAIFYA (SEQ ID NO:12)
OppA (286-300)	IYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO:13)
OppA (276-300)	SDYYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO:14)
Bbg33 (176-190)	DMFSLEQRLEIKLEA (SEQ ID NO:15)
DbpB (11-25)	LVACSIGLVERTNAA (SEQ ID NO:16)
BmpA (56-70)	KEEFKIELVLKSSS (SEQ ID NO:17)
FLiIB (46-60)	IVSYFVSKMVVSQSG (SEQ ID NO:18)
FLiIB (91-110)	NTLDVPPKTFWKLALGYAE (SEQ ID NO:19)
FLiIB (16-30)	VSRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO:20)
FLiIB (126-140)	LKDIIREYFSQRTGQ (SEQ ID NO:21)
Bbk32 (16-30)	GFISCDLFIYEMKE (SEQ ID NO:22)
Bbk32 (51-80)	KKPMNKKGKGIARKKGGKSKVSRKEPYIHS (SEQ ID NO:23)
P35 (101-115)	DTGSERSIRYRRRVY (SEQ ID NO:24)
ErpP (51-65)	KIEFSKFTVKIKNKD (SEQ ID NO:25)
CRASP 2 (206-225)	NSRSRYNNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO:26)
OspF (86-105)	INKLEAKKTSKTYSEYEEQ (SEQ ID NO:27)

Nombre de la proteína/ posición en la proteína	Secuencia
OspF (216-230)	IDDSIKKIDEELKNT (SEQ ID NO:28)
DbpA (6-20)	NKTFNLLKLTLVNL (SEQ ID NO:41)
DbpA (6-30)	NKTFNLLKLTLVNLISCGLTGA (SEQ ID NO:42)
DbpA (16-30)	TILVNLISCGLTGA (SEQ ID NO:43)
DbpA (76-90)	PFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO:44)
OppA (381-400)	KKICEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO:45)
OppA (286-310)	IYFYAFNTHIKPLDENVKIRKALTLA (SEQ ID NO:46)
OppA (356-375)	LAEAGYPNGNGFPILKLYN (SEQ ID NO:47)

La numeración de los restos de aminoácidos de los péptidos corresponde a la numeración de los aminoácidos en las proteínas de longitud completa correspondientes.

- 5 Un aspecto de la invención es una composición que comprende 10 (o menos) de los siguientes 10 péptidos, o variantes activas de los mismos, en la que uno o más de los aminoácidos están sustituidos con un reemplazo de aminoácidos, en donde el péptido o la variante activa pueden unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena y en donde al menos uno de los péptidos es la SEQ ID NO: 25:
- 10 YGQNWTSPENMVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNNK (SEQ ID NO:11)  
 KKPMNKKGKGIARKKGGKSKVSRKEPYIHS (SEQ ID NO:23)  
 MTLFLFISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO:8)  
 KFYSSLRLEVRKIEQ (SEQ ID NO:3)  
 KEEFKIELVLKESSS (SEQ ID NO: 17)
- 15 INKLEAKKTSKTYSEYEEQ (SEQ ID NO:27)  
 TILVNLISCGLTGA (SEQ ID NO:43)  
 KIEFSKFTVKIKNKD (SEQ ID NO:25)  
 DTGSERSIRYRRRVY (SEQ ID NO:24)  
 IDDSIKKIDEELKNT (SEQ ID NO:28).
- 20

Este grupo de péptidos se denomina a veces en el presente documento péptidos del Grupo I. En una realización de este aspecto de la invención, la composición comprende los 10 péptidos del Grupo I, pero no las variantes activas. En algunas realizaciones, la composición comprende cualquiera de 9, cualquiera de 8, cualquiera de 7, cualquiera de 6, cualquiera de 5, cualquiera de 4, cualquiera de 3 o cualquiera de 2 de los 10 péptidos o variantes activas de los mismos. En algunas divulgaciones, la composición comprende el péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 11; o comprende el péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 23; o comprende el péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 8; o comprende el péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 3; o comprende los péptidos o variantes activas de las SEQ ID NO: 11 y 23; o comprende los péptidos o variantes activas de las SEQ ID NO: 11 y 8; o comprende los péptidos o variantes activas de las SEQ ID NO: 8 y 23. En algunas divulgaciones, los péptidos en una composición son de 3 o más, o 4 o más, o 5 o más, o 6 o más, o 7 o más proteínas diferentes de *Borellia burgdorferi* sensu lato. Las proteínas pueden ser, *por ejemplo*, OppA, Bbk32, OspC-tipo K, RecA, BmpA, OspF, DbpA, ErpP, p35, OspF, CRASP 2, FliiB, p66, OspC-tipo A o DdpB. Por ejemplo, la composición comprende al menos 7 o al menos 8 de los péptidos o variantes activas del Grupo I, en donde el péptido de la SEQ ID NO: 11, o el péptido de la SEQ ID NO: 23, o ambos de estos péptidos, están presentes en la composición. La composición puede comprender

25

30

35

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende dos o más (*por ejemplo*, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, o al menos 9) de los péptidos del Grupo I, o variantes activas de los mismos, en la que uno o más de los aminoácidos están sustituidos con un reemplazo de aminoácidos, en donde el péptido o la variante activa puede unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena. Por ejemplo, una composición comprende un péptido o variante activa de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 23, 8, 3, 17, 27, 43, 25, 24, 28, o 26. En otras realizaciones, la composición comprende además, además de uno de los péptidos indicados del Grupo I, un péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 11, o un péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 23, o un péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 8, o un péptido o variante activa de la SEQ ID NO: 3; o péptidos o variantes activas de ambas SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 23; o péptidos o variantes activas de ambas SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 8, o péptidos o variantes activas de ambas SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 23. En algunas realizaciones, los péptidos en una composición de este aspecto de la invención son de 3 o más, o 4 o más, o 5 o más, o 6 o más, o 7 o más u 8 o más, proteínas diferentes de *Borellia burgdorferi* sensu lato. Las proteínas pueden ser, *por ejemplo*, OppA, Bbk32, OspC-tipo K, RecA, BmpA, OspF, DbpA, ErpP, p35, OspF, CRASP 2, FliiB, p66, OspC-tipo A o DdpB. Otras combinaciones de los péptidos del Grupo I también se incluyen en este aspecto de la presente invención.

40

45

50

Las composiciones de cualquiera de los aspectos de la invención discutidos anteriormente pueden comprender

además uno o más de los siguientes 12 péptidos, o variantes activas de los mismos, en los que uno o más de los aminoácidos están sustituidos con un reemplazo de aminoácidos, en donde el péptido o la variante puede unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena:

- 5 NSRSRYNNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO:26)  
 GFISCDLFIRYEMKE (SEQ ID NO:22)  
 NTLDVPPKTFVVKLALGYAE (SEQ ID NO:19)  
 KKICEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO:45)  
 VSRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO:20)  
 10 NKTFNLLKLTLVN (SEQ ID NO:41)  
 LIRFTTISLGWDSNN (SEQ ID NO:2)  
 FEDAMKLGALYLDY (SEQ ID NO:1)  
 IYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO:13)  
 AKKAILITDAAKDKG (SEQ ID NO:9)  
 15 KNEGLKEKIDAAKCCSETFT (SEQ ID NO:7)  
 LVACSIGLVERTNAA (SEQ ID NO:16).

Este grupo de péptidos se denomina a veces en el presente documento péptidos del Grupo II. Por ejemplo, una composición puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de los péptidos o variantes activas de los mismos del Grupo II, en cualquier combinación que sea deseable.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende 12 (o menos) de los péptidos del Grupo II, o variantes activas de los mismos, en los que uno o más de los aminoácidos están sustituidos con un reemplazo de aminoácidos, en donde el péptido o la variante puede unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena.

En una realización de la invención, una composición comprende de aproximadamente 4 a aproximadamente 15 (*por ejemplo*, de aproximadamente 5 a aproximadamente 12) de los péptidos o variantes activas de los mismos del Grupo I y el Grupo II combinados, y los péptidos proceden de al menos 5 o 6 proteínas diferentes. Péptidos adicionales o variantes activas de los mismos también pueden estar presentes en una composición de la invención. Como se utiliza en el presente documento, "aproximadamente" significa más o menos el 10 % del valor.

Uno o más de cualquiera de los péptidos indicados anteriormente pueden comprender además un resto de cisteína N-terminal; y/o puede comprender además 1-3 aminoácidos adicionales y/o 1-3 menos en uno o ambos extremos del péptido.

Una composición discutida anteriormente puede comprender además uno o más péptidos adicionales que son específicos para anticuerpos contra proteínas iguales o diferentes de la misma o diferente *Borrelia* patógena. Por ejemplo, se desvela una composición que comprende, además de los péptidos en las composiciones discutidas anteriormente, un péptido que comprende un epítipo de la *Borrelia* flagellin p41 (*por ejemplo*, el péptido que tiene la secuencia VQEGVQQEGAQQP (SEQ ID NO: 39)), y/o un epítipo de *Borrelia* OspC (*por ejemplo*, el péptido que tiene la secuencia PVVAESPCKP (SEQ ID NO: 40)). Alternativamente, o además, una composición, como se discutió anteriormente, puede comprender además un péptido de la proteína *Borrelia* VLsE (región IR6) (*por ejemplo*, el péptido de 26 aminoácidos CMKKDDQIAA MVLRGMAKDGQFALK (SEQ ID NO 48), que está actualmente en uso comercial), o un péptido más corto de 17 aminoácidos de esta región, MKKNDQI (V o G) AAIALRGVA (SEQ ID NO: 49), o variantes activas de la misma. El péptido de 17 aminoácidos y sus variantes activas se describen en detalle en el documento USP 7.887.815.

Otro aspecto de la invención es un péptido aislado que comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 23, 8, 3, 17, 27, 43, 25, 24, 28, o 26, o una cualquiera de las SEQ ID NO: 26, 22, 19, 45, 20, 41, 2, 1, 13, 9, 7 o 16, o una variante activa de los mismos en la que uno o más de los aminoácidos están sustituidos con un reemplazo de aminoácidos, en donde el péptido o la variante pueden unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena y en donde al menos uno de los péptidos es la SEQ ID NO: 25. El péptido aislado puede comprender además un resto de cisteína N-terminal; y/o puede comprender además 1 aminoácido adicional y/o 1 menos en un extremo del péptido.

Se desvela un compuesto aislado que comprende dicho péptido aislado, unido a al menos una fracción adicional, a través de un enlazador de aminoácido terminal o un agente de acoplamiento químico. La fracción adicional puede ser, *por ejemplo*, un segundo péptido que reconoce específicamente un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena, en la que el péptido y el segundo péptido están unidos covalentemente. En una divulgación, el péptido y el segundo péptido están separados entre sí por un espaciador de 1-5 restos de glicina o alanina. El segundo péptido puede ser cualquiera de los péptidos del Grupo I o Grupo II, o una variante activa de los mismos, o un péptido que comprende un epítipo de *Borrelia* flagellin p41 (*por ejemplo*, que tiene la secuencia VQEGVQQEGAQQP (SEQ ID NO: 39)) o de *Borrelia* OspC (*por ejemplo*, que tiene la secuencia PWAESPCKP (SEQ ID NO: 40)). Cualquiera de estos compuestos aislados puede incluirse en una composición.

Otro aspecto de la invención es un reactivo de diagnóstico que comprende uno o más de los péptidos aislados, compuestos aislados o composiciones descritas en el presente documento, y un sistema para detectar el (los) péptido(s) y/o un sustrato para inmovilizar el (los) péptido(s).

5 Otro aspecto de la invención es un kit para diagnosticar la borreliosis de Lyme, que comprende uno o más péptidos aislados, compuestos aislados o composiciones de la invención, y un sistema para detectar el (los) péptido(s) unidos a un anticuerpo contra una proteína de *Borrelia* patógena y/o un sustrato (*por ejemplo*, una superficie en un pocillo o una perla, tal como una perla de poliestireno, para inmovilizar el (los) péptido(s)). Los péptidos en un kit de la invención pueden distribuirse en uno o más recipientes.

10 Otro aspecto de la invención es un método que diagnostica la enfermedad de Lyme en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra de un sujeto sospechoso de tener anticuerpos contra un agente causante de la enfermedad de Lyme con un péptido aislado, compuesto aislado o composición de la invención, bajo condiciones eficaces para la formación de un complejo péptido-anticuerpo, y para detectar la presencia del complejo péptido-anticuerpo. En realizaciones de la invención, el complejo péptido-anticuerpo se detecta mediante la adición de una pareja de unión que está marcada, o que se puede marcar con un reactivo generador de señal. La pareja de unión puede ser, *por ejemplo*, un anticuerpo unido a una enzima, y se genera una señal cuando la enzima reacciona con un sustrato adecuado. En otra realización, la detección se realiza con un ensayo ELISA. En otra realización, la detección se realiza con un ensayo basado en perlas Luminex; mediante análisis de micromatrices, o métodos de flujo lateral. El sujeto puede ser un mamífero, tal como, *por ejemplo*, un gato, un perro o un ser humano.

Las variantes activas de los péptidos representados por las SEQ ID NO: 1-28 y 41-47 también se incluyen en la invención. Dichas variantes activas incluyen, *por ejemplo*, péptidos en los que uno o más de ciertos aminoácidos están sustituidos con un reemplazo de aminoácidos conservador o no conservador.

25 Los inventores han alineado y comparado las secuencias de los 35 péptidos indicados en la Tabla 1 de una amplia variedad de subespecies o aislados individuales de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, que incluye todas las genoespecies de *Borellia* patógenas que pueden causar la enfermedad de Lyme, incluida *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y *B. afzelli* así como algunas otras menores que pueden causar la enfermedad en regiones geográficas limitadas. Cada genoespecie de la bacteria tiene múltiples cepas. Por lo tanto, cada alineación BLAST puede tener docenas de variantes diferentes entre las diferentes cepas en cada genoespecie. Utilizando tales alineaciones, un experto en la materia puede determinar fácilmente qué restos de aminoácidos se conservan y pueden ser importantes por la capacidad de unirse específica y eficazmente a anticuerpos contra *Borrelia* patógena que se desarrollan en un sujeto infectado con un patógeno de *Borrelia*; y qué aminoácidos difieren entre los péptidos de estas cepas, pero los péptidos parecen retener al menos parte de la especificidad y eficacia de unión y, por lo tanto, estos aminoácidos parecen ser no esenciales (o al menos no muy importantes) para esta actividad.

40 A continuación se muestran las secuencias de consenso para algunos de los péptidos de la invención, procedentes de en parte sobre la base de dichos alineamientos, en parte en el análisis ELISA confirmatorio como se describe en otra parte en el presente documento, y en parte en estudios con péptidos mutantes generados *in vitro*. Se muestran las secuencias de consenso procedentes de dos algoritmos. El análisis también indica variantes activas de los péptidos; las variantes activas puede unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena. En las variantes activas, uno o más de los aminoácidos indicados se pueden sustituir con un reemplazo de aminoácidos, como un reemplazo de aminoácidos conservador. También se muestran algunas variantes activas particulares para cada uno de los péptidos.

#### 1. KEEFKIELVLKESST (BmpA (56-70); SEQ ID NO: 17).

50 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos E2, F4, K5, I6 y/o S15 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos; o los aminoácidos E2, E3, F4, K5, I6, L8 y/o S15 pueden estar sustituidos.

Secuencia de consenso: K (E o A) E (F o R) (K o E) (I o F) E L V L K E S S (S o T) (SEQ ID NO 54);

55 Variantes activas particulares: KEEFKIELVLKESST (SEQ ID NO 55); KAERKIELVLKE-(SEQ ID NO 56); KEEFKFELVLKESST (SEQ ID NO57); KEEFEIELVLKESST (SEQ ID NO 58); KAERKIELV(N)(L)LKE (SEQ ID NO 59); -EIFKIEKVL---- (SEQ ID NO 60),

#### 2. YGQNWTSPEMVTSGPFKLKERIPNEKYVFEKNNK (OppA (191-225); SEQ ID NO: 11).

60 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos Y1, G2, Q3, N4, S7, M11, T13, P16, F17, E21, I23, P24, E26, Y28, V29, F30 y/o N34 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

65 Secuencia de consenso N.º 1: (Y, H, o F) (G o K) (Q, G, E, o N) (N, K, S, R, o E) W T (S, N, o D) P E N (M o I) V (T o V) S G (P o A) (F o Y) K L K (E, K, S o R) R (I, S, L, o V) (P, L, o I) N (E o D) K (Y, V o I) (V o I) (F, V, L o I) E K N (N, D, o E) K (SEQ ID NO 61).

## ES 2 699 812 T3

Secuencia de consenso N.º 2: Y1, G2, Q3, N4, S7, P8, M11, T13, P16, F17, E21, 123, P24, E26, K27, Y28, V29, F30, N34, y/o K35 (SEQ ID NO 62)

Variantes activas particulares:

- 5 YGQNWTNPENMVTSGPFKLKERIPNEKIVFEKNNK (SEQ ID NO 257),  
YGENWTNPENIVVSGAYKLERLINDKIVIENNEK (SEQ ID NO 63),  
YGQEWTPENM/VVSGPFKLKSRVLNEKVVLEKNDK (SEQ ID NO 64),  
YKGNWTNPENMVTSGPFKLKRLPNEKIIFEKN-- (SEQ ID NO 65),  
10 HGQNWTNPENM/VVSGPFKLKSRVLNEKIILEKNNK (SEQ ID NO 66),  
YGQSWTPENIVTSGPFKLKERIPNEKYVVEKNDK (SEQ ID NO 67),  
YKGNWTSPENMVTSGPFKLKRLPNEKIIFEKNER (SEQ ID NO 68),  
YGQRWTPENM/VVSGPFKLKSRVLNEKWLEKNNK (SEQ ID NO 69),  
HGQEWTPENM/VVSGPFKLKSRVLNEKIILEKNNK (SEQ ID NO 70),  
15 FGNKWTNPENMVTSGPFKLKRRILNEEISLEKNNK (SEQ ID NO 71),  
FGNKWTSSENMVTSGPFKLKRRILNEEISLEKNEK (SEQ ID NO 72),

3. MTLFLFISCNNSGKDGNTSA (OspC-tipo K (11-30); SEQ ID NO: 8).

- 20 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos K14, G15, N17, T18, S19 y/o A20 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos F4, C9, N11, D15, G16, N17, T18, S19 y/o A20 pueden estar sustituidos.

25 Secuencia de consenso N.º 1: M T L F L F I S C N N S G (K o G) (D o G) G (N o D) (T, A, o S) (S, A, o T) (A o S) (SEQ ID NO 73).

Secuencia de consenso N.º 2: M T L (F, L, o Y) L F I S (C o S) N (N o T) S G K (D o G) (G, V, o A) (N, D, T o S) (T, A, o S) (S, A, o T) (A o T) (SEQ ID NO 74).

Variantes activas particulares:

- 30 ---FLFISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO 75),  
-TLFLFISCNNSGGD---T (SEQ ID NO 76),  
MTLFLFISCNNSGKGGDSAS (SEQ ID NO 31),  
MTLFLFISCNNSGKDGNSAS (SEQ ID NO 77),  
35 ----FISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO 78),  
---FLFISCNNSGKDGN--- (SEQ ID NO 79),  
MTLFLFISCNNSGKD----- (SEQ ID NO 80),  
MTLFLFISCNNSGKGGDSA- (SEQ ID NO 81),  
MTLFLFISCNNSGKDGNSA- (SEQ ID NO 82),  
40 MTLFFFISSNTSGKDGNSA (SEQ ID NO 83),  
MTLFLFISCNNSGKDGNASA (SEQ ID NO 84)

4. KFYSSLRLEVRKIEQ (RecA (231-245); SEQ ID NO: 3))

- 45 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos S4 y/o 113 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos K1, F2, Y3, S4, S5, L6, R7, L8, E9, V10, R11 y/o 113 pueden estar sustituidos.

50 Secuencia de consenso N.º 1: K F Y (S o A) S L R L E V R K (I o V) E Q (SEQ ID NO 85).

Secuencia de consenso N.º 2: (K o I) (F, I, o L) (Y, F, o D) (S o A) (S o N) (L o R) (R, F, N, o Q) (L, N o Y) (E o D) (V, A, I, o E) (R, V, I, K, o N) K (I, S, o V) E Q (SEQ ID NO 86).

Variantes activas particulares:

- 55 KFYASLRLEVRKIEQ (SEQ ID NO: 87),  
KFYASLRLEVRKVEQ (SEQ ID NO: 88),  
KFYSNRFLEIVKSE- (SEQ ID NO: 89),  
-IFSNLQNEAKKIEQ (SEQ ID NO: 90),  
KFYSSLRLEVRKVEQ (SEQ ID NO: 91),  
60 -FYSSLNYDENKI-- (SEQ ID NO: 92),  
KFYISVKLEYK---- (SEQ ID NO: 93),

5. GFISCDLFIYEMKE (SEQ ID NO: 22)

- 65 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos S4 y/o 113 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos G1, D6, I9, Y11, M13 pueden estar sustituidos.



Secuencia de consenso: (G o S) F I S C (D o N) L F (I o T) R (Y o D) E (M o I) K E (SEQ ID NO: 94).

Variantes activas particulares:

- 5 GFISCDLFI RDEIKE (SEQ ID NO: 95),  
SFISCNLFTRDEIKE (SEQ ID NO: 96),

6. KKPMN KKGKG KIARK KGKSK VSRKE PYIHS (SEQ ID NO: 23)

- 10 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos P3, M4, G8, G10, I12, K16, G17, K18, S19, K20, V21, S22, R23, E25, Y27 y/o 128 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos; o uno o más de los aminoácidos K2, P3, M4, N5, K6, K7, G8, G10, K11, 112, A13, R14, K16, G17, K18, S19, K20, V21, S22, R23, K24, E25, Y27, I28, H29 pueden estar sustituidos.

- 15 Secuencia de consenso N.º 1: K K (P o S) (M, I, o L) N K K (G o D) K (G o D) K (I o V) A R K (K o N) (G o V) (K o E) (S o G) (K o N) (V o A) (S o V) (R, G, o K) K (E o D) P (Y, S, o F) (I o N) H S (SEQ ID NO: 97).  
Secuencia de consenso N.º 2: K (K o N) (P, S, o D) (M, I, o L) (N, S, D, o T) (K o N) (K, Q, o E) (G, S, o D) K (G, S, o D) (K, E, o S) (I o V) (A, S o V) (R o K) K (K, Q, N, o L) (G, R, o V) (K, D, E, o N) (S, N, G, A, D, o W) (K, N, I, D, o R) (V, A, o E) (S, V, T, o F) (R, G, o K) (K o Q) (E o D) P (Y, S, o F) (I, N, T, o V) (H, N, o T) S (SEQ ID NO: 98).
- 20

Variantes activas particulares:

- 25 KNSMNNKKGKGIARKKKGKSKVSRKEPSIHS (SEQ ID NO: 99),  
KKSLNKKGKDKVARKKVEGNAVKKDPFNH- (SEQ ID NO: 100),  
KKPMNKKGKGIARKNGKSKVSGKEPFIHS (SEQ ID NO: 101),  
KKPMNKKGKGIARKKVKSKVSRKEPYIHS (SEQ ID NO: 102),  
KKPIN KQGKS KVSrk QGKSN VSRKE PSIHS (SEQ ID NO: 103),

30 7. TILVNLLISCGLTGA (SEQ ID NO:43)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos N5, 18 y/o S9 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos; o uno o más de los aminoácidos 12, V4, N5, L6, L7, 18, S9, G11 y/o T13 pueden estar sustituidos.

- 35 Secuencia de consenso N.º 1: T I L V (N o S) L L (I o V) (S o A) C G L T G A (SEQ ID NO: 104).  
Secuencia de consenso N.º 2 T (I, L, o V) L (V, I, o L) (N o S) (L o F) (L o F) (I o V) (S o A) C (G o S) L (T o K) G A (SEQ ID NO: 105).

40 Variantes activas particulares:

- 45 TILVNLLISCGLTGA (SEQ ID NO 43),  
TILVLLISCGLTGA (SEQ ID NO: 106),  
TILVNLLVACGLTGA (SEQ ID NO: 107),  
TILVLLVACGLTGA (SEQ ID NO: 108),  
---VLLVACGLTG- (SEQ ID NO: 109),  
-ILVNLFVLSG---- (SEQ ID NO: 110),  
TILVNLFVLS---- (SEQ ID NO: 111),  
TLIVGLLVACSLTG- (SEQ ID NO: 112),  
50 -ILVFFLISC----- (SEQ ID NO: 113),  
TVLI--LISCSL--- (SEQ ID NO: 114),  
TLLVSLFIACSLTG- (SEQ ID NO: 115),

55 8. KIEFSKFTVKIKNKD (SEQ ID NO:25)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos E3, K6, K10 y/o N13 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos; o uno o más de los aminoácidos 12, E3, S5, K6, T8, V9, K10, N13 y/o K14 pueden estar sustituidos.

- 60 Secuencia de consenso: K I (E o K) F S (K o E) F T V (K o N) I K (N o Y) K D (SEQ ID NO: 116).

Variantes activas particulares:

- 65 KIKFSKFTVKIKNKD (SEQ ID NO: 117),  
KIEFSEFTVKIKYK- (SEQ ID NO: 118),  
-IKFSEFTVNIK- (SEQ ID NO: 119),

-IKFSEFTVKIKYK- (SEQ ID NO: 120),

9. VSRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO:20)

5 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos V1, S2, R3, K4, G5, G6, L7, L8, P9, D10, I11 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

Secuencia de consenso N.º 1: (V o I) (S, o G) R K G G L L P D I I K I (SEQ ID NO: 121).

10 Secuencia de consenso N.º 2: secuencia (V o I) (S, G, o F) (R o S) (K, D, o N) (G, A, o D) (G, N, o E) (L, I, o F) (L o F) (P, S, o A) (D o E) (I o L) I I K I (SEQ ID NO: 122)

Variantes activas particulares:

15 IGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 123),  
VGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 124),  
VSRKAGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 125),  
VFSNDNFLSELIKI (SEQ ID NO: 126),  
VFSNDNFLSELIKI (SEQ ID NO: 127),  
20 ---KAGIFPDLII-- (SEQ ID NO: 128),

10. NTLDVPPKTFVVKLALGYAE (SEQ ID NO: 19)

25 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos L3, D4, V5, P6, P7, T9, F10, V12, K13 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos L3, D4, V5, P6, P7, K8, T9, V12, K13 pueden estar sustituidos.

Secuencia de consenso N.º 1: N T (L o Q) (D o E) (V o T) (P o S) (P o S) K (T o S) (F o I) V (V o I) (K o R) L A L G Y A E (SEQ ID NO: 129).

30 Secuencia de consenso N.º 2: N T (L o Q) (D o E) (V o T) (P o S) (P o S) (K o R) (T o D) F V (V o I) (K o R) L A L G Y A E (SEQ ID NO: 130).

Variantes activas particulares:

35 IGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 123),  
VGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 124),  
-TQDTPPKTFVIKALALGYAE (SEQ ID NO 131),  
-TQDTPPKTFVIKALALGYA- (SEQ ID NO: 132),  
-TLEVSSKSIVVRL----- (SEQ ID NO: 133),

40 11. IYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO: 13)

45 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos Y2, F3, Y4, A5, F6, T8, H9, 110 y/o rN15 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos Y2, F3, Y4, A5, F6, T8, H9, 110, D14 pueden estar sustituidos.

Secuencia de consenso N.º 1: I (Y o G) (F, L, o Y) (Y, o I) (A o S) (F o L) N (T o M) (H, T, K, o N) (I o V) K P L D (N o D) (SEQ ID NO: 134).

50 Secuencia de consenso N.º 2: I (Y o G) (F, L, o Y) (Y, F, I, o L) (A, R, K o S) (F o L) N (T o M) (H, T, K, o N) (I, V, o A) K P L (D o N) N (SEQ ID NO: 135).

Variantes activas particulares:

55 IYFYAFNTTVKPLDN (SEQ ID NO: 136),  
IYFYAFNTKAKPLDN (SEQ ID NO: 137),  
IYLYSFNTKIKPLDD- (SEQ ID NO: 138),

12. KKICEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO:45)

60 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos K1, K2, I3, C4, E5, I7, N9, W11, N14, D18, V19, E20 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos. O uno o más de los aminoácidos K1, K2, I3, C4, E5, I7, Q8, N9, W11, K12, K13, N14, D18, V19, E20 está sustituido.

Secuencia de consenso N.º 1: (K o R) (K o E) (I, V, o G) (C, A, o Y) (E, A, S, N, o T) F (I o L) Q (N, S, o E) Q (W o F) K K (N, I, o V) L N I (D o N) (V, I, o L) (E o Q) (SEQ ID NO: 139).

65 Secuencia de consenso N.º 2: (K o R) (K o E) (I, V, o G) (C, A, o Y) (E, A, S, N, o D) F (I o L) (Q o E) (N, S, o E) Q (W, E, F, o K) (K, N, o I) (K o N) (N, I, o V) L N I (D o N) (V, I, o L) (E, A, o Q) (SEQ ID NO: 140).

Variantes activas particulares:

5 KKICEFIQNQWKKNLNINVE (SEQ ID NO: 141),  
 KKICEFIQNQWKKILNIDVE (SEQ ID NO: 142),  
 RKIAEFIQNQWKKNLNINVQ (SEQ ID NO: 143),  
 KKIAAFIQNQWKKILNINL - (SEQ ID NO: 144),  
 KEVASFIQSQWKKVLNIDVE (SEQ ID NO: 145),  
 KKVATFIQNQWKKILNINI- (SEQ ID NO: 146),  
 10 KGAEFLQEQQFKKILNIKIE (SEQ ID NO: 147),  
 KKIAEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO: 148),  
 KKICEFIQNQWKKILNIDVE (SEQ ID NO: 149),  
 KEIANFIQSQWKKVLNIDIE (SEQ ID NO: 150),  
 KITAEFLQEQQFKKVLNINVA (SEQ ID NO: 151),  
 15 - --AEFLQEQQFKKILNINLE (SEQ ID NO: 152),

13. INKLEAKKTSKTYSEYEEQ (SEQ ID NO:27)

20 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos N2, L4, E5, A6, K7, L11, K12 y/o E19 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos N2, L4, E5, A6, K7, K8, T9, S10, L11, K12, S15, E16 y/o E19 pueden estar sustituidos.

25 Secuencia de consenso N.º 1: I (N, E, o D) K (L, S, o I) (E o D) (A, S, E, o I) (K o E) K T S (L o I) (K o E) T Y S E Y E (E o D) Q (SEQ ID NO: 153).  
 Secuencia de consenso N.º 2: I (N, E, o D) K (L, S, o I) (E o D) (A, S, E, o I) (K o E) (K, N, o S) (T o X) (S o X) (L, F, o I) (K, E, G, o T) T Y (S, N, o G) (E, D, o S) Y E (E o D) Q (donde X es cualquier aminoácido) (SEQ ID NO: 154).

Variantes activas particulares:

30 IEKLEAKKTSKTYSEYEE- (SEQ ID NO: 155),  
 IEKLDSKTSKTYSEYEE- (SEQ ID NO: 156),  
 IEKLDSKTSIETYSEYEE- (SEQ ID NO: 157),  
 IDKSDAKKTSKTYSEYE-- (SEQ ID NO: 158),  
 35 IEKSDPKSVSLKTYSDY--- (SEQ ID NO: 159),  
 --KIEIEKTELKTEYNEIED- (SEQ ID NO: 160),

14. IDDSIKKIDEELKNT (SEQ ID NO:28)

40 En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos D2, D3, S4, 15, D9, E11, L12, K13, N14 y/o T15 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos D2, D3, S4, I5, K6, K7, I8, D9, E10, E11, L12, K13, N14 y/o T15 pueden estar sustituidos.

45 Secuencia de consenso N.º 1: I (D,E,R, N, o T) (D, E, o N) (S o X) (I, L, F, o A) K K I (D, E, o N) E (E o S) (L, F, o I) (K o L) (N, K, S, D, o E) (T, S, o A) (donde X es cualquier aminoácido) (SEQ ID NO: 161).  
 Secuencia de consenso N.º 2: I (D,E,G, N, o T) (D, E, o N) (S o X) (I, L, F, V, o A) (K o E) (K o N) (I o L) (D, E, o N) (E o D) (E, A, o S) (L, F, I, o A) (K o N) (N, K, S, D, E, o G) (T, S, V, o A) (donde X es cualquier aminoácido) (SEQ ID NO: 162).

Variantes activas particulares:

50 IDDSIKKIEEELKNT (SEQ ID NO: 163),  
 IDDSLKKIEEELK-- (SEQ ID NO: 164),  
 IDENFKKIEEEFKDT (SEQ ID NO: 165),  
 ITNSLKKIEEELKEA (SEQ ID NO: 166),  
 55 IDENFKKIEEEFKD (SEQ ID NO: 167),  
 IEDLIKKINEEILN- (SEQ ID NO: 168),  
 INDSLKKIEEEL--- (SEQ ID NO: 169),  
 -DENFKKIEEEFKDT (SEQ ID NO: 170),  
 -DENFKKIEEEFKD- (SEQ ID NO: 171),  
 60 IDDALENINEELKK (SEQ ID NO: 172),  
 IRESAKKIDESLK- (SEQ ID NO: 173),  
 -EDLIKKINEEILN (SEQ ID NO: 174),  
 --NVIKRIEEEAKN- (SEQ ID NO: 175),

65

15. DTGSERSIRYRRRVY (SEQ ID NO:24)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos G3, S4, R6, 18, R9, Y10, R12, R13 y/o V14 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos o uno o más de los aminoácidos G3, S4, E5, R6, S7, I8, R9, Y10, R12, R13, V14 pueden estar sustituidos.

Secuencia de consenso N.º 1: D T (G o S) (S o T) E (R o K) S (I, K, o R) (R, K, o A) (Y o F) R (R o K) (R, H, o C) (V, T, I, o A) Y (SEQ ID NO: 176).

Secuencia de consenso N.º 2: D T (G o S) (S o T) (E o D) (R o K) (S o A) (I, K, o R) (R, K, o A) (Y o F) R (R o K) (R, H, C, o N) (V, T, I, o A) Y (SEQ ID NO: 177)

Variantes activas particulares:

DTSSERSIRYRRHVY (SEQ ID NO: 178),  
 DTGTERSIRYRKRTY (SEQ ID NO: 179),  
 DTGTERSIRFRRHTY (SEQ ID NO: 180),  
 DTGTERSIKFRRHHTY (SEQ ID NO: 181),  
 DTGTERSKAYRKRAY (SEQ ID NO: 182),  
 DTGTERSIRYRRRTY (SEQ ID NO: 183),  
 ---TERSIRYRKRTY (SEQ ID NO: 184),  
 ---TERSIRYRRHTY (SEQ ID NO: 185),  
 ---TERSIRFRRHTY (SEQ ID NO: 186),  
 ---SEKARKYRRNVY (SEQ ID NO: 187),  
 ---TERSKAYRKRAY (SEQ ID NO: 188),

16. FEDAMKLGALYLDY (SEQ ID NO: 1)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos A4, L7, L9 y/o A10 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

Secuencia de consenso: F E D (A o V) M K (L o I) G (L o I) (A o T) L Y L D Y (SEQ ID NO: 189).

Variantes activas particulares:

FEDAMKLGIALYLDY (SEQ ID NO: 190),  
 FEDAMKIGIALYLDY (SEQ ID NO: 191),  
 FEDAMKLGTLTYLDY (SEQ ID NO: 192),

17. LIRFTTISLGWDSNN (SEQ ID NO: 2)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos A4, L7, L9 y/o A10 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

Secuencia de consenso: L (I o F) R F (T o S) (T o A) I S (L o I) G (W o S) D S N N (SEQ ID NO: 193).

Variantes activas particulares:

fedamkglial

18. NSRSRYNNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 26)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos S4, N7, F9, G18 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

Secuencia de consenso: N S R (S o G) R Y (N o D) N (F, S, o Y) Y K K E A D F L (G o I) A A (SEQ ID NO: 199).

Variantes activas particulares:

NSRSRYDNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 200),  
 NSRSRYNNYYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 201),  
 NSRGRYNNYSYKKEADFLIAA (SEQ ID NO: 202),

19. NKTFNLLKLTLVN (SEQ ID NO: 41)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos T3, F4, N5, L7, L8 y/o T11 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

Secuencia de consenso: N K (T, E, o A) (F o Y) (N, K, o G) N (L, V, o I) (L o I) K L (T o G) I L V N (SEQ ID NO: 203).

Variantes activas particulares:

- 5 NKAFGNLLKEGILVN (SEQ ID NO: 204),  
NKIYKDLLKIALVN (SEQ ID NO: 205),  
NKTYKNLLKLTLVN (SEQ ID NO: 206),  
NKTFNNVIKLTILVN (SEQ ID NO: 207),

10 20. PFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO: 44)

En las variantes activas de este péptido, uno o más de los aminoácidos P1, L4, E5, A6, V8, R9, A10, T11, T12 pueden estar sustituidos con un reemplazo de aminoácidos.

- 15 Secuencia de consenso: (P o S) F I (L o K) (E, K, o Q) (A o S) K (V, M, o I) (R, K, o Q) (A o G) (T o I) (T, E, A, D, K, Q) V A E (SEQ ID NO: 208).

Variantes activas particulares:

- 20 SFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO: 209),  
SFILEAKMRGTTVAE (SEQ ID NO: 210),  
PFILKAKMRGTEVTE (SEQ ID NO: 211),  
-FIKQAKVRAIKVAE (SEQ ID NO: 212),  
-FILKAKIKAIQVAE (SEQ ID NO: 213),  
25 -FILKAKIQAIQVAE (SEQ ID NO: 214),

En otro análisis, los inventores alinearon y compararon las secuencias de la Tabla 1 con péptidos comparables de subespecies individuales de *B. burgdorferi*, así como *B. garinii* y *B. afzelli*, para identificar los restos de aminoácidos conservados y prescindibles. Los sueros de pacientes con enfermedad de Lyme en Europa, que han estado expuestos a *B. garinii* y/o *B. afzelli* (que, junto con *B. burgdorferi*, son endémicos en Europa), contienen anticuerpos que se unen a los péptidos representados por las SEQ ID NO: 1-28 y 41-47, que proceden de la cepa endémica de América del Norte, *B. burgdorferi*. En vista de esta reactividad cruzada, está claro que para un péptido dado que se une a sueros que contienen anticuerpos contra las tres cepas, y que muestra variabilidad entre restos de aminoácidos particulares en las tres especies, las regiones variables no son esenciales para una unión óptima del péptido al anticuerpo.

Los siguientes cuatro ejemplos son representativos de dichas alineaciones/comparaciones, y representan la variabilidad encontrada en las poblaciones de péptidos entre las tres cepas primarias de *Borrelia* que induce la enfermedad de Lyme. (1) Un péptido de *B. garinii* correspondiente al péptido identificado como SEQ ID NO: 11 tiene la secuencia YGENWTPENIVVSGAYKLERLINDKIVIEKNEK (SEQ ID NO: 29), que difiere de la SEQ ID NO: 11 por doce aminoácidos, en las posiciones 3, 7, 11, 13, 16, 17, 23, 24, 26, 28, 30, 34, mientras que un péptido correspondiente de *B. afzelli* (YKGNWTPENMVTSGPFKLKRLPNEKIIFEKN (SEQ ID NO: 30)) difiere de la SEQ ID NO 11 por nueve aminoácidos en las posiciones 2, 3, 7, 21, 23, 28, 29, 34, 35. Por lo tanto, las secuencias procedentes de *B. garinii* y *B. afzelli* son variantes activas del péptido de la SEQ ID NO: 11. (2) Un péptido de *B. garinii* correspondiente al péptido identificado como SEQ ID NO: 8 tiene la secuencia MTLFLFISCNNSGKGGDSAS (SEQ ID NO: 31), que difiere de la SEQ ID NO: 8 por cinco aminoácidos, *por ejemplo* en las posiciones 15, 17, 18, 19 y 20. Por lo tanto, la secuencia procedente de *B. garinii* es una variante activa del péptido de la SEQ ID NO: 8. (3) Los péptidos procedentes de *B. garinii* y *B. afzelli* correspondientes al péptido identificado como SEQ ID NO: 20 tienen la secuencia VGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 32), que difiere de la SEQ ID NO: 20 por un aminoácido, en la posición 2. Por lo tanto, las secuencias procedentes de *B. garinii* y *B. afzelli* son variantes activas del péptido de la SEQ ID NO: 20. (4) Un péptido de *B. garinii* correspondiente al péptido identificado como SEQ ID NO: 1 tiene la secuencia FEDAMKIGIALYLDY (SEQ ID NO: 33), que difiere de la SEQ ID NO: 1 por dos aminoácidos, en las posiciones 7 y 9, mientras que un péptido correspondiente de *B. afzelli* (FEDAMKLGIALYLDY (SEQ ID NO: 34)) difiere de la SEQ ID NO 1 por un aminoácido en la posición 9. Por lo tanto, las secuencias procedentes de *B. garinii* y *B. afzelli* son variantes activas del péptido de la SEQ ID NO: 1. Un experto en la materia, que conoce las secuencias representadas por una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-28, en vista de la observación de que el péptido puede unirse a anticuerpos *inducidos por Borrelia* de los tres *Borrelia* inductores de la enfermedad de Lyme descritos anteriormente, puede determinar fácilmente las secuencias de péptidos comparables de *B. garinii* y *B. afzelli* y, por lo tanto, derivar una secuencia de consenso que abarca variantes activas del péptido de *B. Burgdorferi* sensu lato.

La expresión "un péptido de la invención", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un péptido representado por cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 1, o una variante activa del mismo, particularmente aquellos péptidos que contribuyen a ensayos específicos y sensibles, talles como los péptidos del Grupo I o Grupo II.

Varios de los péptidos indicados tienen reactividad cruzada. Por ejemplo, tres de las ocho muestras de suero que se

utilizaron para la selección inicial de péptidos se obtuvieron de áreas europeas endémicas donde predominan *B. afzelli* y *B. garinii*.

Basándose en comparaciones de secuencias como las descritas anteriormente, un experto en la materia puede generar secuencias de consenso que representan cada una de las SEQ ID NO: 1-28 y 41-47 y variantes activas de las mismas. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 11 se puede representar por la secuencia de consenso: Y(K/G)(Q/E/G)NWT(S/N)PEN(M/I)V(T/V)SG(P/A)(F/Y)KLE(K)R(I/I)(P/I)N(E/D)K(Y/I)(V/I)( F/I)EKN(N/E/-)(K/-) (SEQ ID NO:35). Otros aminoácidos (ya sea homólogos o no homólogos) también pueden sustituirse en las posiciones variables, siempre que las sustituciones no impacten significativamente la capacidad del péptido para unirse a un anticuerpo generado contra la infección con una *Borrelia* patógena.

Cualquiera de los péptidos de la invención, puede contener opcionalmente un resto de cisteína (C) en su extremo N, para facilitar la unión de una molécula de biotina, que puede ser útil para unir el péptido a una superficie que comprende avidina.

Un aspecto de la invención es un método para diagnosticar la enfermedad de Lyme en un sujeto (*por ejemplo*, para diagnosticar la exposición y/o la infección por una *Borrelia* patógena), que comprende medir un fluido corporal (que se espera que contenga anticuerpos) del sujeto para la presencia de un anticuerpo contra un agente causante de la enfermedad de Lyme (*por ejemplo*, un anticuerpo capaz de unirse a dicho agente), en donde un nivel elevado de anticuerpo en el sujeto se compara con un nivel correspondiente de anticuerpo en un control (como un sujeto no afectado conocido) indica una infección por el agente causante y/o que el sujeto tiene la enfermedad de Lyme. Un "agente causante de la enfermedad de Lyme", como se utiliza en el presente documento, incluye una especie patógena de *B. burgdorferi*, *B. afzelli*, o *B. garinii*. La selección con suero procedente de Norteamérica y Europa indica que la selección con péptidos procedentes de burgdorferi predice la reactividad al mismo péptido presente en las otras dos cepas. Si este no fuera el caso, el suero europeo de Lyme no se uniría a los péptidos que los inventores utilizaron para estos estudios. También se incluyen otras especies de *Borrelia* que se han implicado en la enfermedad de Lyme, como *por ejemplo*, *B. lusitanae* y *B. valaisianae*, siempre que induzcan anticuerpos que puedan reaccionar específicamente con un péptido de la invención. Debe entenderse que la expresión "*Borrelia* patógena", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquiera de dichas genoespecies patógenas que causan la enfermedad de Lyme. "Enfermedad de Lyme", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad que exhibe las características que se resumen en Dattwyler, R.J. y Wormser, G. "Lyme borreliosis." en Infectious Diseases Medicine and Surgery (eds.) S. Gorbach y J. Bartlett, 3ª edición, Saunders Pub. Nueva York, Nueva York, 2003 y que es causada por una *Borrelia* patógena.

Una realización de este método comprende poner en contacto (incubar, reaccionar) un péptido de la invención con una muestra de un fluido biológico (*por ejemplo*, suero o LCR) de un sujeto (*por ejemplo*, un ser humano u otro animal) para ser diagnosticado (un sujeto sospechoso de tener la enfermedad de Lyme). En presencia de una respuesta de anticuerpos a la infección con una *Borrelia* patógena, se forma un complejo antígeno-anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo se denomina a veces en el presente documento como un complejo anticuerpo-péptido, un complejo péptido-anticuerpo, o un complejo anticuerpo-epitopo; estos términos se utilizan indistintamente. Posteriormente, se analiza la mezcla de reacción para determinar la presencia o ausencia de este complejo antígeno-anticuerpo. Se puede emplear una variedad de formatos de ensayos convencionales para la detección, tales como, *por ejemplo*, ELISA, análisis de micromatrices, ensayos basados en perlas de Luminex o métodos de flujo lateral. La presencia de una cantidad elevada del complejo anticuerpo-péptido indica que el sujeto fue expuesto e infectado con una *Borrelia* patógena capaz de causar la enfermedad de Lyme. En cualquier ensayo de detección de la invención, una respuesta positiva se define como un valor de 2 o 3 desviaciones estándar mayor que el valor medio de un grupo de controles sanos. Para los fines de la selección inicial, los inventores definieron una respuesta positiva al péptido como una diferencia estadísticamente significativa en la unión media de los anticuerpos séricos de pacientes con enfermedad de Lyme confirmada, en comparación con el suero de pacientes confirmados como seronegativos para la enfermedad de Lyme (controles normales), y suero de pacientes que son positivos para la sífilis (RPR+), donde la significación se mide como  $p < 0,05$  según lo determinado mediante una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación de Dunn. La unión del anticuerpo sérico se comparó a diluciones simples (1:50), así como los títulos de unión recíproca del 50 % (se prepararon varias diluciones de cada muestra de suero y se incubaron con cada péptido; el título de unión del 50 % se determinó como la dilución del anticuerpo a la absorbancia medida en el ensayo ELISA había alcanzado el 50 % de la absorbancia máxima registrada para cualquiera de las diluciones). Finalmente, cuando se haya completado un ensayo multi-péptido, el límite para una respuesta positiva será mayor que 3 DE de la media de un grupo de controles sanos. En algunas realizaciones, se requiere un análisis confirmatorio para proporcionar un serodiagnóstico inequívoco de la enfermedad de Lyme.

Los péptidos, composiciones que comprenden los péptidos (tales como composiciones de diagnóstico), kits y métodos de la invención ofrecen una serie de ventajas. Por ejemplo, permiten la detección simple, barata, rápida, sensible y precisa de la enfermedad de Lyme, y evitan la reactividad cruzada serológica con otras afecciones con síntomas "similares a Lyme", como mialgias, artralgias, malestar o fiebre, incluidas afecciones tales como sífilis, artritis crónica y esclerosis múltiple. Esto permite un diagnóstico preciso. Además, una prueba de diagnóstico de la invención (*por ejemplo*, un ensayo ELISA o un ensayo basado en perlas de Luminex) es útil en muestras de suero que contienen anticuerpos anti-OspA u otros anticuerpos producidos en respuesta a una vacuna basada en las

proteínas de la superficie externa de *Borrelia*; los péptidos de la invención no reaccionan de forma cruzada con tales anticuerpos, lo que permite la diferenciación de individuos vacunados de individuos que se infectaron naturalmente con *B. burgdorferi*. Además, el pequeño tamaño de un péptido de la invención permite que se combine fácilmente con otros péptidos de diagnóstico, descritos en el presente documento o conocidos por los expertos en la materia, *por ejemplo*, de otras proteínas de *Borrelia*, en un péptido lineal multiantigénico para utilizar en un ensayo de diagnóstico. La utilización de múltiples péptidos de la invención en un solo ensayo (*por ejemplo*, en forma de cóctel) aumentará la sensibilidad del ensayo para muestras de Lyme positivas, pero no para los controles de reactividad cruzada y el suero normal. Al incluir péptidos de una variedad de proteínas de *Borrelia*, la sensibilidad de un ensayo aumenta considerablemente con respecto a los ensayos en los que solo se utiliza un péptido único, o varios péptidos de una proteína única.

Un aspecto de la invención es un péptido aislado de la invención que se une específicamente a un anticuerpo inducido por un agente causante de la enfermedad de Lyme (una *Borrelia* patógena), *por ejemplo*, en una muestra de un sujeto que tiene enfermedad de Lyme. Un anticuerpo "inducido por" una *Borrelia* patógena a veces se denomina en el presente documento como un anticuerpo "contra" la *Borrelia* patógena. Una variante activa puede tener uno o más reemplazos de aminoácidos (*por ejemplo*, aminoácido conservador) en, *por ejemplo*, restos de aminoácidos como se describe en otra parte en el presente documento. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas serán evidentes para un experto en la materia. Por ejemplo, los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Estos incluyen, *por ejemplo*, (1) ácido: aspartato, glutamato; (2) básico: lisina, arginina, histidina; (3) no polar: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; (4) polar sin carga: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina; (5) alifático: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, con serina y treonina se agrupan opcionalmente por separado como hidroxilo alifático; (6) aromático: fenilalanina, tirosina, triptófano; (7) amida: asparagina, glutamina; y (9) que contienen azufre: cisteína y metionina (véase, *por ejemplo*, Biochemistry, 2ª ed., Ed. por L. Stryer, W H Freeman y Co.: 1981). Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido resulta en una variante activa, se puede determinar fácilmente mediante la evaluación de la capacidad del péptido variante para producir una respuesta, *por ejemplo* un ELISA de manera similar al péptido de tipo silvestre, o para inhibir competitivamente dicha respuesta. Los péptidos en los que se ha introducido más de un reemplazo se pueden probar fácilmente de la misma manera. En general, entre una y aproximadamente cuatro cambios de codón pueden estar presentes en dicha variante. En realizaciones, uno, dos, tres o cuatro de dichos cambios están presentes en una variante que consiste en uno o más de los péptidos enumerados en la Tabla 1. Se incluyen muteínas y análogos.

En general, un péptido de la invención procede de una cualquiera de varias proteínas inmunodominantes de una especie de *Borrelia* patógena que causa la enfermedad de Lyme.

Se desvela un péptido que está unido a (*por ejemplo*, asociado con, acoplado o fusionado a, directa o indirectamente) una o más fracciones adicionales. La asociación puede ser, *por ejemplo*, a través de un enlazador de aminoácidos terminal (como Lys o Cys) o un agente de acoplamiento químico. Un péptido puede estar unido directamente a una o más fracciones, tales como otros péptidos. *Por ejemplo*, un péptido puede sintetizarse para contener un péptido de la invención flanqueado por uno o más péptidos adicionales (*por ejemplo*, de *Borrelia*), en su extremo N, su extremo C, o ambos. En una divulgación, los péptidos enlazados están separados por un espaciador. El espaciador puede consistir, *por ejemplo*, de entre aproximadamente uno y cinco (*por ejemplo*, tres) aminoácidos, preferentemente, aminoácidos sin carga, *por ejemplo*, aminoácidos alifáticos tales como Gly o Ala. En una realización, el espaciador es un espaciador triple de Gly. Un enlazador puede, *por ejemplo*, proporcionar distancia entre epítomos de diferentes péptidos antigénicos. La fracción adicional puede ser, *por ejemplo*, un marcador detectable, una pareja de fusión (como un compuesto químico o un péptido que tiene un epítomo de la misma proteína o una diferente de la misma o una *Borrelia* patógena diferente), o un sustrato que inmoviliza el péptido (*por ejemplo*, una placa de micropocillos, una membrana Immobilon o de nitrocelulosa, o perlas de látex).

Otro aspecto de la invención es un reactivo de diagnóstico, que comprende un péptido de la invención y, opcionalmente, un sistema para detectar un complejo del péptido y un anticuerpo específico, y/o un sustrato para inmovilizar el péptido.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende un péptido de la invención y, opcionalmente, uno o más polipéptidos o péptidos adicionales que reconocen específicamente anticuerpos contra un agente causante de la enfermedad de Lyme. Cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más de los péptidos de la invención, incluidos las variantes activas de los péptidos enumerados en la Tabla 1, puede estar presente en dicha combinación; u otros péptidos adecuados pueden ser utilizados. Los polipéptidos o péptido(s) adicionales se pueden utilizar junto con un péptido de la invención como parte de un cóctel; o uno o más de los polipéptidos o péptidos adicionales pueden fusionarse en el extremo N y/o en el extremo C de un péptido de la invención para formar un péptido o polipéptido de fusión. Los términos péptido y polipéptido se utilizan de forma indistinta en el presente documento; *por ejemplo*, un aminoácido que consiste en tres péptidos de 9-15-mer unidos directamente entre sí se puede denominar péptido o polipéptido.

Otro aspecto de la invención es un kit para diagnosticar la enfermedad de Lyme en un sujeto, que comprende uno o

- más péptidos de la invención, o una o más composiciones de la invención y, opcionalmente, comprende uno o más péptidos o polipéptidos adicionales como se indicó anteriormente. El péptido(s) puede comprender una etiqueta detectable, o el kit puede incluir un sistema de detección (*por ejemplo*, un conjugado marcado y un reactivo; o perlas que comprenden firmas espectrales únicas) para detectar un péptido que se une específicamente a un anticuerpo en la muestra. En una realización, el kit contiene un sustrato para inmovilizar el péptido, como una placa de micropocillos, una membrana de inmovilon o de nitrocelulosa, perlas de látex o perlas de poliestireno.
- Otro aspecto de la invención es un método para diagnosticar la enfermedad de Lyme en un sujeto sospechoso de tener anticuerpos contra un agente causante de la enfermedad de Lyme (*por ejemplo*, para diagnosticar la exposición y/o la infección por una *Borrelia* patógena), que comprende poner en contacto una muestra del sujeto con un péptido o composición de la invención, bajo condiciones eficaces para la formación de un complejo péptido/anticuerpo específico, y detectar la presencia (*por ejemplo*, la cantidad) de un complejo péptido/anticuerpo. En una realización, el método de detección es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y/o se lleva a cabo *in vitro*.
- Un péptido aislado de la invención puede ser de cualquier tamaño deseable. Por ejemplo, puede consistir en 1, 2, o 3 o más, o 1, 2, o 3 menos, aminoácidos del extremo N, el extremo C o ambos extremos de un péptido de la invención. En general, debido a que los péptidos más pequeños que 8 aminoácidos no son funcionales para unirse a un anticuerpo, los péptidos de la invención generalmente no son más pequeños que 8 aminoácidos. En realizaciones de la invención, un péptido no tiene más de 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 aminoácidos de longitud. Los péptidos que son demasiado largos, tales como proteínas de longitud completa, generalmente participan en interacciones no específicas y, por lo tanto, no son lo suficientemente específicos para ser adecuados para un ensayo de la presente invención.
- Otros péptidos adecuados incluyen cualquiera de los otros péptidos descritos en el presente documento que además comprenden, unidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal, uno o más de los aminoácidos consecutivos de la cepa de *B. burgdorferi* a partir de la cual se aisló el péptido, que se apoyan en las secuencias peptídicas en la proteína de origen natural a partir de la cual procede el péptido, o variantes activas de esas secuencias. Opcionalmente, dicho péptido puede contener un resto Cys o Lys N-terminal, *por ejemplo* para facilitar la unión de una molécula de biotina. Además, se incluyen variantes activas de los péptidos. Un péptido aislado de la invención se puede asociar con una segunda fracción, utilizada como reactivo de diagnóstico, presente en una composición que comprende uno o más polipéptidos o péptidos adicionales que reconocen específicamente anticuerpos contra un agente causante de la enfermedad de Lyme, o presente en un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.
- Un péptido, que incluye una forma modificada del mismo, que "se une específicamente" a ("es específico para"; se une "preferentemente" a) un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena interactúa con el anticuerpo, o forma o experimenta una asociación física con él, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para permitir la detección del anticuerpo. Por "específicamente" o "preferentemente" se entiende que el péptido tiene una afinidad más alta, *por ejemplo*, un mayor grado de selectividad, para un anticuerpo de este tipo que para otros anticuerpos en una muestra. Es decir, el péptido tiene una afinidad por el anticuerpo de al menos aproximadamente 2 veces más que por otros anticuerpos en la muestra. La afinidad o el grado de especificidad se puede determinar mediante una variedad de procedimientos de rutina, que incluyen, *por ejemplo*, estudios de unión competitiva.
- Un péptido "aislado" de la invención está en una forma diferente a la que se presenta en la naturaleza, *por ejemplo* en un tampón, en una forma seca en espera de reconstitución, como parte de un kit, etc. En algunas realizaciones, el péptido está sustancialmente purificado. La expresión "sustancialmente purificado", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula, como un péptido, que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y otros materiales biológicos con los que está naturalmente asociado. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, como un péptido, puede ser al menos aproximadamente 60 %, en peso seco, preferentemente al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de la molécula de interés. Un péptido aislado o purificado de la invención difiere de la proteína de la que procede al menos debido a enlaces rotos entre los extremos del péptido y la proteína intacta. Los péptidos sintéticos no son, por supuesto, de origen natural.
- Una "variante activa" de un péptido, como los péptidos en la Tabla 1, se refiere a un péptido que conserva la capacidad de reconocer específicamente (unirse a) un anticuerpo contra un agente causante de la enfermedad de Lyme.
- Los péptidos de la invención pueden modificarse mediante una variedad de técnicas, tales como por desnaturalización con calor y/o SDS. Un péptido de la invención puede modificarse para proporcionar una secuencia de aminoácidos N- o C-terminal adicional adecuada para biotilación, *por ejemplo*, cisteína o lisina; adecuada para la lipilación química, *por ejemplo*, cisteína; o similar.
- Los péptidos de la invención pueden modificarse mediante cualquiera de una variedad de modificaciones conocidas. Estas incluyen glicosilación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un



lípidos o derivados de lípidos, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formato de ancla GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, ubiquitinación, modificaciones con ácidos grasos, adición mediada por transferencia de ARN de aminoácidos a proteínas como la arginilación, etc. También se incluyen los análogos de un aminoácido (incluidos los aminoácidos no naturales) y péptidos con enlaces sustituidos.

Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia y se han descrito con gran detalle en la literatura científica. Varias modificaciones particularmente comunes, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, por ejemplo, se describen en muchos textos básicos, tales como *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2ª ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Muchas revisiones detalladas están disponibles sobre este tema, tales como por Wold, F., *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983); Seifter et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 182:626-646 y Rattan et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62.

Los péptidos de la invención que consisten en cualquiera de las secuencias discutidas en el presente documento pueden modificarse mediante cualquiera de las modificaciones discutidas. Dichos péptidos todavía "consisten en" los aminoácidos.

Los péptidos de la invención pueden estar asociados con una o más fracciones adicionales. La asociación puede ser covalente o no covalente, y puede ser, por ejemplo, a través de un enlazador de aminoácidos terminal (como Lys o Cys) o un agente de acoplamiento químico. Una fracción adicional puede ser, *por ejemplo*, un marcador detectable, una pareja de fusión (como un compuesto químico o un péptido que tiene un epítipo de otra *Borrelia* patógena), o un sustrato que inmoviliza el péptido (*por ejemplo*, una placa de micropocillos, una membrana Immobilon o de nitrocelulosa, o perlas de látex o de poliestireno).

Un péptido de la invención puede fusionarse con una pareja de fusión (*por ejemplo*, un péptido u otra fracción) que puede utilizarse para mejorar la purificación, para mejorar la expresión del péptido en una célula hospedadora, para ayudar en la detección, para estabilizar el péptido, etc. Los ejemplos de compuestos adecuados para parejas de fusión incluyen polietilenglicol, PEGilación u otros productos químicos. Entre las muchas parejas de fusión de péptidos o polipéptidos adecuados se encuentran, *por ejemplo*,  $\beta$ -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, un marcador de histidina, etc. En algunas realizaciones, un péptido de la invención se proporciona con un marcador detectable, tal como los que se describen a continuación.

Un péptido de la invención se puede asociar con un sustrato que inmoviliza el péptido. El sustrato puede ser, *por ejemplo*, un vehículo, soporte o superficie sólido o semisólido, que incluye una perla. La asociación puede ser covalente o no covalente, y se puede facilitar mediante una fracción asociada con el péptido que permite la unión covalente o no covalente, tal como una fracción que tiene una alta afinidad con un componente unido al vehículo, soporte o superficie. Por ejemplo, el péptido se puede asociar con una fracción de biotina, y el componente asociado con la superficie puede ser avidina. El péptido se puede inmovilizar sobre la superficie o vehículo sólido o semisólido ya sea antes o después de la adición de la muestra que contiene el anticuerpo.

Un péptido de la presente invención puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ácidos y bases adecuados que son capaces de formar sales con los péptidos de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen ácidos y bases inorgánicos y orgánicos.

Un péptido de la invención se puede producir utilizando técnicas de síntesis química convencionales, tales como las descritas, *por ejemplo*, en G. Barony et al., *The Peptides: Analysis, Synthesis & Biology*, Academic Press, págs. 3-285 (1980). Dichos péptidos sintetizados químicamente pueden obtenerse de proveedores comerciales. Los péptidos producidos mediante síntesis química pueden obtenerse a una pureza superior al aproximadamente el 95 %. Por lo tanto, normalmente existe una probabilidad muy reducida de reactividad cruzada no deseada con anticuerpos aleatorios que mediante la utilización de péptidos obtenidos mediante otros métodos.

Como alternativa, un péptido de la invención se puede producir de forma recombinante siguiendo técnicas de ingeniería genética convencionales. Para producir un péptido recombinante de la invención, se inserta un ácido nucleico que codifica el péptido en un sistema de expresión adecuado. En general, se construye una molécula o vector recombinante en el que la secuencia polinucleotídica que codifica el péptido seleccionado se une operativamente a una secuencia de control de expresión que permite la expresión del péptido. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados en la materia, que incluyen, *por ejemplo*, vectores que contienen sistemas de expresión bacterianos, virales, de levadura, fúngicos, de insectos o de mamíferos. Los métodos para obtener y utilizar dichos vectores de expresión son bien conocidos. Para orientación en esta y otras técnicas de biología molecular utilizadas para composiciones o métodos de la invención, véase, *por ejemplo*, Sambrook et al, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, edición actual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Miller et al, *Genetic Engineering*, 8:277-298 (Plenum Press, edición actual), Wu et al, *Methods in Gene*

Biotechnology (CRC Press, Nueva York, NY, edición actual), Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, edición actual), y Current Protocols in Molecular Biology, (Ausabel et al, Eds.), John Wiley & Sons, NY (edición actual), y referencias citadas en el mismo.

- 5 Las células hospedadoras o líneas celulares adecuadas para los ácidos nucleicos o vectores recombinantes de la invención que se transfectan mediante este método incluyen células bacterianas. Por ejemplo, varias cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, MC1061) son bien conocidas como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. En este método también se pueden emplear varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y otros bacilos. Como alternativa, un péptido de la invención puede expresarse en levaduras, insectos, mamíferos u otros tipos de células, utilizando procedimientos convencionales.

15 Por lo tanto, se desvela un método para producir un péptido o polipéptido recombinante, que implica la transfección o transformación, por ejemplo, mediante medios convencionales, como la electroporación, de una célula hospedadora con al menos un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la invención bajo el control de una secuencia de expresión control (por ejemplo, una secuencia reguladora de la transcripción). La célula hospedadora transfectada o transformada se cultiva luego en condiciones que permiten la expresión del péptido o polipéptido. El péptido o polipéptido expresado se recupera, se aísla y, opcionalmente, se purifica de la célula (o del medio de cultivo, si se expresa extracelularmente) mediante medios apropiados conocidos por los expertos en la materia, incluida la cromatografía líquida como la fase normal o inversa, utilizando HPLC, FPLC; cromatografía de afinidad (tal como con ligandos inorgánicos o anticuerpos monoclonales); cromatografía de exclusión de tamaño; cromatografía de quelato de metal inmovilizado; electroforesis en gel. Un experto en la materia puede seleccionar las técnicas de aislamiento y purificación más adecuadas. Un experto en la materia puede determinar la pureza del péptido o polipéptido mediante la utilización de métodos estándar que incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel de poliácridamida (por ejemplo, SDS-PAGE); cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, de sus siglas en inglés)) o análisis de aminoácidos en el extremo amino.

25 En la divulgación se incluye un polinucleótido que codifica y/o expresa un péptido o polipéptido de la invención, un vector que comprende el polinucleótido y una célula hospedadora que comprende el ácido o vector polinucleotídico.

- 30 Un péptido de la invención se puede utilizar en combinación con uno o más péptidos o polipéptidos adicionales de la misma proteína o una diferente, de la misma o una cepa diferente de *Borrelia* patógena, en donde el péptido(s) o polipéptido(s) adicional(es) también se unen específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena. La combinación puede comprender un cóctel (una mezcla simple) de péptidos o polipéptidos individuales, o puede estar en forma de un péptido o polipéptido de fusión (un péptido multimérico). Por ejemplo, un péptido de la invención puede fusionarse en su extremo N o su extremo C a otro péptido adecuado. Dos o más copias de un péptido de la invención se pueden unir entre sí, solo o en combinación con uno más de los péptidos adicionales. Se pueden utilizar combinaciones de péptidos o polipéptidos fusionados y no fusionados. En una realización, el péptido(s) adicional(es) contienen epítopos de linfocitos B y/o linfocitos T de una proteína de una *Borrelia* patógena.

40 Cualquier combinación de dos o más péptidos de la invención se puede combinar para formar un péptido multiepitopo. Además, los péptidos se pueden combinar con péptidos o polipéptidos adicionales adecuados (a veces denominados en el presente documento como "péptidos o polipéptidos antigénicos" o como "agentes") que pueden proceder de antígenos de *Borrelia* como OspA, OspB, DbpA, proteínas asociadas a flagelos FlaA (p37) y FlaB (p41), OspC (25kd), BBK32, BmpA(p39), p21, p39, p66 op83. Véase, por ejemplo, Barbour et al (1984) Infect. Immun. 45, 94-100; Simpson et al. (1990) J. Clin. Microbiol. 28, 1329-1337; Hansen et al. (1988) Infect. Immun. 56, 2047-2053; Hansen et al. (1988) Infect. J. Clin. Microbiol. 26, 338-346; Wilske et al. (1986) Zentral, Bakteriell, Parsitenkd, Infektionshkr, Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe, A. 263, 92-102; Dorward et al. (1991) J. Clin. Microbiol. 29, 1162-1170; publicada la solicitud de patente estadounidense NTIS 485.551; solicitud de patente europea N.º 465.204; Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US91/01500; Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/EP90/02282; Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/DK89/00248; Solicitud de Patente Internacional N.º WO92/00055. Los péptidos descritos en la patente de EE. UU. 7.887.815 también se pueden utilizar, al igual que el péptido de 26 aminoácidos procedente de la región IR6 de *B. burgdorferi* VlsE, que actualmente está aprobado por la FDA para su uso en un ensayo de inmunodiagnóstico basado en péptidos en los Estados Unidos. También se pueden utilizar polipéptidos o péptidos procedentes de otros microorganismos.

55 Una divulgación - una composición que comprende un péptido de la invención y uno o más agentes adicionales - es particularmente adecuada para diagnosticar infecciones por *Borrelia* tempranas después de la infección (por ejemplo, dentro de una a dos semanas después del inicio de la infección). Entre las proteínas *Borrelia* patógenas cuya expresión se ha reconocido en la infección humana temprana (por ejemplo, en la que aparece el anticuerpo IgM temprano después de la infección) se encuentran OspC, BBK32, la proteína asociada a flagelos, FlaB (p41) y, en una menor medida, BmpA(p39), VlsE la proteína asociada a flagelos, FlaA(p37). Los polipéptidos o péptidos que proceden de esos polipéptidos son adecuados para ensayos de infección temprana. Se espera que cualquiera de los péptidos descritos en el presente documento sea útil para la detección temprana.

- 65 Algunos epítopos lineales adecuados que se pueden utilizar para el diagnóstico de infección temprana incluyen los péptidos identificados en OspC: PVVAESPKKP (SEQ ID NO: 36), informados por Steere et al. (1987) Ann. Intern

Med. 107, 725-731; ILMTLFLFISCNNS (SEQ ID NO: 37), informados por AC Steere (2001) N Engl J Med 345, 115-25; y uno o más epítomos contenidos entre los aminoácidos 161 y 210, informados por Jobe et al. (2003) Clin Diagn Lab Immunol 10, 573-8]. También se pueden utilizar los péptidos OspC descritos en la patente de EE. UU. N.º 6.716.574. Otras regiones adecuadas, que se han mostrado que no contienen epítomos de reactividad cruzada principales, se han identificado en FlaB (p41), *por ejemplo*, los restos 120 a 235. Véase, *por ejemplo*, Crother et al. ((2003) Infect. Immun. 71, 3419-3428 y Wang et al. (1999)) Clin Microbial Rev 12, 633-653. Otros péptidos que llevan epítomos lineales o conformacionales son conocidos en la materia.

En una divulgación, se emplea un péptido de la región IR6 de *B. garinii*, (*por ejemplo*, el péptido de 26 aminoácidos CMKKDDQIAAA MVLRGMAKDGQFALK (SEQ ID NO: 48), que se encuentra actualmente en uso comercial, o un péptido más corto de 17 aminoácidos de esta región, MKKDDQIAAAIALRGMA (SEQ ID NO: 50). El péptido de 17 aminoácidos y sus variantes activas se describen en detalle en el documento USP 12/292.044.

Las variantes de epítomos identificados previamente se pueden seleccionar fácilmente por un experto en la materia, basándose en parte en las propiedades conocidas de los epítomos. Por ejemplo, un epítomo conocido puede alargarse o acortarse, en uno o ambos extremos, en aproximadamente 1-3 aminoácidos; uno, dos o más aminoácidos pueden estar sustituidos por aminoácidos conservadores; etc. Además, si se ha identificado que una región de una proteína contiene un epítomo adecuado, un investigador puede "cambiar" la región de interés (seleccionar diferentes subsecuencias) hasta aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier dirección desde los puntos finales de la región rugosa original, *por ejemplo*, para optimizar la actividad. Los métodos para confirmar que los péptidos variantes son adecuados son convencionales y de rutina. Los métodos para identificar epítomos adicionales, particularmente de regiones variables en lugar de las regiones conservadas discutidas anteriormente (*por ejemplo*, de OspC, BBK32 o DbpA), se discuten en los Ejemplos.

Los polipéptidos que comprenden péptidos enlazados pueden ser de cualquier longitud adecuada (*por ejemplo*, entre aproximadamente 20-80 aminoácidos, o más), y pueden contener cualquier número deseable de epítomos lineales (*por ejemplo*, entre aproximadamente 2-5, o más). Por ejemplo, pueden combinarse entre 3 y 5 péptidos de aproximadamente 9-15 aminoácidos cada uno, opcionalmente en presencia de espaciadores adecuados, para generar un polipéptido de aproximadamente 45-50 aminoácidos. Las tecnologías actuales pueden fácilmente sintetizar químicamente una longitud de aproximadamente 120 aminoácidos. Se pueden utilizar otros métodos para generar péptidos más largos. Los péptidos se pueden unir en cualquier orden.

Se espera que los péptidos multi-epítomo de la invención exhiban significativamente más unión a sueros de sujetos infectados con *Borrelia burgdorferi* sensu lato que uno de los péptidos de la invención, solo. Los métodos para hacer y probar los péptidos multi-epítomo típicos se muestran en el Ejemplo VI.

En una divulgación, una composición que comprende uno o más de los péptidos de la invención y, opcionalmente, uno o más de los péptidos adicionales mencionados anteriormente (*por ejemplo*, en forma de un cóctel o un péptido o polipéptido de fusión) se utiliza en un análisis único, para detectar la enfermedad de Lyme en etapa temprana o tardía. Dicho cóctel peptídico o polipéptido de fusión puede ser eficaz en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme causada por un amplio espectro de aislados de *Borrelia* patógena.

Los péptidos o polipéptidos de fusión (proteínas multiméricas) de la invención se pueden producir de forma recombinante o sintetizarse químicamente. También pueden incluir un péptido de la invención fusionado o acoplado a fracciones distintas de aminoácidos, incluyendo lípidos y carbohidratos.

Un aspecto de la invención es un método para detectar la enfermedad de Lyme en un sujeto sospechoso de tener anticuerpos contra un agente causante de la enfermedad de Lyme. El método de diagnóstico es útil para diagnosticar sujetos que presentan síntomas clínicos de, o se sospecha que tienen, la enfermedad de Lyme.

El sujeto puede ser cualquier sujeto (paciente) en el que se puedan producir anticuerpos contra el agente causante y detectarlos. Los sujetos típicos incluyen vertebrados, tales como mamíferos, incluida la vida silvestre (*por ejemplo*, ratones y ardillas), perros, gatos, primates no humanos y seres humanos.

En una realización, el método de diagnóstico implica detectar la presencia de anticuerpos de origen natural contra la *Borrelia* patógena (*por ejemplo*, *B. burgdorferi*) que son producidos por el sistema inmune del sujeto infectado en sus fluidos o tejidos biológicos, y que son capaces de unirse específicamente a un péptido de la invención o combinaciones de un péptido de la invención y, opcionalmente, uno o más polipéptidos o péptidos antigénicos adicionales adecuados.

Una realización de la invención es un método de inmunoensayo de diagnóstico, que incluye (1) tomar una muestra de fluido o tejido corporal que probablemente contenga anticuerpos; (2) poner en contacto la muestra con un péptido de la invención, bajo condiciones eficaces para la formación de un complejo péptido-anticuerpo específico (para la unión específica del péptido al anticuerpo), *por ejemplo*, reaccionando o incubando la muestra y un péptido; y (3) analizar la muestra contactada (reaccionada) para detectar la presencia de una reacción anticuerpo-péptido (*por ejemplo*, determinar la cantidad de un complejo anticuerpo-péptido).

Tal como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un/a", "uno/a", y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, "un" péptido de la presente invención, tal como se utiliza anteriormente, puede ser dos o más péptidos, que pueden ser iguales o diferentes. De manera similar, cuando un péptido aislado de la invención está asociado con (*por ejemplo*, unido a) "un" péptido adicional, el péptido aislado se puede asociar con uno o más péptidos adicionales.

Frases como "muestra que contiene un anticuerpo" o "detección de un anticuerpo en una muestra" no pretenden excluir muestras o determinaciones (intentos de detección) en los que no se contiene o detecta ningún anticuerpo. En un sentido general, esta invención implica ensayos para determinar si un anticuerpo producido en respuesta a la infección con una *Borrelia* patógena está presente en una muestra, independientemente de si se detecta o no.

Las condiciones para hacer reaccionar péptidos y anticuerpos para que reaccionen específicamente son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc) o los Ejemplos en el presente documento.

Un método de diagnóstico de la invención comprende tomar una muestra de fluido o tejido corporal que pueda contener anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser, *por ejemplo*, de tipo IgG, IgE, IgD, IgM o IgA. En general, se detectan anticuerpos IgM y/o IgA, *Por ejemplo*, para la detección de infección temprana. Los anticuerpos IgG se pueden detectar cuando algunos de los péptidos adicionales analizados anteriormente se utilizan en el método (*por ejemplo*, péptidos para la detección de proteínas de flagelo). La muestra es preferentemente fácil de obtener y puede ser suero o plasma procedente de una muestra de sangre venosa o incluso de un pinchazo en el dedo. Se sabe que el tejido de otras partes del cuerpo u otros fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo (LCR), la saliva, las secreciones gástricas, el moco, etc. contienen anticuerpos y pueden utilizarse como fuente de la muestra.

Una vez que se permite que el antígeno peptídico y el anticuerpo de muestra reaccionen en un medio adecuado, se realiza un ensayo para determinar la presencia o ausencia de una reacción anticuerpo-péptido. Entre los muchos tipos de ensayos adecuados, que serán evidentes para un experto en la materia, se encuentran los ensayos de inmunoprecipitación y aglutinación.

En realizaciones de la invención, el ensayo puede comprender (1) inmovilizar el (los) anticuerpo(s) en la muestra, agregar un péptido de la invención y luego detectar el grado de anticuerpo unido al péptido, *por ejemplo*, mediante el marcaje del péptido o mediante la adición de una sustancia marcada (conjugado, pareja de unión), como un anticuerpo marcado, que reconoce específicamente el péptido; (2) inmovilizar un péptido de la invención, agregar la muestra que contiene un anticuerpo(s) y luego detectar la cantidad de anticuerpo unido al péptido, *por ejemplo*, mediante la adición de una sustancia marcada (conjugado, pareja de unión), como un anticuerpo marcado, que reconoce específicamente el anticuerpo; o (3) hacer reaccionar el péptido y la muestra que contiene anticuerpo(s) sin que ninguno de los reactivos esté inmovilizado, y luego detectar la cantidad de complejos de anticuerpo y péptido, *por ejemplo*, mediante el marcaje del péptido o mediante la adición de una sustancia marcada (conjugado, pareja de unión), como un anticuerpo marcado, que reconoce específicamente el péptido.

La inmovilización de un péptido de la invención puede ser covalente o no covalente, y la inmovilización no covalente puede ser inespecífica (*por ejemplo*, unión no específica a una superficie de poliestireno en, *por ejemplo*, un pocillo de microtitulación). La unión específica o semiespecífica a un vehículo, soporte o superficie sólido o semisólido, se puede lograr mediante el péptido que tiene, asociado, una fracción que permite su unión covalente o no covalente al vehículo, soporte o superficie sólido o semisólido. Por ejemplo, la fracción puede tener afinidad con un componente unido al vehículo, soporte o superficie. En este caso, la fracción puede ser, *por ejemplo*, una biotina o grupo biotinilo o un análogo del mismo unido a un grupo de aminoácidos del péptido, tal como ácido 6-aminohexanoico, y el componente es entonces avidina, estreptavidina o un análogo de la misma. Una alternativa es una situación en la que la fracción tiene la secuencia de aminoácidos His-His-His-His-His (SEQ ID NO: 38) y el vehículo comprende un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA) cargado con iones Ni<sup>++</sup>. Entre los vehículos, soportes o superficies adecuados se encuentran, *por ejemplo*, perlas magnéticas o látex de copolímeros tales como estireno-divinilbenceno, estireno-divinilbenceno hidroxilado, poliestireno, poliestireno carboxilado, perlas de negro de carbono, poliestireno no activado o vidrio activado con cloruro de polivinilo, vidrio magnético poroso activado por epoxi, gelatina o partículas de polisacáridos u otras partículas de proteínas, glóbulos rojos, anticuerpos mono- o policlonales o fragmentos Fab de dichos anticuerpos.

Los protocolos para inmunoensayos que utilizan antígenos para la detección de anticuerpos específicos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo sándwich convencional, o se puede utilizar un formato de ensayo competitivo convencional. Para una discusión de algunos tipos adecuados de ensayos, véase Current Protocols in Immunology (*supra*). En un ensayo preferido, un péptido de la invención se inmoviliza sobre la superficie o el vehículo sólido o semisólido mediante unión covalente o no covalente, ya sea antes o después de la adición de la muestra que contiene el anticuerpo.

Los dispositivos para realizar ensayos de unión específicos, especialmente inmunoensayos, son conocidos y se pueden adaptar fácilmente para su uso en los presentes métodos. Los ensayos en fase sólida, en general, son más fáciles de realizar que los métodos de ensayo heterogéneos que requieren una etapa de separación, como la

precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía o magnetismo, porque la separación de reactivos es más rápida y sencilla. Los dispositivos de ensayo en fase sólida incluyen placas de microtitulación, dispositivos de ensayo de flujo continuo, tiras reactivas y dispositivos de inmunoensayo inmunocapilar o inmunocromatográfico.

- 5 En realizaciones de la invención, la superficie o vehículo sólido o semisólido es el piso o la pared en un pocillo de microtitulación; una superficie de filtro o membrana (*por ejemplo*, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno), como una membrana Immobilon); una fibra hueca; un medio cromatográfico de perlas (*por ejemplo*, un gel de agarosa o poli(acrilamida)); una perla magnética; una matriz de celulosa fibrosa; una matriz de HPLC; una matriz de FPLC; una sustancia que tiene moléculas de tal tamaño que las moléculas con el péptido unido a ellas, cuando se disuelven o dispersan en una fase líquida, se pueden retener por medio de un filtro; una sustancia capaz de formar micelas o participar en la formación de micelas que permite cambiar o intercambiar una fase líquida sin arrastrar las micelas; un polímero soluble en agua; o cualquier otro vehículo, soporte o superficie adecuado.
- 10
- 15 En una realización de la invención, los péptidos de la invención se inmovilizan sobre pequeñas perlas de poliestireno (microesferas), en donde cada péptido se inmoviliza sobre una perla con una firma espectral única, y se analizan mediante la tecnología xMAP® desarrollada por Luminex Technology (Austin, Texas) y se describe en su sitio web [luminexcorp.com](http://luminexcorp.com).
- 20 En algunas realizaciones de la invención, el péptido se proporciona con un marcador adecuado que permite la detección. Se pueden utilizar marcadores convencionales que sean capaces, solos o en concierto con otras composiciones o compuestos, de proporcionar una señal detectable. Los métodos de detección adecuados incluyen, *por ejemplo*, la detección de un agente que está marcado, directa o indirectamente, con un marcador fluorescente mediante microscopía de inmunofluorescencia, incluida la microscopía confocal, o mediante citometría de flujo (FACScan); la detección de un agente marcado radiativamente mediante autorradiografía; microscopio de electrones; inmunotinción; fraccionamiento subcelular, o similares. En una realización, un elemento radiactivo (*por ejemplo*, un aminoácido radiactivo) se incorpora directamente en una cadena peptídica; en otra realización, un marcador fluorescente está asociado con un péptido a través de la interacción biotina/avidina, la asociación con un anticuerpo conjugado con fluoresceína, o similares. En una realización, se añade a la mezcla una pareja de unión específica detectable para el anticuerpo. Por ejemplo, la pareja de unión puede ser un anticuerpo secundario detectable que se une al primer anticuerpo. Este anticuerpo secundario se puede marcar, *por ejemplo*, con un marcador radioactivo, enzimático, fluorescente, luminiscente u otro marcador detectable, como un sistema de avidina/biotina.
- 25
- 30 Un "sistema de detección" para detectar un péptido unido, como se utiliza en el presente documento, puede comprender una pareja de unión detectable, tal como un anticuerpo específico para el péptido. En una realización, la pareja de unión está marcada directamente. En otra realización, la pareja de unión está unida a un reactivo generador de señal, tal como una enzima que, en presencia de un sustrato adecuado, puede producir una señal detectable. Una superficie para inmovilizar el péptido puede acompañar opcionalmente al sistema de detección.
- 35
- 40 En realizaciones de la invención, el procedimiento de detección comprende inspeccionar visiblemente el complejo anticuerpo-péptido para un cambio de color, o inspeccionar el complejo anticuerpo-péptido para un cambio físico-químico. Los cambios físico-químicos pueden ocurrir con reacciones de oxidación u otras reacciones químicas. Pueden detectarse a simple vista, utilizando un espectrofotómetro o similar.
- 45
- 50 En una realización del método, el péptido, o una mezcla de péptidos, se transfiere por transferencia eléctrica o por puntos sobre papel de nitrocelulosa. Posteriormente, el fluido biológico (*por ejemplo*, suero o plasma) se incuba con el antígeno de transferencia, y se deja que el anticuerpo en el fluido biológico se una al antígeno(s). El anticuerpo unido se puede entonces detectar, *por ejemplo*, mediante métodos inmunoenzimáticos estándar.
- 55 En otra realización del método, las perlas de látex o poliestireno se conjugan con el antígeno(s) de la invención. Posteriormente, el fluido biológico se incuba con el conjugado perla/péptido, formando así una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se analiza luego para determinar la presencia de los anticuerpos.
- 60 Un ensayo para la detección de hemoderivados u otros fluidos fisiológicos o biológicos es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, *es decir*, un ELISA. Normalmente, en un ELISA, el antígeno(s) aislado de la invención se adsorbe a la superficie de un pocillo de microtitulación directamente o a través de una matriz de captura (*es decir*, un anticuerpo). Los sitios de unión a proteínas residuales no específicos en la superficie se bloquean luego con un agente apropiado, como la albúmina de suero bovino (BSA, de sus siglas en inglés), el suero normal de cabra (NGS, de sus siglas en inglés) inactivado por calor o BLOTTO (una solución tamponada de leche en polvo desnatada que también contiene un conservante, sales y un agente antiespumante). Luego, se incuba el pocillo con una muestra biológica sospechosa de contener un anticuerpo antipatogénico específico de *Borrelia* (*por ejemplo*, *B. burgdoferi*). La muestra se puede aplicar pura, o con mayor frecuencia se puede diluir, generalmente en una solución tamponada que contiene una pequeña cantidad de proteínas (0,1-5,0 % en peso), tales como BSA, NGS o BLOTTO.
- 65 Después de incubar durante un período de tiempo suficiente para permitir que se produzca una unión específica, se lava el pocillo para eliminar la proteína no unida y luego se incuba con una concentración óptima de un anticuerpo

anti-inmunoglobulina apropiado (*por ejemplo*, para sujetos humanos, un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana ( $\alpha$ Hulg) de otro animal, como perro, ratón, vaca, etc.) que se conjuga con una enzima u otro marcador mediante procedimientos estándar y se disuelve en un tampón de bloqueo. El marcador se puede elegir entre una variedad de enzimas, que incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés),  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, etc. Se permite un tiempo suficiente para que se produzca nuevamente la unión específica, luego se lava nuevamente el pocillo para eliminar el conjugado no unido y se añade un sustrato adecuado para la enzima. Se permite que el color se desarrolle y la densidad óptica de los contenidos del pocillo se determina visual o instrumentalmente (medida en una longitud de onda apropiada). El valor de DO de corte se puede definir como la desviación estándar (DE) media de DO + 3 de al menos 50 muestras de suero recolectadas de individuos de un área donde la enfermedad de Lyme no es endémica, o mediante otras definiciones convencionales. En el caso de un ensayo muy específico, se puede utilizar DE de DO + 2 como valor de corte.

En una realización de un ELISA, un péptido de la invención se inmoviliza en una superficie, tal como una placa de ELISA de noventa y seis pocillos o una fase sólida equivalente recubierta con estreptavidina o un compuesto de unión a biotina equivalente a una concentración óptima en un tampón de recubrimiento alcalino e incubado a 4 °C durante la noche. Después de un número adecuado de lavados con tampones de lavado estándar, se aplica a cada pocillo una concentración óptima de una forma biotinilada de una composición/antígeno de esta invención disuelta en un tampón de bloqueo convencional; se agrega una muestra; y el ensayo procede como antes.

Otro formato de ensayo útil es un formato de flujo lateral. El anticuerpo contra el anticuerpo humano o animal o los anticuerpos de la proteína estafilocócica A o G se marca con un indicador o generador de señal (*es decir*, oro coloidal) que se seca y se coloca en una almohadilla de fibra de vidrio (almohadilla de aplicación de muestra). El péptido de diagnóstico está inmovilizado en la membrana, como una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (*por ejemplo*, una membrana Immobilon (Millipore)) o una membrana de nitrocelulosa. Cuando se aplica una solución de muestra (sangre, suero, etc.) a la almohadilla de aplicación de muestra, se disuelve el indicador coloidal marcado con oro y esto se une a todos los anticuerpos en la muestra. Esta mezcla se transporta a la siguiente membrana (PVDF o nitrocelulosa que contiene el péptido de diagnóstico) mediante acción capilar. Si los anticuerpos contra el péptido de diagnóstico están presentes, estos se unen al péptido de diagnóstico asociado a la membrana generando una señal. Se utiliza un anticuerpo adicional específico para el anticuerpo marcado con oro coloidal (como el anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra) para producir una señal de control.

Un experto en la materia debe entender que cualquier número de formatos de ensayo de proteínas convencionales, particularmente formatos de inmunoensayo, pueden diseñarse para utilizar los péptidos aislados de esta invención para la detección de la infección por *Borrelia* patógena (*por ejemplo*, *B. burgdorferi*) en un sujeto. Por lo tanto, esta invención no se limita por la selección del formato de ensayo particular, y se cree que abarca formatos de ensayo que son conocidos por los expertos en la materia.

Los reactivos para ELISA u otros ensayos de acuerdo con esta invención pueden proporcionarse en forma de kits. Dichos kits son útiles para diagnosticar la infección con una *Borrelia* patógena (*por ejemplo*, una *B. burgdorferi*), que utiliza una muestra de un sujeto (*por ejemplo*, un ser humano u otro animal). Dicho kit de diagnóstico puede contener un péptido de la invención (y, si se desea, péptidos adicionales como se discutió anteriormente) y, opcionalmente, un sistema para la detección (un medio habilitador) de un péptido de la invención unido a un anticuerpo contra una proteína de una *Borrelia* patógena y/o una superficie a la que se puede unir el péptido. En una realización, un kit contiene una mezcla de péptidos adecuados o medios para preparar dichas mezclas, y/o reactivos para detectar complejos péptido-anticuerpo.

El kit puede incluir placas de microtitulación en las cuales el péptido(s) de la invención ha sido pre-adsorbido, otro dispositivo de ensayo apropiado, varios diluyentes y tampones, conjugados marcados u otros agentes para la detección de antígenos o anticuerpos específicamente unidos, y otros reactivos generadores de señal, tales como sustratos enzimáticos, cofactores y cromógenos. Otros componentes de un kit se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia. Dichos componentes pueden incluir reactivos de recubrimiento, anticuerpos policlonales o monoclonales de captura específicos para un péptido de la invención, o un cóctel de dos o más de los anticuerpos, extractos purificados o semi-purificados de estos antígenos como estándares, anticuerpos detectores de MAb, anticuerpo antiratón o antihumano con molécula indicadora conjugada al mismo, una placa ELISA preparada para la absorción, tablas de indicadores para comparaciones colorimétricas, guantes desechables, instrucciones de descontaminación, barras o recipientes aplicadores, una taza preparatoria de muestra, etc. En una realización, un kit comprende tampones u otros reactivos apropiados para constituir un medio de reacción que permite la formación de un complejo péptido-anticuerpo. Dichos kits proporcionan una manera conveniente y eficaz para que un laboratorio clínico diagnostique la infección por una *Borrelia* patógena, tal como *B. burgdorferi*.

Se desvela un anticuerpo aislado, un fragmento de anticuerpo específico de antígeno u otra pareja de unión específica, que es específico para un péptido de la invención, *por ejemplo*, en donde dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo específico de antígeno o pareja de unión específica es específico para uno o los péptidos de la invención. Se pueden preparar anticuerpos, *por ejemplo*, policlonales, monoclonales, recombinantes, quiméricos, humanizados, de cadena única, Fab, y fragmentos de los mismos, de acuerdo con cualquier método deseado. Véase también la selección de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes (*por ejemplo*, Orlandi et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 86, 3833-3837; Huse et al. (1989) Science 256,1275-1281); y *in vitro* stimulation of lymphocyte populations (Winter et al. (1991) Nature 349, 293-299). Los anticuerpos pueden ser IgM, IgG, subtipos, IgG2a, IgG1, etc. Los anticuerpos se pueden utilizar de cualquier fuente, que incluye, cabra, conejo, ratón, pollo, etc. Un anticuerpo específico para un péptido significa que el anticuerpo reconoce una secuencia definida de aminoácidos dentro o que incluye el péptido. Otras parejas de unión específicas incluyen, *por ejemplo*, aptámeros y PNA. La preparación de anticuerpos policlonales es bien conocida por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Green et al., Production of Polyclonal Antisera, en Immunochemical Protocols (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992); Coligan et al., Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters, en Current Protocols in Immunology, sección 2.4.1 (1992). La preparación de anticuerpos monoclonales también es convencional. Véase, por ejemplo, Kohler & Milstein (1975) Nature 256, 495; Coligan *et al.*, secciones 2.5.1-2.6.7; y Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, página 726 (Cold Spring Harbor Pub. 1988).

Se puede utilizar un anticuerpo aislado, un fragmento de anticuerpo específico de antígeno u otra pareja de unión específica para una variedad de aplicaciones, incluidas las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por un anticuerpo "aislado" se entiende en el presente documento una molécula de anticuerpo que se elimina de su entorno original (*por ejemplo*, el entorno natural si es de origen natural), y se aísla o separa de al menos otro componente con el que está asociado de forma natural. Por ejemplo, un anticuerpo de origen natural presente en su hospedador vivo natural no está aislado, pero el mismo anticuerpo, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos anticuerpos podrían ser parte de una composición, y aún estar aislados ya que dicha composición no es parte de su entorno natural.

Un aspecto de la invención es un método para detectar en un sujeto la presencia de un antígeno de origen natural, en sí mismo, en su asociación con una *Borrelia* patógena, que utiliza un anticuerpo aislado de la invención. El método se puede utilizar para determinar que un sujeto ha sido expuesto a o infectado por, una *Borrelia* patógena. En una realización, el método comprende poner en contacto una muestra (*por ejemplo*, un fluido o tejido corporal sospechoso de contener una *Borrelia* patógena) de un sujeto con un anticuerpo, en condiciones eficaces para la formación de una reacción específica antígeno-anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo se marca convencionalmente, ya sea directa o indirectamente, para la detección, *por ejemplo*, con una enzima tal como HRP, avidina o biotina, reactivos quimioluminiscentes, etc. Tras la unión del anticuerpo al antígeno, el exceso de anticuerpo marcado se elimina opcionalmente y se analiza la mezcla de reacción para determinar la presencia o ausencia del complejo antígeno-anticuerpo y la cantidad de marcador asociado con el mismo.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o policlonal (que es capaz de unirse al antígeno) se une a una placa de ELISA. Una muestra, como un fluido biológico, se incuba en la placa unida al anticuerpo y se lava. La detección de un complejo antígeno-anticuerpo y la medición cualitativa del anticuerpo marcado se realizan de manera convencional.

Otros formatos de ensayo útiles incluyen el recipiente de filtro y las tiras reactivas. En el primer ensayo, un anticuerpo de la invención se fija a un filtro de vidrio sinterizado en la abertura de una pequeña tapa. El fluido biológico o muestra (*por ejemplo*, aproximadamente 5 ml) se procesa a través del filtro. Si el antígeno está presente (*por ejemplo*, después de la infección con una *Borrelia* patógena), se unirá al filtro que luego se puede visualizar a través de un segundo anticuerpo/detector. El ensayo de la tira reactiva implica fijar un antígeno o anticuerpo a un filtro, que luego se sumerge en el fluido biológico, se seca y se analiza con una molécula detectora.

Los kits para realizar este u otros métodos de ensayo, que utilizan un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo específico de antígeno u otra pareja de unión específica de la invención, también se incluyen en la invención.

Gran parte de la discusión anterior está dirigida a la detección de anticuerpos contra *Borrelia* patógena. Sin embargo, debe entenderse que la discusión también se aplica a la detección de linfocitos T sensibilizados, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Se espera que se genere una respuesta inmune mediada por células (*por ejemplo*, una respuesta linfocito T-auxiliar), ya que se produce IgG. Por lo tanto, se espera que sea posible determinar la reactividad inmunológica entre linfocitos T sensibilizados y un péptido de la invención. *In vitro*, esto se puede hacer mediante la incubación de linfocitos T aislados del sujeto con un péptido de la invención y la medición de la inmunorreactividad, *por ejemplo*, mediante la medición de la proliferación subsiguiente de linfocitos T o la medición de la liberación de citoquinas de los linfocitos T, tales como IFN-gamma; estos métodos se conocen bien en la materia.

Cuando un método de la invención se lleva a cabo *in vivo*, se puede utilizar cualquiera de una variedad de ensayos convencionales. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo en forma de prueba cutánea, *es decir*, mediante la inyección por vía intradérmica, en el sujeto, de un péptido de la invención. Una reacción cutánea positiva en el lugar de la inyección indica que el sujeto ha sido expuesto e infectado con una *Borrelia* patógena capaz de causar la enfermedad de Lyme, y una respuesta cutánea negativa en el lugar de la inyección indica que el sujeto no ha estado tan expuesto o infectado. Esta u otra prueba *in vivo* se basa en la detección de una respuesta de linfocitos T en el sujeto.

En lo anterior y en los siguientes ejemplos, todas las temperaturas se indican en grados Celsius sin corregir; y, salvo que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso.

## Ejemplos

5

### Ejemplo I -Identificación y caracterización de péptidos de diagnóstico

#### A. Material y métodos

10 Los siguientes métodos se utilizan para los experimentos en los siguientes ejemplos.

##### I. Síntesis Peptídica:

15 Para los estudios de mapeo de epítomos, los péptidos sintéticos se sintetizaron a la medida en la instalación comercial, Prolmmune (Oxford, Inglaterra), bajo la dirección de los inventores, utilizando procedimientos convencionales. Para cada una de las 10 proteínas de *B. burgdorferi*, se generó una biblioteca completa, que consta de péptidos de 15 aminoácidos, compensados por 5 aminoácidos, es decir, superpuestos por 10 aminoácidos. Se proporcionaron las secuencias de cada proteína para las que se generó una biblioteca de péptidos, específicamente: Proteína A de membrana de *Borrelia* (BmpA), Proteína B de unión a decorina (DbpB), proteína asociada al cuerpo basal flagelar (FliIB), transportador II de oligopéptido ABC (OppA), BBG33 (supuesta proteína no caracterizada) (Bbg33), proteína C de la superficie exterior tipo K (OspC tipo K), proteína p66 de membrana externa integral (p66), recombinasa A (RecA), proteína C de la superficie externa tipo A (OspC tipo A) y lipoproteína LA7 (LA-7).

25 Se demostró una unión significativa para múltiples péptidos dentro de cada una de las diez proteínas que se enviaron para su análisis. Se eligieron los péptidos individuales en la Tabla 1 en función de su capacidad para unir más del 75 % de las muestras de suero, que se unen a las muestras de suero en diluciones múltiples (lo que indica una unión de alta afinidad) y una baja identidad de secuencia con otras especies bacterianas según lo determinado mediante alineación de secuencias utilizando el algoritmo BLAST de la proteína NCBI en el sitio web de NCBI (se eligen péptidos únicos para las especies de *Borrelia*).

30

##### 2. Paneles de prueba de sueros

35 Para la evaluación inicial de los péptidos, incluidos los epítomos de diagnóstico identificados, se generaron péptidos Lifetein (South Plainfield, NJ, 07080) que contenían el epítomo. En la caracterización inicial, se utilizaron sueros de nueve pacientes con enfermedad de Lyme confirmada microbiológicamente (mediante cultivo). Estos pacientes tuvieron una respuesta serológica positiva demostrada mediante transferencia Western, utilizando los métodos prescritos actuales para el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Lyme. Los pacientes tenían la enfermedad de Lyme temprana.

40 Para una caracterización adicional de los péptidos, *por ejemplo*, para determinar la especificidad y la sensibilidad, se utilizaron paneles de sueros, incluidos los sueros de un número definido de pacientes con enfermedad de Lyme temprana confirmada mediante PCR. Los paneles de suero de Lyme son representativos de la población de los suburbios de Nueva York e incluyen muestras de adultos varones, mujeres, blancos y minorías, que informan a la clínica de la enfermedad de Lyme en el Centro Médico Westchester (Westchester, NY). La enfermedad de Lyme se confirmó en estos pacientes mediante PCR (PCR+) o mediante cultivo. Se utilizan como controles sanos negativos sueros de individuos sanos normales sin antecedentes conocidos de enfermedad de Lyme ni patrones de inmunotransferencia característicos de la infección obtenida de áreas endémicas y no endémicas para EL. El suero de pacientes con sífilis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico e infección por *Helicobacter pylori* se utilizan como controles negativos para la reactividad cruzada con anticuerpos producidos en respuesta a otras enfermedades (controles de reactividad cruzada). Estas muestras de suero, así como los controles negativos, se han comprado a Bioreclamation, LLC (Westbury, NY).

#### B. Mapeo de epítomos lineales de epítomos de linfocitos B:

55 Prolmmune realizó el mapeo lineal de los epítomos de linfocitos B de las proteínas candidatas de *B. burgdorferi*, bajo la dirección de los inventores. Una discusión más detallada del procedimiento de mapeo de epítomos se describe en el sitio web mundial de Prolmmune, en promiimue.com. En resumen, los péptidos descritos anteriormente se distribuyeron en un formato de micromatrices de alta densidad. Se seleccionó cada péptido para determinar su unión con los ocho conjuntos de sueros descritos anteriormente, y con sueros de control apropiados para la especificidad y sensibilidad, tal como se describió anteriormente. Los péptidos se clasificaron con respecto a la fuerza de su unión a los sueros.

60

Se eligieron los péptidos individuales en la tabla 1 según tres criterios:

65

- 1) su capacidad para unirse al menos al 75 % (6/8) de las muestras de suero,
- 2) su capacidad para unirse a múltiples (~ 50 %) de las muestras de suero en múltiples diluciones (lo que indica



una unión de alta afinidad),

3) baja identidad de secuencia con otras especies bacterianas según lo determinado por la alineación de secuencia utilizando el algoritmo BLAST de la proteína NCBI en el sitio web de NCBI (se eligieron péptidos únicos para las especies de *Borrelia*, y tenían menos de un 50 % de identidad de secuencia con péptidos de otras bacterias).

### **C. Caracterización adicional de péptidos candidatos, para determinar especificidad y sensibilidad.**

#### **Procedimiento ELISA**

Se utilizan soluciones de péptidos purificados (y proteínas de control) en tampón de propano BIS-TRIS 100 mM (pH 9,7) para recubrir placas de micropocillos comerciales (MaxiSorp®, Nunc) a 10 µg/ml. El procedimiento de recubrimiento es el siguiente: se añaden 50 µl de una solución que contiene la concentración apropiada de antígeno a cada pocillo y la placa de micropocillos se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. La solución de antígeno se elimina de los pocillos; la placa se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween-20 al 0,05 %, pH 9 (PBST); y se añadieron 300 µl de una solución de bloqueo convencional (*por ejemplo*, PBS 100 mM pH 7,4, suero bovino fetal al 5 %). El protocolo de bloqueo estándar satura con éxito esta alta capacidad de unión al antígeno, que deja bajas lecturas de fondo en los canales de control. Una concentración de proteína de aproximadamente 10 µg/ml en el tampón de recubrimiento es óptima. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan las placas tres veces con tampón PBST. Aunque la cantidad de cada péptido unido a la superficie y la cantidad de uno cualquiera epítipo expuesto a la solución varía un poco, la cantidad de epítipo unido no es limitante dentro del intervalo útil del ELISA.

Se emplea un procedimiento estándar para las pruebas ELISA. Por ejemplo, se diluyen los sueros humanos en serie (1:2), comenzando a una dilución 1:50 en 50 µl de tampón de bloqueo. Se agregan las muestras en cada pocillo y se incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan las placas tres veces con tampón PBST. El anticuerpo anti-IgG humana (H + L) conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se diluye a 1:15.000 en tampón de bloqueo; se dispensan 100 µl de esta solución sobre la placa y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavan las placas tres veces con tampón TBST y se agregan 100 µl de sustrato (pNPP Microwell Substrate System, KPL, Gaithersburg, Maryland) y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se leen a 405 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices, Spectramax 320).

#### **Inmovilización de conjugados Biotinilpéptido-Estreptavidina en un formato ELISA.**

Se utilizan conjugados de biotinilpéptido-estreptavidina en tampón fosfato de sodio para recubrir las placas de micropocillos (MaxiSorp®, Nunc). El procedimiento de recubrimiento es el siguiente: se agrega el antígeno a cada pocillo y se incuba la placa de micropocillos durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Se elimina la solución de antígeno de los pocillos, se lava la placa tres veces con PBS y se agregan 200 µl de solución de bloqueo (fracción V de albúmina de suero bovino al 2 % (Sigma) en PBS). Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C, se lavan las placas tres veces con PBS, se envuelven en plástico y se almacenan a 4 °C hasta su uso. La unión de los péptidos se controla mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales específicos para una proteína química de control que se recubre como biotinilproteína-estreptavidina. Una concentración de proteína de aproximadamente 5 µg/ml en el tampón de recubrimiento es óptima.

#### **Sensibilidad y especificidad**

Se generaron bibliotecas de péptidos para cada uno de los antígenos proteicos descritos anteriormente que consisten en péptidos de 15-mer que se superponen con 10 aminoácidos. 8 muestras de suero de pacientes con cultivo confirmaron que la enfermedad de Lyme que demostró seropositividad mediante transferencia Western se utilizó para seleccionar las diferentes bibliotecas de péptidos. Se incubaron cuatro diluciones de anticuerpos con las bibliotecas utilizando el sistema de mapeo de epítomos REVEAL propiedad de ProImmune. La unión positiva se indicó para varios péptidos en cada proteína. Los péptidos individuales se eligieron para un análisis adicional utilizando tres criterios:

- 1) su capacidad para unirse al menos al 75 % (6/8) de las muestras de suero,
- 2) su capacidad para unirse a múltiples (~ 50 %) de las muestras de suero en múltiples diluciones (lo que indica una unión de alta afinidad),
- 3) baja identidad de secuencia con otras especies bacterianas según lo determinado por la alineación de secuencia utilizando el algoritmo BLAST de la proteína NCBI en el sitio web de NCBI (se eligieron péptidos únicos para las especies de *Borrelia*, y tenían menos de un 50 % de identidad de secuencia con péptidos de otras bacterias).

Los péptidos seleccionados se enumeran en la Tabla 1.

Cada uno de estos péptidos fue luego seleccionado en un ensayo ELISA, que utiliza muestras de suero de nueve

pacientes con seropositividad confirmada para la enfermedad de Lyme mediante transferencia Western, diez individuos sanos sin antecedentes de enfermedad de Lyme (control negativo) y nueve pacientes con sífilis confirmada (RPR+, control de reactividad cruzada), tal como se describió anteriormente. Se consideró una muestra positiva si estaba presente una diferencia estadísticamente significativa en la unión media de los anticuerpos séricos de pacientes con enfermedad de Lyme confirmada serológicamente en comparación con el suero de pacientes confirmados como seronegativos para la enfermedad de Lyme (controles normales), y suero de pacientes que eran positivos para sífilis (RPR+), donde la significación se mide como  $p < 0,05$  según lo determinado mediante una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación de Dunn. El suero RPR+ se utiliza como control negativo porque es una enfermedad causada por una Spirochete patógena diferente (*Treponema pallidum*) que puede contener antígenos que son reactivos cruzados con pacientes infectados con *Borrelia*. La unión del anticuerpo sérico se comparó en diluciones simples (1:100), diluciones múltiples (análisis de curvas de unión del anticuerpo), así como títulos de unión recíproca del 50 % (se prepararon varias diluciones de cada muestra de suero y se incubaron con cada péptido); el título de unión del 50 % se determinó como la dilución del anticuerpo a la absorbancia medida en el ensayo ELISA había alcanzado el 50 % de la absorbancia máxima registrada para cualquiera de las diluciones). Los datos representativos para la unión del anticuerpo se muestran en las figuras 1-4. La Figura 2 muestra las curvas de unión del anticuerpo sérico para 7 antígenos peptídicos potenciales, que demuestran una unión aumentada del suero de pacientes con enfermedad de Lyme en varias diluciones de las muestras de suero en comparación con el suero de pacientes con sífilis (RPR+) o sueros de control normales. La Figura 3 muestra el análisis de la unión del péptido a una dilución única, que es más representativa de los datos que se obtendrían en un entorno de laboratorio clínico (las líneas y los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, \* $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ ). La Figura 4 es un tipo diferente de análisis que evalúa la unión del suero a los péptidos utilizando títulos de unión del 50 % (la dilución a la cual la absorbancia alcanza el 50 % de la absorbancia máxima registrada para cualquiera de las diluciones). Demuestran claramente una unión mejorada de péptidos en sueros de pacientes con enfermedad de Lyme en comparación con pacientes con sífilis y/o sueros de individuos normales.

Se han generado datos similares para todos los péptidos que se muestran en la Tabla I.

### **Ensayos multipéptidos**

El siguiente paso es crear un ensayo multi-péptido utilizando diferentes combinaciones de los péptidos en la Tabla 1. Se combinarán y seleccionarán diversas combinaciones de péptidos, en función de sus resultados en ELISA individuales, utilizando suero de pacientes con enfermedad de Lyme temprana en los que se confirmó la enfermedad mediante PCR y comparando la eficacia de la unión con el suero de individuos sanos normales sin antecedentes conocidos de enfermedad de Lyme o se utilizaron los patrones de inmunotransferencia característicos de la infección obtenida de áreas endémicas y no endémicas para la EL como controles sanos negativos. El suero de pacientes con sífilis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico e infección por *Helicobacter pylori* se utilizarán como controles negativos para la reactividad cruzada con anticuerpos producidos en respuesta a otras enfermedades (controles de reactividad cruzada). La utilización de múltiples péptidos en un solo ensayo aumentará la sensibilidad del ensayo para muestras de Lyme positivas, pero no para los controles de reactividad cruzada y el suero normal. Se utilizará un punto de corte de 3DE por encima de la media de los grupos de control como un marcador de positividad.

### **D. Evaluar la capacidad de los péptidos que contienen epítomos como se identifica en la sección C para unirse a anticuerpos anti-IgM e IgG de *B. burgdorferi***

Se utilizará suero e IgG e IgM aisladas de pacientes con EL temprana confirmada mediante cultivo de para evaluar el potencial diagnóstico de los 21 péptidos que se muestran en la Tabla 1. La síntesis de péptidos y los métodos ELISA que se utilizarán se describen en el Ejemplo I. Se espera que sea poco probable que solo uno de los péptidos proporcione sensibilidad suficiente para identificar individuos con anticuerpos contra proteínas de *B. burgdorferi*. Se planea evaluar una variedad de combinaciones de los péptidos que contienen epítomos. Se utilizarán 50 muestras de suero de pacientes con EL temprana confirmada mediante cultivo, 50 muestras de suero de pacientes con EL diseminada aguda confirmada mediante cultivo, 50 muestras de suero de pacientes con EL tardía, 50 muestras de suero de un banco de pacientes de salud normal de áreas endémicas y no endémicas y paneles de suero de otras garrapatas y enfermedades que se encuentran en el diagnóstico diferencial de la EL. Estos últimos paneles incluirán suero de 20 pacientes con artritis reumatoide, 20 pacientes con LES, 20 pacientes con sífilis, 20 pacientes con EM, 20 pacientes con *H. pylori*, 20 pacientes con HGE confirmado por cultivo y 20 pacientes con babesiosi microbiológicamente confirmado.

### **E. Desarrollo de un ensayo de péptido de inmunodiagnóstico**

1. Selección de los péptidos: la selección se basará en 1) pruebas adicionales de la sensibilidad y especificidad de cada péptido (*por ejemplo*, utilizando sueros de pacientes que han sido infectados con otros organismos que se sabe que tienen reactividad cruzada con *B. burgdorferi*); 2) la eficiencia de recubrimiento relativa de cada combinación de péptidos (véase a continuación).

2. Preparación y prueba de micropocillos recubiertos con péptidos. Se encontró, inesperadamente, que los

péptidos de la invención se adsorben a superficies de micropocillos bastante bien sin necesidad de biotilación y se unen a estreptavidina, y que los péptidos directamente adsorbidos fueron tan eficaces como los antígenos conjugados con estreptavidina para la detección ELISA de anticuerpos de *B. burgdorferi*. Sin embargo, los péptidos libres no se adsorbieron bien sobre superficies de nitrocelulosa para su uso en inmunoensayos de formato rápido (flujo lateral). Se encontró que la biotilación directa de péptidos sintéticos en el extremo N durante la síntesis en fase sólida era mucho más conveniente que unir grupos biotinilo a péptidos libres después de la desprotección y escisión de los soportes sólidos. Asimismo, los conjugados de estreptavidina de péptidos N-biotinilados funcionaron también en los ensayos de formato rápido, al igual que los péptidos unidos a la estreptavidina de acuerdo con el protocolo publicado (Liang et al. (1999a) (supra). Dado que se sintetizarán algunos péptidos pequeños que abarcan epítomos lineales individuales, en general todos los péptidos se sintetizarán con restos de biotinilo N-terminales y se utilizarán conjugados de estreptavidina para los ensayos ELISA y de formato rápido (membrana). Con los grupos biotinilo unidos durante la síntesis en fase sólida, la conjugación con estreptavidina es apenas más complicada que el recubrimiento de placas con péptidos libres, y no habrá preocupación por la mala adhesión de los péptidos cortos a las superficies inmovilizadoras. Los péptidos no necesitan ser inmovilizados en una relación específica entre sí, pero se debe unir una cantidad suficiente de cada péptido para asegurar que ninguno de los epítomos se vuelva limitante en los ensayos ELISA de los sueros de pacientes.

### 3. Comparación del prototipo de ensayo peptídico para Elisa y transferencia western de *B. burgdorferi* entera.

Una vez que se hayan identificado las mejores combinaciones de péptidos, se comparará el prototipo de ensayo de péptidos con el protocolo estándar recomendado por los CDC. Las muestras clínicas se analizarán en un ELISA estándar utilizando pases bajos enteros de *B. burgdorferi* y en transferencias Western de IgM e IgG para comparar los resultados del ensayo de péptidos.

Controles positivos: las proteínas recombinantes OspC, FlaB, DbpA y péptidos de IR6 se utilizarán como controles. La reactividad de cada uno de los péptidos se comparará con la proteína recombinante correspondiente.

Controles negativos: Para evaluar la unión no específica de anticuerpos en el ensayo de péptidos, se utilizará un péptido aleatorio diseñado específicamente. Para evaluar la unión no específica de anticuerpos en el ensayo de control positivo de proteína recombinante, se utilizará BSA.

Se utilizan muestras de suero positivas para evaluar preparaciones de péptidos y proteínas comparativas:

- a. 100 muestras de suero obtenidas en la presentación de pacientes con EL local temprana confirmada mediante cultivo.
- b. 100 muestras de suero obtenidas en la presentación de pacientes con EL diseminada aguda confirmada mediante cultivo.
- c. 100 muestras de suero de pacientes con EL tardía.

Se utilizan muestras de suero de control negativo para evaluar preparaciones de péptidos y proteínas comparativas:

- a. 50 sueros de un banco de pacientes sanos normales de áreas endémicas.
- b. 50 sueros de un banco de pacientes sanos normales de áreas no endémicas.
- c. 30 muestras de sueros de pacientes individuales con HGE confirmado mediante cultivo.
- d. 20 muestras de sueros de pacientes individuales con babesiosis confirmada microbiológicamente.
- e. 30 muestras de sueros de pacientes individuales con artritis reumatoide
- f. 30 muestras de sueros de pacientes individuales con LES.
- g. 20 muestras de sueros de pacientes individuales con sífilis.
- h. 20 muestras de sueros de pacientes individuales con EM.
- i. 20 muestras de sueros de pacientes individuales con *H. pylori*.

Se espera que los péptidos probados proporcionen un ensayo sensible y específico que sea al menos tan eficaz como el ensayo C6 actualmente aprobado.

### **F. Preparación y caracterización de polipéptidos multi-epítomo**

Para aumentar significativamente la sensibilidad de los ensayos de péptidos basados en los péptidos individuales descritos en el presente documento, se construirán péptidos multiméricos (dímeros, trímeros y más) que contienen varias combinaciones de los 21 péptidos mostrados en la Tabla 1 o variantes activas de los mismos. Se insertarán espaciadores de, por ejemplo, 3 glicinas entre los epítomos en el multímero. Otros péptidos de diagnóstico descritos en el presente documento, o conocidos por los expertos en la materia, también se pueden combinar con péptidos de la invención en multímeros.

Se utilizará el panel de 8 sueros de la enfermedad de Lyme positivos y bien caracterizados clínicamente que fueron

analizados previamente por ELISA: dos títulos bajos, dos medios y dos altos de seis pacientes diferentes de Lyme, además de un control negativo obtenido de un individuo sano.

5 Se espera que algunas combinaciones de los péptidos de la presente invención exhiban una mayor sensibilidad en comparación con los péptidos individuales.

### Ejemplo II - Un péptido de diagnóstico OspC para la enfermedad de Lyme

10 OspC es una proteína de superficie de *Borrelia* necesaria para la transmisión de las bacterias desde el intestino medio de la garrapata al hospedador humano (Tilly et al. (2006) *Infection and Immunity* 74, 3554-3564). Es una proteína de valor diagnóstico significativo porque es necesaria para la entrada en el hospedador mamífero y, por lo tanto, siempre se presentará durante la infección y se expresará durante el inicio de la infección. Sin embargo, la proteína OspC no está altamente conservada, y contiene numerosos subtipos que tienen una variabilidad de secuencia significativa. Además, algunos estudios previos que utilizaron OspC recombinante completa como un serodiagnóstico para la enfermedad de Lyme demostraron un alto nivel de reactividad cruzada en muestras de control de enfermedad negativas.

20 En el presente estudio, se mapearon epítomos lineales dentro de la proteína OspC para identificar regiones altamente conservadas que carecen de reactividad cruzada con antígenos de otras bacterias, y han generado un péptido antigénico (OspC1) que se une al anticuerpo de pacientes con enfermedad de Lyme temprana con alta especificidad. OspC1 superó a un antígeno peptídico previamente identificado de OspC (PepC10) en un inmunoensayo basado en ELISA, y es una diana útil para la inclusión en un ensayo serológico multipéptido sensible para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme temprana.

25 Utilizando una biblioteca de péptidos superpuestos, se mapearon epítomos lineales en OspC, un importante factor de virulencia de *B. burgdorferi* necesario para la infección en mamíferos, y se confirmaron los resultados mediante ELISA. Se identificó un epítomo peptídico de 20 aminoácidos altamente conservado, OspC1. A través de ELISA, OspC1 detectó IgM y/o IgG específica en 60 de 98 muestras de suero (62,1 %) obtenidas de pacientes con eritema migratorio (enfermedad de Lyme temprana) en el momento de su presentación inicial. Por comparación, el péptido OspC disponible en el mercado, PepC10, detectó anticuerpos en solo 48 de 98 muestras de suero (49,0 %). Además, OspC1 generó menos resultados falsos positivos entre las poblaciones de control de salud y enfermedad negativas (artritis reumatoide y sífilis) en comparación con PepC10. Tanto los péptidos OspC altamente específicos como los más sensibles que los disponibles actualmente, OspC1 tendrán valor como componente de un ensayo serológico de la enfermedad de Lyme con múltiples péptidos con capacidades significativamente mejoradas para el diagnóstico de infección temprana.

Las ventajas de los péptidos OspC discutidos en este Ejemplo, así como otros péptidos discutidos a lo largo de esta solicitud, incluyen que se unen bien tanto a IgG como a IgM, y proceden de antígenos que se expresan temprano después de la infección.

40

#### A. Material y métodos

45 **Suero:** 98 muestras de suero (Tabla 3) se obtuvieron con consentimiento, bajo aprobación institucional del IRB, de pacientes con eritema migratorio en su presentación inicial a la clínica de la enfermedad de Lyme en el Centro Médico de Westchester en Westchester, NY (n = 48) o Centro Médico Gundersen-Lutheran en La Crosse, WI (n = 50). Ambas áreas son altamente endémicas de la enfermedad de Lyme. Se compraron 48 sueros de individuos sanos que residen en una región no endémica para la enfermedad de Lyme (Nuevo México) a partir de Creative Testing Solutions (Tempe, AZ). Se adquirieron 88 sueros de control de enfermedad negativos obtenidos de pacientes con artritis reumatoide (AR) (n = 48) o sífilis (n = 40) de Bioreclamation, LLC (Westbury, NY); estos sueros se obtuvieron de una región altamente endémica para la enfermedad de Lyme (sur del estado de Nueva York).

50 **Péptidos:** ProImmune, Inc. (Oxford, Reino Unido) realizó el mapeo de epítomos utilizando su tecnología de micromatrices de péptidos propiedad de ProArray Ultra™. En resumen, se expusieron bibliotecas de péptidos superpuestos generados a partir de la secuencia para OspC tipo K (n.º de acceso AAB86554) y que consisten en péptidos de 15-meros que se superponen con 10 AA, a diluciones múltiples de ocho sueros individuales que contienen anticuerpos contra *B. burgdorferi* sensu stricto, según lo determinado mediante transferencia Western (Gold Standard Diagnostics, Davis, CA). Se detectó unión positiva de suero utilizando un anticuerpo secundario antihumano marcado con fluorocromo y los datos se indicaron como unidades adimensionales de la intensidad de señal de fluorescencia promedio (ISF) para manchas replicadas de cada péptido. Se requirió que una señal positiva fuera al menos 4 veces la ISF del control de ensayo negativo. Los péptidos elegidos para análisis adicionales fueron producidos por Lifetein, Inc. (South Plainfield, NJ), y tenían un mínimo de pureza del 90 %. La alineación de la secuencia de los diferentes tipos de OspC se realizó utilizando CLC Workbench (Figura 6). Las secuencias para los tipos de OspC habían sido identificadas previamente. Cuando no estaba disponible una secuencia completa para un tipo de OspC, se presentaron múltiples secuencias para ese tipo que mostraban la presencia o ausencia del péptido de interés.

65

**ELISA:** Las placas Maxisorp (Nunc, Rochester, NY) de 96 pocillos se recubrieron con 10 µg/ml de cada péptido en tampón de carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 1 hora, se añadió BSA al 1 % en PBS a cada pocillo y se incubó durante la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se lavaron las placas 3x con Tween-20 al 0,05 % en PBS utilizando un lavador de placas automático (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

5 Se añadieron por triplicado las muestras de suero diluidas 1:100 en BSA al 1 % y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Se lavaron las placas de nuevo y el anticuerpo anti-IgM humana de cabra marcada con HRP (específica de la cadena µ) o el anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcada con HRP (específica de la cadena γ) (Southern Biotech, Birmingham, AL) diluida 1:5000 en tampón de bloqueo se añadió a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se revelaron con sustrato TMB (KPL, Gaithersburg, Maryland) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 2 N y se leyó la absorbancia a 450 nm y 570 nm (Molecular Devices).

**Análisis de los datos:** Se determinaron la sensibilidad y la especificidad de cada péptido tanto para IgM como para IgG mediante la comparación de los resultados de los pacientes con Lyme con los resultados de los controles negativos mediante el análisis de ROC utilizando Prism 6.0 (Graphpad, La Jolla, CA). Los valores de corte utilizados para comparar la sensibilidad y la especificidad entre los dos péptidos fueron 3 DE de la media de controles sanos como el corte (límite de detección). El análisis estadístico de los datos categóricos presentados en tablas y el texto se realizó mediante una prueba exacta de Fisher con un valor de p de dos colas utilizando Prism 6.0 (Graphpad).

## 20 B. Resultados

Se seleccionaron ocho muestras de suero de pacientes con enfermedad de Lyme para el mapeo de epítomos inicial basado en un alto título de anticuerpos *anti-Borrelia* según lo determinado por la detección de 9-10 de 10 bandas en una prueba de tira de transferencia de Western de diagnóstico de enfermedad de Lyme disponible comercialmente (5 de 10 bandas es el requisito mínimo para que una muestra se considere positiva). Prolimmune, Inc. realizó el mapeo de epítomos utilizando su tecnología de micromatrices de péptidos propiedad de ProArray Ultra™. Se expresó una secuencia parcial para OspC tipo K (*B. burgdorferi* OC12, n.º de acceso AAB86554) como una biblioteca de péptidos superpuestos que consta de un total de 37 péptidos (Tabla II), cada uno de 15 aminoácidos (AA) que se superponen en longitud por 10 AA (compensados por 5 AA). Se utilizó OspC tipo K para el mapeo de epítomos porque se ha asociado con la enfermedad diseminada (29). Además de carecer de los primeros 10 AA, la secuencia parcial no contiene los 10 AA finales, que corresponden al péptido OspC disponible comercialmente, PepC10. De los 37 péptidos evaluados, solo se observó que 3 se unían a más del 50 % de las ocho muestras de suero utilizadas en el mapeo de epítomos. Estos fueron el péptido 1, el péptido 18 y el péptido 30; además, 3 de 5 muestras que se unieron al péptido 1 también se unieron al péptido 2, lo que indica que el epítomo encontrado en el péptido 1 podría extenderse al péptido 2. En el presente documento, estos péptidos se denominarán OspC1 (péptido 1 + 2, MTLFLFISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO:8, a veces denominado en el presente documento como OspC-tipo K (11-30)), OspC18 (péptido 18, TLLAGAYTISKLITQ (SEQ ID NO 51)), y OspC30 (péptido 30, AKKAILITDAAKDKG (SEQ ID NO: 9, a veces denominado en el presente documento como OspC-tipo K (146-160)). Se confirmó la unión sérica en un ELISA posterior en el que se incubaron los 3 péptidos con 18 sueros adicionales de pacientes con enfermedad de Lyme de alto título (8-10 de 10 bandas en el ensayo de la tira de transferencia Western) y 10 sueros negativos de individuos sanos. Los sueros se titularon en placas recubiertas con péptidos para determinar una dilución óptima para estudios posteriores. OspC18 se unió a los anticuerpos séricos de pacientes de Lyme e individuos normales de manera equivalente (Figura 5), lo que indica que el epítomo contenido en el péptido tenía reactividad cruzada y no era específico para *Borrelia*. OspC 18 no se utilizó en análisis posteriores. La absorbancia media del anticuerpo sérico que se une a OspC1 y OspC30 fue significativamente mayor en pacientes con enfermedad de Lyme en comparación con individuos normales; sin embargo, OspC1 pareció detectar más muestras de Lyme individuales que OspC30 (Figura 5).

**Tabla 3: OspC (tipo K)<sup>a</sup> de *Borrelia burgdorferi* OC12**

N.º de Péptido	Pos. en la secuencia de proteínas	Secuencia peptídica	N.º de Péptido	Pos. en la secuencia de proteínas	Secuencia peptídica
1	11-25	MTLFLFISCNNSGKD	20	106-120	KLITQKLDGLKNSEK
2	16-30	FISCNNSGKDGNTSA	21	111-125	KLDGLKNSEKLKEKI
3	21-35	NSGKDGNTSANSAD	22	116-130	KNSEKLKEKIENAKK
E					
4	26-40	GNTSANSADSVKGP	23	121-135	LKEKIENAKKCSDF

**Tabla 3: OspC (tipo K)<sup>a</sup> de *Borrelia burgdorferi* OC12**

N.º de Péptido	Pos. en la secuencia de proteínas	Secuencia peptídica	N.º de Péptido	Pos. en la secuencia de proteínas	Secuencia peptídica
5	31-45	NSADESVKGNLTEI	24	126-140	ENAKKCEDFTKKLE
6	36-50	SVKGNLTEISKKIT	25	131-145	CSEDFTKKLEGEHAQ
7	41-55	NLTEISKKITESNAV	26	136-150	TKKLEGEHAQLGIEN
8	46-60	SKKITESNAVVLAVK	27	141-155	GEHAQLGIENVTDEN
9	51-65	ESNAVVLAVKEIETL	28	146-160	LGIENVTDENAKKAI
10	56-70	VLAVKEIETLLASID	29	151-165	VTDENAKKAILITDA
11	61-75	EIETLLASIDELATK	30	156-170	AKKAILITDAAKDKG
12	66-80	LASIDELATKAIGKK	31	161-175	LITDAAKDKGAAELE
13	71-85	ELATKAIGKKIQNG	32	166-180	AKDKGAAELEKLFKA
14	76-90	AIGKKIQNGGLAVE	33	171-185	AAELEKLFKAIVENLA
15	81-95	IQQNGGLAVEAGHN	34	176-190	KLFKAIVENLAKAAKE
G					
16	86-100	GLAVEAGHNGTLLAG	35	181-195	VENLAKAAKEMLANS
17	91-105	AGHNGTLLAGAYTIS	36	186-200	KAAKEMLANSVKELT
18	96-110	TLLAGAYTISKLITQ	37	190-204	EMLANSVKELTSPIV
19	101-115	AYTISKLITQKLDGL			

<sup>a</sup> **Secuencia Parcial; N.º de acceso AAB86554**

Las secuencias en esta tabla, en el orden del péptido 1-péptido 37, están representadas por, las SEQ ID NOS: 80, 78, 263-277, 51, 278-288, 9 y 289-295, respectivamente.

- 5 Una limitación en la utilización de OspC en un ensayo de diagnóstico es la variabilidad inherente encontrada dentro de la proteína. Se han descrito muchos 'tipos' de OspC (variantes alélicas) en la literatura (14, 27, 28), algunos se han asociado con una mayor propensión a la diseminación de las bacterias desde el sitio de la infección inicial después de la picadura de la garrapata. Si bien la asociación del tipo OspC y la enfermedad diseminada está más allá del alcance de este estudio, para ser eficaz dentro de las limitaciones de un ensayo de diagnóstico, un epítipo debe estar altamente conservado. Por lo tanto, se alinearon las secuencias de 15 tipos diferentes de OspC, evaluando la variabilidad AA en los epítipos OspC1 y OspC30 y comparándola con el grado de variabilidad de la secuencia encontrada dentro de la secuencia de PepC10 disponible comercialmente (PWAESPCKP (SEQ ID NO: 36)). Las secuencias individuales completas no estaban disponibles para los tipos C, G, H, J, K, M y U de OspC; cuando fue posible, se alinearon múltiples secuencias diferentes del mismo tipo de OspC para demostrar la presencia o ausencia de cada epítipo. Como se demuestra en la Figura 6, la secuencia para OspC1 está presente y altamente conservada en todos los tipos de OspC analizados, siendo idéntica a la secuencia de consenso generada mediante la alineación de las diferentes proteínas de OspC. Esto es similar a PepC10, que también es altamente conservado e idéntico a la secuencia de consenso alineada, aunque este péptido parece estar ausente en OspC tipo U y tipo J. Secuencias completas que contienen la porción c-terminal (donde se encuentra PepC10) de OspC tipo C y tipo G no estaban disponibles, por lo que no está claro si PepC10 está completamente presente en esos tipos. Por otro lado, OspC30 está pobremente conservado entre los diferentes tipos de OspC; la secuencia identificada en el
- 10
- 15
- 20

mapeo de epítomos fue altamente divergente de la secuencia de consenso generada mediante la alineación de esa posición dentro de los diferentes tipos de OspC. De hecho, un mapeo de epítomos posterior de OspC tipo A no identificó la región análoga para OspC 30 como un epítomo (datos no mostrados). El alto grado de conservación tanto en OspC1 como en PepC10 puede deberse a su colocación, respectivamente, en las porciones N-terminal y C-terminal de la proteína, ya que el mayor grado de variación entre los diferentes tipos de OspC se encuentra en el medio de la proteína. OspC 30 no se utilizó en análisis posteriores.

Para evaluar el potencial de OspC1 en un ensayo de diagnóstico para la enfermedad de Lyme temprana, se evaluó el péptido contra un gran panel de suero obtenido de pacientes con EM en el momento de su diagnóstico inicial y se compararon los resultados con los obtenidos con PepC10. A medida que se desarrolla EM en cualquier lugar de 3 a 30 días después de la picadura de garrapata (con un promedio de 7 días), el nivel de anticuerpos *anti-Borrelia* dentro de esta población de pacientes puede variar mucho. La enfermedad temprana está marcada por anticuerpos IgM elevados contra *Borrelia*. A medida que la enfermedad avanza y la respuesta inmune evoluciona, la respuesta IgM disminuye y se reemplaza con IgG. Dependiendo de cuándo un paciente busque atención médica, pueden presentarse con IgM, IgG o una mezcla de ambas. Como resultado, se ensayaron independientemente la IgM y la IgG contra OspC1 y PepC10 (Figura 7). Los sueros de individuos sanos recolectados en una región no endémica para la enfermedad de Lyme (el sudoeste estadounidense) se utilizaron como control negativo y para establecer los límites de detección. Además, en este ensayo se utilizaron sueros de pacientes con AR o sífilis como controles negativos de la enfermedad. La AR es una enfermedad inflamatoria autoinmune caracterizada por niveles elevados de anticuerpos séricos y destrucción articular, que también puede ocurrir en la enfermedad de Lyme. La sífilis es una enfermedad infecciosa causada por la espiroqueta relacionada *Treponema pallidum*, y se utilizó como control negativo para el anticuerpo de reacción cruzada generado por la infección con una espiroqueta relacionada. Se utilizó suero de 48 donantes sanos para establecer los límites de detección para el ELISA. Se determinó la absorbancia media para la unión OspC1 de IgM ( $0,316 \pm 0,187$ ) e IgG ( $0,139 \pm 0,051$ ) y para la unión PepC10 de IgM ( $0,335 \pm 0,187$ ) e IgG ( $0,125 \pm 0,101$ ). Las muestras se consideraron positivas si la absorbancia media de tres pocillos replicados fue mayor que 3DE de la media de los controles sanos, equivoca si estaba entre 2DE y 3DE de la media de los controles sanos, o negativa si era menos de 2DE de la media de los controles sanos. Dos de las 48 muestras en la población de control sana PepC10 se unieron a IgG con valores de absorbancia superiores a 3 DE de la media de la población. Estas muestras se trataron como valores atípicos y, aunque no se eliminaron del análisis, no se incluyeron en el cálculo de los valores de corte. Estas muestras no fueron positivas para la unión de IgM a PepC10 o la unión de cualquiera de los isotipos a OspC1, y posteriormente se trataron como falsos positivos verdaderos. Todas las muestras de control falso positivo se evaluaron con las pruebas de tira de transferencia Western de diagnóstico de la enfermedad de Lyme disponibles en el mercado para determinar si el suero se obtuvo de un individuo con enfermedad de Lyme no diagnosticada previamente. Todos los controles negativos incluidos en esta evaluación fueron negativos para Lyme a través de tiras de transferencia Western.

La unión positiva de la IgM sérica a OspC1 se detectó en casi la mitad (47 de 97) de los sueros de pacientes con enfermedad de Lyme temprana (Figura 6a, Tabla 4), mientras que se encontraron significativamente menos sueros positivos para IgG (24 de 98) (Figura 6b, Tabla 4,  $p = 0,006$ ). Esto se esperaba, ya que la IgM es el isotipo de anticuerpo predominante encontrado durante la infección temprana. Sin embargo, algunas de las muestras solo fueron positivas para IgM o IgG; el número total de sueros de pacientes considerados inequívocamente positivos (que detectan IgM o IgG en suero) para la enfermedad de Lyme mediante la unión de OspC1 fue superior al 60 % (60 de 98, 62,9 %) (Tabla 5). Si se incluyeron muestras que eran equívocas en esa tasa, OspC1 detectó positivamente la enfermedad de Lyme más del 75 % del tiempo (75 de 98, 76,5 %, Tabla 5, positivo + equívoco). Por comparación, PepC10 detectó positivamente anticuerpos IgM en suero en menos muestras de suero de pacientes con Lyme temprana en comparación con OspC1 (40 de 97 frente a 47 de 97, respectivamente, sin diferencia significativa (NS)) (Tabla 4), y también tuvo una tasa más alta de falsos positivos para la unión de IgM en poblaciones de control de enfermedad negativas (Tabla 4). Al igual que con OspC1, PepC10 detectó significativamente menos sueros IgG positivos en comparación con IgM (16 de 98 frente a 40 de 97, respectivamente,  $p < 0,001$ ), pero detectó un número menor de sueros de pacientes con Lyme temprana positivos a IgG en comparación con OspC1 (16 de 98 frente a 24 de 98, respectivamente, NS). PepC10 detectó menos sueros positivos totales (IgM o IgG) (48 de 98, 49,0 %) en comparación con OspC1 (60 de 98, 62,9 %, Tabla 5, NS). Esta diferencia se mantuvo cuando el número de muestras equívocas se incluyó en la tasa (OspC 1-75 de 98, 76,5 % frente a PepC 10-64 de 98, 65,3 %, NS). OspC1 detectó un número aparentemente mayor de falsos positivos de IgG en la población de pacientes control negativo de la enfermedad (Tabla 4). Sin embargo, PepC10 demostró una mayor variabilidad en la unión de IgG en suero dentro de la población control sana negativa en comparación con OspC1, (PepC10 =  $0,125 \pm 0,100$ , CV = 0,80 frente a OspC1 =  $0,139 \pm 0,049$ , CV = 0,35, media  $\pm$  DE, coeficiente de variación), con la detección de 4 falsos positivos en los sueros de control normales incubados con PepC10 en comparación con ningún falso positivo en los sueros de control normales incubados con OspC1 (Figura 7b). Esto dio como resultado valores de corte cada vez más altos para la detección de anticuerpos IgG en comparación con OspC1 como resultado de valores de DE más grandes (Figura 7b), que a su vez dieron como resultado tasas más bajas de positivos verdaderos y falsos. Por lo tanto, contraintuitivamente, el mayor grado de no especificidad demostrado por PepC10 después de la incubación con suero de control normal dio como resultado la detección de menos falsos positivos en otras poblaciones de control negativo.

Tabla 4: Unión de IgM e IgG en suero de OspC1 y PepC10

		Lyme		Sano		AR		Sífilis	
		OspC1	PepC10	OspC1	PepC10	OspC1	PepC10	OspC1	PepC10
IgM	Positivo <sup>a</sup>	48,5 % (47/97)	41,2 % (40/97)	0 % (0/48)	0 % (0/48)	2,0 % (1/48)	12,5 % (6/48)	10,3 % (4/39)	20,5 % (8/39)
	Equívoco <sup>b</sup>	8,2 % (8/97)	13,4 % (13/97)	2 % (1/48)	6,2 % (3/48)	6,2 % (3/48)	2,0 % (1/48)	120,8 % (5/39)	7,7 % (3/39)
	Negativo <sup>c</sup>	43,3 % (42/97)	45,4 % (44/97)	98 % (47/48)	93,8 % (45/48)	91,8 % (44/48)	85,5 % (41/48)	76,9 % (30/39)	71,8 % (28/39)
IgG	Positivo <sup>a</sup>	24,5 % (24/98)	16,3 % (16/98)	2,0 % (1/48)	8,3 % (4/48)	12,5 % (6/48)	2,0 % (1/48)	7,7 % (3/39)	5,1 % (2/39)
	Equívoco <sup>b</sup>	16,3 % (16/98)	11,2 % (11/98)	4,2 % (2/48)	0 % (0/48)	6,2 % (3/48)	4,2 % (2/48)	17,9 % (7/39)	0 % (0/39)
	Negativo <sup>c</sup>	59,2 % (58/98)	72,5 % (71/98)	93,8 % (45/48)	91,7 % (44/48)	81,3 % (39/48)	93,8 % (45/48)	74,4 % (29/39)	94,9 % (37/39)

<sup>a</sup>-Más de 3 DE de la media de controles sanos

<sup>b</sup>-Entre 2 DE y 3 DE de la media de controles sanos

<sup>c</sup>-Menos de 2 DE de la media de los controles sanos

Tabla 5: Reconocimiento compuesto de OspC1 y PepC10 mediante anticuerpos del suero<sup>a</sup>

	Lyme		Normal
	OspC1	PepC10	OspC1
Positivo <sup>d</sup>	62,1 % (60/98)	49,0 % (48/98)	2,0 % (1/48)
Equívoco <sup>c</sup>	15,3 % (15/98)	16,3 % (16/98)	6,3 % (3/48)
Negativo <sup>d</sup>	23,5 % (23/98)	34,7 % (34/98)	92,7 % (44/48)

<sup>a</sup>-Número total de muestras de suero que contienen anticuerpos IgM o IgG que se unen a OspC1 o PepC10

<sup>b</sup>-Más de 3 DE de la media de controles sanos

<sup>c</sup>-Entre 2 DE y 3 DE de la media de controles sanos

<sup>d</sup>-Menos de 2 DE de la media de los controles sanos

Se determinó la sensibilidad y especificidad de ambos péptidos para identificar muestras positivas mediante un análisis ROC utilizando 3DE de la media de controles sanos como valor de corte. Al comparar la detección de la enfermedad de Lyme en sueros de pacientes con controles sanos, OspC1 demostró una especificidad del 100,00 % y una sensibilidad del 41,24 % para la detección de IgM y una especificidad del 97,92 % y una sensibilidad del 24,92 % para la detección de IgG. Esto se compara con PepC10 que demostró una especificidad/sensibilidad de 100,00 % y 29,90 % para IgM, y 91,67 % y 17,35 % para IgG, respectivamente. Por lo tanto, ambos péptidos fueron altamente específicos para la detección de la enfermedad de Lyme, lo que indica que cuando se devuelve un valor positivo es muy probable que sea un verdadero positivo. Cuando estos valores se recalcularon comparando los sueros de pacientes con Lyme con todos los controles negativos, OspC1 demostró una especificidad/sensibilidad del 98,52 % y 41,24 % para IgM y 92,59 % y 24,49 % para IgG, respectivamente. En comparación, PepC10 demostró una sensibilidad/especificidad del 99,26 % y 29,90 % para IgM y 94,81 % y 17,35 % para IgG, respectivamente. Por lo tanto, con respecto a los controles tanto sanos como de enfermedad, ambos péptidos son altamente específicos. Sin embargo, OspC1 tuvo una sensibilidad marginalmente mayor que PepC10 (41,24 % frente al 29,90 % para IgM y 24,49 % frente al 17,35 % para IgG). En su conjunto, el área bajo la curva (AUC) para ambos péptidos fue similar (IgM de OspC1 frente a PepC10, 0,8047 frente a 0,7406 IgG de OspC1 frente a PepC10, 0,7296 frente a 0,7573).

Como objetivo de un ensayo de diagnóstico serológico, OspC1 tiene una serie de atributos deseables: procede de un factor de virulencia principal que se requiere para la infección de los mamíferos, se expresa muy temprano en la infección, lo que aumenta la probabilidad de que una respuesta inmune se monte contra él, está altamente conservado entre los diferentes genotipos de OspC, e identificó una mayoría significativa de pacientes con enfermedad temprana. Se sostiene que OspC1 es un candidato viable para la prueba en un ensayo de diagnóstico de múltiples péptidos. Un ensayo que contenga 5 o más antígenos peptídicos específicos, procedentes de múltiples proteínas de *B. burgdorferi*, mejoraría notablemente las tecnologías disponibles actualmente tanto en especificidad como en sensibilidad (25), y representaría una prueba de laboratorio independiente viable para todas las fases del diagnóstico de la enfermedad de Lyme, especialmente la enfermedad temprana.



### Ejemplo III - Un péptido de diagnóstico OppA para la enfermedad de Lyme

OppA -2, un miembro de la familia oligopeptídica permeasa (Opp) de transportadores de péptidos, se conserva altamente entre las subespecies de *B. burgdorferi* y se expresa temprano en el curso de la infección en el hospedador mamífero, lo que sugiere que puede tener utilidad como diana de diagnóstico. Utilizando una biblioteca de péptidos superpuestos, se mapearon epítomos lineales en OppA2 y se identificaron 9 secuencias para análisis posteriores. Dos de los péptidos generados utilizando estas secuencias, OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400), unen anticuerpos en sueros de pacientes con enfermedad de Lyme con suficiente sensibilidad y especificidad para indicar que pueden ser componentes útiles de un ensayo serológico de la enfermedad de Lyme multipeptídico. Es importante destacar que, estos péptidos también demostraron un potencial para funcionar como marcadores de diagnóstico que distinguen entre las infecciones diseminadas y localizadas de *B. burgdorferi*.

Idealmente, la enfermedad de Lyme se debe diagnosticar temprano, cuando el tratamiento es más eficaz para prevenir la progresión de la enfermedad. En la década de 1980 y principios de la década de 1990, hubo algunas dudas de que había un retraso en la respuesta de anticuerpos, pero ahora se reconoce que el desarrollo de la respuesta inmune a *B. burgdorferi* sigue una cinética similar a la respuesta a otras infecciones bacterianas: de una a dos semanas después del inicio de la infección, los anticuerpos IgM contra *B. burgdorferi* pueden detectarse en la mayoría de los individuos infectados [5,18]. Sin embargo, a pesar del desarrollo de una respuesta de anticuerpos oportuna, los diagnósticos actuales son insensibles a la infección temprana. La respuesta inmune temprana a *B. burgdorferi* se limita a unos pocos antígenos, pero ofrecen dianas atractivas para el desarrollo de mejores pruebas de serodiagnóstico. Los estudios han identificado respuestas de anticuerpos muy tempranas a FlaB, p66, RecA y a OppA-1, -2 y -4 [19,24 Brissette 2010]. Los anticuerpos contra las proteínas OspC (25kd), VlsE, BBK32, FlaA (37 kd), BmpA (39 kd), FliL, BBG33, LA7 y DbpA aparecen un poco más tarde [8], [13,14,18-24].

En el presente estudio, se mapearon los epítomos de linfocitos B lineales de OppA2, un antígeno diana atractivo y se identificaron nueve epítomos inmunodominantes. Al evaluar el potencial de serodiagnóstico de los péptidos que comprenden cada uno de los epítomos identificados, se encontraron 2 que son marcadores específicos y sensibles para la enfermedad de Lyme. Los 2 péptidos que contienen estos epítomos pueden ser componentes de un ensayo basado en multipéptidos.

#### A. Materiales y métodos

Los materiales y métodos fueron similares a los descritos para los Ejemplos I y II. Más particularmente, **los sujetos humanos.** Se extrajo sangre de voluntarios adultos de acuerdo con los protocolos aprobados por las Juntas de Revisión Institucional de las respectivas instituciones. Un total de 103 muestras de sueros o plasma se obtuvieron de pacientes que presentaban EM en el momento de su visita inicial. Las muestras procedían de 3 sitios diferentes: el Centro Médico Gunderson Lutheran en LaCross, Wisconsin (n = 48, generosamente proporcionado por el Dr. Steve Callister); el Centro de Diagnóstico de la Enfermedad de Lyme de la Facultad de Medicina de Nueva York, Valhalla, New York (n = 31); y la Universidad Estatal de Nueva York-Stony Brook (n = 24). A los 31 pacientes de la Facultad de Medicina de Nueva York se les aisló a *B. burgdorferi* mediante cultivo a partir de una biopsia de la piel de la lesión de la piel (n = 16) o de la sangre (n = 15). Se utilizaron como controles negativos los sueros de voluntarios sanos que residen en áreas de los Estados Unidos que no son endémicas para la enfermedad de Lyme (n = 45) adquiridos de Creative Testing Solutions (Tempe, AZ). Los sueros de pacientes con una prueba de recuperación rápida de plasma positiva (n = 30) o diagnosticados con artritis reumatoide (n = 30) se compraron a (Bioreclamation, LLC). Las muestras se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

**Mapeo de epítomos** de OppA2. El mapeo de epítomos se realizó utilizando bibliotecas de péptidos superpuestos que abarcan la longitud completa de *B. burgdorferi* B31, OppA2. Una biblioteca consistió en péptidos de 15 aminoácidos de longitud solapados por 10 AA (compensados por 5 AA), 104 péptidos en total, se sintetizaron por ProlImmune, Inc (Oxford, UK). El mapeo de epítomos se realizó utilizando la tecnología de micromatrices de péptidos ProArray Ultra™, propiedad de ProlImmune, Inc. Se utilizaron Sueros de ocho pacientes con EL que se sabe que contienen anticuerpos *anti-Borrelia*, 4? con diseminación temprana y 4? con la enfermedad de Lyme tardía, para sondear la biblioteca de péptidos. Se produjo otra biblioteca de péptidos que consiste en péptidos de 20 AA que se superponen con 15 AA (compensados con 5 AA), mediante la generación por ArrayIt (California). Esta biblioteca se seleccionó utilizando un panel similar de sueros de pacientes con enfermedad de Lyme que se utilizó para seleccionar la biblioteca ProlImmune, Inc. Los 2 paneles de suero contenían diferentes conjuntos de suero.

**Síntesis de péptidos.** Se identificaron péptidos que abarcan secuencias para un análisis adicional. Los péptidos OppA2 (11-25), OppA2 (191-225), OppA2 (276-290), OppA2 (276-300), OppA2 (286-300), OppA2 (286-310), OppA2 (381-400), OppA2 (356-375) y OppA2 (491-505) se sintetizaron por Lifetein, Inc. (South Plainfield, NJ).

**Péptido ELISA.** Se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) con péptido 10 µg/ml, se diluyeron en tampón de bicarbonato de carbonato 0,1 M, pH 9,4 (50 µl por pocillo), durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió tampón de bloqueo de albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en PBS a los pocillos (250 µl/pocillo) y se incubó durante la noche a 4 °C. Se lavaron los pocillos tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBS-T) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con muestras humanas diluidas 1:100 en PBS-BSA al 1 %. Cada placa incluyó muestras de pacientes y donantes sanos, y todas las muestras se analizaron por triplicado. Tras el lavado, se incubaron los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:15.000 de anticuerpo secundario conjugado con HRP contra IgG + IgM humana. Las reacciones se desarrollaron durante 30 minutos con

3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en la oscuridad a temperatura ambiente y se detuvo la reacción mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Las densidades ópticas se determinaron a longitudes de onda de 450 nm y 570 nm utilizando un lector de placas SpectraMax Plus (Molecular Devices). El límite para la seropositividad se definió como la densidad óptica media (DO) de las muestras de control sanas más dos desviaciones estándar (DE).

5 **Las comparaciones de secuencias BLAST** se realizaron como se describe en otra parte en el presente documento.

**Análisis estadístico.** La importancia estadística de las diferencias cuantitativas entre los grupos de muestra se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada con el software GraphPad Prism (San Diego, CA). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

10

## B. RESULTADOS

Identificación de epítomos inmunogénicos de OppA2. Se revisaron de forma independiente los resultados de los 2 estudios de mapeo de epítomos diferentes. OppA2 es una proteína grande y cada muestra de suero detectó múltiples epítomos en ambos estudios. Se limitó el análisis a aquellos epítomos que fueron detectados por un mínimo de seis de ocho muestras de pacientes (75 %) en cada mapeo de epítomos. Como se esperaba, los resultados de los 2 estudios fueron similares, aunque hubo algunas diferencias, probablemente debido a la longitud del epítomo. En ambos estudios, el análisis demostró que los epítomos no tenían una longitud uniforme y, en algunas áreas, la unión de anticuerpos abarcaba péptidos adyacentes. No se determinó si los epítomos se superponían o eran adyacentes. Después del análisis y la comparación de los 2 estudios, se seleccionaron nueve péptidos, que abarcan epítomos de 5 regiones diferentes del péptido para la síntesis y el estudio posterior: OppA2 (11-25), OppA2 (191-225), OppA2 (276-290), OppA2 (276-300), OppA2 (286-300), OppA2 (286-310), OppA2 (381-400), OppA2 (356-375) y OppA2 (491-505) (Tabla 6, Figura 8). Como se muestra en la Figura 8, los epítomos no se agruparon dentro de una región específica de OppA2, pero están presentes a lo largo de toda la proteína. La región de OppA2 (276-310) tuvo la tasa más alta de reconocimiento. Entre los 2 estudios, 15 de 16 muestras de suero demostraron unión de anticuerpos en esa área de la proteína. Sin embargo, no todas las muestras se unen a la misma secuencia peptídica. Esto sugirió que esta región tiene un alto nivel de exposición al sistema inmune y contiene más de un epítomo. Debido a esto, se generaron múltiples péptidos que abarcan esta región.

30

**Tabla 6.** Secuencias de 9 péptidos elegidos para ELISA

Nombre del péptido/ posición en la proteína	Secuencia peptídica
OppA (11-25)	IFFLFLCCNNKERK (SEQ ID NO: 10)
OppA (191-225)	YGQNWTSPENMVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNNK (SEQ ID NO: 11)
OppA (276-290)	SDYYSSAVNAIFYA (SEQ ID NO: 12)
OppA (276-300)	SDYYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO: 14)
OppA (286-300)	IYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO: 13)
OppA (286-310)	IYFYSFNTHIKPLDNVKIRKALTLA (SEQ ID NO 52)
OppA (356-375)	LAEAGYPNGNGFPILKLYN (SEQ ID NO 47)
OppA (381-400)	KKICEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO 45)
OppA (491-505)	APIIYGNLSYLFNRND (SEQ ID NO 53)

Los péptidos OppA2 reaccionan específicamente con anticuerpos de pacientes con enfermedad de Lyme. Se examinaron los nueve péptidos más a fondo mediante ELISA utilizando suero o plasma obtenido de 104 pacientes con enfermedad de Lyme diagnosticada por un médico. Todos los pacientes presentaron uno o más EM. Se obtuvieron los sueros de control de 45 donantes sanos que residen en una región de los Estados Unidos no endémica para EL, New Mexico. Se incubaron todos los péptidos con suero por triplicado y los resultados se validaron en dos experimentos independientes. Para cada péptido, el valor umbral para la inmunoreactividad se definió como el valor de densidad óptica media (DO) más dos desviaciones estándar (DE) de los resultados obtenidos utilizando sueros de donantes sanos. Los péptidos OppA2 (11-25) y OppA2 (495-505) se excluyeron de una evaluación adicional porque la reactividad de los sueros de pacientes con enfermedad de Lyme era comparable a la de los sueros de donantes sanos (datos no mostrados). Cinco de los siete péptidos restantes fueron significativamente más inmunoreactivos con el suero de la enfermedad de Lyme que el suero de control sano: OppA2 (276-290), 37,6 %; OppA2 (276-300), 36,6 %; OppA2 (286-300), 44,5 %; OppA2 (286-310), 43,6 %; y OppA2 (356-375), 45,5 % (Tabla 7). Los péptidos OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400) reaccionaron con un porcentaje notablemente mayor (63,4 % y 61,4 %, respectivamente) de las muestras de pacientes con EL que los otros cinco péptidos (Tabla 2, no estadísticamente significativo (NS)). OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400) se detectaron en solo el 2,2 % y el 6,7 %, respectivamente, de las muestras de donantes sanos.

50 La especificidad de la respuesta de anticuerpos a estos siete péptidos se evaluó adicionalmente utilizando sueros de 30 pacientes diagnosticados con artritis reumatoide y de 26 pacientes con un RPR positivo. La prueba RPR se utiliza como prueba de detección de sífilis, una infección causada por la espiroqueta relacionada *Treponema pallidum*.

Ninguno de los péptidos fue inmunorreactivo para los sueros de pacientes con artritis reumatoide (Tabla 7). Además, los anticuerpos presentes en el suero RPR+ no se unieron a OppA2 (276-300), OppA2 (286-300), OppA2 (286-310) y OppA2 (356-375), mientras que un pequeño número de muestras se unieron a OppA2 (191-225) (3/26, 11,5 %), OppA2 (276-290)(1/26, 3,8 %) y OppA2 (381-400)(3/26, 11,5 %).

5

**Tabla 7 - Anticuerpo positivo de muestras de sueros con ELISA**

Panel de suero	N.º positivo/Total (% positivo)						
	OppA (191-225)	OppA (381-400)	OppA (276-290)	OppA (276-300)	OppA (286-300)	OppA (286-310)	OppA (356-375)
Sueros de la enfermedad de Lyme							
EM positivo (1ª visita)	64/104 (63,4)	62/104 (61,4)	38/104 (37,6)	34/104 (36,6)	45/104 (44,5)	44/104 (43,6)	46/104 (45,5)
• Wisconsin	41/46 (89,1)	38/46 (82,6)	30/46 (65,2)	26/46 (56,5)	36/46 (78,3)	36/46 (78,3)	37/46 (80,4)
• Elisa Positivo	18/35 (51,4)	17/35 (48,5)	6/35 (17,1)	8/35 (22,9)	7/35 (20)	8/35 (22,9)	9/35 (25,7)
• Hemocultivo negativo	0/13 (0)	0/13 (0)	0/13 (0)	0/13 (0)	0/13 (0)	0/13 (0)	0/13 (0)
• Hemocultivo positivo	5/10 (50)	4/10 (40)	2/10 (20)	0/10 (0)	2/10 (20)	0/10 (0)	0/10 (0)
Sueros de control							
• Donantes de sangre sanos	2/45 (4,4)	3/45 (6,7)	2/45 (4,4)	2/45 (4,4)	2/45 (4,4)	2/45 (4,4)	1/45 (2,2)
• AR	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)
• Sífilis	3/26 (11,5)	3/26 (11,5)	1/26 (3,8)	0/26 (0)	0/26 (0)	0/26 (0)	0/26 (0)

Además, se analizaron las diferencias entre cada grupo mediante la comparación de los valores de densidad óptica promedio obtenidos para los grupos de muestra (Figura 9). Para cada uno de los siete péptidos, se detectó una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) al comparar la reactividad media de las muestras de pacientes con enfermedad de Lyme con la de los sueros de donantes sanos. Por el contrario, no hubo diferencias significativas para ninguno de los péptidos cuando se compararon los sueros de pacientes sanos con sueros de AR o de sífilis. Además, cada uno de los péptidos mostró una inmunorreactividad significativamente mayor con sueros de muestras de pacientes con enfermedad de Lyme que con artritis reumatoide o con sífilis.

10

15

Los péptidos OppA2 distinguen entre infección localizada y diseminada por *B. burgdorferi*. Se obtuvo un subconjunto de muestras de suero de pacientes en los que se había obtenido evidencia microbiológica de infección por Borellia. Es decir, la presencia de la bacteria se confirmó mediante PCR o cultivo de muestras de piel y/o sangre. Se obtuvieron plasma o sueros de pacientes con EL en el momento de la visita inicial (día 0) o en una segunda visita (día 30) después de completar el tratamiento con antibióticos. Los pacientes se clasificaron como infección localizada ( $n = 13$ , día 0 y día 30) o diseminada ( $n = 10$ , día 0;  $n = 16$ , día 30) según la detección de ADN o espiroquetas de *B. burgdorferi* mediante amplificación por PCR o mediante cultivo y examen microscópico, respectivamente, de biopsias de sangre o piel. Se evaluó la inmunorreactividad peptídica utilizando solo a estos pacientes para determinar si un epítipo particular podría asociarse cuantitativamente con la infección diseminada. En este conjunto de suero, ninguno de los pacientes con enfermedad de Lyme localizada reaccionó con ninguno de los péptidos OppA2, mientras que OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400) se detectaron en un 50 % (5/10) y un 40 % (4/10), respectivamente, en muestras de pacientes con infección diseminada por la enfermedad de Lyme (Tabla 8). Diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad óptica media entre muestras de infección localizada y diseminada por *B. burgdorferi*, tanto en el día 0 como en el día 30 ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,001$ , respectivamente) (Figura 3). Además, la reactividad media de OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400) con sueros diseminadores fue significativamente mayor que con muestras de control normales ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 10). Por el contrario, no se pudo detectar ninguna diferencia entre los grupos de pacientes para ninguno de los otros péptidos. Aunque pocos pacientes con infección por *Borrelia* observada directamente estaban disponibles para evaluación, estos datos sugieren que estos epítipos, como los que se encuentran en OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400), son útiles para diferenciar entre la infección localizada y la diseminada temprana. Se estudiarán grupos de pacientes

20

25

30

35

más grandes para confirmar que los marcadores de diagnóstico serológico pueden diferenciar entre infecciones diseminadas y localizadas por *B. burgdorferi*.

5 Los epítomos lineales OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400) se conservan entre diferentes especies de *Borrelia* patógena. La EL en América del Norte es causada por diversos genotipos de *B. burgdorferi*, mientras que *B. garinii* y *B. afzelii* son los principales agentes de la EL en Europa. Una prueba de diagnóstico altamente sensible para EL tendría la capacidad de detectar una respuesta de anticuerpos a todas estas especies de *Borrelia*. Para determinar si los epítomos lineales inmunodominantes de OppA2 se conservan entre *Borrelia* patógena, se realizó una comparación BLAST utilizando las secuencias de OppA2 (191-225) y OppA2 (381-400). Aunque las diferencias en AA individuales estaban presentes entre las diferentes especies de *Borellia*, ambos epítomos estaban presentes en cada una de las diferentes especies evaluadas (Figura 11).

15 Las proteínas de unión al péptido OppA de *B. burgdorferi* se reconocen en una etapa temprana del curso de la infección humana y, por lo tanto, pueden aumentar la capacidad de diagnosticar la enfermedad de Lyme en una etapa temprana. La oligopéptido permeasa A (OppA) es el componente de unión a péptidos del único sistema de transporte de péptidos conocido en *B. burgdorferi*. Está codificado por cinco homólogos que se expresan diferencialmente en diversas condiciones ambientales; en las garrapatas alimentadas y no alimentadas, el ARNm oppA-2 y oppA-4 estaba por debajo del límite de detección confiable. Sin embargo, OppA2 está regulada al alza en el tejido del ratón por día ... (Xing-Guo Wang, Bo Lin, J. Michael Kidder, Samuel Telford, y Linden T. Hu, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 2002, págs. 6198-6206 Vol. 184, No. 22). En un modelo de conejo de infección de la piel, OppA2 se expresó el día 7 de la infección (Crother et al, INFECTION AND IMMUNITY, Sept. 2004, págs. 5063-5072 Vol. 72, No. 9). Un estudio reciente que utilizó primates no humanos destacó la importancia de OppA2 no solo como un antígeno significativo en la infección temprana, sino también como un indicador potencial del aclaramiento de espiroquetas. Debido a su capacidad para inducir una respuesta inmune temprana durante la infección en mamíferos, y al hecho de que la secuencia de aminoácidos de OppA2 está altamente conservada entre las 3 genoespecies patógenas principales de *B. burgdorferi* (Kornacki y Oliver, 1998, Infection and Immunity) y como los anticuerpos contra *B. burdorferi* OppA2 no reaccionan de forma cruzada con las proteínas Opp de otras especies, como *E. coli* (Lin, 2001, Biochimica et Biophysica Acta), OppA2 presenta una diana atractivo para el diagnóstico serológico

30 De la descripción anterior, un experto en la materia, puede determinar fácilmente las características esenciales de esta invención. Las realizaciones específicas preferidas anteriores deben interpretarse como meramente ilustrativas, y no limitativas del alcance de la invención de ninguna manera.

### 35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOPEPTIDES CORP

<120> PÉPTIDOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA ENFERMEDAD DE LYME

40

<130> 64557-343983

<140> PCT/US2013/024370

<141> 01-02-2013

45

<150> 61/705.344

<151> 25-09-2012

50

<150> 61/680.583

<151> 07-08-2012

<150> 61/593.605

<151> 01-02-2012

55

<160> 295

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

60

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

<400> 1

65

ES 2 699 812 T3

Phe Glu Asp Ala Met Lys Leu Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Tyr  
1 5 10 15

5  
<210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 2

Leu Ile Arg Phe Thr Thr Ile Ser Leu Gly Trp Asp Ser Asn Asn  
1 5 10 15

10  
<210> 3  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 3

Lys Phe Tyr Ser Ser Leu Arg Leu Glu Val Arg Lys Ile Glu Gln  
1 5 10 15

20  
<210> 4  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
25  
<400> 4

Ile Pro Ser Lys Glu Asn Ala Lys Leu Ile Val Tyr Phe Tyr Asp Asn  
1 5 10 15

Val Tyr Ala Gly  
20

30  
<210> 5  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
35  
<400> 5

Ile Pro Ser Lys Glu Asn Ala Lys Leu Ile Val Tyr Phe Tyr Asp  
1 5 10 15

40  
<210> 6  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
45  
<400> 6

Asn Ala Lys Leu Ile Val Tyr Phe Tyr Asp Asn Val Tyr Ala Gly  
1 5 10 15

<210> 7

ES 2 699 812 T3

<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

5 <400> 7

Lys Asn Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys Lys Cys Ser  
1 5 10 15  
Glu Thr Phe Thr  
20

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

10

<400> 8

15

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15  
Asn Thr Ser Ala  
20

<210> 9  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*

20

<400> 9

Ala Lys Lys Ala Ile Leu Ile Thr Asp Ala Ala Lys Asp Lys Gly  
1 5 10 15

25

<210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

30

<400> 10

Ile Phe Phe Leu Thr Phe Leu Cys Cys Asn Asn Lys Glu Arg Lys  
1 5 10 15

35

<210> 11  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

40

<400> 11

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Phe Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

5 <210> 12  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 12

10 Ser Asp Tyr Tyr Ser Ser Ala Val Asn Ala Ile Tyr Phe Tyr Ala  
1 5 10 15

15 <210> 13  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 13

20 Ile Tyr Phe Tyr Ala Phe Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp Asn  
1 5 10 15

25 <210> 14  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 14

Ser Asp Tyr Tyr Ser Ser Ala Val Asn Ala Ile Tyr Phe Tyr Ala Phe  
1 5 10 15

Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp Asn  
20 25

30 <210> 15  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

35 <400> 15

Asp Met Phe Ser Leu Glu Gln Arg Leu Glu Ile Lys Leu Glu Ala  
1 5 10 15

40 <210> 16  
<211> 15  
<212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia* sp.

<400> 16

Leu Val Ala Cys Ser Ile Gly Leu Val Glu Arg Thr Asn Ala Ala  
1 5 10 15

5

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Borrelia* sp.

<400> 17

Lys Glu Glu Phe Lys Ile Glu Leu Val Leu Lys Glu Ser Ser Ser  
1 5 10 15

15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

20 <213> *Borrelia* sp.

<400> 18

Ile Val Ser Tyr Phe Val Ser Lys Met Val Val Ser Gln Ser Gly  
1 5 10 15

25

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

30 <213> *Borrelia* sp.

<400> 19

Asn Thr Leu Asp Val Pro Pro Lys Thr Phe Val Val Lys Leu Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Tyr Ala Glu  
20

35

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

<400> 20

40

Val Ser Arg Lys Gly Gly Leu Leu Pro Asp Ile Ile Ile Lys Ile  
1 5 10 15

45

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

<400> 21



ES 2 699 812 T3

Leu Lys Asp Ile Ile Arg Glu Tyr Phe Ser Gln Arg Thr Gly Gln  
1 5 10 15

5 <210> 22  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 22

10 Gly Phe Ile Ser Cys Asp Leu Phe Ile Arg Tyr Glu Met Lys Glu  
1 5 10 15

15 <210> 23  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 23

Lys Lys Pro Met Asn Lys Lys Gly Lys Gly Lys Ile Ala Arg Lys Lys  
1 5 10 15

20 Gly Lys Ser Lys Val Ser Arg Lys Glu Pro Tyr Ile His Ser  
20 25 30

25 <210> 24  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 24

Asp Thr Gly Ser Glu Arg Ser Ile Arg Tyr Arg Arg Arg Val Tyr  
1 5 10 15

30 <210> 25  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

35 <400> 25

Lys Ile Glu Phe Ser Lys Phe Thr Val Lys Ile Lys Asn Lys Asp  
1 5 10 15

40 <210> 26  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

45 <400> 26

ES 2 699 812 T3

Asn Ser Arg Ser Arg Tyr Asn Asn Phe Tyr Lys Lys Glu Ala Asp Phe  
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala  
20

5 <210> 27  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 27

Ile Asn Lys Leu Glu Ala Lys Lys Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Ser Glu  
1 5 10 15

10 Tyr Glu Glu Gln  
20

15 <210> 28  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 28

Ile Asp Asp Ser Ile Lys Lys Ile Asp Glu Glu Leu Lys Asn Thr  
1 5 10 15

20 <210> 29  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*

<400> 29

Tyr Gly Glu Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Ile Val Val Ser Gly Ala  
1 5 10 15

Tyr Lys Leu Lys Glu Arg Leu Ile Asn Asp Lys Ile Val Ile Glu Lys  
20 25 30

Asn Glu Lys  
35

30 <210> 30  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> *Borrelia afzelli*

35 <400> 30

ES 2 699 812 T3

Tyr Lys Gly Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Lys Arg Leu Pro Asn Glu Lys Ile Ile Phe Glu Lys  
 20 25 30

Asn

5 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia garinii*  
 <400> 31

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly  
 1 5 10 15

10 Asp Ser Ala Ser  
 20

15 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 32

20 Val Gly Arg Lys Gly Gly Leu Leu Pro Asp Ile Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

25 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia garinii*  
 <400> 33

Phe Glu Asp Ala Met Lys Ile Gly Ile Ala Leu Tyr Leu Asp Tyr  
 1 5 10 15

30 <210> 34  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia afzelli*  
 35 <400> 34

Phe Glu Asp Ala Met Lys Leu Gly Ile Ala Leu Tyr Leu Asp Tyr  
 1 5 10 15

40 <210> 35  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (2)..(2)  
 <223> Lys o Gly  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (3)..(3)  
 <223> Gln, Glu o Gly  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (7)..(7)  
 <223> Ser o Asn  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (11)..(11)  
 <223> Met o Ile  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (13)..(13)  
 <223> Thr o val  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 30 <222> (16)..(16)  
 <223> Pro o Ala  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (17)..(17)  
 <223> Phe o Tyr  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (21)..(21)  
 <223> Glu o Lys  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (23)..(23)  
 <223> Ile o Leu  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (24)..(24)  
 <223> Pro o Ile  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 55 <222> (26)..(26)  
 <223> Glu o Asp  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (28)..(28)  
 <223> Tyr o Ile  
  
 <220>  
 <221> MOD\_REB  
 65 <222> (29)..(29)  
 <223> Val o Ile

ES 2 699 812 T3

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Phe o lle  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Asn, Glu o ausente  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (35)..(35)  
 <223> Lys o ausente  
 15  
 <400> 35  
 Tyr Xaa Xaa Asn Trp Thr Xaa Pro Glu Asn Xaa Val Xaa Ser Gly Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Lys Leu Lys Xaa Arg Xaa Xaa Asn Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Glu Lys  
 20 25 30  
 Asn Xaa Xaa  
 35  
 20 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 36  
 Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
 1 5 10  
 30 <210> 37  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 35 <400> 37  
 Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser  
 1 5 10  
 40 <210> 38  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: marcador sintético de 6xHis  
 <400> 38  
 50

ES 2 699 812 T3

His His His His His His  
1 5

5 <210> 39  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 39

10 Val Gln Glu Gly Val Gln Gln Glu Gly Ala Gln Gln Pro  
1 5 10

15 <210> 40  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 40

20 Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
1 5 10

25 <210> 41  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 41

30 Asn Lys Thr Phe Asn Asn Leu Leu Lys Leu Thr Ile Leu Val Asn  
1 5 10 15

35 <210> 42  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 42

Asn Lys Thr Phe Asn Asn Leu Leu Lys Leu Thr Ile Leu Val Asn Leu  
1 5 10 15

Leu Ile Ser Cys Gly Leu Thr Gly Ala  
20 25

40 <210> 43  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 43

45 Thr Ile Leu Val Asn Leu Leu Ile Ser Cys Gly Leu Thr Gly Ala  
1 5 10 15

ES 2 699 812 T3

<210> 44  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

5  
<400> 44

Pro Phe Ile Leu Glu Ala Lys Val Arg Ala Thr Thr Val Ala Glu  
1 5 10 15

10  
<210> 45  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*

15  
<400> 45

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
20

20  
<210> 46  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

25  
<400> 46

Ile Tyr Phe Tyr Ala Phe Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp Asn Val  
1 5 10 15

Lys Ile Arg Lys Ala Leu Thr Leu Ala  
20 25

30  
<210> 47  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 47

Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gly Phe Pro Ile Leu Lys  
1 5 10 15

Leu Lys Tyr Asn  
20

35  
<210> 48  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*

40  
<400> 48

ES 2 699 812 T3

Cys Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Met Val Leu Arg Gly  
1 5 10 15

Met Ala Lys Asp Gly Gln Phe Ala Leu Lys  
20 25

5 <210> 49  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> val o Gly

<400> 49

Met Lys Lys Asn Asp Gln Ile Xaa Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Val  
1 5 10 15

Ala

20 <210> 50  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*

25 <400> 50

Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Met  
1 5 10 15

Ala

30 <210> 51  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

35 <400> 51

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

40 <210> 52  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 52



ES 2 699 812 T3

Ile Tyr Phe Tyr Ser Phe Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp Asn Val  
 1 5 10 15

Lys Ile Arg Lys Ala Leu Thr Leu Ala  
 20 25

5 <210> 53  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*  
 <400> 53

10 Ala Pro Ile Tyr Ile Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Phe Arg Asn Asp  
 1 5 10 15

15 <210> 54  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Glu o Ala

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Phe o Arg

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Lys o Glu

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Ile o Phe

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Ser o Thr

45 <400> 54

Lys Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Glu Leu Val Leu Lys Glu Ser Ser Xaa  
 1 5 10 15

50 <210> 55  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

55 <400> 55

ES 2 699 812 T3

Lys Glu Glu Phe Lys Ile Glu Leu Val Leu Lys Glu Ser Ser Thr  
1 5 10 15

5  
<210> 56  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 56

Lys Ala Glu Arg Lys Ile Glu Leu Val Leu Lys Glu  
1 5 10

10  
  
15  
<210> 57  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 57

Lys Glu Glu Phe Lys Phe Glu Leu Val Leu Lys Glu Ser Ser Thr  
1 5 10 15

20  
  
25  
<210> 58  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 58

Lys Glu Glu Phe Glu Ile Glu Leu Val Leu Lys Glu Ser Ser Thr  
1 5 10 15

30  
  
35  
<210> 59  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 59

Lys Ala Glu Arg Lys Ile Glu Leu Val Asn Leu Leu Lys Glu  
1 5 10

40  
  
45  
<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 60

Glu Ile Phe Lys Ile Glu Lys Val Leu  
1 5

50  
<210> 61  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 699 812 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

- 5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Tyr, His o Phe
- 10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Gly o Lys
- 15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Gln, Gly, Glu o Asn
- 20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Asn, Lys, Ser, Arg o Glu
- 25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Ser, Asn o Asp
- 30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Met o Ile
- 35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> Thr o Val
- 40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Pro o Ala
- 45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Phe o Tyr
- 50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (21)..(21)  
<223> Glu, Lys, Ser o Arg
- 55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (23)..(23)  
<223> Ile, Ser, Leu o Val
- 60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (24)..(24)  
<223> Pro, Leu o Ile
- 65 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (26)..(26)

ES 2 699 812 T3

<223> Glu o Asp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (28)..(28)  
 <223> Tyr, Val o Ile

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (29)..(29)  
 <223> val o Ile

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (30)..(30)  
 <223> Phe, val, Leu o Ile

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (34)..(34)  
 <223> Asn, Asp o Glu

<400> 61

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Thr Xaa Pro Glu Asn Xaa Val Xaa Ser Gly Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Lys Leu Lys Xaa Arg Xaa Xaa Asn Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Glu Lys  
 20 25 30

Asn Xaa Lys  
 25 35

<210> 62  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 62

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Phe Glu Lys  
 20 25 30

Asn Asn Lys  
 35

<210> 63  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 63

40

45

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Glu Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Ile Val Val Ser Gly Ala  
1 5 10 15

Tyr Lys Leu Lys Glu Arg Leu Ile Asn Asp Lys Ile Val Ile Glu Asn  
20 25 30

Asn Glu Lys  
35

5 <210> 64  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 64

Tyr Gly Gln Glu Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Val Val Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asp Lys  
35

10 <210> 65  
<211> 33  
<212> PRT  
15 <213> *Borrelia* sp.

<400> 65

Tyr Lys Gly Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Lys Arg Leu Pro Asn Glu Lys Ile Ile Phe Glu Lys  
20 25 30

Asn

20 <210> 66  
<211> 35  
<212> PRT  
25 <213> *Borrelia* sp.

<400> 66

ES 2 699 812 T3

His Gly Gln Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Ile Ile Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

5  
<210> 67  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 67

Tyr Gly Gln Ser Trp Thr Asn Pro Glu Asn Ile Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys  
20 25 30

Asn Asp Lys  
35

10  
15  
<210> 68  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 68

Tyr Lys Gly Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Lys Arg Leu Pro Asn Glu Lys Ile Ile Phe Glu Lys  
20 25 30

Asn Glu Arg  
35

20  
25  
<210> 69  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 69

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Gln Arg Trp Thr Asp Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Val Val Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

5  
<210> 70  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 70

His Gly Gln Glu Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Ile Ile Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

10  
15  
<210> 71  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 71

Phe Gly Asn Lys Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Arg Arg Ile Leu Asn Glu Glu Ile Ser Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Lys Lys  
35

20  
25  
<210> 72  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 72

ES 2 699 812 T3

Phe Gly Asn Lys Trp Thr Ser Ser Glu Asn Met Val Thr ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Arg Arg Ile Leu Asn Glu Glu Ile Ser Leu Glu Lys  
 20 25 30

Asn Glu Lys  
 35

- 5 <210> 73
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
- 15 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (14)..(14)
- <223> Lys o Gly
- 20 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (15)..(15)
- <223> Asp o Gly
- 25 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (17)..(17)
- <223> Asn o Asp
- 30 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (18)..(18)
- <223> Thr, Ala o ser
- 35 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (19)..(19)
- <223> Ser, Ala o Thr
- 40 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (20)..(20)
- <223> Ala o Ser
- <400> 73

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Xaa Xaa Gly  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20

- 45 <210> 74
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>



<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Phe, Leu o Tyr

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cys o Ser

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Asn o Thr

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Asp o Gly

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Gly, val o Ala

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Asn, Asp, Thr o Ser

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Thr, Ala o Ser

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Ser, Ala o Thr

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Ala o Thr

50 <400> 74

Met Thr Leu Xaa Leu Phe Ile Ser Xaa Asn Xaa Ser Gly Lys Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20

55 <210> 75  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 75

ES 2 699 812 T3

Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser  
1 5 10 15

Ala

5 <210> 76  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 76

Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Gly Asp Thr  
1 5 10 15

10 <210> 77  
<211> 20  
<212> PRT  
15 <213> *Borrelia* sp.  
<400> 77

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Ser Ala Ser  
20

20 <210> 78  
<211> 15  
<212> PRT  
25 <213> *Borrelia burgdorferi*  
<400> 78

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

30 <210> 79  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
35 <400> 79

Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn  
1 5 10

40 <210> 80  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*  
45 <400> 80

ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp  
1 5 10 15

5 <210> 81  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 81

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Gly Gly  
1 5 10 15

10 Asp Ser Ala

15 <210> 82  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 82

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

20 Asn Ser Ala

25 <210> 83  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 83

Met Thr Leu Leu Leu Phe Ile Ser Ser Asn Thr Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ala  
20

30 <210> 84  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
35 <400> 84

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Ala Ser Ala  
20

40 <210> 85  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Ser o Ala

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Ile o val

15 <400> 85

Lys Phe Tyr Xaa Ser Leu Arg Leu Glu Val Arg Lys Xaa Glu Gln  
 1 5 10 15

20 <210> 86  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Lys o Ile

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Phe, Ile o Leu

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Tyr, Phe o Asp

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Ser o Ala

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Ser o Asn

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Leu o Arg

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Arg, Phe, Asn o Gln

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)

ES 2 699 812 T3

<223> Leu, Asn o Tyr  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (9)..(9)  
 <223> Glu o Asp  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (10)..(10)  
 <223> Val, Ala, Ile o Glu  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (11)..(11)  
 <223> Arg, Val, Ile, Lys o Asn  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (13)..(13)  
 <223> Ile, Ser o Val  
 <400> 86  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Glu Gln  
 1 5 10 15  
 25  
 <210> 87  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 87  
 Lys Phe Tyr Ala Ser Leu Arg Leu Glu Val Arg Lys Ile Glu Gln  
 1 5 10 15  
 35  
 <210> 88  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 40 <400> 88  
 Lys Phe Tyr Ala Ser Leu Arg Leu Glu Val Arg Lys Val Glu Gln  
 1 5 10 15  
 45  
 <210> 89  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 50 <400> 89  
 Lys Phe Tyr Ser Asn Arg Phe Leu Glu Ile Val Lys Ser Glu  
 1 5 10  
 55  
 <210> 90  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

ES 2 699 812 T3

<400> 90

Ile Phe Ser Asn Leu Gln Asn Glu Ala Lys Lys Ile Glu Gln  
 1 5 10

5

<210> 91  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

10

<400> 91

Lys Phe Tyr Ser Ser Leu Arg Leu Glu Val Arg Lys Val Glu Gln  
 1 5 10 15

15

<210> 92  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

20

<400> 92

Phe Tyr Ser Ser Leu Asn Tyr Asp Glu Asn Lys Ile  
 1 5 10

25

<210> 93  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

30

<400> 93

Lys Phe Tyr Ile Ser Val Lys Leu Glu Tyr Lys  
 1 5 10

35

<210> 94  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Gly o ser

50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Asp o Asn

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Ile o Thr

60

<220>  
 <221> MOD\_RES

ES 2 699 812 T3

<222> (11)..(11)  
 <223> Tyr o Asp

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Met o Ile

10 <400> 94

Xaa Phe Ile Ser Cys Xaa Leu Phe Xaa Arg Xaa Glu Xaa Lys Glu  
 1 5 10 15

15 <210> 95  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 95

Gly Phe Ile Ser Cys Asp Leu Phe Ile Arg Asp Glu Ile Lys Glu  
 1 5 10 15

20

25 <210> 96  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 96

Ser Phe Ile Ser Cys Asn Leu Phe Thr Arg Asp Glu Ile Lys Glu  
 1 5 10 15

30

35 <210> 97  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Pro o Ser

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Met, Ile o Leu

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Gly o Asp

55 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)  
 <223> Gly o Asp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Ile o val  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Lys o Asn  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Gly o val  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Lys o Glu  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Ser o Gly  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Lys o Asn  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Val o Ala  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (22)..(22)  
 <223> Ser o Val  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Arg, Gly o Lys  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Glu o Asp  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Tyr, Ser o Phe  
 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Ile o Asn  
 60  
 <400> 97



ES 2 699 812 T3

Lys Lys Xaa Xaa Asn Lys Lys Xaa Lys Xaa Lys Xaa Ala Arg Lys Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Pro Xaa Xaa His Ser  
 20 25 30

- 5 <210> 98
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
- 15 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (2)..(2)
- <223> Lys o Asn
- 20 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (3)..(3)
- <223> Pro, Ser o Asp
- 25 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> Met, Ile o Leu
- 30 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (5)..(5)
- <223> Asn, Ser, Asp o Thr
- 35 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (6)..(6)
- <223> Lys o Asn
- 40 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (7)..(7)
- <223> Lys, Gln o Glu
- 45 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (8)..(8)
- <223> Gly, Ser o Asp
- 50 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (10)..(10)
- <223> Gly, Ser o Asp
- 55 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (11)..(11)
- <223> Lys, Glu o Ser
- 60 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (12)..(12)
- <223> Ile o val

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Ala, Ser o Val  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Arg o Lys  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Lys, Gln, Asn o Leu  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Gly, Arg o Val  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Lys, Asp, Glu o Asn  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Ser, Asn, Gly, Ala, Asp o Trp  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Lys, Asn, Ile, Asp o Arg  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Val, Ala o Glu  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (22)..(22)  
 <223> Ser, Val, Thr o Phe  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Arg, Gly o Lys  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Lys o Gln  
 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Glu o Asp  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Tyr, Ser o Phe  
 65  
 <220>

ES 2 699 812 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Ile, Asn, Thr o Val

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> His, Asn o Thr

10 <400> 98

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Ser  
 20 25 30

15 <210> 99  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

20 <400> 99

Lys Asn Ser Met Asn Lys Lys Gly Lys Gly Lys Ile Ala Arg Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Ser Lys Val Ser Arg Lys Glu Pro Ser Ile His Ser  
 20 25 30

25 <210> 100  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 100

Lys Lys Ser Leu Asn Lys Lys Gly Lys Asp Lys Val Ala Arg Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Val Glu Gly Asn Ala Val Lys Lys Asp Pro Phe Asn His  
 20 25

35 <210> 101  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 101

Lys Lys Pro Met Asn Lys Lys Gly Lys Gly Lys Ile Ala Arg Lys Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Ser Lys Val Ser Gly Lys Glu Pro Phe Ile His Ser  
 20 25 30

40 <210> 102

ES 2 699 812 T3

<211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

5 <400> 102

Lys Lys Pro Met Asn Lys Lys Gly Lys Gly Lys Ile Ala Arg Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Val Lys Ser Lys Val Ser Arg Lys Glu Pro Tyr Ile His Ser  
 20 25 30

<210> 103  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

10

<400> 103

15

Lys Lys Pro Ile Asn Lys Gln Gly Lys Ser Lys Val Ser Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Ser Asn Val Ser Arg Lys Glu Pro Ser Ile His Ser  
 20 25 30

<210> 104  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Asn o Ser

30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Ile o Val

35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Ser o Ala

40

<400> 104

Thr Ile Leu Val Xaa Leu Leu Xaa Xaa Cys Gly Leu Thr Gly Ala  
 1 5 10 15

<210> 105  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50

ES 2 699 812 T3

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ile, Leu o Val

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Val, Ile o Leu

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Asn o Ser

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(7)  
 <223> Leu o Phe

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Ile o val

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Ser o Ala

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Gly o Ser

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Thr o Lys

<400> 105

45 Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Leu Xaa Gly Ala  
 1 5 10 15

<210> 106  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 50 <400> 106

Thr Ile Leu Val Ser Leu Leu Ile Ser Cys Gly Leu Thr Gly Ala  
 1 5 10 15

55 <210> 107  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 60 <400> 107

ES 2 699 812 T3

Thr Ile Leu Val Asn Leu Leu Val Ala Cys Gly Leu Thr Gly Ala  
 1 5 10 15

5 <210> 108  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 108

Thr Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Ala Cys Gly Leu Thr Gly Ala  
 1 5 10 15

10 <210> 109  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 15 <400> 109

Val Ser Leu Leu Val Ala Cys Gly Leu Thr Gly  
 1 5 10

20 <210> 110  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 25 <400> 110

Ile Leu Val Asn Leu Phe Leu Ser Cys Gly

1 5 10

30 <210> 111  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 35 <400> 111

Thr Ile Leu Val Asn Leu Phe Leu Val Ser  
 1 5 10

40 <210> 112  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 45 <400> 112

Thr Leu Ile Val Gly Leu Leu Val Ala Cys Ser Leu Thr Gly  
 1 5 10

50 <210> 113  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia* sp.

<400> 113

Ile Leu Val Phe Phe Leu Ile Ser Cys  
1 5

5

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

10

<213> *Borrelia* sp.

<400> 114

Thr Val Leu Ile Leu Ile Ser Cys Ser Leu  
1 5 10

15

<210> 115

<211> 14

<212> PRT

20

<213> *Borrelia* sp.

<400> 115

Thr Leu Leu Val Ser Leu Phe Ile Ala Cys Ser Leu Thr Gly  
1 5 10

25

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Glu o Lys

35

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Lys o Glu

40

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Lys o Asn

45

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)..(13)

<223> Asn o Tyr

50

<400> 116

Lys Ile Xaa Phe Ser Xaa Phe Thr Val Xaa Ile Lys Xaa Lys Asp  
1 5 10 15

55

<210> 117

<211> 15

<212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia* sp.

<400> 117

Lys Ile Lys Phe Ser Lys Phe Thr Val Lys Ile Lys Asn Lys Asp  
 1 5 10 15

5

<210> 118

<211> 14

<212> PRT

10 <213> *Borrelia* sp.

<400> 118

Lys Ile Glu Phe Ser Glu Phe Thr Val Lys Ile Lys Tyr Lys  
 1 5 10

15

<210> 119

<211> 13

<212> PRT

20 <213> *Borrelia* sp.

<400> 119

Ile Lys Phe Ser Glu Phe Thr Val Asn Ile Lys Asn Lys  
 1 5 10

25

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

30

<400> 120

Ile Lys Phe Ser Glu Phe Thr Val Lys Ile Lys Tyr Lys  
 1 5 10

35

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

45 <223> Val o Ile

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

50 <223> Ser o Gly

<400> 121

Xaa Xaa Arg Lys Gly Gly Leu Leu Pro Asp Ile Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

55



<210> 122  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Val o Ile  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ser, Gly o Phe  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Arg o Ser  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Lys, Asp o Asn  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Gly, Ala o Asp  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Gly, Asn o Glu  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Leu, Ile o Phe  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Leu o Phe  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Pro, Ser o Ala  
 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Asp o Glu  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Ile o Leu  
 65  
 <400> 122

ES 2 699 812 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

5 <210> 123  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 123

Ile Gly Arg Lys Gly Gly Leu Leu Pro Asp Ile Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

10 <210> 124  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 15 <400> 124

Val Gly Arg Lys Gly Gly Leu Leu Pro Asp Ile Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

20 <210> 125  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 25 <400> 125

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

30 <210> 126  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 35 <400> 126

Val Phe Ser Asn Asp Asn Phe Leu Ser Glu Leu Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

40 <210> 127  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 45 <400> 127

Val Phe Ser Asn Asp Asn Phe Leu Ser Glu Leu Ile Ile Lys Ile  
 1 5 10 15

50 <210> 128  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

ES 2 699 812 T3

<400> 128

Lys Ala Gly Ile Phe Pro Asp Leu Ile Ile  
 1 5 10

5

<210> 129  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leu o Gln

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Asp o Glu

25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Val o Thr

30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(7)  
 <223> Pro o Ser

35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Thr o Ser

40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Phe o Ile

45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Val o Ile

50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Lys o Arg

55

<400> 129

Asn Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Val Xaa Xaa Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Tyr Ala Glu  
 20

ES 2 699 812 T3

<210> 130  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leu o Gln  
  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Asp o Glu  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Val o Thr  
  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(7)  
 <223> Pro o Ser  
  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Lys o Arg  
  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Thr o Asp  
  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> val o lle  
  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Lys o Arg  
  
 50 <400> 130

Asn Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Val Xaa Xaa Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Tyr Ala Glu  
 20

55 <210> 131  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
  
 <400> 131

Thr Gln Asp Thr Pro Pro Lys Thr Phe Val Ile Lys Leu Ala Leu Gly  
 1 5 10 15

Tyr Ala Glu

5 <210> 132  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

10 <400> 132

Thr Gln Asp Thr Pro Pro Lys Thr Phe Val Ile Lys Leu Ala Leu Gly  
 1 5 10 15

Tyr Ala

15 <210> 133  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 133

Thr Leu Glu Val Ser Ser Lys Ser Ile Val Val Arg Leu  
 1 5 10

20 <210> 134  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Tyr o Gly

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Phe, Leu o Tyr

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Tyr o Ile

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Ala o Ser

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Phe o Leu

ES 2 699 812 T3

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 5 <223> Thr o Met

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 10 <223> His, Thr, Lys o Asn

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 15 <223> Ile o Val

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 20 <223> Asn o Asp

<400> 134

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Lys Pro Leu Asp Xaa  
 1 5 10

25 <210> 135  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Tyr o Gly

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Phe, Leu o Tyr

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Tyr, Phe, Ile o Leu

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Ala, Arg, Lys o Ser

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Phe o Leu

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Thr o Met

<220>

ES 2 699 812 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> His, Thr, Lys o Asn

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Ile, Val o Ala

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Asp o Asn

15 <400> 135

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Lys Pro Leu Xaa Asn  
 1 5 10

20 <210> 136  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

25 <400> 136

Ile Tyr Phe Tyr Ala Phe Asn Thr Thr Val Lys Pro Leu Asp Asn  
 1 5 10 15

30 <210> 137  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 137

Ile Tyr Phe Tyr Ala Phe Asn Thr Lys Ala Lys Pro Leu Asp Asn  
 1 5 10 15

35 <210> 138  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 138

Ile Tyr Leu Tyr Ser Phe Asn Thr Lys Ile Lys Pro Leu Asp Asp  
 1 5 10 15

45 <210> 139  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)

<223> Lys o Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (2)..(2)  
 <223> Lys o Glu  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (3)..(3)  
 <223> Ile, Val o Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (4)..(4)  
 <223> Cys, Ala o Tyr  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (5)..(5)  
 <223> Glu, Ala, Ser, Asn o Thr  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (7)..(7)  
 <223> Ile o Leu  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 30 <222> (9)..(9)  
 <223> Asn, Ser o Glu  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (11)..(11)  
 <223> Trp o Phe  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (14)..(14)  
 <223> Asn, Ile o Val  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (18)..(18)  
 <223> Asp o Asn  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (19)..(19)  
 <223> Val, Ile o Leu  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 55 <222> (20)..(20)  
 <223> Glu o Gln  
 <400> 139  
 60



ES 2 699 812 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gln Xaa Gln Xaa Lys Lys Xaa Leu Asn  
 1 5 10 15

Ile Xaa Xaa Xaa  
 20

5  
 <210> 140  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Lys o Arg

20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Lys o Glu

25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ile, val o Gly

30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Cys, Ala o Tyr

35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Glu, Ala, ser, Asn o Thr

40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Ile o Leu

45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Gln o Glu

50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Asn, Ser o Glu

55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Trp, Glu, Phe o Lys

60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Lys, Asn o Ile

ES 2 699 812 T3

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Lys o Asn  
 5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Asn, Ile o Val  
 10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Asp o Asn  
 15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Val, Ile o Leu  
 20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Glu, Ala o Gln  
 25

<400> 140  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ile Xaa Xaa Xaa  
 20

30 <210> 141  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

35 <400> 141  
 Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ile Asn Val Glu  
 20

40 <210> 142  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

45 <400> 142  
 Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Ile Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ile Asp Val Glu  
 20

ES 2 699 812 T3

<210> 143  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

5 <400> 143

Arg Lys Ile Ala Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asn Val Gln  
20

10 <210> 144  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

15 <400> 144

Lys Lys Ile Ala Ala Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Ile Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asn Leu

20 <210> 145  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

25 <400> 145

Lys Glu Val Ala Ser Phe Ile Gln Ser Gln Trp Lys Lys Val Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
20

30 <210> 146  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 146

Lys Lys Val Ala Thr Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Ile Leu Asn  
1 5 10 15

35 Ile Asn Ile

40 <210> 147  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 147

ES 2 699 812 T3

Lys Gly Ala Glu Phe Leu Gln Glu Gln Phe Lys Lys Ile Leu Asn Ile  
1 5 10 15

Lys Ile Glu

<210> 148  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 148

Lys Lys Ile Ala Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
20

<210> 149  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 149

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Ile Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
20

<210> 150  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 150

Lys Glu Ile Ala Asn Phe Ile Gln Ser Gln Trp Lys Lys Val Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asp Ile Glu  
20

<210> 151  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 151

ES 2 699 812 T3

Lys Ile Thr Ala Glu Phe Leu Gln Glu Gln Phe Lys Lys Val Leu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asn Val Ala  
 20

5 <210> 152  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 152

Ala Glu Phe Leu Gln Glu Gln Phe Lys Lys Ile Leu Asn Ile Asn Leu  
 1 5 10 15

10 Glu  
 <210> 153  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Asn, Glu o Asp

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leu, Ser o Ile

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Glu o Asp

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Ala, Ser, Glu o Ile

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Lys o Glu

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Leu o Ile

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Lys o Glu

55 <220>

ES 2 699 812 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (18)..(18)  
 <223> Glu o Asp

5 <400> 153

Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Thr Ser Xaa Xaa Thr Tyr Ser Glu Tyr  
 1 5 10 15

Glu Xaa Gln

10 <210> 154  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Asn, Glu o Asp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leu, Ser o Ile

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Glu o Asp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Ala, Ser, Glu o Ile

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Lys o Glu

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Lys, Asn o Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido o Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Cualquier aminoácido o Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Leu, Phe o Ile

ES 2 699 812 T3

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Lys, Glu, Gly o Thr

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Ser, Asn o Gly

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Glu, Asp o Ser

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Glu o Asp

<400> 154

Ile Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Tyr Glu xaa Gln  
 20

25 <210> 155  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

30 <400> 155

Ile Glu Lys Leu Glu Ala Lys Lys Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Ser Glu  
 1 5 10 15

Tyr Glu Glu

35 <210> 156  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

40 <400> 156

Ile Glu Lys Leu Asp Ser Lys Lys Thr Ser Leu Lys Thr Tyr Ser Glu  
 1 5 10 15

Tyr Glu Glu

45 <210> 157  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 157

ES 2 699 812 T3

Ile Glu Lys Leu Asp Ser Lys Lys Thr Ser Ile Glu Thr Tyr Ser Glu  
1 5 10 15

Tyr Glu Glu

5 <210> 158  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

10 <400> 158

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

Tyr Glu

15 <210> 159  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 159

Ile Glu Lys Ser Asp Pro Lys Ser Val Ser Leu Lys Thr Tyr Ser Asp  
1 5 10 15

Tyr

20 <210> 160  
<211> 18  
<212> PRT  
25 <213> *Borrelia* sp.

<400> 160

Lys Ile Glu Ile Glu Lys Thr Glu Leu Lys Thr Glu Tyr Asn Glu Ile  
1 5 10 15

Glu Asp

30 <210> 161  
<211> 15  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Asp, Glu, Arg, Asn o Thr



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Asp, Glu o Asn  
 5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Cualquier aminoácido o Ser  
 10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Ile, Leu, Phe o Ala  
 15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Asp, Glu o Asn  
 20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Glu o Ser  
 25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu, Phe o Ile  
 30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Lys o Leu  
 35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Asn, Lys, Ser, Asp o Glu  
 40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Thr, Ser o Ala  
 45

<400> 161  
  
 Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Lys Ile Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

50 <210> 162  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Asp, Glu, Gly, Asn o Thr  
  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Asp, Glu o Asn

5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Qualquer aminoácido o Ser

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Ile, Leu, Phe, Val o Ala

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Lys o Glu

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Lys o Asn

25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Ile o Leu.

30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Asp, Glu o Asn

35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Glu o Asp

40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Glu, Ala o Ser

45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu, Phe, Ile o Ala

50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Lys o Asn

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Asn, Lys, Ser, Asp, Glu o Gly

60

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Thr, Ser, Val o Ala

65

<400> 162

ES 2 699 812 T3

Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

5 <210> 163  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 163

Ile Asp Asp Ser Ile Lys Lys Ile Glu Glu Glu Leu Lys Asn Thr  
 1 5 10 15

10 <210> 164  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 15 <400> 164

Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Ile Glu Glu Glu Leu Lys  
 1 5 10

20 <210> 165  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 25 <400> 165

Ile Asp Glu Asn Phe Lys Lys Ile Glu Glu Glu Phe Lys Asp Thr  
 1 5 10 15

30 <210> 166  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 35 <400> 166

Ile Thr Asn Ser Leu Lys Lys Ile Glu Glu Glu Leu Lys Glu Ala  
 1 5 10 15

40 <210> 167  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 45 <400> 167

Ile Asp Glu Asn Phe Lys Lys Ile Glu Glu Glu Phe Lys Asp  
 1 5 10

50 <210> 168  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

ES 2 699 812 T3

<400> 168

Ile Glu Asp Leu Ile Lys Lys Ile Asn Glu Glu Ile Leu Asn  
1 5 10

5 <210> 169  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

10 <400> 169

Ile Asn Asp Ser Leu Lys Lys Ile Glu Glu Glu Leu  
1 5 10

15 <210> 170  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

20 <400> 170

Asp Glu Asn Phe Lys Lys Ile Glu Glu Glu Phe Lys Asp Thr  
1 5 10

25 <210> 171  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 171

Asp Glu Asn Phe Lys Lys Ile Glu Glu Glu Phe Lys Asp  
1 5 10

30 <210> 172  
<211> 14  
<212> PRT  
35 <213> *Borrelia* sp.

<400> 172

Ile Asp Asp Ala Leu Glu Asn Ile Asn Glu Glu Leu Lys Lys  
1 5 10

40 <210> 173  
<211> 13  
<212> PRT  
45 <213> *Borrelia* sp.

<400> 173

Ile Arg Glu Ser Ala Lys Lys Ile Asp Glu Ser Leu Lys  
1 5 10

50 <210> 174  
<211> 13  
<212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia* sp.

<400> 174

Glu Asp Leu Ile Lys Lys Ile Asn Glu Glu Ile Leu Asn  
 1 5 10

5

<210> 175

<211> 12

<212> PRT

10 <213> *Borrelia* sp.

<400> 175

Asn Val Ile Lys Arg Ile Glu Glu Glu Ala Lys Asn  
 1 5 10

15

<210> 176

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

25 <221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Gly o Ser

<220>

30 <221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Ser o Thr

<220>

35 <221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Arg o Lys

<220>

40 <221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ile, Lys o Arg

<220>

45 <221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Arg, Lys o Ala

<220>

50 <221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Tyr o Phe

<220>

55 <221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> Arg o Lys

<220>

60 <221> MOD\_RES

<222> (13)..(13)

ES 2 699 812 T3

<223> Arg, His o Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Val, Thr, Ile o Ala

5

<400> 176

Asp Thr Xaa Xaa Glu Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Tyr  
 1 5 10 15

10

<210> 177  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Gly o Ser

25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Ser o Thr

30

<220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)  
 <223> Glu o Asp

35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Arg o Lys

40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Ser o Ala

45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Ile, Lys o Arg

50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Arg, Lys o Ala

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Tyr o Phe

60

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Arg o Lys

ES 2 699 812 T3

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Arg, His, cys o Asn

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Val, Thr, Ile o Ala

<400> 177

Asp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Tyr  
 1 5 10 15

15 <210> 178  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

20 <400> 178

Asp Thr Ser Ser Glu Arg Ser Ile Arg Tyr Arg Arg His Val Tyr  
 1 5 10 15

25 <210> 179  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

30 <400> 179

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

35 <210> 180  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

40 <400> 180

Asp Thr Gly Thr Glu Arg Ser Ile Arg Phe Arg Arg His Thr Tyr  
 1 5 10 15

45 <210> 181  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 181

Asp Thr Gly Thr Glu Arg Ser Ile Lys Phe Arg Arg His Thr Tyr  
 1 5 10 15

50 <210> 182  
 <211> 15  
 <212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia* sp.

<400> 182

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

5

<210> 183

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Borrelia* sp.

<400> 183

Asp Thr Gly Thr Glu Arg Ser Ile Arg Tyr Arg Arg Arg Thr Tyr  
 1 5 10 15

15

<210> 184

<211> 12

<212> PRT

20 <213> *Borrelia* sp.

<400> 184

Thr Glu Arg Ser Ile Arg Tyr Arg Lys Arg Thr Tyr  
 1 5 10

25

<210> 185

<211> 12

<212> PRT

30 <213> *Borrelia* sp.

<400> 185

Thr Glu Arg Ser Ile Arg Tyr Arg Arg His Thr Tyr  
 1 5 10

35

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

40 <213> *Borrelia* sp.

<400> 186

Thr Glu Arg Ser Ile Arg Phe Arg Arg His Thr Tyr  
 1 5 10

45

<210> 187

<211> 12

<212> PRT

50 <213> *Borrelia* sp.

<400> 187

Ser Glu Lys Ala Arg Lys Tyr Arg Arg Asn Val Tyr  
 1 5 10

50

<210> 188

<211> 12



ES 2 699 812 T3

<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 188

5

Thr Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Arg Lys Arg Ala Tyr  
1 5 10

<210> 189  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Ala o val

20

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Leu o Ile

25

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> Leu o Ile

30

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Ala o Thr

35

<400> 189

Phe Glu Asp Xaa Met Lys Xaa Gly Xaa Xaa Leu Tyr Leu Asp Tyr  
1 5 10 15

40

<210> 190  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

45

<400> 190

Phe Glu Asp Ala Met Lys Leu Gly Ile Ala Leu Tyr Leu Asp Tyr  
1 5 10 15

50

<210> 191  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

55

<400> 191

ES 2 699 812 T3

Phe Glu Asp Ala Met Lys Ile Gly Ile Ala Leu Tyr Leu Asp Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 192  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 192

10 Phe Glu Asp Ala Met Lys Leu Gly Leu Thr Leu Tyr Leu Asp Tyr  
 1 5 10 15

15 <210> 193  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ile o Phe

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Thr o Ser

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Thr o Ala

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Leu o Ile

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Trp o Ser

45 <400> 193

Leu Xaa Arg Phe Xaa Xaa Ile Ser Xaa Gly Xaa Asp Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

50 <210> 194  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 194

55

Leu Phe Arg Phe Ser Ala Ile ser Ile Gly ser  
 1 5 10

ES 2 699 812 T3

5 <210> 195  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 195

Leu Phe Arg Phe Ser Ala Ile Ser Ile Gly Ser Asp Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

10 <210> 196  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 15 <400> 196

Leu Phe Arg Phe Ser Ala Ile Ser Ile Gly Ser  
 1 5 10

20 <210> 197  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 25 <400> 197

Leu Ile Arg Phe Ser Ala Ile Ser Leu Gly Ser Asp Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

30 <210> 198  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 35 <400> 198

Leu Ile Arg Phe Thr Ala Ile Ser Ile Gly Trp Asp Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

40 <210> 199  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Ser o Gly

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Asn o Asp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)

ES 2 699 812 T3

<223> Phe, Ser o Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (18)..(18)

<223> Gly o Ile

<400> 199

Asn Ser Arg Xaa Arg Tyr Xaa Asn Xaa Tyr Lys Lys Glu Ala Asp Phe  
1 5 10 15

Leu Xaa Ala Ala  
20

10

<210> 200

<211> 20

<212> PRT

15 <213> *Borrelia* sp.

<400> 200

Asn Ser Arg Ser Arg Tyr Asp Asn Phe Tyr Lys Lys Glu Ala Asp Phe  
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala  
20

20

<210> 201

<211> 20

<212> PRT

25 <213> *Borrelia* sp.

<400> 201

Asn Ser Arg Ser Arg Tyr Asn Asn Tyr Tyr Lys Lys Glu Ala Asp Phe  
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala  
20

30

<210> 202

<211> 20

<212> PRT

<213> *Borrelia* sp.

35

<400> 202

Asn Ser Arg Gly Arg Tyr Asn Asn Ser Tyr Lys Lys Glu Ala Asp Phe  
1 5 10 15

Leu Ile Ala Ala  
20

<210> 203

ES 2 699 812 T3

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Thr, Glu o Ala

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Phe o Tyr

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Asn, Lys o Gly

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Leu, val o Ile

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Leu o Ile

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Thr o Gly

<400> 203

Asn Lys Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Lys Leu Xaa Ile Leu Val Asn  
 1 5 10 15

40

<210> 204  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 204

Asn Lys Ala Phe Gly Asn Leu Leu Lys Glu Gly Ile Leu Val Asn  
 1 5 10 15

50

<210> 205  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

55

<400> 205

ES 2 699 812 T3

Asn Lys Ile Tyr Lys Asp Leu Leu Lys Ile Ala Ile Leu Val Asn  
 1 5 10 15

5  
 <210> 206  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 206

Asn Lys Thr Tyr Lys Asn Leu Leu Lys Leu Thr Ile Leu Val Asn  
 1 5 10 15

10  
 15  
 <210> 207  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.  
 <400> 207

Asn Lys Thr Phe Asn Asn Val Ile Lys Leu Thr Ile Leu Val Asn  
 1 5 10 15

20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 <210> 208  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Pro o Ser  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leu o Lys  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Glu, Lys o Gln  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Ala o Ser  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Val, Met o Ile  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Arg, Lys o Gln  
 <220>

ES 2 699 812 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Ala o Gly

5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Thr o Ile

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Thr, Glu, Ala, Asp, Lys o Gln

15

<400> 208

Xaa Phe Ile Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ala Glu  
 1 5 10 15

20

<210> 209  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

25

<400> 209

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

30

<210> 210  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

35

<400> 210

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

40

<210> 211  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

45

<400> 211

Pro Phe Ile Leu Lys Ala Lys Met Arg Gly Thr Glu Val Thr Glu  
 1 5 10 15

50

<210> 212  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

55

<400> 212

Phe Ile Lys Gln Ala Lys Val Arg Ala Ile Lys Val Ala Glu  
 1 5 10

ES 2 699 812 T3

<210> 213  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

5

<400> 213

Phe Ile Leu Lys Ala Lys Ile Lys Ala Ile Gln Val Ala Glu  
1 5 10

10 <210> 214  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

15 <400> 214

Phe Ile Leu Lys Ala Lys Ile Gln Ala Ile Gln Val Ala Glu  
1 5 10

20 <210> 215  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*

25 <400> 215

Ser Asp Tyr Tyr Ser Ser Ala Val Asn Ala Ile Tyr Phe Tyr Ser Phe  
1 5 10 15

Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp Asn Val Lys Ile Arg Lys Ala Leu  
20 25 30

Thr Leu Ala  
35

30 <210> 216  
<211> 528  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 216

Met Lys Leu Gln Arg Ser Leu Phe Leu Ile Ile Phe Phe Leu Thr Phe  
1 5 10 15

35



ES 2 699 812 T3

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

ES 2 699 812 T3

Lys Leu Arg Ser Asp Tyr Tyr Ser Ser Ala Val Asn Ala Ile Tyr Phe  
 275 280 285

Tyr Ser Phe Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp Asn Val Lys Ile Arg  
 290 300

Lys Ala Leu Thr Leu Ala Ile Asp Arg Glu Thr Leu Thr Tyr Lys Val  
 305 310 315 320

Leu Asp Asn Gly Thr Thr Pro Thr Arg Arg Ala Thr Pro Asn Phe Ser  
 325 330 335

Ser Tyr Ser Tyr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Phe Asn Pro Glu Ile Ala  
 340 345 350

Lys Thr Leu Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gly Phe Pro  
 355 360 365

Ile Leu Lys Leu Lys Tyr Asn Thr Asn Glu Ala Asn Lys Lys Ile Cys  
 370 375 380

Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn Ile Asp Val Glu  
 385 390 395 400

Leu Glu Asn Glu Glu Trp Thr Thr Tyr Leu Asn Thr Lys Ala Asn Gly  
 405 410 415

Asn Tyr Glu Ile Ala Arg Ala Gly Trp Ile Gly Asp Tyr Ala Asp Pro  
 420 425 430

Leu Thr Phe Leu Ser Ile Phe Thr Gln Gly Tyr Thr Gln Phe Ser Ser  
 435 440 445

His Asn Tyr Ser Asn Pro Glu Tyr Asn Glu Leu Ile Lys Lys Ser Asp  
 450 455 460

Leu Glu Leu Asp Pro Ile Lys Arg Gln Asp Ile Leu Arg Gln Ala Glu  
 465 470 475 480

Glu Ile Ile Ile Glu Lys Asp Phe Pro Ile Ala Pro Ile Tyr Ile Tyr  
 485 490 495

Gly Asn Ser Tyr Leu Phe Arg Asn Asp Lys Trp Thr Gly Trp Asn Thr  
 500 505 510

Asn Ile Leu Glu Arg Phe Asp Leu Ser Gln Leu Lys Leu Lys Asn Lys  
 515 520 525

ES 2 699 812 T3

<210> 217  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

5 <400> 217

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys  
 20 25 30

Thr Lys Gly Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
 35 40 45

10 <210> 218  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

15 <400> 218

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ala Gly  
 20 25 30

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

20 <210> 219  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

25 <400> 219

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Asn Ala Ser Ala Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys  
 20 25 30

Asp Lys Gly Pro Val Val  
 35

30 <210> 220  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 220

ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly

1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Asn Ala Lys  
20 25 30

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

5  
<210> 221  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 221

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Ala Ser Ala Ala Gln Arg Ala Ile Leu Lys Lys His Ala Asn Lys  
20 25 30

10  
Asp Lys Gly Pro Ile Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
35 40 45

15  
<210> 222  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> *Borrelia pacificus*  
<400> 222

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Asn  
20 25 30

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

20  
<210> 223  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
25  
<400> 223

ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Ala Ser Thr Ala Lys Arg Ala Ile Leu Lys Thr His Gly His Glu  
20 25 30

Asp Lys Gly  
35

5  
<210> 224  
<211> 36  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 224

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

Leu Lys Thr His Gly Asn Thr Asp Lys Gly Pro Val Val Ala Glu Ser  
20 25 30

Pro Lys Lys Pro  
35

10  
15  
<210> 225  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 225

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Gly Asn Thr  
20 25 30

Asp Lys Gly  
35

20  
25  
<210> 226  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 226

ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Asn Asp Lys  
20 25 30

Thr Lys Gly Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
35 40 45

5  
<210> 227  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 227

Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn  
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gln Ala Asn Asp  
20 25 30

Lys Gly

10  
<210> 228  
<211> 35  
<212> PRT  
15 <213> *Borrelia* sp.  
<400> 228

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gln Ala Asn  
20 25 30

Asp Lys Gly  
35

20  
<210> 229  
<211> 38  
<212> PRT  
25 <213> *Borrelia* sp.  
<400> 229

ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Ile Thr Asp Ala Ala Lys  
20 25 30

Asp Lys Gly Pro Ile Val  
35

5  
<210> 230  
<211> 36  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 230

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

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

Pro Lys Lys Pro  
35

10  
15  
<210> 231  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 231

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Ala Ser Val Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr His Asn Asp Ile  
20 25 30

Thr Lys Gly Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
35 40 45

20  
25  
<210> 232  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 232

ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys  
20 25 30

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

<210> 233  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 233

5

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys  
20 25 30

Asp Lys Gly Pro Val Val Ala Glu Asn Pro Lys Lys Pro  
35 40 45

<210> 234  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 234

10

15

Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Ala Ser Thr Ala Lys Lys Ala

1 5 10 15

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

Thr Pro Lys Lys Pro  
35

<210> 235  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
<400> 235

20

25



ES 2 699 812 T3

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Asn Ala Ser Ala Ala Lys Asp Ala Ile Leu Lys Thr Asn Pro Thr Lys  
 20 25 30

Thr Lys Gly Leu Leu Trp Pro Glu Ser Pro  
 35 40

5 <210> 236  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Thr, Ala, Asn, His, Asp o Ile

<400> 236

Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15

Asn Thr Ser Ala Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Xaa Lys  
 20 25 30

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

20 <210> 237  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

25 <400> 237

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Phe Glu Lys  
 20 25 30

Asn Asn Lys  
 35

30 <210> 238  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

35 <400> 238

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Phe Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

5  
<210> 239  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*  
<400> 239

Tyr Gly Gln Arg Trp Thr Asp Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Val Val Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

10  
15  
<210> 240  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*  
<400> 240

Tyr Gly Gln Ser Trp Thr Ser Pro Glu Asn Ile Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys  
20 25 30

Asn Asp Lys

20  
25  
35  
<210> 241  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*  
<400> 241

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Gln Ser Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys  
20 25 30

Asn Asp Lys  
35

5  
<210> 242  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*  
  
<400> 242

Tyr Gly Gln Glu Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Val Val Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asp Lys  
35

10  
15  
<210> 243  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia afzelii*  
  
<400> 243

His Gly Gln Glu Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Val Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Ser Arg Val Leu Asn Glu Lys Ile Ile Leu Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

20  
25  
<210> 244  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia afzelii*  
  
<400> 244

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Glu Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Ile Val Val Ser Gly Ala  
 1 5 10 15

Tyr Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ile Asn Asp Lys Ile Val Ile Glu Lys  
 20 25 30

Asn Glu Lys  
 35

5 <210> 245  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Phe, Leu, val o Ile

15 <400> 245

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Xaa Glu Lys  
 20 25 30

Asn Asn Lys  
 35

20 <210> 246  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

25 <400> 246

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
 20

30 <210> 247  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

35 <400> 247

ES 2 699 812 T3

Arg Lys Ile Ala Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asn Val Gln  
20

5 <210> 248  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*  
  
<400> 248

Arg Lys Ile Ala Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

10 Ile Asn Val Gln  
20

15 <210> 249  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*  
  
<400> 249

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

20 Ile Asp Val Glu  
20

25 <210> 250  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*  
  
<400> 250

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Ile Leu Asn  
1 5 10 15

30 Ile Asp Val Glu  
20

35 <210> 251  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Borrelia garinii*  
  
<400> 251

Arg Lys Ile Ala Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ile Asn Val Gln  
20

ES 2 699 812 T3

5 <210> 252  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia afzelii*

<400> 252

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Ile Leu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
 20

10 <210> 253  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia afzelii*

15 <400> 253

Arg Lys Ile Ala Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asn Val Gln  
 20

20 <210> 254  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 254

Lys Lys Ile Cys Glu Phe Ile Gln Asn Gln Trp Lys Lys Asn Leu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu  
 20

30 <210> 255  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 255

Leu Ile Arg Phe Thr Thr Ile Ser Leu Gly Trp Asp Ser Asn Cys Asn  
 1 5 10 15

40 <210> 256  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia* sp.

45

ES 2 699 812 T3

<400> 256

Leu Ile Arg Phe Thr Thr Ile Ser Leu Gly Trp Asp Ser Asn Cys  
1 5 10 15

5 <210> 257  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

10 <400> 257

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Ile Val Phe Glu Lys  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

15 <210> 258  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

20 <400> 258

Gly Gln Asn Trp Thr Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro Phe  
1 5 10 15

Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Tyr Val Phe Glu Lys Asn  
20 25 30

Asn Lys

25 <210> 259  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 259

30 Ser Asp Tyr Tyr Ser Ser Ala Val Asn Ala Ile Tyr Phe Tyr Ser  
1 5 10 15

35 <210> 260  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.

<400> 260

ES 2 699 812 T3

Tyr Gly Gln Asn Trp Thr Asn Pro Glu Asn Met Val Thr Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Phe Lys Leu Lys Glu Arg Ile Pro Asn Glu Lys Ile Val Phe Lys Glu  
20 25 30

Asn Asn Lys  
35

5 <210> 261  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 261

10 Ile Tyr Phe Tyr Ser Phe Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp  
1 5 10

15 <210> 262  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Borrelia* sp.  
  
<400> 262

Ser Asp Tyr Tyr Ser Ser Ala Val Asn Ala Ile Tyr Phe Tyr Ser Phe  
1 5 10 15

20 Asn Thr His Ile Lys Pro Leu Asp  
20

25 <210> 263  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*  
  
<400> 263

30 Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu  
1 5 10 15

35 <210> 264  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*  
  
<400> 264

40 Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro  
1 5 10 15

<210> 265  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Borrelia burgdorferi*  
  
<400> 265



ES 2 699 812 T3

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

5 <210> 266  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

10 <400> 266

Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr

1 5 10 15

15 <210> 267  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 267

Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Glu Ser Asn Ala Val  
 1 5 10 15

20 <210> 268  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 268

Ser Lys Lys Ile Thr Glu Ser Asn Ala Val Val Leu Ala Val Lys  
 1 5 10 15

30 <210> 269  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

35 <400> 269

Glu Ser Asn Ala Val Val Leu Ala Val Lys Glu Ile Glu Thr Leu  
 1 5 10 15

40 <210> 270  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

45 <400> 270

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

50 <210> 271  
 <211> 15  
 <212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 271

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

<210> 272

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 272

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

<210> 273

<211> 15

<212> PRT

20 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 273

25                   Glu Leu Ala Thr Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Gln Gln Asn Gly  
                  1                                   5                                   10                                   15

<210> 274

<211> 15

<212> PRT

30 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 274

35                   Ala Ile Gly Lys Lys Ile Gln Gln Asn Gly Gly Leu Ala Val Glu  
                  1                                   5                                   10                                   15

<210> 275

<211> 15

<212> PRT

40 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 275

45                   Ile Gln Gln Asn Gly Gly Leu Ala Val Glu Ala Gly His Asn Gly  
                  1                                   5                                   10                                   15

<210> 276

<211> 15

<212> PRT

50 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 276

55                   Gly Leu Ala Val Glu Ala Gly His Asn Gly Thr Leu Leu Ala Gly  
                  1                                   5                                   10                                   15

<210> 277

<211> 15

<212> PRT

ES 2 699 812 T3

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 277

Ala Gly His Asn Gly Thr Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser  
 1 5 10 15

<210> 278

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 278

Ala Tyr Thr Ile Ser Lys Leu Ile Thr Gln Lys Leu Asp Gly Leu  
 1 5 10 15

<210> 279

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 279

Lys Leu Ile Thr Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn Ser Glu Lys  
 1 5 10 15

<210> 280

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 280

Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn Ser Glu Lys Leu Lys Glu Lys Ile  
 1 5 10 15

<210> 281

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 281

Lys Asn Ser Glu Lys Leu Lys Glu Lys Ile Glu Asn Ala Lys Lys  
 1 5 10 15

<210> 282

<211> 15

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 282

Leu Lys Glu Lys Ile Glu Asn Ala Lys Lys Cys Ser Glu Asp Phe  
 1 5 10 15

<210> 283

ES 2 699 812 T3

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

5 <400> 283

Glu Asn Ala Lys Lys Cys Ser Glu Asp Phe Thr Lys Lys Leu Glu  
 1 5 10 15

<210> 284  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

10

<400> 284

15

Cys Ser Glu Asp Phe Thr Lys Lys Leu Glu Gly Glu His Ala Gln  
 1 5 10 15

<210> 285  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

20

<400> 285

Thr Lys Lys Leu Glu Gly Glu His Ala Gln Leu Gly Ile Glu Asn  
 1 5 10 15

25

<210> 286  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

30

<400> 286

Gly Glu His Ala Gln Leu Gly Ile Glu Asn Val Thr Asp Glu Asn  
 1 5 10 15

35

<210> 287  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

40

<400> 287

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

45

<210> 288  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

50

<400> 288

Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Ile Thr Asp Ala  
 1 5 10 15

ES 2 699 812 T3

5 <210> 289  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 289

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

10 <210> 290  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 290

Ala Lys Asp Lys Gly Ala Ala Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ala  
 1 5 10 15

20 <210> 291  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

25 <400> 291

Ala Ala Glu Leu Glu Lys Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn Leu Ala  
 1 5 10 15

30 <210> 292  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 292

Lys Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn Leu Ala Lys Ala Ala Lys Glu  
 1 5 10 15

40 <210> 293  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 293

Val Glu Asn Leu Ala Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser  
 1 5 10 15

45 <210> 294  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 294

ES 2 699 812 T3

Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr  
1 5 10 15

<210> 295

<211> 15

5 <212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 295

10 Glu Met Leu Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Ile Val  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende dos o más de los siguientes péptidos aislados en donde al menos uno de los péptidos en la composición es un péptido seleccionado del grupo (a):

5

(a) KIEFSKFTVKIKNKD (SEQ ID NO: 25), o una variante activa del mismo seleccionado de

(i) un péptido de SEQ ID NO: 25 en donde uno o dos de los aminoácidos E3, K6, K10 y/o N13 está sustituido con otro aminoácido; o

10 (ii) un péptido seleccionado de:

- 1) KIKFSKFTVKIKNKD (SEQ ID NO: 117),
- 2) KIEFSEFTVKIKYK- (SEQ ID NO: 118),
- 3) -IKFSEFTVNIKKNK- (SEQ ID NO: 119), o
- 15 4) -IKFSEFTVKIKYK- (SEQ ID NO: 120);

(b) DTGTERSIRYRRRVY (SEQ ID NO: 24), o una variante activa seleccionada de:

20 (i) un péptido de SEQ ID NO: 24 en donde uno o dos de los aminoácidos G3, S4, R6, I8, R9, Y10, R12, R13 y/o V14 o uno o más de los aminoácidos G3, S4, E5, R6, S7, I8, R9, Y10, R12, R13, V14 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:

- 25 1) DTSSERSIRYRRHVY (SEQ ID NO: 178),
- 2) DTGTERSIRYRKRTY (SEQ ID NO: 179),
- 3) DTGTERSIRFRRHTY (SEQ ID NO: 180),
- 4) DTGTERSIFRRHTY (SEQ ID NO: 181),
- 5) DTGTERSKAYRKRAY (SEQ ID NO: 182),
- 6) DTGTERSIRYRRRTY (SEQ ID NO: 183),
- 30 7) --- TERSIRYRKRTY (SEQ ID NO: 184),
- 8) --- TERSIRYRRHTY (SEQ ID NO: 185),
- 9) --- TERSIRFRRHTY (SEQ ID NO: 186),
- 10) --- SEKARKYRRNVY (SEQ ID NO: 187), o
- 35 11) --- TERSKAYRKRAY (SEQ ID NO: 188);

(c) YGQNWTSPENMVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNNK (SEQ ID NO:11), o una variante activa seleccionada de:

40 (i) un péptido de SEQ ID NO: 11 en donde uno o dos de los aminoácidos Y1, G2, Q3, N4, S7, M11, T13, P16, F17, E21, I23, P24, E26, Y28, V29, F30 y/o N34 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:

- 45 1) YGQNWTNPENMVTSGPFKLERIPNEKIVFEKNNK (SEQ ID NO:257),
- 2) YGENWTPENIVVSGAYKLERLINDKIVIENNEK (SEQ ID NO: 63),
- 3) YGQEWTPENMVTSGPFKLSRVLNEKVVLEKNDK (SEQ ID NO: 64),
- 4) YKGNWTPENMVTSGPFKLRKRLPNEKIIFEKN-- (SEQ ID NO: 65),
- 5) HGQNWTNPENMVTSGPFKLSRVLNEKIILEKNNK (SEQ ID NO: 66),
- 6) YGQSWTPENIVTSGPFKLERIPNEKYVVEKNDK (SEQ ID NO: 67),
- 7) YKGNWTSPENMVTSGPFKLRKRLPNEKIIFEKNER (SEQ ID NO: 68),
- 8) YGQRWTPENMVTSGPFKLSRVLNEKVVLEKNNK (SEQ ID NO: 69),
- 50 9) HGQEWTPENMVTSGPFKLSRVLNEKIILEKNNK (SEQ ID NO: 70),
- 10) FGNKWTNPENMVTSGPFKLRILNEEISLEKNNK (SEQ ID NO: 71), o
- 11) FGNKWTSENMTSGPFKLRILNEEISLEKNEK (SEQ ID NO: 72);

(d) KKPMMNKKGKGIARKKGGKSKVSRKEPYIHS (SEQ ID NO:23), o una variante activa seleccionada de:

55

(i) un péptido de SEQ ID NO: 23 en donde uno o dos de los aminoácidos P3, M4, G8, G10, I12, K16, G17, K18, S19, K20, V21, S22, R23, E25, Y27 y/o I28 o uno o más de los aminoácidos K2, P3, M4, N5, K6, K7, G8, G10, K11, I12, A13, R14, K16, G17, K18, S19, K20, V21, S22, R23, K24, E25, Y27, I28, H29 está sustituido con otro aminoácido; o

60 (ii) un péptido seleccionado de:

- 1) IARKKGGKSKVSRKEPSIHS (SEQ ID NO: 99),
- 2) KKSLLNKKGGKDKVARKKVEGNAVKKDPFNH- (SEQ ID NO: 100),
- 3) KKPMMNKKGGKGIARKKNGKSKVSGKEPFIHS (SEQ ID NO: 101),
- 65 4) KKPMMNKKGGKGIARKKVKSKVSRKEPYIHS (SEQ ID NO: 102), o
- 5) KKPIN KQGKS KVS RK QGKSN VSRKE PSIHS (SEQ ID NO: 103);

(e) MTLFLFISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO: 8), o una variante activa seleccionada de:

(i) un péptido de SEQ ID NO: 8 en donde uno o dos de los aminoácidos K14, G15, N17, T18, S19 y/o A20 o uno o más de los aminoácidos F4, C9, N11, D15, G16, N17, T18, S19 y/o A20 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:

- 1) ---FLFISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO: 75),
- 2) -TLFLF1SCNNSGGD---T (SEQ ID NO: 76),
- 3) MTLFLFISCNNSGKGGDSAS (SEQ ID NO: 31),
- 4) MTLFLFISCNNSGKDGNSAS (SEQ ID NO: 77),
- 5) ----FISCNNSGKDGNTSA (SEQ ID NO: 78),
- 6) ---FLFISCNNSGKDGN--- (SEQ ID NO: 79),
- 7) MTLFLFISCNNSGKD---- (SEQ ID NO: 80),
- 8) MTLFLFISCNNSGKGGDSA- (SEQ ID NO: 81),
- 9) MTLFLFISCNNSGKDGNSA- (SEQ ID NO: 82),
- 10) MTLFLFISCNNSGKDGNSA (SEQ ID NO: 83), o
- 11) MTLFLFISCNNSGKDGNASA (SEQ ID NO: 84);

(f) KFYSSLRLEVRKIEQ (SEQ ID NO: 3), o una variante activa seleccionada de:

(i) un péptido de la SEQ ID NO: 3 en donde uno o más de los aminoácidos S4 y/o I13, o uno o más de los aminoácidos K1, F2, Y3, S4, S5, L6, R7, L8, E9, V10, R11 y/o I13 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:

- 1) KFYASLRLEVRKIEQ (SEQ ID NO: 87),
- 2) KFYASLRLEVRKVEQ (SEQ ID NO: 88),
- 3) KFYSNRFLEIVKSE- (SEQ ID NO: 89),
- 4) -IFSNLQNEAKKIEQ (SEQ ID NO: 90),
- 5) KFYSSLRLEVRKVEQ (SEQ ID NO: 91),
- 6) -FYSSLNYDENKI-- (SEQ ID NO: 92), o
- 7) KFYISVKLEYK---- (SEQ ID NO: 93);

(g) KEEFKIELVLKESST (SEQ ID NO: 17), o una variante activa seleccionada de:

(i) un péptido de SEQ ID NO: 17 en donde uno o dos de los aminoácidos E2, F4, K5, I6 y/o S15 o los aminoácidos E2, E3, F4, K5, L8 y/o S15 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:

- 1) KEEFKIELVLKESST (SEQ ID NO:55);
- 2) KAERKIELVLKE--- (SEQ ID NO:56);
- 3) KEEFKFELVLKESST (SEQ ID NO:57);
- 4) KEEFEIELVLKESST (SEQ ID NO:58);
- 5) KAERKIELV(N)(L)LKE (SEQ ID NO:59), o
- 6) -EIFKIEKVL---- (SEQ ID NO: 60);

(h) INKLEAKKTSLKTYSEYEEQ (SEQ ID NO: 27), o una variante activa seleccionada de:

(i) un péptido de SEQ ID NO: 27 en donde uno o dos de los aminoácidos N2, L4, E5, A6, K7, L11, K12 y/o E19 o uno o más de los aminoácidos N2, L4, E5, A6, K7, K8, T9, S10, L11, K12, S15, E16 y/o E19 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:

- 1) IEKLEAKKTSLKTYSEYEE- (SEQ ID NO: 155),
- 2) IEKLDKSKKTSLKTYSEYEE- (SEQ ID NO: 156),
- 3) IEKLDKSKKTSIETSEYEE- (SEQ ID NO: 157),
- 4) IDKSDAKKTSLKTYSEYE-- (SEQ ID NO: 158),
- 5) IEKSDPKSVSLKTYSDY--- (SEQ ID NO: 159), o
- 6) --KIEIEKTELKTEYNEIED- (SEQ ID NO: 160);

(i) TILVNLLISCGLTGA (SEQ ID NO: 43), o una variante activa seleccionada de:

(i) un péptido de SEQ ID NO: 43 en donde uno o dos de los aminoácidos N5, I8 y/o S9 o uno o más de los aminoácidos I2, V4, N5, L6, L7, I8, S9, G11 y/o T13 está sustituido con otro aminoácido; o

(ii) un péptido seleccionado de:



- 5  
10
- 1) TILVNLLISCGLTGA (SEQ ID NO: 43),
  - 2) TILVSLVLLISCGLTGA (SEQ ID NO: 106),
  - 3) TILVNLLVACGLTGA (SEQ ID NO: 107),
  - 4) TILVSLLVACGLTGA (SEQ ID NO: 108),
  - 5) ---VSLLVACGLTG- (SEQ ID NO: 109),
  - 6) -ILVNLFLSCG---- (SEQ ID NO: 110),
  - 7) TILVNLFLVS----- (SEQ ID NO: 111),
  - 8) TLIVGLLVACSLTG- (SEQ ID NO: 112),
  - 9) -ILVFFLISC----- (SEQ ID NO: 113),
  - 10) TVLI--LISCSL--- (SEQ ID NO: 114), o
  - 11) TLLVSLFIACSLTG- (SEQ ID NO: 115);

(j) IDDSIKKIDEELKNT (SEQ ID NO: 28), o una variante activa seleccionada de:

- 15
- (i) un péptido de SEQ ID NO: 28 en donde uno o dos de los aminoácidos D2, D3, S4, I5, D9, E11, L12, K13, N14 y/o T15 o uno o más de los aminoácidos D2, D3, S4, 15, K6, K7, I8, D9, E10, E11, L12, K13, N14 y/o T15 está sustituido con otro aminoácido; o
  - (ii) un péptido seleccionado de:

- 20  
25  
30
- 1) IDDSIKKIEEELKNT (SEQ ID NO: 163),
  - 2) IDDSLKKIEEELK-- (SEQ ID NO: 164),
  - 3) IDENFKKIEEEFKDT (SEQ ID NO: 165),
  - 4) ITNSLKKIEEELKEA (SEQ ID NO: 166),
  - 5) IDENFKKIEEEFKD (SEQ ID NO: 167),
  - 6) IEDLIKKINEEILN- (SEQ ID NO: 168),
  - 7) INDSLKKIEEEL--- (SEQ ID NO: 169),
  - 8) -DENFKKIEEEFKDT (SEQ ID NO: 170),
  - 9) -DENFKKIEEEFKD- (SEQ ID NO: 171),
  - 10) IDDALENINEELKK (SEQ ID NO: 172),
  - 11) IRESAKKIDESLK- (SEQ ID NO: 173),
  - 12) -EDLIKKINEEILN (SEQ ID NO: 174), o
  - 13) --NVIKRIEEEEAKN- (SEQ ID NO: 175);

35 y, opcionalmente, el péptido aislado MKKNDQI(V o G)AAIALRGVA (SEQ ID NO: 49), en donde el péptido o la variante activa pueden unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena.

2. La composición que comprende el péptido (a) y uno o más de los péptidos de (b) - (j) de la reivindicación 1, más el péptido aislado MKKNDQI(V o G)AAIALRGVA (SEQ ID NO: 49).

40 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, que comprende los péptidos indicados pero no las variantes activas.

4. La composición de la reivindicación 1 o 2, que comprende el péptido de la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 25, más uno o más de los péptidos representados por la SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 11.

45 5. Una composición de la reivindicación 1 o 2, que comprende además uno o más de los siguientes péptidos:

(k) NSRSRYNNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO:26), o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 50
- (i) NSRSRYDNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 200),
  - (ii) NSRSRYNNYYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 201), o
  - (iii) NSRGRYNNYSYKKEADFLIAA (SEQ ID NO: 202));

(1) GFISCDLFI RYEMKE (SEQ ID NO: 22), o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 55
- (i) GFISCDLFI RDEIKE (SEQ ID NO: 95), o
  - (ii) SFISCNLFTRDEIKE (SEQ ID NO: 96);

(m) NTLDVPPKTFVVKLALGYAE (SEQ ID NO: 19), o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 60  
65
- (i) IGRKGGLLPDI I I KI (SEQ ID NO: 123),
  - (ii) VGRKGGLLPDI I I KI (SEQ ID NO: 124),
  - (iii) -TQDTPPKTFVIK LALGYAE (SEQ ID NO: 131),
  - (iv) -TQDTPPKTFVIK LALGYA- (SEQ ID NO: 132), o
  - (v) -TLEVSSKSIVVRL----- (SEQ ID NO: 133);

(n) KKICEFIQNQWKKNLIDVE (SEQ ID NO: 45), o una variante activa del mismo seleccionada de:

- (i) KKICEFIQNQWKKNLNINVE (SEQ ID NO: 141),  
(ii) KKICEFIQNQWKKILNIDVE (SEQ ID NO: 142),  
(iii) RKIAEFIQNQWKKNLNINVQ (SEQ ID NO: 143),  
5 (iv) KKIAAFIQNQWKKILNINL- (SEQ ID NO: 144),  
(v) KEVASFIQSQWKKVLNIDVE (SEQ ID NO: 145),  
(vi) KKVATFIQNQWKKILNINI- (SEQ ID NO: 146),  
(vii) KGAEFLQEQFKKILNIKIE (SEQ ID NO: 147),  
(viii) KKIAEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO: 148),  
10 (ix) KKICEFIQNQWKKILNIDVE (SEQ ID NO: 149),  
(x) KEIANFIQSQWKKVLNIDIE (SEQ ID NO: 150),  
(xi) KITAEFLQEQFKKVLNINVA (SEQ ID NO: 151), o  
(xii) ---AEFLQEQFKKILNINLE (SEQ ID NO: 152);
- (o) VSRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 20), o una variante activa del mismo seleccionada de:
- 15 (i) IGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 123),  
(ii) VGRKGGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 124),  
(iii) VSRKAGLLPDIIKI (SEQ ID NO: 125),  
20 (iv) VFSNDNFLSELIKI (SEQ ID NO: 126),  
(v) VFSNDNFLSELIKI (SEQ ID NO: 127), o  
(vi) ---KAGIFPDII-- (SEQ ID NO: 128);
- (p) NKTFNLLKLTLILVN (SEQ ID NO: 41), o una variante activa del mismo seleccionada de:
- 25 (i) NKAFGNLLKEGILVN (SEQ ID NO: 204),  
(ii) NKIYKDLLKIALILVN (SEQ ID NO: 205),  
(iii) NKTYKNLLKLTLILVN (SEQ ID NO: 206), o  
(iv) NKTFNNVIKLTLILVN (SEQ ID NO: 207);
- 30 (q) LIRFTTISLGWDSNCN (SEQ ID NO: 2), o una variante activa del mismo seleccionada de:
- (i) LFRFSAISIGS---- (SEQ ID NO: 194),  
(ii) LFRFSAISIGSDSNN (SEQ ID NO: 195),  
35 (iii) LFRFSAI-SIG----S (SEQ ID NO: 196),  
(iv) LIRFSAISLGSDSNN (SEQ ID NO: 197), o  
(v) LIRFTAISIGWDSNN (SEQ ID NO: 198);
- (r) FEDAMKLGALYLDY (SEQ ID NO: 1), o una variante activa del mismo seleccionada de:
- 40 (i) FEDAMKLGIALYLDY (SEQ ID NO: 190),  
(ii) FEDAMKIGIALYLDY (SEQ ID NO: 191), o  
(iii) FEDAMKLGTLYLDY (SEQ ID NO: 192);
- (s) IYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO: 13), o una variante activa del mismo seleccionada de:
- 45 (i) IYFYAFNTTVKPLDN (SEQ ID NO: 136),  
(ii) IYFYAFNTKAKPLDN (SEQ ID NO: 137), o  
(iii) IYLYSFNTKIKPLDD- (SEQ ID NO: 138);
- 50 (t) AKKAILITDAAKDKG (SEQ ID NO:9);  
(u) KNEGLKEKIDAAKCCSETFT (SEQ ID NO:7);  
(v) LVACSIGLVERTNAA (SEQ ID NO:16);  
(w) IPSKENAKLIVYFYDENVYAG (SEQ ID NO: 4);  
55 (x) IPSKENAKLIVYFYD (SEQ ID NO: 5);  
(y) NAKLIVYFYDENVYAG (SEQ ID NO: 6);  
(z) SDYYSSAVNAIYFYA (SEQ ID NO: 12);  
(aa) SDYYSSAVNAIYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO: 14);  
(bb) IYFYAFNTHIKPLDNVKIRKALTLA (SEQ ID NO: 46);  
(cc) LAEAGYPNGNGFPILKLYN (SEQ ID NO: 47);  
60 (dd) DMFSLEQRLEIKLEA (SEQ ID NO: 15);  
(ee) NKTFNLLKLTLILVLLISCGLTGA (SEQ ID NO: 42);  
(ff) PFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO: 44), o una variante activa del mismo seleccionada de:
- 65 (i) SFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO: 209),  
(ii) SFILEAKMRGTTVAE (SEQ ID NO: 210),  
(iii) PFILKAKMRGTEVTE (SEQ ID NO: 211),

- (iv) -FIKQAKVRAIKVAE (SEQ ID NO: 212),
- (v) -FILKAKIKAIQVAE (SEQ ID NO: 213), o
- (vi) -FILKAKIQAIQVAE (SEQ ID NO: 214);

- 5 (gg) IFFLTFLCCNNKERK (SEQ ID NO: 10);  
 (hh) IVSYFVSKMVVVSQSG (SEQ ID NO: 18); y  
 (ii) LKDIIREYFSQRTGQ (SEQ ID NO: 21)

en donde el péptido puede unirse específicamente a un anticuerpo contra una *Borrelia* patógena.

10

6. La composición de la reivindicación 5, en donde los péptidos se seleccionan de:

(k) NSRSRYNNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 26) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 15 (i) NSRSRYDNFYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 200),  
 (ii) NSRSRYNNYYKKEADFLGAA (SEQ ID NO: 201), o  
 (iii) NSRGRYNNNSYKKEADFLIAA (SEQ ID NO: 202);

(l) GFISCDLFI RYEMKE (SEQ ID NO: 22) o una variante activa del mismo seleccionada de:

20

- (i) GFISCDLFI RDEIKE (SEQ ID NO: 95), o
- (ii) SFISCNLFTRDEIKE (SEQ ID NO: 96);

(m) NTLDVPPKTFVVKLALGYAE (SEQ ID NO: 19) o una variante seleccionada de:

25

- (i) IGRKGGLLPDIIIKI (SEQ ID NO: 123),
- (ii) VGRKGGLLPDIIIKI (SEQ ID NO: 124),
- (iii) -TQDTPPKTFVIKALALGYAE (SEQ ID NO: 131),
- (iv) -TQDTPPKTFVIKALALGYA- (SEQ ID NO: 132), o
- (v) -TLEVSSKSIVVRL----- (SEQ ID NO: 133);

30

(n) KKICEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO: 45) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 35 (i) KKICEFIQNQWKKNLNINVE (SEQ ID NO: 141),  
 (ii) KKICEFIQNQWKKILNIDVE (SEQ ID NO: 142),  
 (iii) RKIAEFIQNQWKKNLNINVQ (SEQ ID NO: 143),  
 (iv) KKIAAFIQNQWKKILNINL- (SEQ ID NO: 144),  
 (v) KEVASFIQSQWKKVLNIDVE (SEQ ID NO: 145),  
 (vi) KKVATFIQNQWKKILNINI- (SEQ ID NO: 146),  
 40 (vii) KGAEFLQE QFKKILNIKIE (SEQ ID NO: 147),  
 (viii) KKIAEFIQNQWKKNLNIDVE (SEQ ID NO: 148),  
 (ix) KKICEFIQNQWKKILNIDVE (SEQ ID NO: 149),  
 (x) KEIANFIQSQWKKVLNIDIE (SEQ ID NO: 150),  
 (xi) KITAEFLQE QFKKVLNINVA (SEQ ID NO: 151), o  
 45 (xii) ---AEFLQE QFKKILNINLE (SEQ ID NO: 152);

(o) VSRKGGLLPDIIIKI (SEQ ID NO: 20) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 50 (i) IGRKGGLLPDIIIKI (SEQ ID NO: 123),  
 (ii) VGRKGGLLPDIIIKI (SEQ ID NO: 124),  
 (iii) VSRKAGLLPDIIIKI (SEQ ID NO: 125),  
 (iv) VFSNDNFLSELIKI (SEQ ID NO: 126),  
 (v) VFSNDNFLSELIKI (SEQ ID NO: 127), o  
 (vi) ---KAGIFPDII- (SEQ ID NO: 128);

55

(p) NKTFNLLKLTLILVN (SEQ ID NO: 41) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 60 (i) NKAFGNLLKEGILVN (SEQ ID NO: 204),  
 (ii) NKIYKDLLKIALVN (SEQ ID NO: 205),  
 (iii) NKTYKNLLKLTLILVN (SEQ ID NO: 206), o  
 (iv) NKTFNLLKLTLILVN (SEQ ID NO: 207);

(q) LIRFTTISLGWDSNN (SEQ ID NO: 2) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- 65 (i) LFRFSAISIGS---- (SEQ ID NO: 194),  
 (ii) LFRFSAISIGSDSNN (SEQ ID NO: 195),

- (iii) LFRFSAI-SIG----S (SEQ ID NO: 196),
- (iv) LIRFSAISLGSDSNN (SEQ ID NO: 197), o
- (v) LIRFTAISIGWDSNN (SEQ ID NO: 198);

5 (r) FEDAMKLGALYLDY (SEQ ID NO: 1) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- (i) FEDAMKLGIALYLDY (SEQ ID NO: 190),
- (ii) FEDAMKIGIALYLDY (SEQ ID NO: 191), o
- (iii) FEDAMKLGTLYLDY (SEQ ID NO: 192);

10

(s) IYFYAFNTHIKPLDN (SEQ ID NO: 13) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- (i) IYFYAFNTTVKPLDN (SEQ ID NO: 136),
- (ii) IYFYAFNTKAKPLDN (SEQ ID NO: 137), o
- (iii) IYLYSFNTKIKPLDD- (SEQ ID NO: 138);

15

(ff) PFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO: 44) o una variante activa del mismo seleccionada de:

- (iv) SFILEAKVRATTVAE (SEQ ID NO: 209),
- (v) SFILEAKMRGTTVAE (SEQ ID NO: 210),
- (vi) PFILKAKMRGTEVTE (SEQ ID NO: 211),
- (vii) -FIKQAKVRAIKVAE (SEQ ID NO: 212),
- (viii) -FILKAKIKAIQVAE (SEQ ID NO: 213), o
- (ix) -FILKAKIQAIQVAE (SEQ ID NO: 214);

20

y, opcionalmente, el péptido aislado MKKNDQI(V o G)AAIALRGVA (SEQ ID NO: 49).

7. La composición de la reivindicación 1,5 o 6, en donde, uno o más de los péptidos expuestos en las SEQ ID NO: 1 a 24, 26 a 28, y 41 a 47, pueden comprender además 1 aminoácido adicional o tener 1 menos en un extremo del péptido.

30

8. La composición de la reivindicación 1,2 o 6, en donde los dos o más péptidos están unidos covalentemente a través de sus extremos N o C, y en donde los péptidos unidos están separados por un espaciador de 1-5 restos de glicina o alanina.

35

9. La composición de la reivindicación 8, en donde en la SEQ ID NO: 49, el resto indicado como (V o G) es V.

10. La composición de la reivindicación 1,2 o 5 a 9, que comprende además uno o más péptidos adicionales que son específicos para anticuerpos contra la misma proteína o una diferente de la misma o diferente *Borrelia* patógena.

40

11. La composición de la reivindicación 1,2 o 6 a 9, en donde uno o más de los péptidos comprende además un resto de cisteína o lisina N-terminal o C-terminal.

12. Un reactivo de diagnóstico que comprende (a) una composición de la reivindicación 1,2, o 5 a 9 y (b) un sistema para detectar el péptido y/o un sustrato para inmovilizar el péptido.

45

13. Un kit para diagnosticar la borreliosis de Lyme, que comprende (a) una composición de la reivindicación 1, 2 o 5 a 9 y (b) un sistema para detectar el péptido unido a un anticuerpo contra una proteína de *Borrelia* patógena y/o un sustrato para inmovilizar el péptido.

50

14. Un método para diagnosticar la enfermedad de Lyme en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra de un sujeto sospechoso de tener anticuerpos contra un agente causante de la enfermedad de Lyme con una composición de la reivindicación 1, 2 o 5 a 9, bajo condiciones eficaces para la formación de un complejo péptido-anticuerpo, y para detectar la presencia del complejo péptido-anticuerpo.

55

15. El método de la reivindicación 14, en donde:

- (a) el complejo péptido-anticuerpo se detecta mediante la adición de una pareja de unión que está marcada, o que se puede marcar con un reactivo generador de señal, opcionalmente, en donde la pareja de unión es un anticuerpo unido a una enzima, y se genera una señal cuando la enzima reacciona con un sustrato adecuado; o
- (b) la detección se realiza con un ensayo ELISA; o
- (c) la detección se realiza con un ensayo basado en perlas Luminex; o
- (d) el sujeto es un gato o un perro; o
- (e) el sujeto es un ser humano.

60

16. La composición de las reivindicaciones 1, 5 o 6, en donde la variante activa en la subparte (i) en cada caso está

65

sustituida en una de las sustituciones de aminoácidos específicamente indicadas.

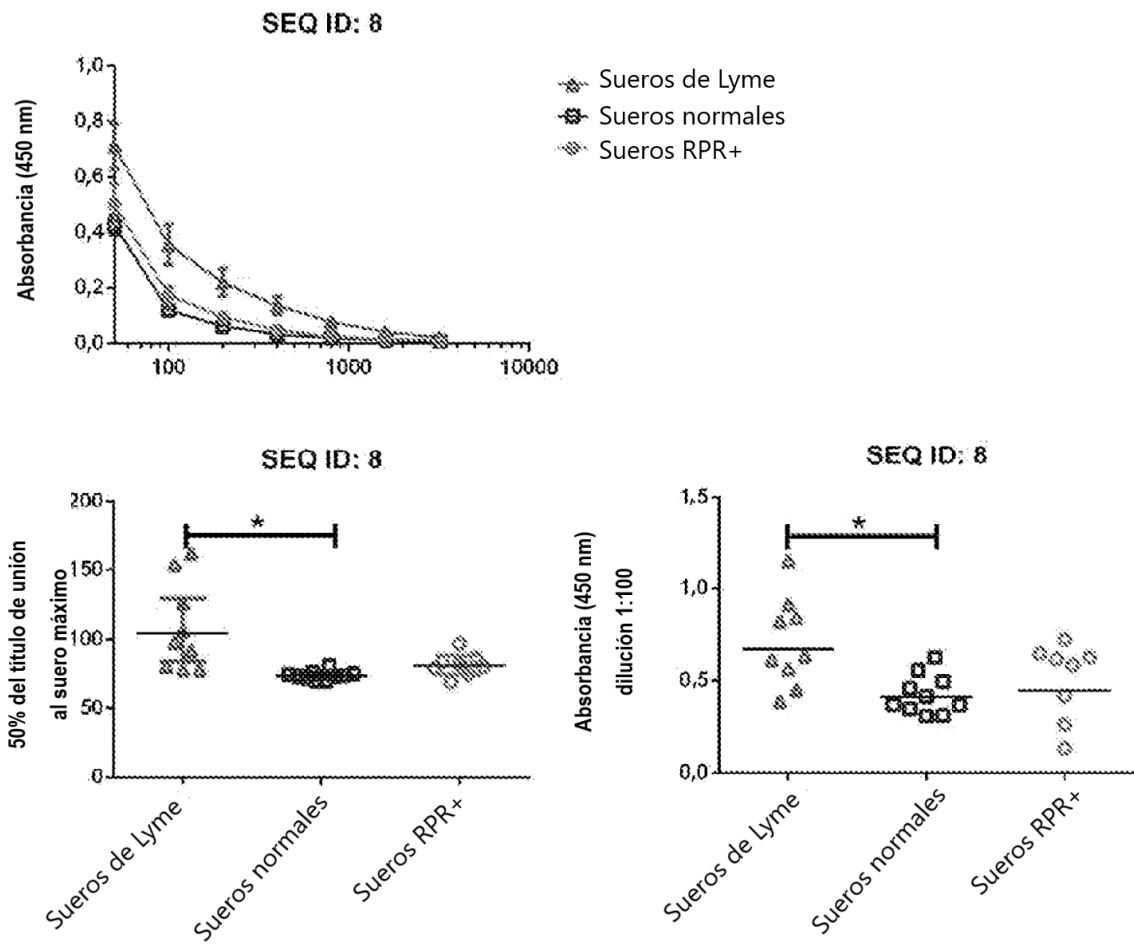


FIG. 1A

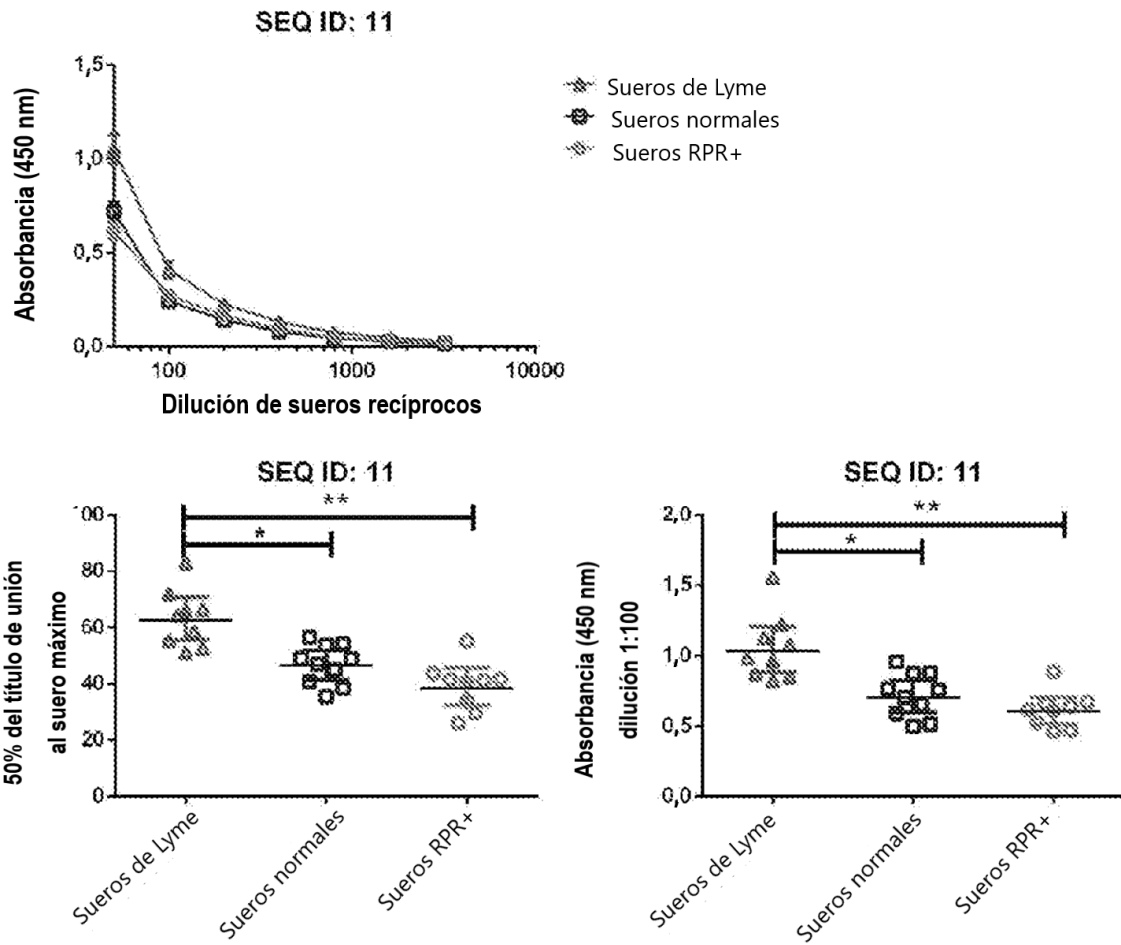


FIG. 1B

ES 2 699 812 T3

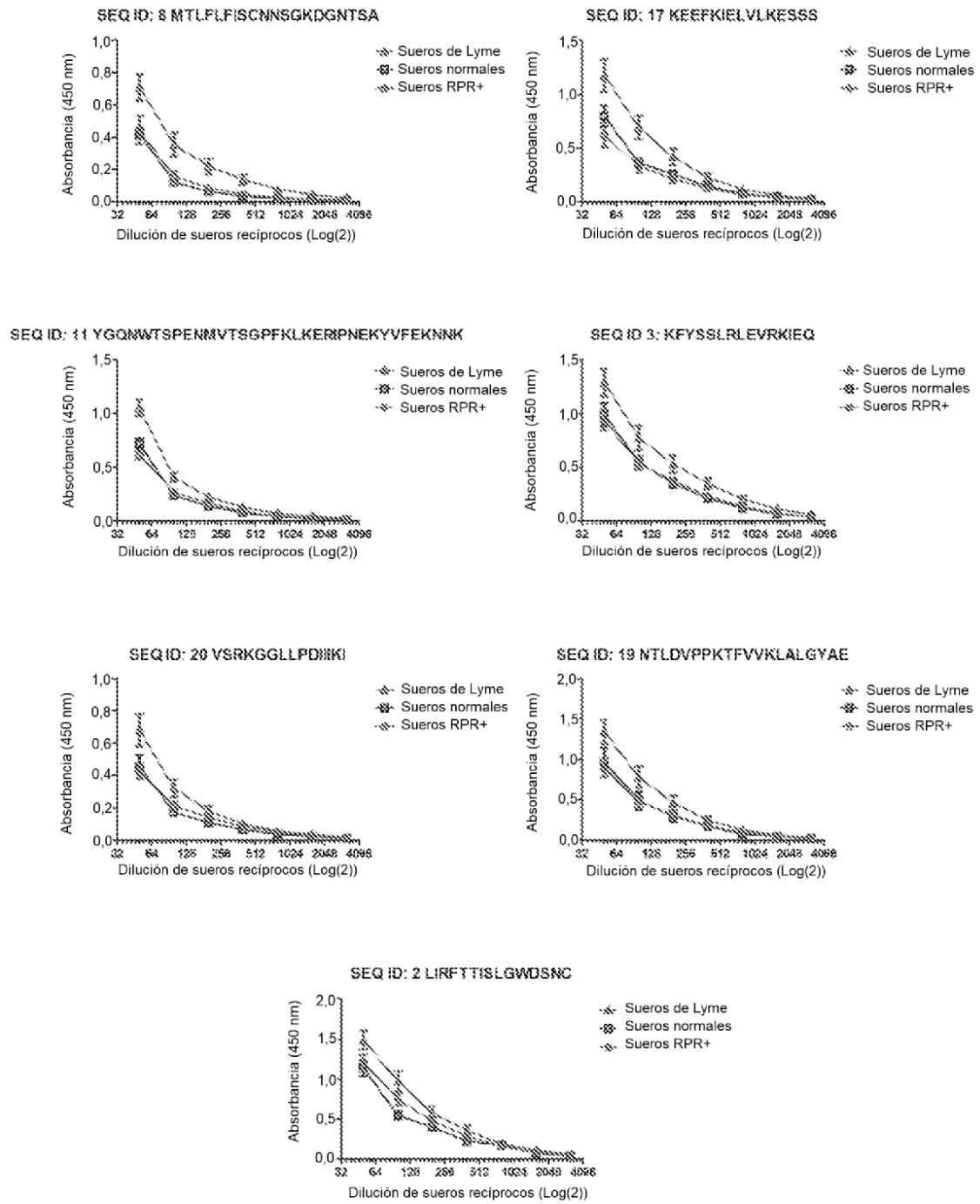


FIG. 2



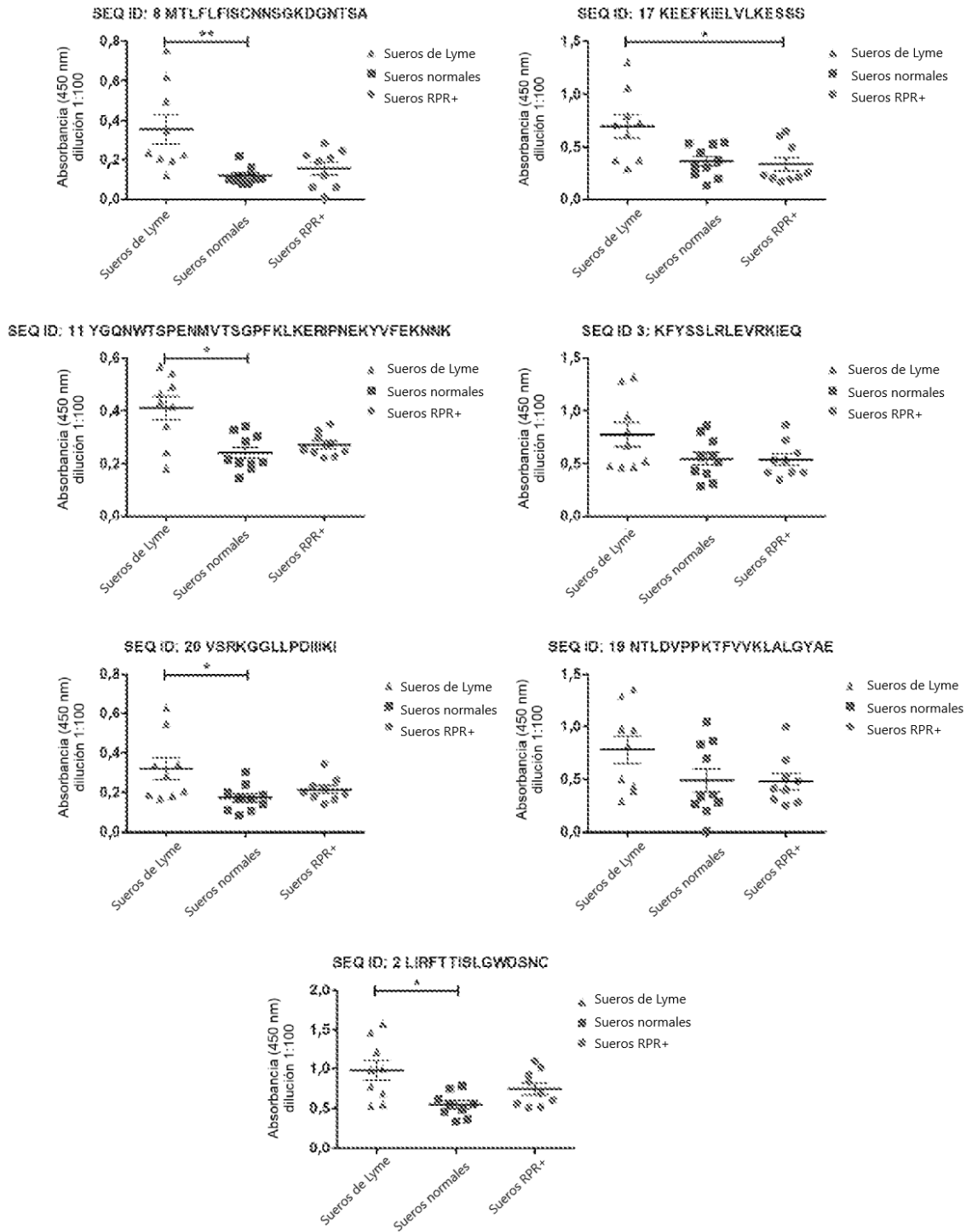


FIG. 3

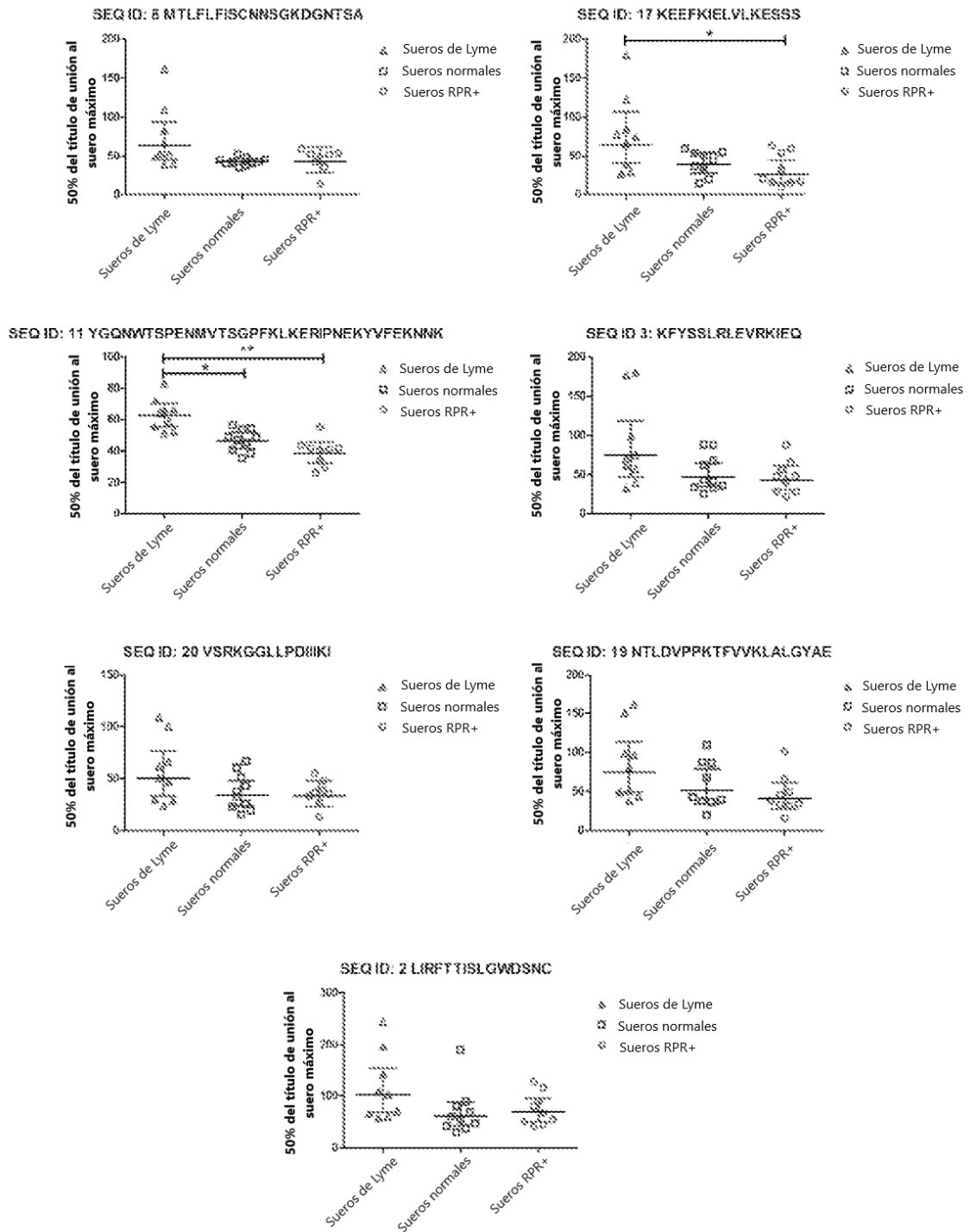


FIG. 4

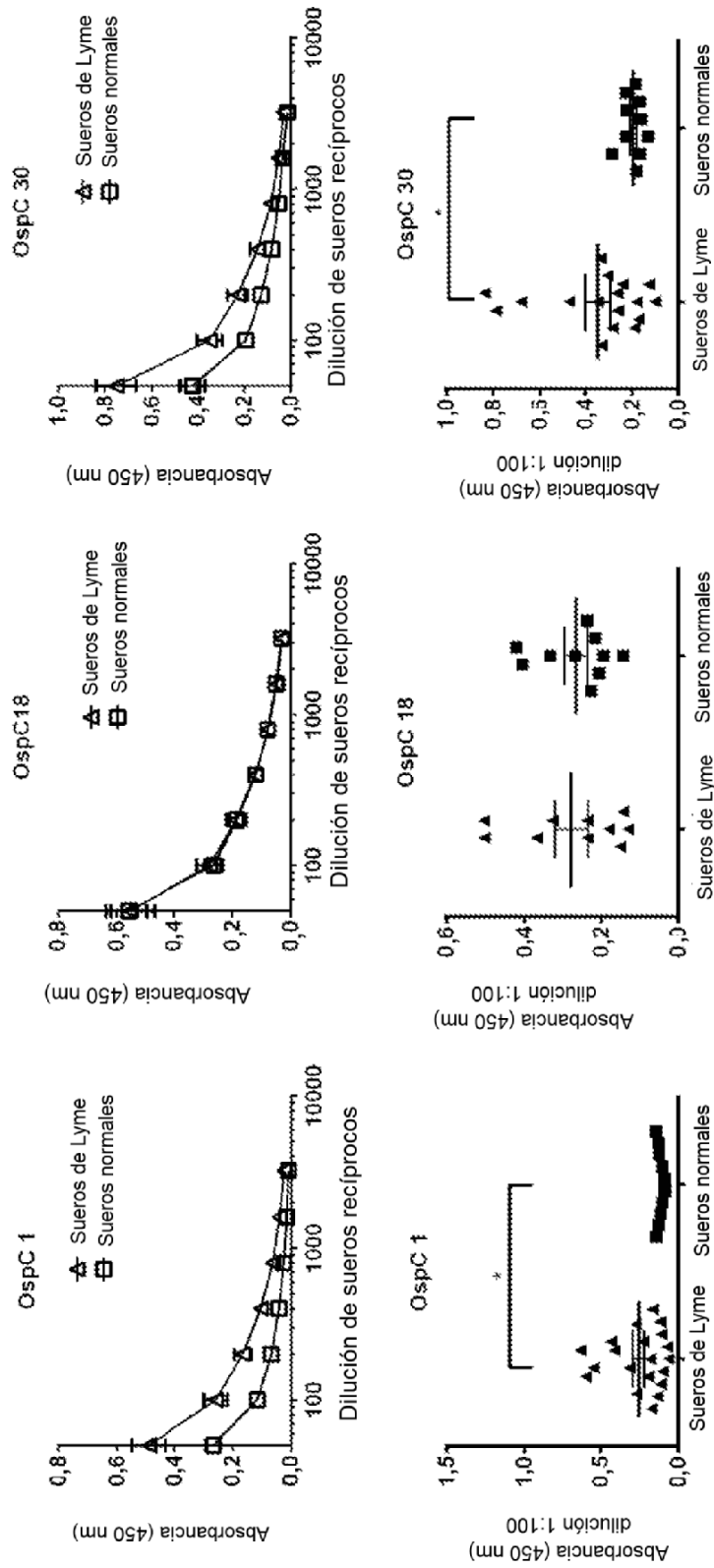


FIG. 5

Cepa (Tipo OspC)	OspC 1	OspC 33	PépC10
B31 (A)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKEA I LKTNGT -KTKG	--PVVAESP KKP
PBrs (B)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKANAAGKDKG	--PVVAESP KKP
OC3 (C)	MTLFLFISCNNSGKDGNASA	--AKEA I LKTNGT -KDKG	--PVV-----
CA-11.2A (D)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKTHNA -KDKG	--PVVAESP KKP
N40 (E)	MTLFLFISCNNSGKDGNASA	--AQRA I LKKHAN -KDKG	--PIVAESP KKP
<i>B. pacificus</i> (F)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKAA I LKTNGT -NDKG	--PVVAESP KKP
OC8 (G)	MTLFLFISCNNSGKDGNAST	--AKRA I LKTHGH -EDKG	-----
LDS79 (H)	-----NNSGKDGNASA	--AKKA I LKTHGN -TDKG	--PVVAESP KKP
OC9 (H)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKTHGN -TDKG	-----
HB19 (I)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKTND -KTKG	--PVVAESP KKP
MIL (J)	-TLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKTNQA -NDKG	-----
OC10 (J)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKTNQA -NDKG	-----
OC12 (K)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LITDAA -KDKG	--PIV-----
LDP74 (K)	-----NNSGKDGNTSA	--AKKA I LITDAA -KDKG	--PIVAESP KKP
T255 (L)	MTLFLFISCNNSGKDGNASV	--AKKA I LKTHND -ITKG	--PVVAESP KKP
B358 (M)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKAA I LKTNGT -KDKG	--PVVAESP KKP
2591 (M)	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKAA I LKTNGT -KDKG	--PVVAENPKKP
26815 (N)	-----CNNSGKDGNAST	--AKKA I LRTNA I -KDKG	--PVVAETPKKP
CS6 (U)	MTLFLFISCNNSGKDGNASA	--AKDA I LKTNPT -KTKG	--LLWPESP---
Consenso	MTLFLFISCNNSGKDGNTSA	--AKKA I LKTNGX -KDKG	--PVVAESP KKP

FIG. 6

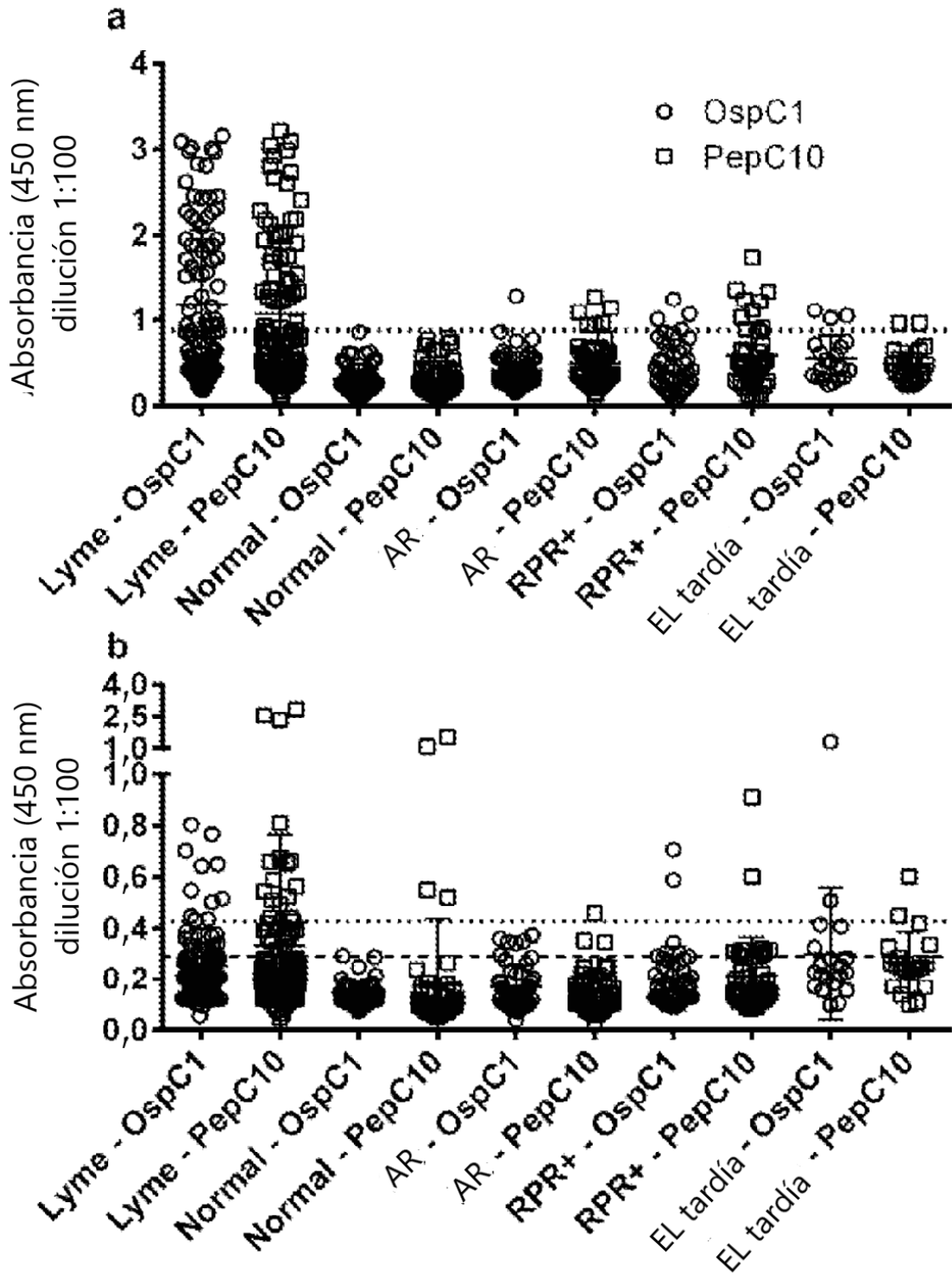


FIG. 7

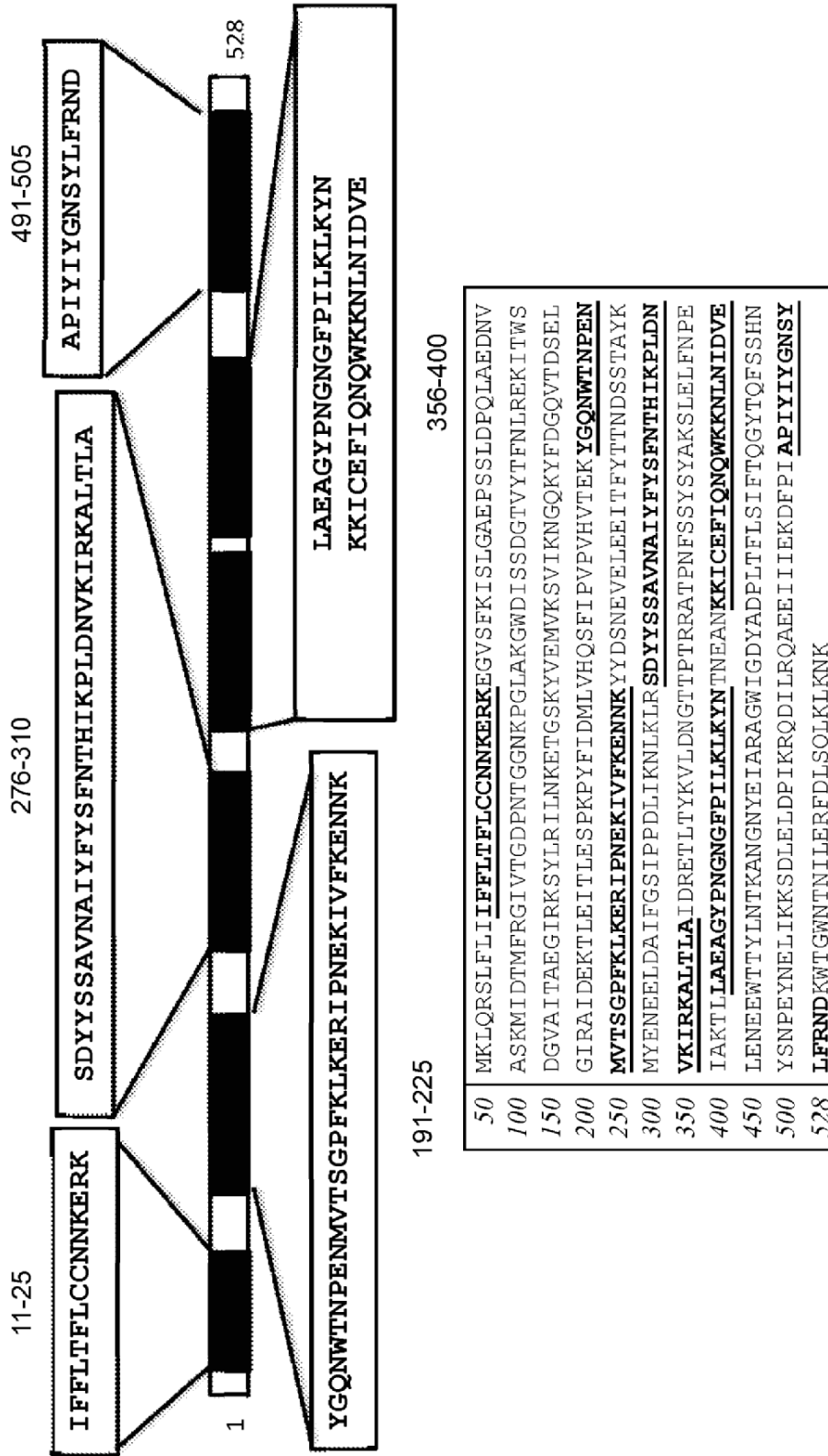


FIG. 8

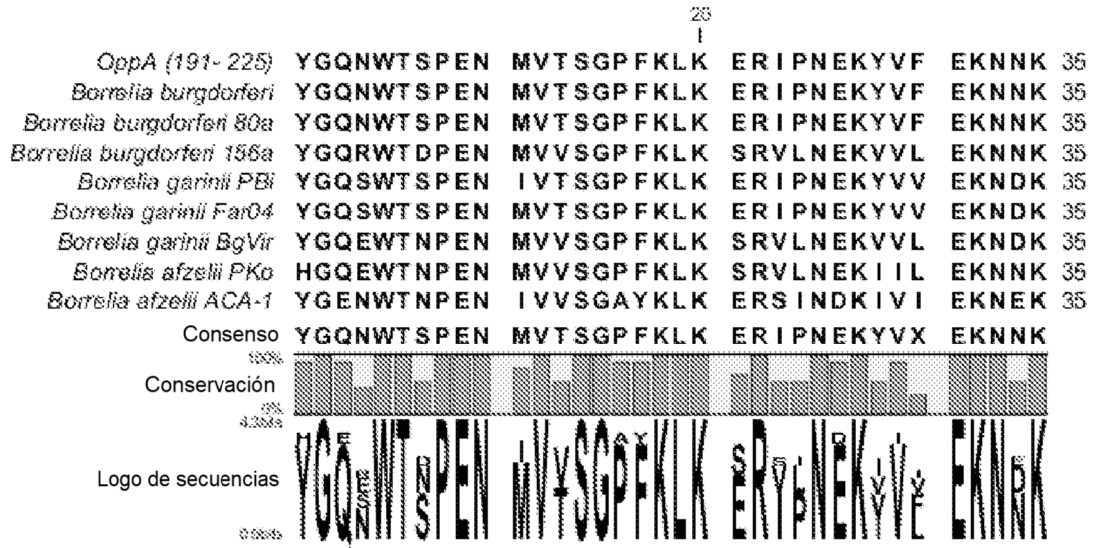


FIG. 9

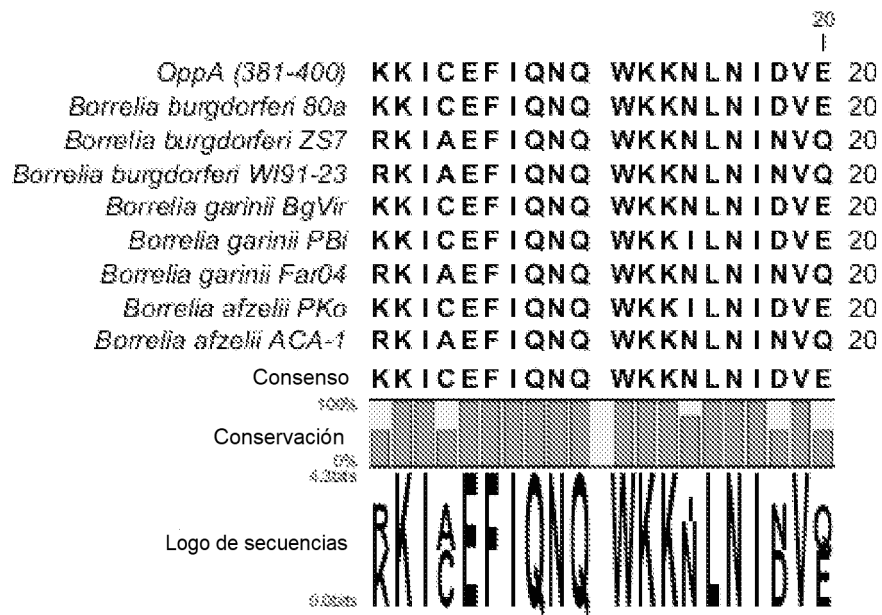


FIG. 10



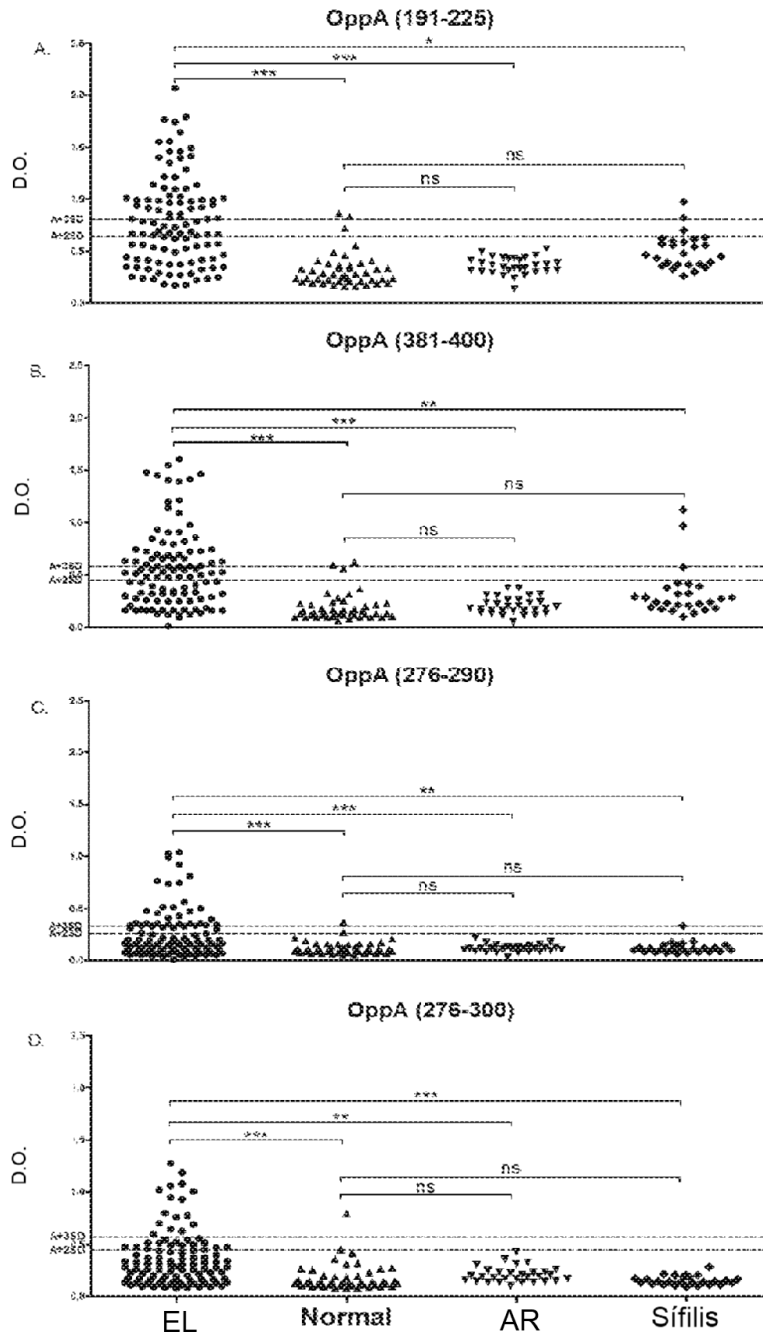


FIG. 11

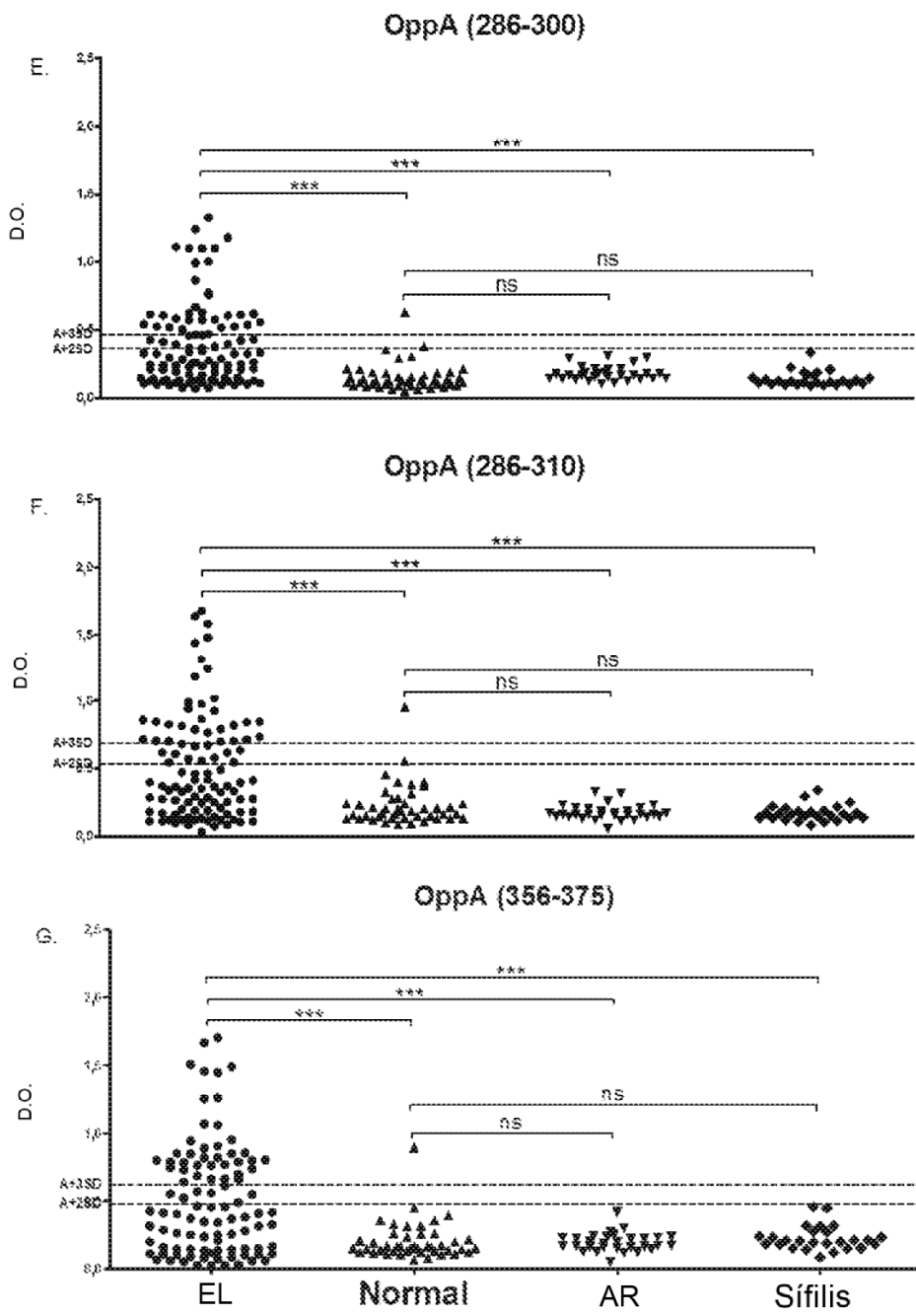


FIG. 11 (cont)

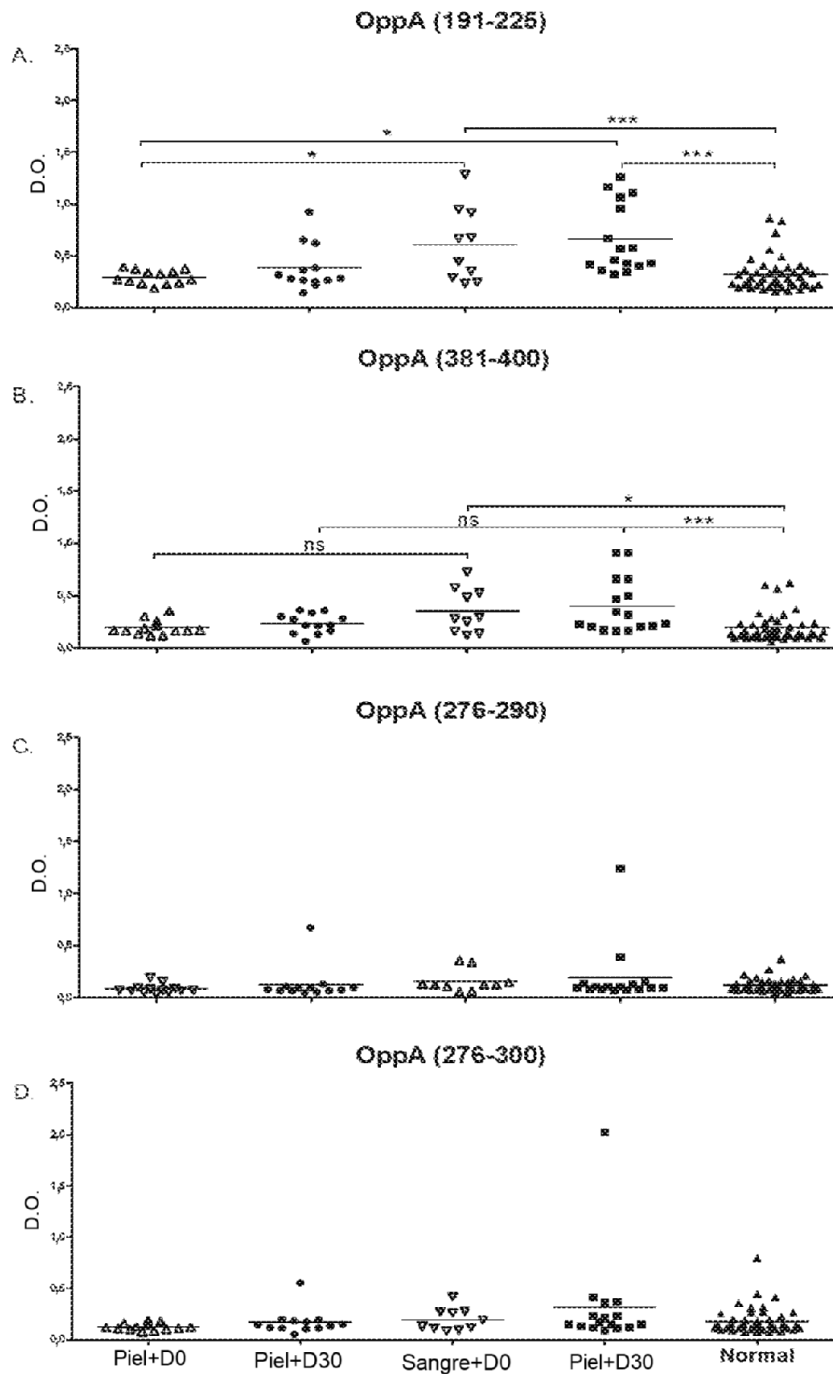


FIG. 12

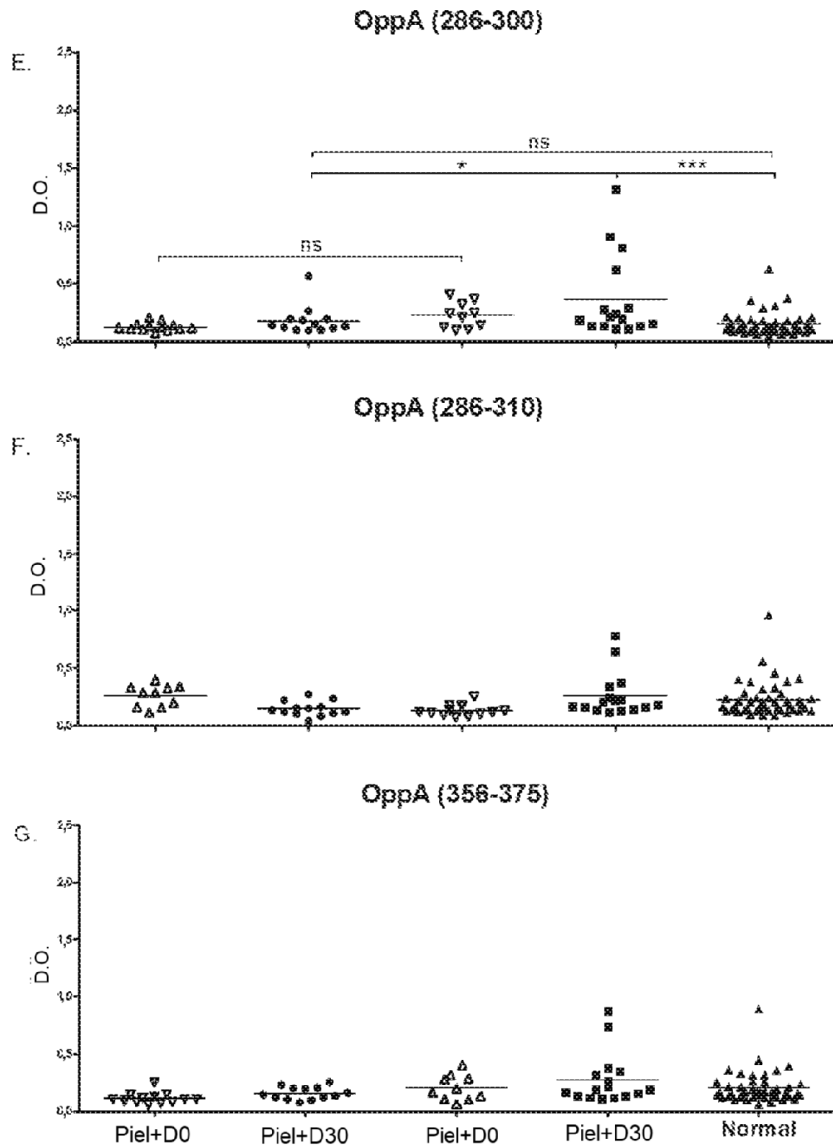


FIG. 12 (cont)