



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104487084 B

(45)授权公告日 2017.09.22

(21)申请号 201380035702.7

罗伯特·施勒格尔

(22)申请日 2013.07.08

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104487084 A

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(43)申请公布日 2015.04.01

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/668,627 2012.07.06 US

A61K 39/02(2006.01)

13/802,991 2013.03.14 US

C07K 14/20(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/12(2006.01)

2015.01.04

C12P 21/02(2006.01)

C12N 5/07(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/064403 2013.07.08

(56)对比文件

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/006226 EN 2014.01.09

HERTADI R 等.Unfolding Mechanics of Multiple OspA Substructures Investigated with Single Molecule Force Spectroscopy.《JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY》.2003,第333卷(第5期),993-1002.

(73)专利权人 瓦尔尼瓦奥地利有限责任公司

地址 奥地利维也纳

HERTADI R 等.Unfolding Mechanics of Multiple OspA Substructures Investigated with Single Molecule Force Spectroscopy.《JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY》.2003,第333卷(第5期),993-1002. (续)

(72)发明人 帕尔·科姆斯泰特

乌尔班·伦德贝格

安德烈亚斯·迈因克

马库斯·汉纳 沃尔夫冈·舒勒

本亚明·维策尔

克里斯托夫·赖尼施

布里吉特·格罗曼

审查员 田颖

权利要求书2页 说明书103页 附图5页

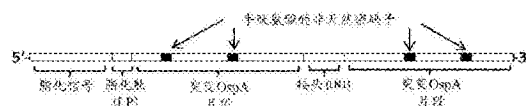
(54)发明名称

OspA的突变片段以及相关方法和用途

(57)摘要

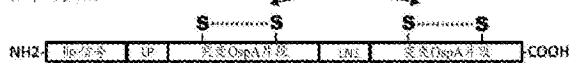
本发明涉及一种包含外表面蛋白A(OspA)的突变片段的多肽、一种编码所述多肽的核酸、一种包含所述多肽和/或所述核酸的药物组合物(具体地在治疗或预防疏螺旋体感染的方法中用作药剂)、一种治疗或预防疏螺旋体感染的方法以及一种免疫受试者的方法。

A. 编码突变OspA异二聚体多肽的核酸:



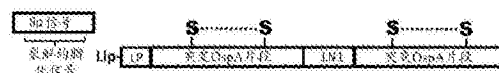
翻译

B. 中间多肽:



翻译后修饰

C. 最终脂化多肽:



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

LI H 等.Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab.《PNAS》.1997,第94卷(第8期),3584-3589.

KOIDE S 等.Structure-based Design of

a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA.《JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY》.2005,第350卷(第2期),290-299.

1. 多肽,其由脂化的氨基酸序列SEQ ID NO:186所组成。
2. 一种编码根据权利要求1所述的多肽的核酸。
3. 一种包含根据权利要求2所述的核酸分子的载体。
4. 一种包含如权利要求2所述的核酸或如权利要求3所述的载体的宿主细胞。
5. 如权利要求4所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为大肠杆菌。
6. 一种用于产生表达如权利要求1所述的多肽的细胞的方法,其包括用如权利要求3所述的载体转化或转染适合的宿主细胞。
7. 一种用于产生根据权利要求1所述的多肽的方法,其包括表达根据权利要求2所述的核酸。
8. 一种用于产生根据权利要求1所述的多肽的方法,其特征在于以下步骤:
 - a) 将编码所述多肽的载体引入到宿主细胞中;
 - b) 使所述宿主细胞在允许所述多肽表达的条件下生长;
 - c) 使所述宿主细胞均质化;以及
 - d) 使所述宿主细胞均浆经受纯化步骤。
9. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的多肽和/或根据权利要求2所述的核酸。
10. 如权利要求9所述的药物组合物,其还包含具有SEQ ID NO:190氨基酸序列的多肽。
11. 如权利要求9或10所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。
12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的赋形剂包括L-甲硫氨酸。
13. 根据权利要求9所述的药物组合物,其还包含来源于导致莱姆疏螺旋体病的疏螺旋体物种的至少一种另外的抗原。
14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述疏螺旋体物种是巴伐利亚疏螺旋体(*B.bavariensis*)或伽氏疏螺旋体(*B.garinii*)。
15. 如权利要求9所述的药物组合物,其还包含至少一种另外的抗原,其中所述至少一种另外的抗原来自蜱传病原体。
16. 如权利要求15所述的药物组合物,其中所述蜱传病原体选自包括以下各项的组:赫姆斯疏螺旋体、扁虱疏螺旋体、达氏疏螺旋体、宫本疏螺旋体、特里蜱疏螺旋体、立氏立克次体、澳洲立克次体、康诺尔立克次体、瑞士立克次体、帕氏立克次体、土拉弗朗西斯菌、嗜吞噬细胞无形体、腺热埃立希体、查菲埃立克体、伯纳特氏立克次氏体以及孤星疏螺旋体、蜱传脑炎病毒(TBEV)、科罗拉多蜱传热病毒(CTFV)、克里米亚-刚果出血热病毒(CCHFV)、库阿撒鲁尔森林病毒(KFDV)、波瓦森病毒、哈特兰病毒、鄂木斯克出血热病毒(OHFV)以及巴贝西虫某种。
17. 根据权利要求9所述的药物组合物,其特征在于其还包含免疫刺激物质。
18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述免疫刺激物质选自包括以下各项的组:聚阳离子聚合物,免疫刺激寡脱氧核苷酸(ODN),含有至少两个LysLeuLys基序的肽,神经活性化合物,氢氧化铝或磷酸铝,弗氏完全或不完全佐剂或其组合。
19. 如权利要求9所述的药物组合物,其中所述药物组合物为疫苗。
20. 如权利要求1所述的多肽在制备用于治疗或预防疏螺旋体感染之药剂中的用途。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述药剂是疫苗。

22. 根据权利要求20所述的用途,其中所述疏螺旋体感染是狭义伯氏疏螺旋体、或阿氏疏螺旋体感染。

OspA的突变片段以及其相关方法和用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于预防和治疗疏螺旋体 (*Borrelia*) 感染的组合物和方法。具体地说,本发明涉及一种包含外表面蛋白A (OspA) 的突变片段的多肽、一种编码所述多肽的核酸、一种包含所述多肽和/或所述核酸的药物组合物(具体地适于在治疗或预防疏螺旋体感染的方法中用作药剂)、一种治疗或预防疏螺旋体感染的方法以及一种免疫受试者的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在欧洲和北美,莱姆疏螺旋体病或莱姆病是最常报道的蜱传疾病。所述疾病是由虫媒传播的革兰氏阴性样螺旋体广义伯氏疏螺旋体 (*B.burgdorferi* s.l.) 引起,并且是可涉及多种器官或组织,导致皮肤、心脏、肌肉骨骼和神经学病症的感染。在大多数国家,莱姆疏螺旋体病不是应具报疾病并且没有关于年发病率的准确数据可用。在美国,致病物为狭义伯氏疏螺旋体 (*B.burgdorferi* s.s) 并且莱姆疏螺旋体病定位于东北部、大西洋中部和中北上部各州。在2010年,美国疾病控制与预防中心 (CDC) 报道了总计约30,000例莱姆疏螺旋体病。在欧洲,阿氏疏螺旋体 (*B.afzelii*) 和伽氏疏螺旋体 (*B.garinii*) 为莱姆疏螺旋体病的主要致病物,而且狭义伯氏疏螺旋体和巴伐利亚疏螺旋体 (*B.bavariensis*) 根据地理位置在较低程度上促成莱姆疏螺旋体病。莱姆疏螺旋体病的患病率在不同欧洲国家变化相当大,并且从西到东患病率总体逐渐增加。在多数欧洲国家,报道的莱姆疏螺旋体病病例数目自20世纪90年代早期开始逐渐增加(例如,捷克共和国、爱沙尼亚、立陶宛;参见 Lyme borreliosis in Europe, 2006年WHO报道),并且病例的地理分布也有所扩大。

[0004] 疏螺旋体属于螺旋体科家族,所述螺旋体科家族细分为医学上重要的密螺旋体 (*Treponema*) 属、钩端螺旋体 (*Leptospira*) 属和疏螺旋体属。广义伯氏疏螺旋体为约10-20 μ m长和0.2-0.5 μ m宽的螺旋状、运动活泼的革兰氏阴性菌,它在微量需氧的条件下生长。螺旋体细胞壁由细胞质膜组成,所述细胞质膜由肽聚糖和若干鞭毛围绕并且接着由松散结合的外膜围绕。

[0005] 莱姆疏螺旋体病通常分阶段地发生,各阶段的特征为出现缓解和恶化的不同临床表现。阶段1,早期感染,由皮肤的局部感染组成;数天或数周后为阶段2,播散性感染;数月至数年后为阶段3,持续性感染。然而,感染为可变的;一些患者仅患有皮肤的局部感染,而其他患者仅显示疾病后期表现,如关节炎。莱姆疏螺旋体病的不同临床症状也是由不同的广义伯氏疏螺旋物种感染引起。狭义伯氏疏螺旋体更经常地引起关节表现(关节炎)和心脏问题,阿氏疏螺旋体主要引起皮肤症状(游走性红斑EM和慢性萎缩性肢皮炎ACA),而伽氏疏螺旋体牵涉大部分莱姆神经疏螺旋体病病例。

[0006] 局部感染-感染的阶段1的最常见症状为游走性红斑,这出现于70%-80%的受感染人群中。这种皮肤损害之后通常为流感样症状,如肌痛、关节痛、头疼和发热。这些非特异性症状出现于50%的患有游走性红斑的患者中。

[0007] 播散性感染-在阶段2期间,细菌从感染部位移动到血流中,到达远端组织和器官。在此阶段出现的神经学、心血管和关节炎症状包括脑膜炎、颅神经病变和间歇性炎性关节

[0008] 持续性感染-感染的阶段3为慢性的并且发生于蜱叮咬之后数月至数年间。在北美最常见的症状为由狭义伯氏疏螺旋体感染所引起的风湿性关节炎。伽氏疏螺旋体引起的中枢神经系统的持续性感染在阶段3期间导致更严重的神经学症状,并且阿氏疏螺旋体引起的皮肤的持续性感染导致慢性萎缩性肢皮炎。

[0009] 在一些危险群体如农民、林业工人、徒步旅行者、跑步者或度假者中,如同在15岁以下的儿童和39岁与59岁之间的成人中一样,血清阳性率和疾病发病率增加,其中没有性别偏好。莱姆疏螺旋体病的这种增加的发病率与森林栖息地以及社会因素的改变有关。环境改变如森林片断化已导致啮齿动物捕食者如狐狸和猛禽类急剧减少,这进而导致老鼠数量增加,之后导致蜱数量增加。最近,不均衡的重新造林已增加鹿的数量并因此增加蜱的数量。郊区扩张和用于娱乐如露营和徒步旅行的林地区域使用的增加使人们与更大数目的疏螺旋体属蜱载体更深入地接触。所有这些因素共同导致疏螺旋体的更广泛分布和莱姆疏螺旋体病的更高发病率。

[0010] 抗微生物剂为治疗疏螺旋体感染的基本方法。所使用的抗生素取决于疾病的阶段、症状和患者对药物的过敏性。抗生素疗程的长度也取决于疾病的阶段和症状的严重性。早期莱姆疏螺旋体病通常用口服四环素如多西环素和半合成青霉素如阿莫西林或青霉素V来治疗。关节炎和神经学病症用高剂量静脉内青霉素G或头孢曲松治疗。高至30%的莱姆疏螺旋体病患者不展示疏螺旋体感染的早期特征症状,这使得诊断和治疗均成问题。抗生素疗程可为较长的(长至数月)并且有时为无效的,并且因此在疏螺旋体领域,特别是在晚期疾病期间很有争议。即使在有效治疗疏螺旋体的情况下,患者也可在数年过后患有衰弱疲劳、疼痛或神经症状,这些称为治疗后果莱姆病症状。通常,抗生素的使用可产生不希望的后果,如靶微生物发展出抗性。最终,抗生素疗法可有效地治愈莱姆疏螺旋体病,但没有对之后的感染提供保护。

[0011] 单价血清型1-OspA-基疫苗(LYMERix™)在美国得到批准并且在市场上销售,用于预防由狭义伯氏疏螺旋体引起的莱姆病。然而,在欧洲和其它地方的不同血清型中的OspA序列的异质性妨碍了利用来自仅一种血清型的基于OspA的疫苗进行有效保护。

[0012] 包含来自一种OspA血清型的近端部分连同来自另一种OspA血清型的远端部分的嵌合OspA分子在保留这两种亲本多肽的抗原特征的同时,可用于预防和治疗莱姆病或莱姆疏螺旋体病(WO2011/143617,WO2011/143623)。

[0013] 目前,在市场上没有用于莱姆疏螺旋体病的预防性药剂,并且因此在本领域中需要开发可提供针对存在于美国、欧洲和其它地方的疏螺旋体的有效保护的这种药剂,特别是需要开发可提供同时针对若干种疏螺旋体血清型的有效保护的药剂。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及一种包含疏螺旋体外表面蛋白A(OspA)的突变片段的多肽、一种编码所述多肽的核酸、一种包含此类核酸分子的载体以及一种包含此类载体的宿主细胞。此外,本发明提供一种用于产生此类多肽的方法和一种用于产生表达此类多肽的细胞的方法。另外,本发明提供特异性结合此类多肽的抗体;产生此类抗体的杂交瘤细胞;用于产生此类抗体的方法;包含此类多肽、核酸分子、载体或抗体的药物组合物;此类多肽、核酸分子、载体或抗体用于制备药剂或药物组合物(具体地用作疫苗或用于治疗或预防疏螺旋体感染的方法)的用途;用于诊断感染的方法和用于治疗或预防疏螺旋体感染的方法以及免疫受试者

的方法。

[0016] 开发用于预防莱姆疏螺旋体病的亚单位疫苗的努力大部分集中于使用疏螺旋体外表面蛋白A (OspA) 作为抗原。OspA蛋白仅在处于蜱载体肠内时由疏螺旋体表达。因此,通过疫苗接种产生的OspA抗体在体内不会对抗感染,而是在蜱摄食血液时进入其肠内。在肠内,抗体中和螺旋体并且阻断细菌从蜱的中肠迁移到唾液腺,即阻断疏螺旋体进入脊椎动物宿主所通过的路线。因此,OspA-特异性抗体防止疏螺旋体从蜱载体传递到人宿主中。

[0017] 来自狭义伯氏疏螺旋体菌株ZS7的脂化形式的OspA与氢氧化铝一起由SmithKline Beecham(现在为GlaxoSmithKline (GSK)) 商业开发为针对疏螺旋体的疫苗 (LYMErix™) 用于美国市场。在一年时间段内需要三个剂量的LYMErix™以用于最佳保护。在前两个剂量之后,针对莱姆疏螺旋体病的疫苗效力为49%,并且在第三个剂量之后为76%。然而,在LYMErix™商业可用之后不久,它就在2002年退出了市场。引用的原因为疫苗实际应用的问题,例如需要每年或每隔一年加强注射,以及这种预防方法与早期感染的抗生素治疗相比成本相对较高。此外,一个问题在于LYMErix™可由于与人蛋白的序列同源性而在群体亚组中引发自体免疫反应,尽管这并未得到证明。此外,这种疫苗并未提供针对临床上重要的疏螺旋体物种的交叉保护。

[0018] 因此,在一个实施方案中,本发明的目标在于提供一种用于预防莱姆疏螺旋体病的改进的疫苗。优选地,所述疫苗为容易生产的同时为保护性的、安全的且比现有疗法更有效的和/或提供针对多于一种疏螺旋体物种的保护。

[0019] 本发明的根本问题通过包含外表面蛋白A (OspA) 的突变片段的多肽得以解决,其中所述突变片段由疏螺旋体OspA蛋白的C-末端结构域组成并且与对应的野生型片段的不同之处至少在于至少一个二硫键的引入。

[0020] 意外的是,发现在突变片段中引入至少一个二硫键相对于包含野生型OspA片段的多肽而言增加了包含突变OspA片段的多肽的保护能力,如体内感染模型所示的。如实施例所示出的,在阿氏疏螺旋体OspA C-末端片段中引入至少一个二硫键相对于没有二硫键的野生型OspA片段而言增加了其保护能力。表2和表3所提供的数据表明了具有引入的二硫键的突变片段(“S2D1-5”)与野生型OspA片段(“S2D0”)相比的保护能力,因为与野生型OspA片段相比,在用突变OspA片段免疫之后更少的动物受到感染。一些测试的突变OspA片段提供与通过阳性对照抗原非脂化全长OspA蛋白所传达的保护比得上的保护。

[0021] 发明详述

[0022] 因此,在第一方面,本发明涉及一种包含外表面蛋白A (OspA) 的突变片段的多肽,其中所述突变片段由疏螺旋体OspA的C-末端结构域组成并且与对应的野生型片段不同之处至少在于至少一个二硫键的引入。

[0023] 术语广义伯氏疏螺旋体涵盖至少13种疏螺旋体物种(表A-1)。这些物种出现于不同的地理区域,并且以涉及蓖子硬蜱 (*Ixodes ricinus*) 复合物(也称为全沟硬蜱 (*Ixodes persulcatus*) 复合物)的蜱的地方性动物病周期生活在自然界中并且生活在广泛范围的动物宿主中。四种疏螺旋体物种为大部分人体感染的原因:狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体和伽氏疏螺旋体。三种其它物种卢西塔尼亚疏螺旋体 (*B. lusitaniae*)、比塞蒂疏螺旋体 (*B. bissettii*) 和斯柏曼疏螺旋体 (*B. spielmanii*) 偶尔在人体中检测到,但是它们在莱姆疏螺旋体病中的作用目前还不确定。仍在报道新的疏螺

旋体物种。

[0024] 表A-1.

致病物种(4)	主要蜱载体	位置
伯氏疏螺旋体 (狭义伯氏疏螺旋体)	肩突硬蜱(<i>Ixodes scapularis</i>) 太平洋硬蜱(<i>Ixodes pacificus</i>) 蓖子硬蜱 全沟硬蜱	美国东北/中北部 美国西部 欧洲 亚洲
伽氏疏螺旋体	蓖子硬蜱 全沟硬蜱	欧洲 亚洲
阿氏疏螺旋体	蓖子硬蜱 全沟硬蜱	欧洲 亚洲
巴伐利亚疏螺旋体	蓖子硬蜱 全沟硬蜱	欧洲 亚洲
最低程度致病或不致病物种(9)	主要蜱载体	位置
安德森疏螺旋体(<i>Borrelia andersonii</i>)	齿状硬蜱(<i>Ixodes dentatus</i>)	美国东部
比塞蒂疏螺旋体	刺须硬蜱(<i>Ixodes spinipalpis</i>) 太平洋硬蜱 蓖子硬蜱	美国西部 欧洲
法雷斯疏螺旋体(<i>Borrelia valaisiana</i>)	蓖子硬蜱 圆柱硬蜱(<i>Ixodes columnae</i>)	欧洲和亚洲
卢西塔尼亚疏螺旋体	蓖子硬蜱	欧洲
斯柏曼疏螺旋体	蓖子硬蜱	欧洲
日本疏螺旋体(<i>Borrelia japonica</i>)	卵形硬蜱(<i>Ixodes ovatus</i>)	日本
坦尼基疏螺旋体(<i>Borrelia tanukii</i>)	狸猫硬蜱(<i>Ixodes tanuki</i>)	日本
土德疏螺旋体(<i>Borrelia turdi</i>)	乌鸫硬蜱(<i>Ixodes turdus</i>)	日本
西尼伽疏螺旋体(<i>Borrelia sinica</i>)	全沟硬蜱	中国

[0026] 如以上详述的,疏螺旋体外表面蛋白A (OspA) 由于其作为疫苗候选物的可能性而成为特别引人关注的丰富的疏螺旋体免疫原性脂蛋白。广义伯氏疏螺旋体的OspA为具有约30kDa的分子量的并且在线性质粒上编码的碱性脂蛋白。OspA蛋白的一个重要方面为其N-末端脂化;即,N-末端半胱氨酸残基被具有C14与C19之间的链长度的具有或没有双键(增强OspA蛋白的免疫原性的特征)的脂肪酸取代。已显示免疫原性差的合成肽在脂化时诱导较强的抗体反应;例如,在共价连接至Pam₃Cys (Bessler和Jung, Research Immunology (1992) 143:548-552) 时,在通过信号序列指定的脂质连接合成的许多细菌脂蛋白的氨基端处发现脂肪酸取代。另外,显示Pam₃Cys部分在小鼠中部分凭借其与TLR-2的相互作用而增强对OspA的免疫反应(Yoder等(2003) Infection and Immunity 71:3894-3900)。因此,将预期OspA C-末端片段的脂化增强所述片段的免疫原性和保护能力。

[0027] 对在美国北部和欧洲获得的广义伯氏疏螺旋体的分离株的分析已揭示,OspA具有抗原性变异并且可基于血清学定义若干种不同的组。已报道了结合特异性N-末端和C-末端抗原决定簇的抗-OspA mAb。X-射线结晶学和NMR分析已用于鉴别OspA中的免疫学上重要的超变结构域并且已绘出C-末端氨基酸203-257的LA-2表位(Ding等, Mol. Biol. 302:1153-64, 2000)。先前的研究已显示在用OspA接种之后针对C-末端表位LA-2的抗体的产生与保护性免疫力相关联(Van Hoecke等 Vaccine (1996) 14(17-18):1620-6和Steere等, N Engl J Med (1998) 339:209-215)。针对LA-2的抗体显示阻断疏螺旋体从蜱传递到宿主(Golde等, Infect Immun (1997) 65(3):882-889)。这些研究表明OspA蛋白的C-末端部分可足以用于诱导保护性免疫力。应注意,OspA的C-末端部分的序列在疏螺旋体血清型之间的高保守性低于N-末端部分的高保守性(参见图1)。

[0028] 基于来自以上所列出的研究连同其它研究的信息,在本发明中使用包含C-末端部分的截短形式的OspA(在本文中也称为“OspA片段”或“单体”)。已证明这些截短形式的OspA具有比全长OspA蛋白低的保护性。然而,意外的是,在本发明的过程中发现在截短形式中引入二硫键(在本文中也称为“突变OspA片段”或“突变片段”)克服了这个缺点。虽然不限于特定机制,但是认为提高的保护性是由于增加的OspA片段稳定性,如在测量热稳定性的测定中所示的。

[0029] 根据本发明,突变OspA片段可源于任何疏螺旋体物种;然而,由于它们在医学领域(特别是对于人)的相关性,优选狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体以及伽氏疏螺旋体。在这点上,这四种疏螺旋体物种可根据其OspA血清型进一步分类,它们的OspA血清型已通过使用对相应OspA蛋白特异的单克隆抗体进行分析得以确定。导致大部分人疏螺旋体感染的血清型1-7连同其患病率示出在以下表A-2中。

[0030] 表A-2. 狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体以及伽氏疏螺旋体的血清型指示和患病率。从人脑脊液或皮肤中或从蜱载体中分离的疏螺旋体通过用小鼠单克隆抗体探测全细胞裂解物来按血清型分类,所述单克隆抗体各自对OspA的特定表位特异(如由Wilske等, J. of Clin Microbiol (1993) 31 (2): 340-350所述的并且由Baxter Bioscience在“Climate change effect on ticks and tick-borne diseases”, Brussels, 2009年2月06中提供的)。

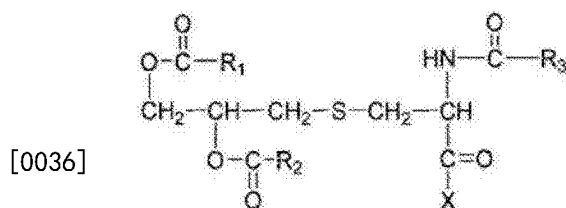
[0031]	疏螺旋体物种	通过mAb测试确定的OspA血清型	人疾病中的患病率	序列的菌株来源	Seq ID No:
	狭义伯氏疏螺旋体	1	11%	B31	20
	阿氏疏螺旋体	2	63%	K78	19
	伽氏疏螺旋体	3	1.5%	PBr	21
	巴伐利亚疏螺旋体	4	4%	PBi	22
	伽氏疏螺旋体	5	6%	PHEi	23
	伽氏疏螺旋体	6	13%	DK29	24
	伽氏疏螺旋体	7	0.5%	T25	25

[0032] 通过Li等(Proc Natl Acad Sci (1997) 94:3584-3589)确定来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA蛋白的结构。它由N-末端(β -链1至4)和中心 β -折叠(β -链5至14n[N-末端部分])、圆筒折叠1(β -链14c[C-末端部分]至16)、圆筒折叠2(β -链17至21)以及C-末端 α -螺旋组成。如贯穿本说明书使用的关于OspA的术语“OspA C-末端结构域”或“C-末端结构域”或“野生型片段”或“C-末端部分”应意指OspA的C-末端氨基酸序列,即OspA缺乏至少N-末端 β -折叠(包括 β -链1至4)。在来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA中,N-末端折叠由氨基酸17至70组成(在长16aa的脂化信号肽翻译后裂解之后)。

[0033] 本发明的C-末端OspA片段还可包括N-末端的脂化信号序列,例如来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA(SEQ ID NO:14)或OspB(SEQ ID NO:15)的氨基酸1至16的脂化信号序列、来自大肠杆菌的脂化信号序列(在本文中称为“1pp脂化信号”(SEQ ID NO:16))或例如如下所定义的任何其它信号序列。

[0034] 具有N-末端脂化信号序列(例如在初生OspA多肽上存在的那些)的蛋白质的脂化在大肠杆菌表达载体中分别通过酶二酰甘油转移酶、信号肽酶II和转酰酶的逐步作用来发生。第一步为将二酰甘油转移至未修饰的前脂蛋白的半胱氨酸巯基、然后通过信号肽酶II裂解信号肽并且最后使前脂蛋白的N-末端半胱氨酸的 α -氨基酰化。结果为一个脂质和用两个另外的脂质取代的甘油基在多肽N-末端半胱氨酸残基上的布置。在脂化期间裂解的脂化信号序列不存在于最终的多肽序列中。

[0035] 根据本发明,突变OspA片段可为脂化的蛋白质,也称脂蛋白,其中脂质部分连同甘油基也称为“Lip”。根据本发明,Lip包含连接至本发明的多肽的甘油和N末端半胱氨酸的一个至三个脂质,如C₁₄₋₂₀烷基和/或C₁₄₋₂₀烯基,或者优选地其中Lip为下式(I)的部分:



式(I),

[0037] 其中R₁、R₂或R₃中的一个为C₁₄-C₂₀烷基或烯基,并且其它每一个独立地为C₁₄-C₂₀烷基或C₁₄-C₂₀烯基,并且X为连接至式(I)所示的半胱氨酸残基的氨基酸序列。更优选地,Lip加上多肽的N-末端半胱氨酸为N-棕榈酰基-S-(2RS)-2,3-双-(棕榈酰氧基)丙基半胱氨酸(在本文中称为“Pam₃Cys”)并且通过半胱氨酸的羧基C连接至本发明的所述氨基酸序列。在以上式(I)中,R₁、R₂和R₃可为棕榈酰基部分并且X为连接至半胱氨酸残基的氨基酸序列。

[0038] 根据本发明,来自除狭义伯氏疏螺旋体B31之外的菌株的OspA的C-末端结构域由以下所定义:(i)至少缺乏氨基酸17至70和/或(ii)至少缺乏与来自狭义伯氏疏螺旋体B31的OspA的氨基酸17至70同源的N-末端结构域。另外,根据本发明的OspA C-末端结构域还可缺乏如Li和其同事(Li等,同上)所定义的另外的中央折叠部分,具体为另外的链,如来自任何疏螺旋体(具体为狭义伯氏疏螺旋体B31)的氨基酸17至82、93、105、118或119,优选17至129,更优选1至125、1至129或1至130的氨基酸部分,或者来自除狭义伯氏疏螺旋体B31之外的疏螺旋体物种的OspA蛋白的同源部分。

[0039] 在本发明的背景下,OspA C-末端结构域也被称为“OspA片段”或“OspA的片段”。

[0040] 在本发明的多肽背景下的和贯穿本说明书所使用的“突变片段”应意指OspA C-末端片段,如以上所定义的,它与野生型片段的不同之处至少在于可形成二硫键的至少两个引入的半胱氨酸。在不受该理论约束的情况下,假定二硫键稳定在有利于抗体结合诱导的构造中的片段。OspA的野生型C-末端片段的折叠显示与全长蛋白相比有所减小的温度稳定性(Koide等,Structure-based Design of a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA, J.Mol.Biol. (2005) 350:290-299)。对于本发明,狭义伯氏疏螺旋体B31OspA的C-末端结构域的序列已在计算机上进行分析,以确定用于可增强此C-末端结构域折叠的稳定性的引入的双硫桥的位置。分析的结果已抽调给其它疏螺旋体物种的同源OspA片段,假定折叠在各物种之间为保守的。

[0041] 通常,可通过引入一个或多个半胱氨酸残基来引入二硫键,其中二硫键(S-S桥)在两个半胱氨酸残基的巯醇基之间形成。如果二硫键是与存在于野生型片段中的半胱氨酸形成的,则仅需要引入一个半胱氨酸残基。可通过氨基酸添加或优选取代引入一个或优选两个半胱氨酸。

[0042] OspA突变片段还可包含相对于野生型的另外的突变。如以上详述的,OspA的结构和表面结构域为本领域已知的。因此,突变片段可包含另外的突变,具体为处于不在蛋白质表面上的位点和/或不涉及在免疫反应中并且因此不影响抗原能力的突变。这些可突变包括一个或多个氨基酸缺失(具体为小的(例如,多至10个氨基酸)缺失)、一个或多个氨基酸添加(具体为在C-末端或N-末端处)、一个或多个氨基酸取代(具体为一个或多个保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代的实例包括但不限于以下所列出的那些:

[0043]	Ala	Ser	Leu	Ile; Val
	Arg	Lys	Lys	Arg; Gln; Asn
	Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
	Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
	Cys	Ser	Ser	Thr
	Gln	Asn	Thr	Ser
	Glu	Asp	Trp	Tyr
	His	Asn; Gln	Tyr	Trp; Phe
	Ile	Leu; Val	Val	Ile; Leu

[0044] 优选的突变包括在选择片段部分中的改变,例如,其中与存在于狭义伯氏疏螺旋体中的人白细胞功能相关抗原(hLFA-1)具有序列相似性的序列被修饰例如被来自另一种疏螺旋体物种的OspA蛋白的同源性序列置换。此修饰的基本原理为减小诱导与人蛋白的免疫交叉反应的危险。也可能在最终片段或中间片段中添加用于脂化的信号序列,或添加标志蛋白(例如,用于鉴别或纯化)。

[0045] 在一些实施方案中,突变OspA片段的氨基酸序列与野生型片段具有60%、优选至少70%、更优选至少80%、更优选85%、更优选90%、甚至更优选95%的序列同一性。在另一个实施方案中,所述序列由于序列添加、缺失或取代而为至多10%、至多9%、至多8%、至多7%、至多6%、5%、4%、3%、2%、最优选至多1%不同。

[0046] 如本领域已知的并且如本文所用的,同一性为两个或更多个多肽序列之间的关系,如通过比较所述序列所确定的。在本领域中,同一性还意指多肽或多核苷酸序列之间的序列相关程度,视情况而定,如通过此类序列串之间的匹配所确定的。可容易计算同一性。虽然存在测量两个多核苷酸或两个多肽序列之间的多种方法,所述术语为技术人员所熟知的(例如,Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987)。设计确定同一性的优选方法以得到所测试序列之间的最大匹配。在计算机程序中编码确定同一性的方法。确定两个序列之间的同一性的优选计算机程序方法包括但不限于,GCG程序包(Devereux,J.等,1984)、BLASTP、BLASTN以及FASTA(Altschul,S.等,1990)。

[0047] 与突变OspA片段相比,在本发明的背景下的“野生型片段”涉及天然存在的疏螺旋体OspA的片段。野生型片段通过N-末端缺失来获得,但是它不包含内部缺失(除如本文详述的信号序列之外)或突变。相对于突变OspA片段,野生型片段由相同OspA部分(相同长度和相同链的OspA等)组成并且差异仅在于以上详述的突变,具体地在于至少一个二硫键的引入或具有人同源性的序列例如hLFA-1(参见上文)的置换。

[0048] 根据本发明的优选实施方案,本发明的多肽不包含具有至少一个引入的二硫键的全长OspA多肽或者不是由其组成。

[0049] 在本发明的一个实施方案中,突变OspA片段与相应野生型片段的不同之处仅在于引入至少一个,优选为恰好一个二硫键。

[0050] 多肽为通过肽键,在一些情况下也通过二硫键连接的氨基酸的单一线性聚合物。根据本发明,所述多肽也包含一个或多个翻译后修饰;即连接的生物化学官能团,如连接的乙酸酯、磷酸酯、脂质或碳水化合物,优选为连接至连同甘油的N末端半胱氨酸的一种或多种脂质,更优选为1至3个C₁₄-C₂₀烷基或烯基部分,甚至更优选为1至3个棕榈酰基,最优选为三个棕榈酰基(Pam₃)。

[0051] 根据本发明,本发明的多肽包含以上所述的突变OspA片段。根据本发明,它不包含(i)如以上所定义的N-末端折叠和(ii)任选的如以上所定义的一个或多个另外的中央折叠链。然而,所述多肽可包含一个或多个功能序列,如信号序列,例如脂化信号序列或翻译后修饰如脂化。

[0052] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的多肽由以下各项组成:(i)任选地通过例如如下所定义的接头连接的一个或多个突变OspA片段;和(ii)任选的与OspA异源的一个或多个氨基酸,具体为信号序列;以及(iii)任选的翻译后修饰如脂化。

[0053] 本发明的多肽具有保护能力。如以上详述的,将二硫键引入突变OspA片段中相对于包含没有二硫键的相应片段的多肽增加了所述多肽的保护能力。在一些实施方案中,相对于包含没有二硫键的相应片段的多肽,保护能力增加了至少10%、更优选至少20%、更优选至少30%、更优选至少40%、更优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%。

[0054] 术语保护能力描述保护受试者抵抗疏螺旋体感染的能力。关于本发明的多肽,保护能力涉及所述多肽诱导保护受试者抵抗疏螺旋体感染的免疫反应的能力。保护能力可通过以诱导针对所述多肽的免疫反应的方式向受试者施用所述多肽来测试。此后,用疏螺旋体攻击受试者。监测受试者对感染的反应。具体地,可确定在受试者中疏螺旋体的存在。例如,如果在受试者中不能检测到疏螺旋体,则所述多肽为保护性的。疏螺旋体的存在可通过检测疏螺旋体特异性核酸(例如,通过PCR)或疏螺旋体特异性抗体(例如,通过ELISA或蛋白质印迹)或通过检测疏螺旋体本身(例如,在生长培养基中培养器官或组织并且通过显微镜验证疏螺旋体的存在)来确定。具体地说,对于特定剂量,报道为百分比的保护能力("pc")如下定义:

[0055]
$$pc(\%) = [(总测试受试者数目 - 疏螺旋体感染受试者数目) / 总测试受试者数目] \times 100$$

[0056] 保护能力的差异(Δpc)可通过例如将具有二硫键的突变OspA片段的保护能力(pc)(pc [有键])与没有二硫键的OspA片段的保护能力(pc [无键])进行比较来确定。根据本发明,待比较的多肽的不同之处仅在于至少一个二硫键的引入。引入二硫键所引起的保护能力的改变(Δpc)如下确定:

[0057]
$$\Delta pc = (pc[样品] - pc[对照])$$

[0058] 例如,
$$\Delta pc = (pc[有键] - pc[无键])$$

[0059] 如果 Δpc 大于零(>0),假定所有其它参数(例如,剂量和测定)为相同的,那么样品

(例如,具有二硫键的突变OspA片段)的保护能力高于对照物(例如,没有二硫键的OspA片段)的保护能力。相反,如果 Δpc 小于零(<0)并且假定所有其它参数(例如,剂量和测定)为相同的,那么样品(例如,具有二硫键的突变OspA片段)的保护能力小于比较物(例如,没有二硫键的OspA片段)的保护能力。

[0060] 优选地,通过体内攻击测定评估本发明的多肽的保护能力,其中用本发明的多肽或安慰剂对照免疫的小鼠通过用皮下注射针(针攻击方法)或通过引入蜱载体(蜱攻击方法)引入到免疫受试者中的疏螺旋体攻击。

[0061] 针对所希望的疏螺旋体菌株(例如,伯氏疏螺旋体,菌株N40)通过以20倍与50倍感染剂量(ID_{50})之间的剂量将疏螺旋体皮下引入到小鼠中并且比较所攻击的小鼠中的感染速率来实施所述针攻击方法,所述小鼠是首先用第一方面的所述第一多肽免疫或者用适当安慰剂(阴性)对照如单独的缓冲液或佐剂免疫的。 ID_{50} 定义为50%攻击的小鼠受到感染的剂量。在多种细菌中测量疏螺旋体的剂量。攻击剂量可广泛地改变并且为菌株相关的;因此,首先必须通过攻击实验确定 ID_{50} 来评估菌株的毒力。在针攻击之后四周,收集血液和组织以用于确定感染状态的读出方法。这些读出方法可为,例如如本文所述的用于鉴别疏螺旋体的VlsE ELISA(对于血清)或qPCR(对于收集的组织),或者其它方法。

[0062] 通过向用第一方面的所述第一多肽免疫的小鼠应用感染疏螺旋体(例如,阿氏疏螺旋体,菌株IS1)的至少一种蜱若虫(例如,蓖子硬蜱);以及b)向用第一方面的所述第二多肽免疫的第二小鼠应用至少一种感染的蜱若虫;以及c)通常在攻击之后六周比较两种小鼠的感染速率来实施蜱攻击方法。优选地,每种待测试的多肽用一组小鼠进行测定或测试。在实施例中也描述并说明了适合的测试。可以对于血清使用VlsE ELISA或者对于收集的组织使用qPCR或者使用其它适合方法进行感染状态的评估。

[0063] 在本发明的优选实施方案中,本发明的产品例如像包含具有二硫键的突变OspA片段的本发明的多肽,以30 μ g、优选10 μ g、优选5.0 μ g、优选1.0 μ g、优选0.3 μ g或更低的剂量向受试者施用3次,它具有50%或更大、优选60%或更大、更优选70%或更大、更优选80%或更大、更优选90%或更大、甚至更优选95%或更大、最优选99%或更大的保护能力。在一个实施方案中,以体内攻击方法,优选蜱攻击方法,更优选针攻击方法(例如,如实施例中所描述的)评估保护能力。意外地观察到,用一种血清型的OspA突变片段免疫可提供针对另一种血清型的交叉保护(实施例4,表4)。基于此发现,可预期本发明的多肽的剂量甚至可进一步减小。

[0064] 在一个优选的实施方案中,当以30 μ g、优选10 μ g、优选5.0 μ g、优选1.0 μ g、优选0.3 μ g或更低的剂量向受试者施用3次时,本发明的包含具有二硫键的突变OspA片段的多肽与安慰剂(阴性)对照之间的保护能力差异(Δpc)为至少50%,特别是至少60%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选90%、甚至更优选95%、最优选至少95%。

[0065] 在本发明的一个优选的实施方案中,C-末端结构域被定义为由OspA蛋白的至少C-末端150个氨基酸组成的片段。在一个实施方案中,C-末端结构域的长度为140个与152个氨基酸之间。在另一个实施方案中,C-末端结构域由OspA蛋白的不超过最后152个氨基酸,优选最后151个氨基酸,更优选最后150个氨基酸组成。在一个替代实施方案中,C-末端结构域由OspA蛋白的不少于最后140个氨基酸,优选最后141个氨基酸,优选最后142个氨基酸,最优选最后143个氨基酸组成。OspA蛋白的最后氨基酸在本文中被定义为OspA蛋白的最C-末

端连续氨基酸序列。

[0066] 在另一个实施方案中,疏螺旋体OspA蛋白的C-末端结构域包含以下各项,基本上由其组成或由其组成:(i) 来自阿氏疏螺旋体菌株K78的OspA的位置126、131或130至位置273的氨基酸或者(ii) 来自除阿氏疏螺旋体菌株K78之外的疏螺旋体菌株的OspA的氨基酸的同源结构域。

[0067] 本发明的多肽可包含以下各项或基本上由其组成或由其组成:(i) 任选地通过例如如下所定义的接头连接的这些突变片段中的一个或多个;以及(ii) 任选的与OspA异源的一个或多个氨基酸,具体地用于翻译后修饰如脂化的信号序列或位点;以及(iii) 任选的翻译后修饰,如脂化。

[0068] 根据本发明,本发明的多肽可包含以下各项或基本上由其组成或由其组成:如本文所定义的元件,具体地一种或多种突变OspA片段;以及任选的一个或多个另外的元件,如异源结构域、接头肽、用于脂化的信号序列或位点。在此背景下“基本上由…组成”意指所述元件可相对于以上序列具有一些小的氨基酸改变,如氨基酸添加、取代或缺失,优选涉及如本文所定义的元件的氨基酸的至多10%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0069] 根据本发明,将至少一个二硫键引入到OspA片段中。这可优选通过将至少1个或2个半胱氨酸,特别是2个半胱氨酸引入到所述片段中以便允许形成至少一个二硫键来实现。如果在所述片段中另一个半胱氨酸可用于二硫键,则可仅引入一个半胱氨酸。然而,优选引入两个半胱氨酸。所述半胱氨酸通过氨基酸添加或取代,优选取代来引入。在添加的情况下,将半胱氨酸插入到两个氨基酸之间的氨基酸序列中,而在取代的情况下用半胱氨酸置换一个氨基酸。

[0070] 根据本发明,OspA可来自任何疏螺旋体菌株,具体地来自本文所指定的那些,如狭义伯氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、安德森疏螺旋体(*B. andersoni*)、比塞蒂疏螺旋体、法雷斯疏螺旋体、卢西塔尼亚疏螺旋体、斯柏曼疏螺旋体、日本疏螺旋体、坦尼基疏螺旋体、土德疏螺旋体或西尼伽疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体,优选来自狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体或伽氏疏螺旋体。优选地,OspA来自阿氏疏螺旋体,具体为菌株K78,OspA血清型2 (SEQ ID NO:19);狭义伯氏疏螺旋体,具体为菌株B31,OspA血清型1 (SEQ ID NO:20);伽氏疏螺旋体,具体为菌株PBr,OspA血清型3 (SEQ ID NO:21);巴伐利亚疏螺旋体,具体为菌株PBi,OspA血清型4 (SEQ ID NO:22);伽氏疏螺旋体,具体为菌株PHei,OspA血清型5 (SEQ ID NO:23);伽氏疏螺旋体,具体为菌株DK29,OspA血清型6 (SEQ ID NO:24) 或伽氏疏螺旋体,具体为菌株T25,OspA血清型7 (SEQ ID NO:25)。这些OspA蛋白的氨基酸序列(全长)在以下给出。

[0071] 表A-3. 来自选择的疏螺旋体物种菌株的OspA序列的登录号。缩写:Baf=阿氏疏螺旋体,Bbu=狭义伯氏疏螺旋体,Bga=伽氏疏螺旋体,Bsp=斯柏曼疏螺旋体,Bbi=比塞蒂疏螺旋体,Bva=法雷斯疏螺旋体,Btu=特氏疏螺旋体(*Borrelia turicatae*),Bdu=达氏疏螺旋体(*Borrelia duttonii*),Blu=卢西塔尼亚疏螺旋体,Bja=日本疏螺旋体,gb=基因库,emb=EMBL,tr=UniProt/tremble,sp=UniProt/Swissprot,prf=蛋白质研究基金(Protein Research Foundation),dbj=日本DNA数据库(DNA Databank of Japan)(DDBJ),pdb=蛋白质数据库(Protein Data Bank),db=数据库

[0072]

生物体_菌株	db[保藏版本]	生物体_菌株	db[保藏版本]	生物体_菌株	db[保藏版本]
Bbu_156a (血清型1)	gb ACI33776.1	Bbu_K48	emb CAA44492.1	Bga_Mng4702	gb ABF29559.1
Baf_K78 (血清型2)	emb CAA49828.1	Bbu_N40	gb ACS94765.1	Bga_N34	emb CAB64763.1
Bga_PBr (血清型3)	emb CAA56549.1	Bbu_POA3N6.1	sp POA3N6.1	Bga_Nov1006	gb ACD02016.1
Bga_PBi (血清型4)	emb CAA56550.1	Bbu_PBo	emb CAA56468.1	Bga_Nov105	gb ABF29551.1
Bbu_PHei (血清型5)	tr Q06228	Bbu_PBre	emb CAA59742.1	Bga_Nov14506	gb ACD02013.1
Bbu_DK29 (血清型6)	emb CAA45010.1	Bbu_PHei	emb CAA56544.1	Bga_Nov14606	gb ACD02017.1
Bga_T25 (血清型7)	emb CAA56547.1	Bbu_PKa	emb CAA56467.1	Bga_Nov2005	gb ABF29553.1
Baf_ACA-1	gb ACI73559.1	Bbu_PKo	emb CAA46550.1	Bga_Nov2006	gb ACD02018.1
Baf_K78	(测序的)	Bbu_Potl_B1	emb CAB64754.1	Bga_Nov3305	gb ABF29554.1
Baf_Khab_625	gb AAR96311.1	Bbu_Potl_B2	emb CAB64755.1	Bga_Nov405	gb ABF29552.1
Baf_Khab2-Sakh	gb AAP94134.1	Bbu_Potl_B3	emb CAB64756.1	Bga_Nov7006	gb ACD02014.1
Baf_Khab470	gb AAO91923.1	Bbu_PTre	emb CAA56471.1	Bga_Nov9906	gb ACD02015.1
Baf_Khab505	gb AAO91925.1	Bbu_PWudl	emb CAA56469.1	Bga_PBi	gb AAT93773.1
Baf_LU192	(测序的,部分)	Bbu_PWudl/6	emb CAA56470.1	Bga_PBr	emb CAA56549.1
Baf_Mng3602	gb ABF29573.1	Bbu_PWudl	emb CAA56546.1	Bga_Q1HLH6	gb ABF29564.1
Baf_Mng4302	gb ABF29574.1	Bbu_Q04851.1	sp Q04851.1	Bga_T25	emb CAA56547.1
Baf_Mng6702	gb ABF29578.1	Bbu_Q04968.1	sp Q04968.1	Bga_Tist	emb CAA59727.1
Baf_Mng702	gb ABF29572.1	Bbu_Q09086.1	sp Q09086.1	Bga_TN	emb CAA56545.1
Baf_Nov1105	gb ABF29569.1	Bbu_Q09087.1	sp Q09087.1	Bga_Tom1003	gb ABF29564.1
Baf_Nov11506	gb ACD02019.1	Bbu_Q44738	tr Q44738	Bga_Tom1805	gb ABF29567.1
Baf_Nov3005	gb ABF29570.1	Bbu_Q44956	emb CAA56937.1	Bga_Tom203	gb ABF29562.1
Baf_POA3N7.1	sp POA3N7.1	Bbu_Q44962	dbj BAA06133.1	Bga_Tom2903	gb ABF29565.1
Baf_PHy	emb CAA59724.1	Bbu_Q45039	emb CAR95556.1	Bga_Tom3005	gb ABF29568.1
Baf_PKo	gb ABH02138.1	Bbu_Q45040	tr Q45040	Bga_Tom303	gb ABF29563.1
Baf_PLe	emb CAA59970.1	Bbu_S-1-10	gb AAB96354.1	Bga_Tom3101	gb ABF29557.1
Baf_PLi7	emb CAA59725.1	Bbu_T.R.O.	emb CAA46549.1	Bga_Tom3803	gb ABF29566.1
Baf_PLud	emb CAA59726.1	Bbu_T255	emb CAA59730.1	Bga_Tom5102	gb ABF29560.1
Baf_Tom1103	gb ABF29581.1	Bbu_UK	emb CAB64758.1	Bga_Tom5202	gb ABF29561.1
Baf_Tom1303	gb ABF29582.1	Bbu_VS116	emb CAB64757.1	Bga_Tom7105	gb ABF29556.1
Baf_Tom1503	gb ABF29583.1	Bbu_V5461	emb CAA82329.1	Bga_VS100	emb CAB64765.1
Baf_Tom2303	gb ABF29584.1	Bbu_WI91-23	ref ZP_03091138.1	Bga_VS307	emb CAB64764.1
Baf_Tom2403	gb ABF29585.1	Bbu_ZQ1	emb CAA01704.1	Bga_WAB500	emb CAA59728.1
Baf_Tom2504	gb ABF29577.1	Bbu_ZS7	gb ACK74228.1	Bja_Cow611	emb CAB64759.1
Baf_Tom2803	gb ABF29586.1	Bga_BgVir-1	gb ABF29555.1	Bja_F63	emb CAB64760.1
Baf_Tom3401	gb ABF29571.1	Bga_Far04	ref ZP_03328706.1	Bja_HO14	emb CAB64762.1
Baf_Tom3703	gb ABF29587.1	Bga_FujiP2	gb AAA92301.1	Bja_IKA2	emb CAB64761.1
Baf_Tom4703	gb ABF29588.1	Bga_IP90	emb CAJ75754.1	Btu_A8D057	gb ABR22627.1

[0073]

Baf_Tom5403	gb ABF29575.1	Bga_Isp90	emb CAJ75754.1	Blu_A8D060	gb ABR22625.1
Baf_Tom603	gb ABF29579.1	Bga_JEM1	gb AAB81567.1	Blu_A8D075	gb ABR22628.1
Baf_Tom6303	gb ABF29576.1	Bga_JEM2	gb AAB81569.1	Blu_A8D079	gb ABR22629.1
Baf_Tom703	gb ABF29580.1	Bga_JEM3	gb AAB81571.1	Blu_ABR22624.1	gb ABR22624.1
Baf_XJ23	gb AAB95225.1	Bga_JEM4	dbj BAA19222.1	Blu_ABR22626.1	gb ABR22626.1
Bbu_118a	ref ZP_02720644.1	Bga_JEM5	gb AAB81573.1	Bsp_A145	gb AAB16455.1
Bbu_156a	gb ACL33776.1	Bga_JEM6	gb AAB81575.1	Btu_Ya501	dbj BAA32513.1
Bbu_19857	emb CAA48196.1	Bga_JEM7	gb AAB81577.1	Bva_AR-2	gb AAF00571.1
Bbu_2005348A	prf 2005348A	Bga_JEM8	gb AAB81579.1	Bva_M19	gb AAF00573.1
Bbu_2005348B	prf 2005348B	Bga_Khab3155	gb AAR96310.1	Bva_M49	gb AAF00574.1
Bbu_297	emb CAA59729.1	Bga_Khab550	gb AAR96306.1	Bva_M52	gb AAF00575.1
Bbu_29805	ref ZP_03092996.1	Bga_Khab616	gb AAR96307.1	Bva_M53	gb AAF00576.1
Bbu_64b	ref ZP_03097520.1	Bga_Khab648	gb AAR96308.1	Bva_M7	gb AAF00572.1
Bbu_72a	ref ZP_02724465.1	Bga_Khab722	gb AAR96309.1	Bva_Q9RM88	emb CAB56150.1
Bbu_80a	ref ZP_03088001.1	Bga_Khab73	gb AAP94125.1	Bva_QL7SP1	gb ACA13516.1
Bbu_94a	ref ZP_02725946.1	Bga_Khab24	gb AAP94126.1	Bva_QSD54	gb ACA13517.1
Bbu_AAB23809.1	gb AAB23809.1	Bga_Khab31	gb AAP94127.1	Bva_QSYSP3	gb ACA13518.1
Bbu_AAB23810.1	gb AAB23810.1	Bga_Khab31a	gb AAP94128.1	Bva_QSYSP4	gb ACA13519.1
Bbu_829	gb AAA18508.1	Bga_Khab-466	gb AAP94129.1	Bva_QTMP2	gb ACA13520.1
Bbu_831	gb AAC66260.1	Bga_Khab489	gb AAP94130.1	Bva_QX-S13	gb ACA13521.1
Bbu_Bo126	ref ZP_02531917.1	Bga_Khab5-Sakh	gb AAO91932.1	Bva_UK	gb AAF00570.1
Bbu_C-1.11	gb AAB96351.1	Bga_Khab506	gb AAP94132.1	Bva_VS116	gb AAF00569.1
Bbu_CA-11.2a_1	ref ZP_03094587.1	Bga_Khab516	gb AAP94133.1	Bsp_10MT	dbj BAA32516.1
Bbu_CA-11.2a_2	ref ZP_03094587.1	Bga_Khab721	gb AAP94131.1	Bsp_5MT	dbj BAA32515.1
Bbu_CA-11.2a_CA-11.2a	ref ZP_03094587.1	Bga_Khab2119	gb AAO91928.1	Bsp_Am501	dbj BAA32514.1
Bbu_CAA00316.1	emb CAA00316.1	Bga_Khab2559	gb AAO91929.1	Bsp_LV5	gb AAB96353.1
Bbu_CAA42842.1	emb CAA42842.1	Bga_Khab2560	gb AAO91930.1	Bsp_PAnz	emb CAJ43585.1
Bbu_CAA44258.1	emb CAA44258.1	Bga_Khab2594	gb AAO91931.1	Bsp_PHaP_PHaP	emb CAJ43582.1
Bbu_CAR95597.1	emb CAR95597.1	Bga_Khab430	gb AAO91919.1	Bsp_PJes	emb CAJ43586.1
Bbu_DK1	gb AAA22955.1	Bga_Khab448	gb AAO91920.1	Bsp_PMai	emb CAJ43584.1
Bbu_DK29	emb CAA45010.1	Bga_Khab457	gb AAO91921.1	Bsp_PMew	emb CAJ43583.1
Bbu_DK6_Danish_isolate	emb CAA58601.1	Bga_Khab468	gb AAO91922.1	Bsp_PSigli	emb CAJ43581.1
Bbu_G2	gb AAA88846.1	Bga_Khab492	gb AAO91924.1	Bsp_SV1	ref ZP_03095680.1
Bbu_G25	emb CAA82328.1	Bga_Khab511	gb AAO91926.1	Bbi_25015	gb AAB21761.1
Bbu_H.E.	emb CAA46551.1	Bga_Khab560	gb AAO91927.1	Bbi_DM127	emb CAB54766.1
Bbu_H819	gb AAC18776.1	Bga_LV4	gb AAB96352.1	Bbi_Q9Q087.1	gb AAB21761.1

[0074] 根据本发明,可在引入至OspA片段的任何位置以允许或支持适当的片段折叠的半胱氨酸之间形成二硫键。可如以上详述的基于OspA的已知结构选择所述位置。在一个优选的实施方案中,本发明的多肽包含在以下位置之间的至少一个二硫键:位置182+/-3中任一一个与位置269+/-3中任一一个之间(二硫键类型1);位置182+/-3中任一一个与位置272+/-3中任一一个之间(二硫键类型2);位置244+/-3中任一一个与位置259+/-3中任一一个之间(二硫键类型3);位置141+/-3中任一一个与位置241+/-3中任一一个之间(二硫键类型4);位置165+/-3中任一一个与位置265+/-3中任一一个之间(二硫键类型5);位置185+/-3中任一一个与位置272+/-3中任一一个之间(二硫键类型6);位置199+/-3中任一一个与位置223+/-3中任一一个之间(二硫键类型7);位置243+/-3中任一一个与位置262+/-3中任一一个之间(二硫键类型8);位置184+/-3中任一一个与位置204+/-3中任一一个之间(二硫键类型9);位置201+/-3中任一一个与位置214+/-3中任一一个之间(二硫键类型10);位置246+/-3中任一一个与位置259+/-3中任一一个之间(二硫键类型11);和/或位置167+/-3中任一一个与位置178+/-3中任一一个之间(二硫键类型12),所述位置为阿氏疏螺旋体,具体地阿氏疏螺旋体K78血清型20spA的位置,或者为来自除阿氏疏螺旋体之外的疏螺旋体物种的OspA的同源氨基酸位置,所述除阿氏疏螺旋体之外的疏螺旋体物种例如狭义伯氏疏螺旋体,具体地菌株B31,血清型1;伽氏疏螺旋体,具体地菌株PBr,血清型3;巴伐利亚疏螺旋体,具体地菌株PBi,血清型4;伽氏疏螺旋体,具体地菌株PHei,血清型5;伽氏疏螺旋体,具体地菌株DK29,血清型6;或伽氏疏螺旋体,具体地菌株

T25,血清型7。

[0075] 更具体地说,本发明的多肽包含在以下位置之间中任一个的至少一个二硫键:位置182与269之间(二硫键类型1);位置182与272之间(二硫键类型2);位置244与259之间(二硫键类型3);位置141与241之间(二硫键类型4);位置165与265之间(二硫键类型5);位置185与272之间(二硫键类型6);位置199与223之间(二硫键类型7);位置243与262之间(二硫键类型8);位置184与204之间(二硫键类型9);位置201与214之间(二硫键类型10);位置246与259之间(二硫键类型11);和/或位置167与178之间(二硫键类型12),所述位置为阿氏疏螺旋体,具体地阿氏疏螺旋体K78血清型20spA的位置,或者为来自除阿氏疏螺旋体之外的疏螺旋体的OspA的同源氨基酸位置,所述除阿氏疏螺旋体之外的疏螺旋体例如狭义伯氏疏螺旋体,具体地菌株B31,血清型1;伽氏疏螺旋体,具体地菌株PBr,血清型3;巴伐利亚疏螺旋体,具体地菌株PBi,血清型4;伽氏疏螺旋体,具体地菌株PHei,血清型5;伽氏疏螺旋体,具体地菌株DK29,血清型6;或伽氏疏螺旋体,具体地菌株T25,血清型7。

[0076] 表A-4.具有命名的二硫键类型和血清型20spA蛋白中的半胱氨酸取代的位置。

二硫键类型	命名	阿氏疏螺旋体 K78 血清型 2 OspA 中的半胱氨酸位置
野生型序列	D0	无半胱氨酸取代
1	D1	182 和 269
2	D2	182 和 272
3	D3	244 和 259
4	D4	141 和 241
5	D5	165 和 265
6	D6	185 和 272
7	D7	199 和 223
8	D8	243 和 262
9	D9	184 和 204
10	D10	201 和 214
11	D11	246 和 259
12	D12	167 和 178

[0078] 甚至更优选的为二硫键类型1至5,特别是二硫键类型1至4。

[0079] 应注意:

[0080] 位置182+/-3为位置179、180、181、182、183、184或185的缩写,优选为182。

[0081] 位置269+/-3为位置266、267、268、269、270、271或272的缩写,优选为269。

[0082] 位置272+/-3为位置269、270、271、272、273、274或275的缩写,优选为272。

[0083] 位置244+/-3为位置241、242、243、244、245、246或247的缩写,优选为244。

[0084] 位置259+/-3为位置256、257、258、259、260、261或262的缩写,优选为259。

[0085] 位置141+/-3为位置138、139、140、141、142、143或144的缩写,优选为141。

[0086] 位置241+/-3为位置238、239、240、241、242、243或244的缩写,优选为241。

[0087] 位置165+/-3为位置162、163、164、165、166、167或168的缩写,优选为165。

[0088] 位置265+/-3为位置262、263、264、265、266、267或268的缩写,优选为265。

[0089] 位置185+/-3为位置182、183、184、185、186、187或188的缩写,优选为185。

- [0090] 位置199+/-3为位置196、197、198、199、200、201或202的缩写,优选为199。
- [0091] 位置223+/-3为位置220、221、222、223、224、225或226的缩写,优选为223。
- [0092] 位置243+/-3为位置240、241、242、243、244、245或246的缩写,优选为143。
- [0093] 位置262+/-3为位置259、260、261、262、263、264或265的缩写,优选为262。
- [0094] 位置184+/-3为位置181、182、183、184、185、186或187的缩写,优选为184。
- [0095] 位置204+/-3为位置201、202、203、204、205、206或207的缩写,优选为204。
- [0096] 位置201+/-3为位置198、199、200、201、202、203或204的缩写,优选为201。
- [0097] 位置214+/-3为位置211、212、213、214、215、216或217的缩写,优选为214。
- [0098] 位置246+/-3为位置243、244、245、246、247、248或249的缩写,优选为246。
- [0099] 位置167+/-3为位置164、165、166、167、168、169或170的缩写,优选为167。
- [0100] 位置178+/-3为位置175、176、177、178、179、180或181的缩写,优选为178。
- [0101] 在一个优选的实施方案中,突变片段源于阿氏疏螺旋体菌株K78血清型2 (SEQ ID NO:18) 的OspA的野生型序列的位置126、130或131至位置273的氨基酸,并且不同之处仅在于至少一个二硫键的引入,具体地说其中所述至少一个二硫键处于位置182与269之间(二硫键类型1);位置182与272之间(二硫键类型2);位置244与259之间(二硫键类型3);位置141与241之间(二硫键类型4);位置165与265之间(二硫键类型5);位置185与272之间(二硫键类型6);位置199与223之间(二硫键类型7);位置243与262之间(二硫键类型8);位置184与204之间(二硫键类型9);位置201与214之间(二硫键类型10);位置246与259之间(二硫键类型11);和/或位置167与178之间(二硫键类型12),或者处于来自除阿氏疏螺旋体之外的疏螺旋体物种的OspA的同源片段和位置,所述来自除阿氏疏螺旋体之外的疏螺旋体物种例如狭义伯氏疏螺旋体,具体为菌株B31,血清型1;伽氏疏螺旋体,具体为菌株PBr,血清型3;巴伐利亚疏螺旋体,具体为菌株PBi,血清型4;伽氏疏螺旋体,具体为菌株PHei,血清型5;伽氏疏螺旋体,具体为菌株DK29,血清型6;或伽氏疏螺旋体,具体为菌株T25,血清型7。
- [0102] 在一个更优选的实施方案中,突变片段具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:169、SEQ ID NO:170、SEQ ID NO:171、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:174、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:178以及与具有SEQ ID NO:2至13的序列中的至少一个具有80%,更优选85%,更优选90%,甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列,其中半胱氨酸并未被置换。关于突变和序列同一性的其它细节在上文给出。
- [0103] 如以上详述的,本发明的多肽可包含信号序列。已显示,脂化赋予OspA佐剂特性。因此,优选脂化形式的本发明的多肽或者包含脂化信号的多肽。在一个优选的实施方案中,本发明的多肽包含脂化信号,优选疏螺旋体外表面蛋白OspA或OspB(分别为SEQ ID NO:14和15)的脂化信号或者更优选地大肠杆菌lpp脂化信号序列(SEQ ID NO:16)。包含脂化信号的本发明的OspA片段在加工期间被脂化并且脂化信号肽被裂解掉。因此,信号肽不再存在于成熟的脂化蛋白中。
- [0104] 在N-末端用“Lip”标记根据本发明的脂化蛋白,以指示将3个脂肪酸基团和一个甘油添加到所述多肽中(参见图4)。如以上所述的适合的脂化信号包括MKKYLLGIGLILALIA (SEQ ID NO:14)、MRL LIGFALALALIG (SEQ ID NO:15) 和MKATKLVLGAVILGSTLLAG (SEQ ID NO:16)。因为脂质部分和甘油连接至存在于全长野生型OspA蛋白的N-末端半胱氨酸残基,

所以用于脂化的OspA C-末端片段可另外包含含有半胱氨酸残基和随后的另外的氨基酸的肽,在本文中称为“脂化肽”或“LP”(参见图1和图2)。例如,紧接着脂化信号序列的C-末端的序列如CSS或CKQN(SEQ ID NO:211)提供用于在脂化信号肽裂解时脂化的N-末端半胱氨酸残基。脂化的含半胱氨酸肽存在于本发明的最终脂化多肽中。

[0105] 已发现,狭义伯氏疏螺旋体的OspA蛋白包含具有结合T-细胞受体的能力并且还具有结合人白细胞功能相关抗原(hLFA-1)的能力的序列(在本文中也称为“hLFA-1-样序列”)。此OspA区域与hLFA-1的相似性可在向人受试者施用狭义伯氏疏螺旋体OspA时导致具有交叉反应性的免疫反应并且可在敏感个体中诱导自身免疫疾病,具体为自身免疫关节炎。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的多肽不包含具有结合T细胞受体的能力并且具有结合人白细胞功能相关抗原(hLFA-1)的能力的序列,并且具体地说不包含氨基酸序列GYVLEGLTAE(SEQ ID NO:17)。为此,hLFA-1-样序列,具体为氨基酸序列GYVLEGLTAE(SEQ ID NO:17),可用来自另一种疏螺旋体物种的OspA蛋白的同源序列,具体地说用NFTLEGKVAND(SEQ ID NO:18)置换。

[0106] 在一个优选的实施方案中,本发明的包含至少一个二硫键的多肽相对于源于至少一种疏螺旋体菌株的野生型全长OspA蛋白中的至少一种基本上建立与所述多肽相同的抵抗疏螺旋体感染的保护能力,所述OspA蛋白具体为阿氏疏螺旋体K78,OspA血清型2(SEQ ID NO:19);狭义伯氏疏螺旋体,具体地菌株B31,血清型1(SEQ ID NO:20);伽氏疏螺旋体,具体地菌株PBr,血清型3(SEQ ID NO:21);巴伐利亚疏螺旋体,具体地菌株PBi,血清型4(SEQ ID NO:22);伽氏疏螺旋体,具体地菌株PHei,血清型5(SEQ ID NO:23);伽氏疏螺旋体,具体地菌株DK29,血清型6(SEQ ID NO:24);或伽氏疏螺旋体,具体地菌株T25,血清型7(SEQ ID NO:25)。

[0107] 为了提供针对不同疏螺旋体物种或OspA血清型的交叉保护,需要开发多价疫苗。因此,在另一个优选的实施方案中,第一方面的多肽包含来自如以上所定义的不同疏螺旋体血清型的至少两个突变片段。在一个优选的实施方案中,第一方面的多肽包含选自以下各项组成的组的至少两个突变OspA片段:

[0108] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型2的片段;

[0109] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型3的片段;

[0110] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型4的片段;

[0111] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型5的片段;

[0112] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型6的片段;

[0113] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型7的片段;

[0114] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型8的片段;

[0115] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型9的片段;

[0116] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型10的片段;

[0117] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型11的片段;

[0118] -具有二硫键类型1的片段和具有二硫键类型12的片段;

[0119] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型3的片段;

[0120] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型4的片段;

[0121] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型5的片段;

- [0122] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型6的片段；
- [0123] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型7的片段；
- [0124] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型8的片段；
- [0125] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型9的片段；
- [0126] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0127] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0128] -具有二硫键类型2的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0129] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型4的片段；
- [0130] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型5的片段；
- [0131] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型6的片段；
- [0132] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型7的片段；
- [0133] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型8的片段；
- [0134] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型9的片段；
- [0135] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0136] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0137] -具有二硫键类型3的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0138] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型5的片段；
- [0139] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型6的片段；
- [0140] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型7的片段；
- [0141] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型8的片段；
- [0142] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型9的片段；
- [0143] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0144] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0145] -具有二硫键类型4的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0146] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型6的片段；
- [0147] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型7的片段；
- [0148] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型8的片段；
- [0149] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型9的片段；
- [0150] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0151] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0152] -具有二硫键类型5的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0153] -具有二硫键类型6的片段和具有二硫键类型7的片段；
- [0154] -具有二硫键类型6的片段和具有二硫键类型8的片段；
- [0155] -具有二硫键类型6的片段和具有二硫键类型9的片段；
- [0156] -具有二硫键类型6的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0157] -具有二硫键类型6的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0158] -具有二硫键类型6的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0159] -具有二硫键类型7的片段和具有二硫键类型8的片段；
- [0160] -具有二硫键类型7的片段和具有二硫键类型9的片段；

- [0161] -具有二硫键类型7的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0162] -具有二硫键类型7的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0163] -具有二硫键类型7的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0164] -具有二硫键类型8的片段和具有二硫键类型9的片段；
- [0165] -具有二硫键类型8的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0166] -具有二硫键类型8的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0167] -具有二硫键类型8的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0168] -具有二硫键类型9的片段和具有二硫键类型10的片段；
- [0169] -具有二硫键类型9的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0170] -具有二硫键类型9的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0171] -具有二硫键类型10的片段和具有二硫键类型11的片段；
- [0172] -具有二硫键类型10的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0173] -具有二硫键类型11的片段和具有二硫键类型12的片段；
- [0174] -以及
- [0175] 具体地说其中
- [0176] -具有二硫键类型1的片段具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:2具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0177] -具有二硫键类型2的片段具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:3具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0178] -具有二硫键类型3的片段具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:4具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0179] -具有二硫键类型4的片段具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:5具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0180] -具有二硫键类型5的片段具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0181] -具有二硫键类型6的片段具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0182] -具有二硫键类型7的片段具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；
- [0183] -具有二硫键类型8的片段具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；

[0184] -具有二硫键类型9的片段具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；

[0185] -具有二硫键类型10的片段具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；

[0186] -具有二硫键类型11的片段具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换；和/或

[0187] -具有二硫键类型12的片段具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有至少80%，更优选85%，更优选90%，甚至更优选95%序列同一性的氨基酸序列，其中所述半胱氨酸未被置换。

[0188] 请注意，关于突变和序列同一性的其它细节在上文给出。

[0189] 表A-5. 本发明中所描述的非脂化和脂化的突变OspA片段异二聚体的命名和SEQ ID NO。

[0190]

突变OspA 片段 异二聚体*	SEQ ID NO:	脂化的 突变OspA 片段异二聚体*	SEQ ID NO:
S1D4-S2D4	43	Lip-S1D4-S2D4	185
S1D1-S2D1	47	Lip-S1D1-S2D1	186
S3D4-S4D4	51	Lip-S3D4-S4D4	187
S3D1-S4D1	55	Lip-S3D1-S4D1	188
S5D4-S6D4	59	Lip-S5D4-S6D4	189
S5D1-S6D1	63	Lip-S5D1-S6D1	190
S2D4-S1D4	67	Lip-S2D4-S1D4	191
S2D1-S1D1	71	Lip-S2D1-S1D1	192
S4D4-S3D4	75	Lip-S4D4-S3D4	193
S4D1-S3D1	79	Lip-S4D1-S3D1	194
S6D4-S5D4	83	Lip-S6D4-S5D4	195
S6D1-S5D1	87	Lip-S6D1-S5D1	196
S1D4-S2D1	91	Lip-S1D4-S2D1	197
S1D1-S2D4	95	Lip-S1D1-S2D4	198
S3D4-S4D1	99	Lip-S3D4-S4D1	199
S3D1-S4D4	103	Lip-S3D1-S4D4	200
S5D4-S6D1	107	Lip-S5D4-S6D1	201
S5D1-S6D4	111	Lip-S5D1-S6D4	202
S2D4-S1D1	115	Lip-S2D4-S1D1	203
S2D1-S1D4	119	Lip-S2D1-S1D4	204
S4D4-S3D1	123	Lip-S4D4-S3D1	205
S4D1-S3D4	127	Lip-S4D1-S3D4	206
S6D4-S5D1	131	Lip-S6D4-S5D1	207
S6D1-S5D4	135	Lip-S6D1-S5D4	208

[0191] *S=血清型(1-6)(参见表A-2);D=二硫键类型(参见表A-4);

[0192] Lip=脂化:甘油和脂肪酸残基的N-末端添加。

[0193] 在另一个优选的实施方案中,根据第一方面的多肽包含通过一个或多个接头连接的至少两个或三个突变片段。接头为用于连接两个片段的相当短的氨基酸序列。它应被设计为避免对片段、它们在待治疗或接种疫苗的受试者中的相互作用或者它们的保护能力产生任何负面影响。优选为至多21个氨基酸,具体为至多15个氨基酸,特别是至多12个或8个氨基酸的短接头。更优选地,一个或多个接头由小的氨基酸组成,以便减小或最小化与片段的相互作用,所述小的氨基酸如甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸。实例或优选的接头包括含有聚G

或由其组成的接头,例如(G)₈(SEQ ID NO:36)、(G)₁₂(SEQ ID NO:37)、GAGA(SEQ ID NO:38)、(GAGA)₂(SEQ ID NO:39)、(GAGA)₃(SEQ ID NO:40)、(GGGS)₂(SEQ ID NO:41)或(GGGGS)₃(SEQ ID NO:42)。更优选的接头为“LN1”肽接头”,它是由来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA的N末端半部分的两个分开的环区域组成的融合物(aa65-74和aa 42-53,具有在位置53处的氨基酸交换:D53S),具有以下序列:GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS(SEQ ID NO:184)。

[0194] 在另一个优选的实施方案中,根据第一方面的多肽包括:具有至多500个氨基酸的总大小、包含如第一方面的优选实施方案所定义的两个或三个不同突变片段的多肽;或者基本上由两个或三个突变片段、一个或两个接头和任选的N-末端半胱氨酸组成的多肽;和/或基本上由两个或三个不同突变片段、由至多24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11个氨基酸、优选至多10、9、8、7或6个氨基酸、还更优选至多5、4、3、2或1个氨基酸组成的片段的N-末端延伸和任选的N-末端半胱氨酸所组成的多肽,其中所述N-末端延伸直接位于相应疏螺旋体OspA的片段的N-末端。所述N-末端半胱氨酸可任选地接着长1至10个氨基酸的短肽接头并且优选采用N-末端CSS肽或CKQN肽(SEQ ID NO:211)的形式。

[0195] 在第二方面,本发明涉及一种编码根据第一方面的多肽的核酸。

[0196] 本发明进一步提供一种编码本发明的多肽的核酸。出于本发明的目的,术语“核酸”通常是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,它们可为包括单链和双链区域/形式的未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。

[0197] 如本文所用的术语“编码多肽的核酸”涵盖包含编码本发明的肽或多肽的序列的多核苷酸。所述术语还涵盖包含编码肽或多肽的单个连续区域或不连续区域(例如,被整合的噬菌体、整合的插入序列、整合的载体序列、整合的转座子序列中断或者由于RNA编辑或基因组DNA重组而中断的多核苷酸)连同另外的区域(也可包含编码和/或非编码序列)的多核苷酸。

[0198] 本领域普通技术人员将了解,由于遗传密码的简并性,存在很多编码本文所述的多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然(即,天然存在的)基因的核苷酸序列具有极小的相似性。尽管如此,本发明特别涵盖了由于密码子使用的差异而改变的多核苷酸,例如优化用于人和/或灵长类动物和/或大肠杆菌密码子选择的多核苷酸。

[0199] 可使用本领域熟知的化学方法完整或部分地合成编码所需多肽的序列(参见Caruthers,M.H.等,Nucl.Acids Res.Symp.Ser.第215-223页(1980);Horn等,Nucl.Acids Res.Symp.Ser.第225-232页(1980))。可选地,可使用化学方法合成多肽或其部分的氨基酸序列以便产生蛋白质本身。例如,可使用各种固相技术(Roberge等,Science269:202-204(1995))进行肽合成并且可例如使用ASI 431A肽合成器(Perkin Elmer,Palo Alto,CA)实现自动合成。

[0200] 此外,可使用本领域通常已知的方法改造本发明的多核苷酸序列,以便出于多种原因改变多肽编码序列,包括但不限于改变基因产品的克隆、加工和/或表达的改变。例如,可使用通过基因片段和合成寡核苷酸的随机片段化和PCR重组进行的DNA改组来改造核苷酸序列。此外,可使用定点诱变来插入新限制位点,改变糖基化模式,改变密码子偏向,产生剪接变体或引入突变等。

[0201] 在本发明的另一方面,本发明涉及包含连接至诱导型启动子以使得在诱导启动子时表达由核酸编码的多肽的本发明的核酸的载体。在一个优选的实施方案中,所述载体为

pET28b (+)。

[0202] 本发明的另一方面包括所述载体,其中诱导型启动子通过将足量的IPTG(异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷)优选添加到生长培养基中来活化诱导型启动子。任选地,IPTG的浓度为0.1与10mM、0.1与5mM、0.1与2.5mM、0.2与10mM、0.2与5mM、0.2与2.5mM、0.4与10mM、1与10mM、1与5mM、2.5与10mM、2.5与5mM、5与10mM之间。可选地,所述启动子可通过改变温度或pH来诱导。

[0203] 如本文所用的核酸分子通常是指任何核糖核酸分子或脱氧核糖核酸分子,它们可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。因此,例如,如本文所用的核酸分子是指至少单链和双链DNA、包含可为单链或更典型地双链的DNA和RNA的杂合分子或者单链和双链区域的混合物。如本文所用的,术语核酸分子包括如以上所述的含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA。因此,具有出于稳定性或其它原因而修饰的主链的DNA或RNA分子为“核酸分子”,如该术语在本文中所预期的。此外,包含不常见碱基如肌苷或修饰的碱基如三苯甲基化碱基(仅是举两个例子)的DNA或RNA种类也是如本文所定义的核酸分子。将了解的是,已对DNA和RNA分子做出各种各样的修饰,所述DNA和RNA分子用于本领域技术人员已知的很多有用目的。如本文所用的术语核酸分子包括核酸分子的此类化学、酶促或代谢修饰的形式以及病毒和细胞(除其它之外包括简单和复杂的细胞)所特有的DNA和RNA的化学形式。术语核酸分子还涵盖通常称为寡核苷酸的短核酸分子。术语“多核苷酸”和“核酸”或“核酸分子”可在本文中互换使用。

[0204] 根据本发明的核酸可为化学合成的。可选地,核酸可从疏螺旋体中分离并且通过本领域技术人员已知的方法进行修饰。这同样适用于根据本发明的多肽。

[0205] 此外,可使用标准技术如克隆将本发明的核酸功能性连接至任何所需序列,无论是疏螺旋体调控序列或异源调控序列、异源前导序列、异源标志序列或异源编码序列,以便产生融合基因。

[0206] 本发明的核酸分子可为通过克隆获得的或通过化学合成技术产生或通过其组合产生的RNA形式,如mRNA或cRNA,或者DNA形式,包括例如cDNA和基因组DNA。所述DNA可为三链、双链或单链的。单链DNA可为编码链,也称为有义链,或者它可为非编码链,也称为反义链。

[0207] 本发明的核酸可包括在载体或细胞中。所述载体可以载体为可复制的方式包含以上提及的核酸并且可在宿主细胞内表达由核苷酸序列编码的蛋白质。

[0208] 对于本发明的多肽的重组产生,宿主细胞可基因改造为并入表达系统或其部分或本发明的核酸。将核酸引入到宿主细胞中可通过许多标准实验室手册例如Davis等,BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,(1986)以及Sambrook等,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)中所述的方法来实现,例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转位、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、接合、转导、刮擦装载(scrape loading)、弹道引入以及感染。

[0209] 适合宿主的代表性实例包括革兰氏阴性菌细胞,如大肠杆菌、不动杆菌、放线杆菌、博德特氏菌(Bordetella)、布鲁氏菌、弯曲杆菌、蓝藻细菌、肠杆菌、欧文氏菌、弗朗西斯氏菌(Francisella)、螺杆菌、嗜血杆菌、克雷伯氏菌、军团菌、莫拉氏菌(Moraxella)、奈瑟

氏菌 (*Neisseria*)、巴斯德氏菌 (*Pasteurella*)、变形菌、假单胞菌、沙门氏菌、沙雷氏菌、志贺氏菌、密螺旋体、弧菌、耶尔森氏菌 (*Yersinia*) 的细胞。在一个实施方案中, 宿主细胞为大肠杆菌细胞。在优选实施方案中, 宿主细胞为大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞或大肠杆菌 BL21Star™ (DE3) 细胞。

[0210] 可选地, 也可使用革兰氏阳性菌细胞。各种各样的表达系统可用于产生本发明的多肽。在一个实施方案中, 所述载体源于细菌质粒。通常, 适用于在宿主中维持、增殖或表达多核苷酸和/或表达多肽的任何系统或载体在这点上可用于表达。适当的 DNA 序列可通过任何各种各样的熟知且常规的技术插入到表达系统中, 所述技术例如像 Sambrook 等, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, (同上) 中所列出的那些。

[0211] 在本发明的一个实施方案中, 细胞在选择压力下生长, 例如在抗生素, 优选卡那霉素存在下生长。在另一个实施方案中, 细胞在抗生素缺乏下生长。

[0212] 各种各样的表达载体可用于表达根据本发明的多肽。通常, 适用于在宿主中维持、增殖或表达核酸以表达多肽的任何载体在这点上可用于表达。根据本发明的此方面, 所述载体可为例如质粒载体、单链或双链噬菌体载体或单链或双链 RNA 或 DNA 病毒载体。本文所公开的起始质粒可商购获得, 公开获得, 或者可通过常规应用熟知的公布的程序由可用的质粒构建。在某些方面, 在载体中优选的为用于表达核酸分子和根据本发明的多肽的那些。宿主细胞内的核酸构建体可以常规方式使用以产生通过重组序列编码的基因产物。可选地, 根据本发明的多肽可通过常规肽合成器合成地产生。

[0213] 此外, 本发明涉及一种包含此载体的宿主细胞。适当宿主细胞的代表性实例包括细菌, 如链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌和枯草杆菌; 真菌, 如酵母和曲霉属真菌; 昆虫细胞, 如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9 细胞; 哺乳动物细胞, 如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293 或 Bowes 黑色素瘤细胞; 以及植物细胞。无细胞翻译系统也可用于使用源于本发明的 DNA 构建体的 RNA 来产生此类蛋白质。

[0214] 为了通过将根据本发明的载体引入到宿主细胞中来实际地表达所需的氨基酸序列, 除根据本发明的核酸序列之外, 所述载体还可包含用于控制表达的其它序列 (例如, 启动子序列、终止子序列和增强子序列) 和用于选择微生物、昆虫细胞、动物培养细胞等的基因标志 (例如, 新霉素抗性基因和卡那霉素抗性基因)。此外, 所述载体可包含重复形式的 (例如, 串联的) 根据本发明的核酸序列。所述载体可基于常规用于基因改造领域的程序和方式来构建。

[0215] 宿主细胞可在适当培养基中培养, 并且根据本发明的蛋白质可从培养产物中获得。根据本发明的蛋白质可从培养基中回收并且以常规方式进行纯化。

[0216] 此外, 本发明的根本问题通过一种用于产生如以上所定义的多肽的方法得以进一步解决, 所述方法的特征在于以下步骤:

[0217] a) 将编码所述多肽的载体引入到宿主细胞中;

[0218] b) 使宿主细胞在允许所述多肽表达的条件下生长;

[0219] c) 使所述宿主细胞均质化; 以及

[0220] d) 使宿主细胞均浆经过纯化步骤。

[0221] 本发明进一步涉及一种用于产生如以上所定义的多肽的方法, 其特征在于以下步骤:

- [0222] a) 将编码多肽的核酸引入到载体中;
- [0223] b) 将所述载体引入到宿主细胞中;
- [0224] c) 使所述宿主细胞在允许多肽表达的条件下生长;
- [0225] d) 使所述宿主细胞均质化;
- [0226] e) 通过相分离在液相中富集多肽;以及
- [0227] f) 在凝胶过滤柱上进行进一步纯化。
- [0228] 本发明进一步涉及一种用于产生如以上所定义的多肽的方法,其特征在于以下步骤:
- [0229] a) 将编码多肽的核酸引入到载体中;
- [0230] b) 将所述载体引入到宿主细胞中;
- [0231] c) 使所述宿主细胞在允许多肽表达的条件下生长;
- [0232] d) 使所述宿主细胞均质化;
- [0233] e) 通过相分离在液相中富集多肽;
- [0234] g) 在凝胶过滤柱上进行纯化;以及
- [0235] h) 任选地,在缓冲液交换柱上进一步处理。
- [0236] 在另一方面,本发明的根本问题通过特异性结合如以上所定义的多肽的至少选择部分的抗体或至少其有效部分得以解决。
- [0237] 在一个优选的实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。
- [0238] 在另一个优选的实施方案中,所述有效部分包含Fab片段、F(ab)片段、F(ab)N片段、F(ab)₂片段或F_v片段。
- [0239] 在本发明的再一个实施方案中,所述抗体为嵌合抗体。
- [0240] 在又一个实施方案中,所述抗体为人源化抗体。
- [0241] 在一个优选的方面,本发明的抗体特异性结合本发明的突变OspA片段多肽,但是不结合相应的野生型OspA片段多肽。在一个更优选的方面,所述抗体特异性结合本发明的突变OspA片段的二硫键。
- [0242] 术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白(如本发明的纳米抗体或多肽)可结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。抗原结合蛋白的特异性可基于亲和力和/或亲合力来确定。由抗原与抗原结合蛋白的解离的平衡常数(K_D)表示的亲和力为抗原决定簇与抗原结合蛋白上的抗原结合位点之间的结合强度的量度。 K_D 的值越小,抗原决定簇与抗原结合分子之间的结合强度越强(可选地,所述亲和力也可表示为亲和力常数(K_A),其为 $1/K_D$)。
- [0243] 如技术人员将清楚的(例如,基于本文的另外的公开内容),亲和力可依据相关特定抗原以本身已知的方式确定。亲合力为抗原结合分子(如本发明的抗体或其有效部分)与相关抗原之间的结合强度的量度。亲合力涉及抗原决定簇与抗原结合分子上的抗原结合位点之间的亲和力以及存在于抗原结合分子上的相关结合位点的数目两者。通常,抗原结合蛋白(如本发明的抗体或其有效部分)将以 10^{-5} 至 10^{-12} 摩尔/升或更小以及优选 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升或更小以及更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升的解离常数(K_D)(即,以 10^5 至 10^{12} 升/摩尔或更大以及优选 10^7 至 10^{12} 升/摩尔或更大以及更优选 10^8 至 10^{12} 升/摩尔的缔合常数(K_A))结合其抗原。大于 10^4 摩尔/升的任何 K_D 值(或小于 $10^4 M^{-1}$ 升/摩尔的 K_A 值)通常被认为指示非特异

性结合。优选地,本发明的单价免疫球蛋白序列将以小于500nM,优选小于200nM,更优选小于10nM如小于500pM的亲合力结合所需抗原。抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以本身已知的任何适合的方式确定,所述方法包括例如,斯卡查德分析和/或竞争结合测定,如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)以及夹心竞争测定,以及本领域本身已知的它们的不同变型,以及本文所提及的其它技术。

[0244] 如技术人员将清楚的,解离常数可为实际解离常数或表观解离常数。用于确定解离常数的方法为技术人员所清楚的,并且例如包括本文所提及的技术。在此方面,还将清楚的是,也许不可能测量大于 10^{-4} 摩尔/升或 10^{-3} 摩尔/升(例如, 10^{-2} 摩尔/升)的解离常数。任选地,技术人员还将清楚的是,可基于(实际或表观)缔合常数(K_A)通过关系式 $[K_D=1/K_A]$ 计算(实际或表观)解离常数。

[0245] 亲合力指示分子相互作用的强度或稳定性。亲合力通常给出为 K_D 或解离常数,单位为摩尔/升(或M)。亲合力也可表示为缔合常数 K_A ,其等于 $1/K_D$ 并且具有(摩尔/升) $^{-1}$ (或 M^{-1})的单位。在本说明书中,两个分子(如本发明的氨基酸序列、纳米抗体或多肽与其预期靶标)之间的相互作用的稳定性将主要表示为其相互作用的 K_D 值,技术人员将清楚的是,鉴于关系式 $K_A=1/K_D$,通过其 K_D 值指明分子相互作用的强度也可用于计算对应的 K_A 值。所述 K_D 值也以热力学含义表征分子相互作用的强度,因为它通过熟知的关系式 $DG=RT \cdot \ln(K_D)$ (等同于 $DG=-RT \cdot \ln(K_A)$)而与结合自由能(DG)有关,其中R等于气体常数,T等于绝对稳定,并且 $\ln$ 指示自然对数。

[0246] 认为有意义的(例如,特异性的)的生物相互作用的 K_D 的范围通常为 $10^{-10}M$ (0.1nM)至 $10^{-5}M$ (10000nM)。相互作用越强,其 K_D 越低。

[0247] 在一个优选的实施方案中,本发明的抗体的 K_D 为 $10^{-12}M$ 与 $10^{-5}M$ 之间,优选小于 10^{-6} ,优选小于 10^{-7} ,优选小于 $10^{-8}M$,优选小于 $10^{-9}M$,更优选小于 $10^{-10}M$,甚至更优选小于 $10^{-11}M$,最优选小于 $10^{-12}M$ 。

[0248] 所述 K_D 还可表示为复合物解离速率常数(表示为 k_{off})与其缔合速率(表示为 k_{on})之比(使得 $K_D=k_{off}/k_{on}$ 并且 $K_A=k_{on}/k_{off}$)。解离速率 k_{off} 具有单位 s^{-1} (其中s为秒的SI单位符号)。缔合速率 k_{on} 具有单位 $M^{-1}s^{-1}$ 。缔合速率可在 $10^2M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 之间改变,接近双分子相互作用的扩散限制的缔合速率常数。解离速率通过关系式 $t_{1/2}=\ln(2)/k_{off}$ 而与给定分子相互作用的半衰期有关。解离速率可在 $10^{-6}s^{-1}$ (具有多天的 $t_{1/2}$ 的几乎不可逆复合物)至 $1s^{-1}$ ($t_{1/2}=0.69s$)之间改变。

[0249] 两个分子之间的分子相互作用亲合力可通过本身已知的不同技术进行测量,如熟知的表面等离子体共振(SPR)生物传感器技术(参见,例如,Ober等,Intern.Immunology, 13,1551-1559,2001),其中一个分子固定在生物传感器芯片上并且另一个分子在流动条件下经过固定的分子,从而产生 k_{on} 、 k_{off} 测量值并因此获得 K_D (或 K_A)值。这可以例如使用熟知的BIAcore仪器进行。

[0250] 技术人员还将清楚的是,如果测量过程在一定程度上例如因一个分子的生物传感器上的涂层相关的人为现象而影响隐含的分子的内在结合亲合力,则测量的 K_D 可与表观 K_D 相对应。而且,如果一个分子包含多于一个用于另一个分子的识别位点,则可测量表观 K_D 。在这种情况下,测量的亲合力可受两个分子的相互作用的亲合力影响。

[0251] 可用于评估亲和力的另一种方式为Friguet等(J.Immunol.Methods,77,305-19,

1985)的2-步ELISA(酶联免疫吸附测定)程序。此方法建立溶液相结合平衡测量并且避免与在支撑体如塑料上分子之一的吸附有关的可能的人为现象。

[0252] 然而, K_D 的绝对测量可为相当耗费劳力的;因此,通常确定表观 K_D 值以便评估两个分子的结合强度。应注意,只要以一致的方式(例如,保持测定条件不变)进行所有的测量,表观 K_D 测量值可用作真实 K_D 的近似值,并且因此在本文件中, K_D 和表观 K_D 应以同等重要性或相关性对待。

[0253] 最后,应注意,在很多情况下,有经验的科学家可判断它是否便于相对于一些参考分子确定结合亲和力。例如,为了评估分子A与B之间的结合强度,可例如使用已知结合B并且用荧光团或发色团或其它化学部分(例如在ELISA或流式细胞术中容易检测的生物素或其它形式(用于荧光检测的荧光团、用于光吸收检测的发色团、用于链霉亲和素介导的ELISA检测的生物素))适当地标记的参考分子C。通常,将参考分子C保持在固定浓度下并且针对给定浓度或量的B改变A的浓度。因此,获得抑制浓度(IC)₅₀值,此值对应于在A缺乏下对于C测量的信号减半时的A的浓度。假设, $K_{D\text{ ref}}$ (参考分子的 K_D)以及参考分子的总浓度 c_{ref} 为已知的,由以下式可获得相互作用A-B的表观 K_D : $K_D = IC_{50} / (1 + c_{\text{ref}} / K_{D\text{ ref}})$ 。注意如果 $c_{\text{ref}} \ll K_{D\text{ ref}}$,则 $K_D \approx IC_{50}$ 。假设以一致的方式(例如,保持 c_{ref} 固定)对于所比较的结合剂进行 IC_{50} 测量,则可通过 IC_{50} 评估分子相互作用的强度或稳定性,并且此测量值在整个此文本中被判定为等于 K_D 或等于表观 K_D 。

[0254] 本发明的另一方面涉及一种产生如以上所定义的抗体的杂交瘤细胞系。

[0255] 此外,本发明的根本问题通过一种用于产生如以上所定义的抗体的方法得以进一步解决,所述方法的特征在于以下步骤:

[0256] a) 通过向非人动物施用如以上所定义的多肽来起始所述动物中的免疫反应;

[0257] b) 从所述动物中取出含有抗体的体液;以及

[0258] c) 通过使所述含有抗体的体液经受另外的纯化步骤来产生抗体。

[0259] 本发明进一步涉及一种用于产生如以上所定义的抗体的方法,其特征在于以下步骤:

[0260] a) 通过向非人动物施用如以上所定义的多肽来起始所述动物中的免疫反应;

[0261] b) 从所述动物中取出脾或脾细胞;

[0262] c) 产生所述脾或脾细胞的杂交瘤细胞;

[0263] d) 选择并克隆对所述多肽特异的杂交瘤细胞;

[0264] e) 通过培养所述克隆的杂交瘤细胞来产生所述抗体;以及

[0265] f) 任选地进行另外的纯化步骤。

[0266] 本发明的另一方面涉及一种包含如以上所指定的抗体的药物组合物。

[0267] 再一方面涉及一种如以上所定义的抗体或者一种包含如以上所定义的抗体的用于治疗或预防疏螺旋体物种(更优选为如本文所公开的致病性疏螺旋体物种,更优选地包括狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体和伽氏疏螺旋体)感染的药物组合物。

[0268] 在另一方面,本发明的根本问题通过使用如以上所定义的用于制备用于治疗或预防疏螺旋体物种(更优选为如本文所公开的致病性疏螺旋体物种,更优选地包括狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体和伽氏疏螺旋体)感染的药物组合物的抗体得

以解决。

[0269] 在第三方面,本发明涉及一种包含根据第一方面的多肽和/或根据第二方面的核酸的药物组合物。所述药物组合物可任选地包含任何药学上可接受的载体或赋形剂,如缓冲物质、稳定剂或另外的活性成分,特别是有关药物组合物和/或疫苗生产已知的成分。优选地,所述药物组合物用作药剂,具体地用作疫苗或者用于预防或治疗由疏螺旋体物种,更优选为如本文所公开的致病性疏螺旋体物种,更优选地包括狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体和伽氏疏螺旋体,和/或疫苗中所包含的抗原所针对的其它病原体引起的感染。

[0270] 在一个实施方案中,所述药物组合物还包含佐剂。与使用本发明的方法制备的细菌毒素或缀合物混合的适合佐剂的选择为本领域技术人员所知。适合的佐剂包括铝盐如氢氧化铝或磷酸铝,但是也可其它金属盐,如钙盐、镁盐、铁盐或锌盐,或者可为酰化酪氨酸或酰化糖、阳离子或阴离子衍生的糖类或聚磷腈的不溶性悬浮液。在一个优选的实施方案中,药物组合物用氢氧化铝作为佐剂。

[0271] 在另一个实施方案中,药物组合物还包含免疫刺激物质,优选自由以下各项组成的组:聚阳离子聚合物,特别是聚阳离子肽;免疫刺激寡脱氧核苷酸(ODN),特别是寡(dIdC)₁₃(SEQ ID NO:32);含有至少两个LysLeuLys基序的肽,特别是肽KLKLLLLLKLK(SEQ ID NO:33);神经活性化合物,特别是人生长激素;氢氧化铝、磷酸铝、弗氏完全或不完全佐剂或其组合。优选地,免疫刺激物质为聚阳离子聚合物和免疫刺激脱氧核苷酸的组合或者为含有至少两个LysLeuLys基序的肽和免疫刺激脱氧核苷酸的组合,优选为KLKLLLLLKLK(SEQ ID NO:33)和寡(dIdC)₁₃(SEQ ID NO:32)的组合。更优选地,所述聚阳离子肽为聚精氨酸。

[0272] 在另一个实施方案中,药物组合物包含磷酸钠、氯化钠、L-甲硫氨酸、蔗糖以及Tween-20,pH为6.7+/-0.2。优选地,药物组合物还包含氢氧化铝,优选浓度为0.15%。

[0273] 在一个实施方案中,制剂包含5mM与50mM之间的磷酸钠、100与200mM之间的氯化钠、5mM与25mM之间的L-甲硫氨酸、2.5%与10%之间的蔗糖、0.01%与0.1%之间的Tween 20以及0.1%与0.2% (w/v) 之间的氢氧化铝。更优选地,制剂包含10mM磷酸钠、150mM氯化钠、10mM L-甲硫氨酸、5%蔗糖、0.05% Tween 20以及0.15% (w/v) 氢氧化铝,pH为6.7±0.2。甚至更优选地,制剂包含至少一种、至少两种、至少三种根据本发明的突变OspA异二聚体。

[0274] 在一个实施方案中,药物组合物包含3种异二聚体,优选为Lip-S1D1-S2D1(SEQ ID NO:186)、Lip-S4D1-S3D1(SEQ ID NO:194)以及Lip-S5D1-S6D1(SEQ ID NO:190)。优选地,三种异二聚体以1:2:1、1:3:1、1:1:2、1:1:3、1:2:2、1:2:3、1:3:2、1:3:3、2:1:1、2:1:2、2:1:3、2:2:3、2:2:1、2:3:1、2:3:2、2:3:3、3:1:1、3:1:2、3:1:3、3:2:1、3:2:2、3:2:3、3:3:1、3:3:2,最优选1:1:1的摩尔比混合。

[0275] 在一个实施方案中,药物组合物包含两种异二聚体,优选为摩尔比为1:2、1:3、2:1、3:1、2:3、3:2(优选1:1)的Lip-S1D1-S2D1(SEQ ID NO:186)和Lip-S5D1-S6D1(SEQ ID NO:190)、Lip-S1D1-S2D1(SEQ ID NO:186)和Lip-S4D1-S3D1(SEQ ID NO:194)或者Lip-S4D1-S3D1(SEQ ID NO:194)和Lip-S5D1-S6D1(SEQ ID NO:190)。

[0276] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或疫苗还包含至少一种另外的抗原(在

本文中一般称为“组合疫苗”)。在一个优选的实施方案中,所述至少一种另外的抗原源于引起莱姆疏螺旋体病的疏螺旋体物种。在各个方面,所述至少一种另外的抗原源于另一种病原体,优选蜱传病原体。在另一方面,病原体引起落基山斑疹热、人粒细胞埃立克体病(HGE)、森里特苏热(Sennetsu Fever)、人单核细胞埃立克体病(HM)、边虫病、康氏立克次体斑疹热(Boutonneuse fever)、帕氏立克次体的立克次体病(Rickettsia parkeri Rickettsiosis)、南部蜱虫相关皮疹病(Southern Tick-Associated Rash Illness)(STARI)、海维提卡斑疹热(Helvetica Spotted fever)、364D立克次氏体病、非洲斑疹热、回归热(Relapsing fever)、兔热病、科罗拉多蜱热(Colorado tick fever)、蜱传脑炎(TBE,也称为FSME)、克里米亚-刚果出血热、Q型热病、鄂木斯克出血热(Omsk hemorrhagic fever)、科萨努尔森林病(Kyasanur forest disease)、玻瓦桑脑炎(Powassan encephalitis)、哈特兰病毒病(Heartland virus disease)或巴贝西虫病(Babesiosis)。在另一方面,所述疾病为日本脑炎。

[0277] 在另一个实施方案中,所述至少一种另外的抗原源于载体传播的,优选蜱传病原体,所述病原体选自包含以下各项的组:赫姆斯疏螺旋体(*Borrelia hermsii*)、扁虱疏螺旋体(*Borrelia parkeri*)、达氏疏螺旋体(*Borrelia duttoni*)、宫本疏螺旋体(*Borrelia miyamotoi*)、特里蜱疏螺旋体(*Borrelia turicatae*)、立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)、澳洲立克次体(*Rickettsia australis*)、康诺尔立克次体(*Rickettsia conori*)、瑞士立克次体(*Rickettsia helvetica*)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、腺热埃立希体(*Ehrlichia sennetsu*)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、伯纳特氏立克次氏体(*Coxiella burnetii*)以及孤星疏螺旋体(*Borrelia lonestari*)、蜱传脑炎病毒(TBEV aka FSME病毒)、科罗拉多蜱传热病毒(CTFV)、克里米亚-刚果出血热病毒(CCHFV)、鄂木斯克出血热病毒(OHFV)、日本脑炎病毒(JEV)以及巴贝西虫物种。

[0278] 在另一方面,本发明的组合疫苗包含本文所讨论的任何疫苗组合物与至少一种第二疫苗组合物的组合。在一些方面,所述第二疫苗组合物防御载体传播疾病,优选蜱传疾病。在各个方面,所述第二疫苗组合物具有与针对疏螺旋体感染或莱姆疏螺旋体病的免疫相容的季节性免疫程序(seasonal immunization schedule)。在其它方面,组合疫苗适用于预防多种疾病,用于这些疾病流行的地理位置。

[0279] 在一方面,所述第二疫苗组合物为选自由以下各项组成的组的疫苗:蜱传脑炎疫苗、日本脑炎疫苗以及落基山斑疹热疫苗。在一个优选的方面,疫苗组合物为FSME-IMMUN[®] (Baxter)、Encepur[®] (Novartis Vaccines)、EnceVir[®] (Microgen NPO) 或者TBE Moscow Vaccine[®] (Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides of Russian Academy of Medical Sciences)。在另一个优选的方面,疫苗组合物为IXIARO[®]/JESPECT[®] (Valneva SE)、JEEV[®] (Biological E, Ltd.) 或IMOJEV[®] (Sanofi Pasteur)。

[0280] 进一步提供一种包含所述药物组合物的疫苗,此疫苗可还包含药学上可接受的赋形剂。在一个优选的实施方案中,赋形剂为L-甲硫氨酸。

[0281] 本发明还包括免疫原性组合物。在一些方面,本发明的免疫原性组合物包含本文所讨论的组合物中的任何组合物和药学上可接受的载体。在各个方面,所述免疫原性组合物具有诱导产生特异地结合外膜蛋白A (OspA) 蛋白的抗体的特性。在某些方面,所述免疫原性组合物具有诱导产生特异地结合疏螺旋体的抗体的特性。在特定方面,所述免疫原性组合物具有诱导产生中和疏螺旋体的抗体的特性。在一些方面,抗体是由动物产生。在其它方面,动物为哺乳动物。在甚至其它方面,哺乳动物为人类。

[0282] 包含本发明的药物组合物的疫苗制剂可用于通过经由全身或粘膜途径施用所述疫苗来保护对疏螺旋体感染敏感的哺乳动物或者治疗患有疏螺旋体感染的哺乳动物。这些施用可包括经由肌肉内、腹膜内、皮肤内或皮下途径进行注射;或者经由粘膜施用至口腔/消化道、呼吸道或泌尿生殖道。尽管本发明的疫苗可作为单个剂量施用,但是其组分也可在相同时间或不同时间一起共同施用。

[0283] 在本发明的一方面,提供一种疫苗试剂盒,所述疫苗试剂盒包括包含本发明的药物组合物(任选冻干形式)的小瓶并且还包括包含如本文所述的佐剂的小瓶。在本发明的此方面,设想所述佐剂将用于重新组成冻干的免疫原性组合物。在另一方面,本发明的药物组合物可在小瓶,优选在注射器中预先混合。

[0284] 本发明的另一方面为一种预防或治疗疏螺旋体感染的方法,所述方法包括向宿主施用免疫保护剂量的本发明的药物组合物或疫苗或试剂盒。在一个实施方案中,提供一种预防或治疗疏螺旋体感染的初次发作和/或复发性发作的方法,所述方法包括向宿主施用免疫保护剂量的本发明的药物组合物或疫苗或试剂盒。

[0285] 本发明的另一方面为用于治疗或预防疏螺旋体疾病的本发明的药物组合物。在一个实施方案中,提供一种用于治疗或预防疏螺旋体感染的药物组合物。

[0286] 本发明的另一方面为本发明的药物组合物或疫苗或试剂盒在制造用于治疗或预防疏螺旋体感染的药剂中的用途。在一个实施方案中,提供一种用于制造用于治疗或预防疏螺旋体感染的药剂的本发明的药物组合物。

[0287] 本发明还包括用于诱导受试者中的免疫反应的方法。在各个方面,此类方法包括向受试者施用有效诱导免疫反应的量的本文所讨论的免疫原性组合物或疫苗组合物中的任一种的步骤。在某些方面,免疫反应包括产生抗OspA抗体。

[0288] 本发明包括用于预防或治疗受试者中的疏螺旋体感染或莱姆疏螺旋体病的方法。在各个方面,此类方法包括向受试者施用有效预防或治疗疏螺旋体感染或莱姆疏螺旋体病的量的本文所讨论的疫苗组合物中的任一种或本文所讨论的组合疫苗中的任一种的步骤。

[0289] 本发明包括本发明的多肽、核酸、抗体、药物组合物或疫苗用于制备药剂的用途。在本发明中还提供其它相关方面。

[0290] 本发明人预期本文的术语“包含的 (comprising)”、“包含了 (comprise)”和“包含 (comprises)”在每种情况下可任选地分别与“由...组成的 (consisting of)”、“由...组成了 (consist of)”和“由...组成 (consists of)”替换。术语“包含 (comprises)”意指“包括 (includes)”。因此,除非上下文另外要求,否则词语“包含”以及变型“包含了”和“包含的”将理解为暗指包含说明的化合物或组合物(例如,核酸、多肽、抗体)或步骤或者化合物或步骤的组,但是不排除任何其它化合物、组合物、步骤或其组。缩写“e.g.”源于拉丁语例如 (exempli gratia) 并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“e.g.”与术语“例如”

同义。

[0291] 在本文中涉及本发明的“疫苗组合物”的实施方案也可用于涉及本发明的“药物组合物”的实施方案,并且反之亦然。

[0292] 除非另外说明,否则本文所使用的所有技术和科技术语均具有如本公开内容所属的领域中的普通技术人员通常所理解的含义。分子生物学中常见术语的定义可见于 Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press 出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew 等(编辑), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 以及 Robert A. Meyers (编辑), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0293] 除非上下文另外清楚地指示,否则单数术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”以及“所述(the)”包括复数指代物。类似地,除非上下文另外清楚地指示,否则词语“或”意图包括“和”。术语“多个”是指两个或更多个。应进一步理解地是,针对核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值均为近似值,并且提供用于描述。另外,关于物质如抗原的浓度或水平给出的数值限制可为近似值。

[0294] 用于根据本发明的在其不同实施方案中的多肽或者根据本发明的核酸分子的优选载体或赋形剂为用于进一步刺激对根据本发明的多肽或其编码核酸分子的免疫反应的免疫刺激化合物如佐剂。

[0295] 可用于本发明的组合物的佐剂包括但不限于:

[0296] A. 含矿物质组合物

[0297] 适用作本发明中的佐剂的含矿物质组合物包括矿物盐,如铝盐和钙盐。本发明包括矿物盐,如氢氧化物(例如,羟基氧化物)、磷酸盐(例如,羟基磷酸盐、正磷酸盐)、硫酸盐等,或者不同矿物质化合物的混合物,其中所述化合物采用任何适合的形式(例如,凝胶形式、结晶形式、无定形形式等)并且其中吸附为优选的。含矿物质组合物也可被配制为金属盐颗粒。

[0298] 一种有用的磷酸铝佐剂为无定形羟基磷酸铝,其中 PO_4/Al 摩尔比为0.84与0.92之间。另一种有用的铝基佐剂为 ASO_4 ,其为氢氧化铝+单磷酸基脂质A (MPL) 的组合。

[0299] B. 油乳液

[0300] 适用作本发明中的佐剂的油乳液组合物包括水包角鲨烯乳液,如MF59 (5%角鲨烯、0.5%Tween 80和0.5%Span 85,使用微流化器配制为亚微颗粒)、AS03 (角鲨烯、DL- α -生育酚和Tween 80) 以及AF03 (角鲨烯、Montane[®] 80和Eumulgon[®] B1PH)。也可使用完全弗氏佐剂(CFA) 和不完全弗氏佐剂(IFA)。

[0301] 有用的水包油乳液通常包括至少一种油和至少一种表面活性剂,其中一种或多种油和一种或多种表面活性剂为生物可降解的(可代谢的) 和生物相容的。乳液中的油滴的直径通常小于1 μm ,这些小的大小是使用微流化器实现的以提供稳定的乳液。大小小于220nm的液滴为优选的,因为它们可经受过滤灭菌。

[0302] 乳液可包含油,如来自动物(如鱼)或植物来源的那些。植物油来源包括坚果、种子和谷粒。最常使用的花生油、大豆油、椰子油和橄榄油例示了坚果油。例如可使用由荷荷巴豆获得的荷荷巴油。种子油包括红花油、棉籽油、葵花籽油、芝麻籽油等。在谷粒组中,玉米

油为最容易得到的,但是也可使用其它谷粒油,如小麦、燕麦、黑麦、大米、苔麸(teff)、黑小麦等。甘油和1,2-丙二醇的6-10碳脂肪酸酯虽然不是天然存在于种子油中,但是可通过对始于坚果和种子油的适当材料进行水解、分离和酯化来制备。来自哺乳动物奶的脂肪和油为可代谢的并且因此可用于实践本发明。用于分离、纯化、皂化以及从动物来源获得纯油所需要的其它方式的程序为本领域熟知的。大部分鱼包含可容易回收的可代谢油。例如,鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和鲸油如鲸蜡例示了本文可使用的若干种鱼油。多种支链油是以5-碳异戊二烯单元生物合成并且通常称为类萜。鲨鱼肝油包含称为角鲨烯的支链、不饱和类萜2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四烷六烯,它在本文中为特别优选的。角鲨烯的饱和和类似物角鲨烷也为优选的油。包括角鲨烯和角鲨烷的鱼油可易于从商业来源获得或者可通过本领域已知的方法获得。其它优选的油为生育酚(参见下文)。可使用油的混合物。

[0303] 表面活性剂可根据其‘HLB’(亲水性/亲脂性平衡)进行分类。本发明的优选表面活性剂具有至少10,优选至少15并且更优选至少16的HLB。本发明可与包括但不限于以下各项的表面活性剂一起使用:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为Tween),特别是聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80;环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚物,以DOWF AX™商品名销售,如线性EO/PO嵌段共聚物;辛苯聚醇,其重复乙氧基(氧基-1,2-乙烷二基)基团的数目可发生改变,其中辛苯聚醇-9(Triton X-100或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)为特别引人关注的;(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPALCA-630/NP-40);磷脂,如磷脂酰胆碱(卵磷脂);壬基苯酚乙氧基化物,如Tergitol™ NP系列;源于月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为Brij表面活性剂),如三乙二醇单月桂基醚(Brij 30);以及脱水山梨糖醇酯(通常称为SPAN),如脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)和脱水山梨糖醇月桂酸酯。优选非离子型表面活性剂。用于包含在乳液中的优选表面活性剂为Tween 80(聚氧乙烯脱水山梨糖醇油酸酯)、Span 85(脱水山梨糖醇三油酸酯)、卵磷脂以及Triton X-100。

[0304] 可使用表面活性剂的混合物,例如Tween 80/Span 85混合物。聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(Tween 80)和辛苯聚醇如叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton X-100)的组合也为适合的。另一种有用的组合包括月桂醇聚醚9加上聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯和/或辛苯聚醇。

[0305] 表面活性剂的优选的量(重量%)为:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯(如Tween 80):0.01%至1%,具体地为约0.1%;辛基或壬基苯氧基聚氧基乙醇(如Triton X-100或Triton系列的其它洗涤剂):0.001%至0.1%,具体地为0.005%至0.02%;聚氧乙烯醚(如月桂醇聚醚9):0.1%至20%,优选0.1%至10%并且具体地为0.1%至1%或约0.5%。

[0306] 优选地,基本上所有(例如,按数量计至少90%)的油滴的直径都小于1 μ m,例如<750nm、<500nm、<400nm、<300nm、<250nm、<220nm、<200nm或为更小的。一种特别有用的亚微乳液由角鲨烯、Tween 80和Span 85组成。按体积计乳液的组成可为约5%角鲨烯、约0.5%聚山梨醇酯80和约0.5%Span 85。按重量计,这些比率为4.3%角鲨烯、0.5%聚山梨醇酯80和0.48%Span 85。MF59乳液有利地包括柠檬酸离子,例如10mM柠檬酸钠缓冲液。

[0307] C. 皂苷制剂

[0308] 皂苷制剂也可用作本发明中的佐剂。皂苷为可发现于广泛范围的植物物种的皮、叶、茎、根以及甚至花中的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群体。来自皂树莫利纳树(Quillaia

saponaria Molina tree) 树皮的皂苷已作为佐剂得到广泛研究。皂苷也可从棕菝契 (Smilax ornata) (撒尔沙植物 (sarsapilla))、锥花丝石竹 (Gypsophilla paniculata) (brideal veil) 和肥皂草 (Saponaria officianalis) (皂根) 中商业获得。皂苷佐剂制剂包括纯化的制剂如QS21以及脂质制剂如ISCOM。QS21作为Stimulon™销售。

[0309] 皂苷组合物已使用HPLC和RP-HPLC纯化。已鉴别使用这些技术获得的特定纯化级分, 包括QS7、QS 17、QS 18、QS21、QH-A、QH-B以及QH-C。优选地, 皂苷为QS21。皂苷制剂也可包括甾醇, 如胆固醇。

[0310] 皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物 (ISCOM) 的独特颗粒。ISCOM通常还包括磷脂如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。在ISCOM中可使用任何已知的皂苷。优选地, ISCOM包括QS7、QS 17、QS 18、QS21、QH-A、QH-B以及QH-C中的一种或多种。任选地, ISCOM可缺乏另外的洗涤剂。

[0311] D. 病毒体和病毒样颗粒

[0312] 病毒体和病毒样颗粒 (VLP) 也可用作本发明中的佐剂。这些结构通常包含来自病毒的任选与磷脂组合或配制的一种或多种蛋白质。它们通常为非致病性的、非复制性的, 并且通常不包含任何天然病毒基因组。病毒蛋白可重组产生或者从全病毒中分离。适用于病毒体或VLP的这些病毒蛋白包括源于以下各项的蛋白: 流感病毒 (如HA或NA)、B型肝炎病毒 (如核心蛋白或衣壳蛋白)、E型肝炎病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录酶病毒、诺沃克病毒、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA-噬菌体、QB-噬菌体 (如外壳蛋白)、GA-噬菌体、fr-噬菌体、AP205噬菌体以及Ty (如逆转录转座子Ty蛋白pi)。

[0313] E. 细菌或微生物衍生物

[0314] 适用于本发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物, 如肠道细菌脂多糖 (LPS) 的无毒衍生物、脂质A衍生物、免疫刺激寡核苷酸和ADP-核糖基化毒素以及其去毒衍生物。

[0315] LPS的无毒衍生物包括单磷酸基脂质A (MPL) 和3-O-脱酰基MPL (3dMPL)。3dMPL为具有4、5或6条酰化链的3脱-O-酰化单磷酸基脂质A。3dMPL的此类“小颗粒”小到足以通过0.22 μm膜无菌过滤。其它无毒LPS衍生物包括单磷酸基脂质A模拟物, 如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯衍生物, 例如RC-529以及合成的磷脂二聚体E6020。

[0316] 脂质A衍生物包括来自大肠杆菌的脂质A的衍生物如OM-174。适用作本发明中的佐剂的免疫刺激寡核苷酸包括含有CpG基序的核苷酸序列 (包含通过磷酸酯键连接至鸟苷的未甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)。包含回文序列或聚 (dG) 序列的双链RNA和寡核苷酸也显示为免疫刺激性的。

[0317] CpG可包括核苷酸修饰/类似物, 如硫代磷酸酯修饰, 并且可为双链或单链的。CpG序列可以是针对TLR9, 如基序GTCGTT或TTCGTT。CpG序列可对诱导Th1免疫反应特异, 如CpG-A ODN, 或者它可更对诱导B细胞反应特异, 如CpG-B ODN。优选地, CpG为CpG-A ODN。

[0318] 优选地, 构建CpG寡核苷酸以使得5'端对于受体识别为可接近的。任选地, 两个CpG寡核苷酸序列可在其3'端连接, 以形成“致免疫物”。基于免疫刺激寡核苷酸的特别有用的佐剂称为IC31®。因此, 用于本发明的佐剂可包括以下各项的混合物: (i) 寡核苷酸 (例如, 15-40个之间的核苷酸), 其包括至少一个 (并且优选多个) CpI基序 (即, 胞嘧啶连接至肌苷以形成二核苷酸); 以及 (ii) 聚阳离子聚合物, 如寡肽 (例如, 5-20个之间的氨基酸), 其包括至少一个 (并且优选多个) Lys-Arg-Lys三肽序列。寡核苷酸可为包含26-聚体序列5'-

(dIdC)₁₃-3' (SEQ ID NO:32) 的脱氧核苷酸。聚阳离子聚合物可为包含11聚体氨基酸序列 KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO:33) 的肽。

[0319] 源于天然来源的聚阳离子化合物包括HIV-REV或HIV-TAT (衍生的阳离子肽、触角肽、壳聚糖或其它壳多糖衍生物) 或通过生物化学或重组产生由这些肽或蛋白质获得的其它肽。其它优选的聚阳离子化合物为抗微生物肽前体 (cathelin) 或来自抗微生物肽前体的相关或衍生物。例如, 小鼠抗微生物肽前体为具有氨基酸序列 NH₂-RLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPQPE-COOH (SEQ ID NO:31) 的肽。相关或衍生抗微生物肽前体物质包含具有至少15-20个氨基酸残基的全部或部分抗微生物肽前体序列。衍生可包括不在这20个标准氨基酸中的氨基酸对天然氨基酸的取代或修饰。此外, 另外的阳离子残基可引入到此类抗微生物肽前体分子中。这些抗微生物肽前体分子优选地与所述抗原组合。这些抗微生物肽前体分子意外地被证明也有效地作为抗原的佐剂, 而不用添加另外的佐剂。因此, 可能使用此类抗微生物肽前体分子作为有或没有另外的免疫活化物质的疫苗制剂中的有效佐剂。

[0320] 细菌ADP-核糖基化毒素及其去毒衍生物可用作本发明中的佐剂。优选地, 蛋白质源于大肠杆菌 (大肠杆菌不耐热性肠毒素“LT”)、霍乱弧菌 (霍乱毒素“CT”) 或百日咳博代氏杆菌 (百日咳毒素“PT”)。去毒的ADP-核糖基化毒素作为粘膜佐剂以及作为胃肠外佐剂的用途是已知的。毒素或类毒素优选为海参毒素的形式, 其包含A和B亚基二者。优选地, A亚基包含去毒突变; 优选地, B亚基并未突变。优选地, 佐剂为去毒的LT突变体, 如LT-K63、LT-R72、LT-G192或dmLT。有用的CT突变体为CT-E29H。

[0321] F. 人免疫调节剂

[0322] 适用作本发明中的佐剂的人免疫调节剂包括细胞因子如白介素 (例如, IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、干扰素 (例如, 干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子以及肿瘤坏死因子。优选的免疫调节剂为IL-12。

[0323] G. 生物粘附剂和粘膜粘附剂

[0324] 生物粘附剂和粘膜粘附剂也可用作本发明中的佐剂。适合的生物粘附剂包括酯化的透明质酸微球体或粘膜粘附剂如聚丙烯酸、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖以及羧甲基纤维素的交联衍生物。壳聚糖及其衍生物也可用作本发明的佐剂。

[0325] H. 微粒

[0326] 微粒也可用作本发明中的佐剂。微粒 (即, 直径为约100nm至约150 μ m, 更优选地直径为约200nm至约30 μ m并且最优选地直径为约500nm至约10 μ m的颗粒) 由生物可降解的且无毒的材料 (例如, 聚(α -羟基酸)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酸酐、聚己酸内酯、聚(丙交酯-共-乙交酯)等) 形成, 其中聚(丙交酯-共-乙交酯) 是优选的, 所述微粒被任选处理成具有带负电荷的表面 (例如, 利用SDS) 或者带正电荷的表面 (例如, 利用阳离子洗涤剂, 如CTAB)。

[0327] I. 脂质体

[0328] 适用作佐剂的脂质体制剂的实例为已知的。

[0329] J. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0330] 适用于本发明的佐剂包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯。此类制剂还包括与辛苯聚醇组合的聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂以及至少一种另外的非离子型表面活性剂如辛苯聚醇组合的聚氧乙烯烷基醚或烷基酯表面活性剂。优选的聚氧乙烯醚选自下组: 聚

氧乙烯-9-月桂基醚(月桂醇聚醚9)、聚氧乙烯-9-硬脂基(stearyl)醚、聚氧乙烯-8-硬脂基醚、聚氧乙烯-4-月桂基醚、聚氧乙烯-35-月桂基醚以及聚氧乙烯-23-月桂基醚。

[0331] K.胞壁肽

[0332] 适用作本发明中的佐剂的胞壁肽的实例包括N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酰基-D-异谷酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷酰胺(nor-MDP)以及N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷酰氨基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-5n-甘油基-3-羟基磷酸基氧基)-乙胺MTP-PE)。

[0333] L.咪唑并喹诺酮化合物。

[0334] 适用作本发明中的佐剂的咪唑并喹诺酮化合物的实例包括咪唑莫特及其同系物(例如,“瑞喹莫德3M”)。

[0335] 本发明还可包括以上鉴别的佐剂中的一种或多种的方面的组合。

[0336] 优选地,根据本发明的药物制剂中的免疫刺激化合物选自下组:聚阳离子物质(特别是聚阳离子肽)、免疫刺激核酸分子(优选免疫刺激脱氧核苷酸)、水包油或油包水乳液、MF59、铝盐、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、神经活性化合物(特别是人生长激素)或它们的组合。

[0337] 氢氧化铝和/或磷酸铝佐剂的使用为特别优选的,并且抗原通常被吸附至这些盐。

[0338] 而且,根据本发明的药物组合物为包含以下化合物中的至少任一种或其组合的药物组合物:根据本发明的核酸分子、根据本发明的在其不同实施方案中的多肽、根据本发明的载体、根据本发明的细胞以及根据本发明的抗体。与此相关,任何这些化合物可与用于细胞、组织或生物体的一种或多种未经过灭菌或经过灭菌的载体,例如适用于施用给受试者的药物载体组合使用。此类载体可包括但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇以及其组合。所述制剂应该符合施用方式的要求。

[0339] 在一个实施方案中,药物组合物包含稳定剂。术语“稳定剂”是指保护疫苗的免疫原性组合物不受不利条件(如在加热或冷冻期间产生的那些条件)的影响和/或延长免疫原性组合物在稳定和免疫原性的条件或状态下的稳定性或保质期的物质或疫苗赋形剂。稳定剂的实例包括但不限于糖类,如蔗糖、乳糖以及甘露糖;糖醇,如甘露醇(manitol);氨基酸,如甘氨酸或谷氨酸;以及蛋白质,如人血清清蛋白或明胶。

[0340] 本发明的药物组合物可以任何有效的便利的方式施用,包括,例如通过局部、口腔、肛门、阴道、静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、鼻内、气管内或皮内途径以及其它方式施用。在一个优选的实施方案中,皮下或肌肉内地,最优选肌肉内地施用药物组合物。

[0341] 在治疗中或者作为预防药,本发明的药物组合物的活性剂可作为可注射组合物,例如作为无菌水性分散体(优选等渗的)施用给个体。

[0342] 可选地,所述组合物,优选药物组合物可配制用于例如呈软膏、乳膏、洗剂、眼膏、滴眼剂、滴耳剂、洗口药、浸渍敷料和缝合线以及气溶胶的形式局部应用,并且可包含适当的常规添加剂,包括例如防腐剂、促进药物渗透的溶剂以及软膏和乳膏中的软化剂。此类局部制剂也可包含相容性常规载体,例如乳膏或软膏基质以及用于洗剂的乙醇或油醇。此类载体可构成制剂的约1重量%至约98重量%;通常它们将构成制剂的约80重量%。

[0343] 除以上所述的疗法之外,本发明的组合物通常可用作创伤处理剂以防止细菌粘附至暴露于创伤组织的基质蛋白并且在牙科治疗中作为抗生素预防的替代选择或与抗生素

预防的组合用于预防性用途。

[0344] 在一个优选的实施方案中,药物组合物为疫苗组合物。优选地,此类疫苗组合物便利地呈可注射形式。常规佐剂可用于增强免疫反应。用于用蛋白抗原接种疫苗的适合单位剂量对于成人每千克体重0.02 μ g与3 μ g抗原之间,并且对于儿童为每千克体重0.2 μ g与10 μ g抗原之间,并且此剂量优选以2周至24周的间隔施用1至3次。

[0345] 在指定的剂量范围内,预期利用本发明的化合物不产生不良毒性作用,而不良毒性作用会妨碍将所述化合物施用给适合的个体。

[0346] 作为另一方面,本发明包括包含用于向受试者施用的一种或多种药物制剂的试剂盒,所述制剂以促进它们用于向受试者施用的方式进行包装。在一个优选的实施方案中,所述试剂盒包含最终体积为2mL,更优选最终体积为1mL的制剂。

[0347] 在一个特定实施方案中,本发明包括用于产生单一剂量施用单元的试剂盒。在各个方面,试剂盒各自含有具有干燥蛋白的第一容器和具有水性制剂的第二容器。本发明的范围内还包括含有单室和多室预装填注射器(例如,液体注射器和药粉注射器(lyosyringe))的试剂盒。

[0348] 在另一个实施方案中,这种试剂盒包括本文所述的药物制剂(例如,包含治疗性蛋白或肽的组合物),所述药物制剂被包装在容器如密封瓶或器皿中,其中描述化合物或组合物在实践所述方法中的用法的标签贴在容器上或包括在包装中。在一个实施方案中,药物制剂包装在容器中,以使得容器的顶部空间的量(例如,在液体制剂与容器顶部之间的空气的量)十分之小。优选地,顶部空间的量是可忽视的(即,几乎不存在)。

[0349] 在一方面,试剂盒包含具有治疗性蛋白或肽组合物的第一容器和具有用于该组合物的生理学上可接受的复原溶液的第二容器。在一方面,药物制剂以单位剂量形式进行包装。试剂盒任选地还包括适用于根据特定施用途径来施用药物制剂的设备。在一些方面,试剂盒包含描述药物制剂的用法的标签。

[0350] 药物组合物可包含一系列不同抗原。抗原的实例为完全灭活的或减毒的生物体、这些生物体的亚组分、蛋白质或其最简单的形式的肽。抗原也可通过免疫系统以糖基化蛋白或肽的形式被识别并且也可包含多糖或脂质。因为细胞毒性T-细胞(CTL)识别与主要组织相容性复合物(MHC)结合的短肽(通常8至11个氨基酸长度)形式的抗原,所以可使用短肽。B细胞可识别短至4至5个氨基酸的线性表位以及三维结构(构象表位)。

[0351] 在一个优选的实施方案中,第三方面的药物组合物另外包含针对疏螺旋体蛋白的超免疫血清反应性抗原或其活性片段或变体,例如像WO 2008/031133中所述的抗原、片段和变体。

[0352] 根据本发明,根据第三方面的药物组合物可用作药剂,具体地用作疫苗,具体地结合由疏螺旋体引起的、与疏螺旋体有关或相关的具体疾病或患病病状使用。

[0353] 本发明的药物组合物可用作药剂,具体地用作疫苗,具体地结合由疏螺旋体(更优选地任何致病性疏螺旋体物种)引起的、与疏螺旋体有关或相关的疾病或患病病状使用,并且更优选地用于一种用于治疗或预防疏螺旋体感染的方法,所述感染具体地为狭义伯氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、安德森疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体、比塞蒂疏螺旋体、法雷斯疏螺旋体、卢西塔尼亚疏螺旋体、斯柏曼疏螺旋体、日本疏螺旋体、坦尼基疏螺旋体、土德疏螺旋体或西尼伽疏螺旋体感染,优选地狭义伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体或伽氏

疏螺旋体感染。

[0354] 与此相关,应注意,不同疏螺旋体物种(包括广义伯氏疏螺旋体)包括若干种物种和菌株,包括本文所公开的那些。待根据本发明预防和/或治疗的与所述细菌感染相关、由其引起或与其有关的疾病包括莱姆疏螺旋体病(莱姆病)。如也在本文公开的莱姆疏螺旋体病的另外的方面、症状、阶段和亚组以及罹患此类疾病的特定患者群组(包括在引言部分中)以引用的方式并入本文。更确切地说,莱姆疏螺旋体病通常分阶段地发生,其中在各个阶段存在出现缓解和恶化的不同临床表现,。早期感染阶段1由皮肤的局部感染组成;数天或数周后为阶段2,播散性感染;数月至数年后为阶段3,持续性感染。然而,感染为可变的;一些患者仅患有局部皮肤感染,而其他患者仅显示疾病后期表现,如关节炎。

[0355] 在第四方面,本发明涉及一种治疗或预防有需要的受试者中的疏螺旋体感染的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的根据第三方面的药物组合物。

[0356] 贯穿本说明书使用术语“受试者”来描述根据本发明的治疗或方法所提供给的动物,优选哺乳动物,更优选人。对于对特定动物如人患者特异的那些感染、病状或疾病状态的治疗,术语患者是指该特定动物。优选地,受试者为人;然而,组合物的医学用途也可包括动物如家禽(包括鸡、火鸡、鸭或鹅)、家畜(如马、牛或羊)或伴侣动物(如狗或猫)。

[0357] 贯穿本说明书中使用术语“有效量”来描述在用于本发明的方法时可用于诱导预期结果的本发明药物组合物的量。在本发明的多个方面,术语有效量与治疗或预防结合使用。在其它方面,术语有效量仅仅是指,包括在其中寻求疏螺旋体感染的治疗或预防的根据本发明的方法中,产生认为有利或有用的结果的药剂的量。

[0358] 贯穿本说明书使用有关目前描述的化合物和组合物的术语有效量来描述向罹患疏螺旋体相关疾病的哺乳动物患者(特别包括人患者)施用以减少或抑制疏螺旋体感染的根据本发明的化合物的量。

[0359] 在一个优选的实施方案中,根据第四方面的免疫受试者的方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的第三方面的药物组合物的步骤。

[0360] 所述方法包括通过基因疗法或其它方式通过体内施用根据本发明的多肽或核酸来在个体中诱导免疫反应,以便刺激免疫反应从而产生抗体或细胞介导的T细胞反应(产生细胞因子的T细胞或细胞毒性T细胞),以保护所述个体免受疾病影响,无论该疾病是否已经在个体内存在。

[0361] 本发明的产物(具体为多肽和核酸)优选以分离形式提供并且可纯化至均质。如本文所用的术语“分离的”意指“通过人工”从其自然状态分离,即如果它存在于自然界中,其已从其原始环境改变或去除,或二者。例如,以天然状态天然地存在于活的生物体中的天然存在的核酸分子或多肽为未“分离的”,但是与其天然状态的共存材料分离的相同核酸分子或多肽为“分离的”,如所述术语在本文所用的。作为分离的一部分或者在分离之后,此类核酸分子可接合至其它核酸分子如DNA分子用于诱变以便形成融合基因,并且用于在例如宿主中进行增殖或表达。单独的或接合至其它核酸分子如载体的分离的核酸分子可引入到培养物或全生物体的宿主细胞中。引入到培养物或全生物体的宿主细胞中,此类DNA分子仍可为分离的,如所述术语在本文所用的,因为它们不是处于其天然存在的形式或环境中。类似地,核酸分子和多肽可存在于组合物中,如用于将核酸分子或多肽引入到例如细胞中的介质制剂、溶液,用于例如化学或酶促反应的组合物或溶液,它们不是天然存在的组合物并且

其中保留有在如本文所用的该术语的含义内的分离的核酸分子或多肽。

[0362] 本发明不限于本文所述的具体方法、方案和试剂,因为它们可以改变。此外,本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的,并且不意图限制本发明的范围。除非上下文另外明确规定,否则如本文和所附权利要求书中所用的,单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”以及“所述(the)”包括复数指代物。类似地,词语“包含”、“含有”和“涵盖”应理解为包含的而非排他的。

[0363] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语以及任何缩写均具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料相类似或等同的任何方法和材料均可用于实践本发明,但是本文描述了优选的方法和材料。

[0364] 本发明通过以下附图、表格、实施例和序列表进行进一步说明,从中可获得另外的特征、实施方案和优点。同样地,所讨论的特定修改不应理解为对本发明的范围的限制。本领域技术人员将清楚的是,可在不背离本发明的范围的情况下做出各种等效方案、改变和修改,并且因此应理解此类等效实施方案包括在本文中。

[0365] 结合本发明

[0366] 图1示出来自疏螺旋体的OspA血清型1-6的氨基酸比对。

[0367] 图2示意性示出根据本发明的突变OspA片段异二聚体的产生。

[0368] 图3示意性表示包含三种不同突变OspA异二聚体的本发明的一种可能的药物组合物“组合疫苗”的多肽组分。

[0369] 图4示出Pam3Cys的化学结构,Pam3Cys是脂肪酸取代的半胱氨酸的实例,其例如将出现在本发明的脂化多肽的N-末端。

[0370] 图5示出来自用本发明的突变OspA片段异二聚体多肽免疫的小鼠的抗体与具有OspA血清型1-6的疏螺旋体的细胞表面的结合。

[0371] 表1示出与不具有二硫键(D0)的野生型血清型2 OspA片段相比具有二硫键类型D1至D5(对于命名,参见表A-4)的突变的血清型2OspA片段的折叠的热稳定性。

[0372] 表2示出在用具有二硫键类型D1至D5(对于命名,参见表A-4)的突变血清型2 OspA片段免疫之后对小鼠抵御通过蜱攻击方法进行的阿氏疏螺旋体(菌株IS1)感染的保护,包括用PBS、全长OspA或野生型血清型2 OspA片段(S2D0-His)免疫的小鼠的对照组。

[0373] 表3示出在用具有二硫键类型D1、D3和D4的脂化突变血清型2 OspA片段(Lip-S2D1-His、Lip-S2D3-His和Lip-S2D4-His)免疫之后对小鼠抵御通过蜱攻击方法进行的阿氏疏螺旋体(菌株IS1)感染的保护,包括用PBS和全长OspA蛋白免疫的小鼠的对照组。

[0374] 表4示出本发明的突变OspA异二聚体在体内疏螺旋体攻击模型中的保护能力。用Lip-S1D1-S2D1-His、Lip-S4D1-S3D1-His、Lip-S4D1-S3D1或Lip-S5D1-S6D1-His免疫小鼠并且通过如所指示的蜱攻击方法或针攻击方法用指定的疏螺旋体OspA血清型攻击小鼠。每个实验中的对照组用单独的A1(OH)₃佐剂免疫。

[0375] 表5示出本发明的组合疫苗抵御用OspA血清型1疏螺旋体(菌株N40,在针攻击方法中)和OspA血清型2疏螺旋体(菌株IS1,在蜱攻击方法中)进行的体内攻击的保护能力。用三种抗原Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1和Lip-S5D1-S6D1一起以1:1:1比率(组合疫苗)或者用指定的对照抗原免疫小鼠,并且通过如所指示的蜱攻击方法或针攻击方法用疏螺旋体攻击小鼠。每个实验中的对照组用单独的A1(OH)₃佐剂免疫。

[0376] 在本说明书中可能参照的附图和表格在以下进行更详细地描述。

[0377] 图1 OspA血清型1至6的氨基酸序列比对。所述比对显示,蛋白质的膜相关N-末端部分比更暴露的C-末端部分具有更加高度保守的氨基酸序列。

[0378] 图2包含来自疏螺旋体物种的两种不同OspA血清型的突变OspA C-末端片段的本发明的突变OspA异二聚体的产生。(A) 编码脂化的突变OspA异二聚体的核酸的示意性表示。组件从5' 至3' 包括脂化信号序列(Lip信号)的编码序列、用于N-末端脂化的小的含半胱氨酸肽(脂化肽=LP)、具有两个非天然半胱氨酸的OspA的突变C-末端片段、短接头肽(LN1)、之后的具有两个非天然半胱氨酸的第二突变OspA C-末端片段。(B) 中间突变OspA异二聚体多肽包含直接在核酸构建体翻译之后的新生产物。从N-末端至C-末端,此多肽由脂化信号序列(Lip信号)、用于脂化的含半胱氨酸肽(LP)、具有非天然二硫键的突变OspA片段、短接头肽(LN1)、之后的具有非天然二硫键的第二突变OspA片段组成。(C) 在翻译后修饰之后的最终脂化突变OspA异二聚体多肽。从N-末端至C-末端,异二聚体由具有脂化的N-末端半胱氨酸的短含半胱氨酸肽(指示为“Lip”)、通过二硫键稳定的突变OspA片段、接头肽(LN1)以及通过二硫键稳定的第二突变OspA片段组成。如所示的,在多肽的翻译后修饰期间脂化信号序列被裂解掉。

[0379] 图3根据本发明的优选药物组合物的实例。各自包含来自两种不同疏螺旋体OspA血清型的突变OspA片段的三种突变OspA异二聚体存在于组合物中,从而一起提供来自六种不同疏螺旋体OspA血清型的OspA抗原。这种药物组合物使得针对六种疏螺旋体血清型的同时免疫成为可能。

[0380] 图4 Pam₃Cys的化学结构示意图,Pam₃Cys为全长野生型OspA蛋白的N-末端半胱氨酸的脂肪酸取代以及本发明的脂化突变OspA片段单体和异二聚体的实例。在本发明的全长OspA蛋白或多肽的翻译后修饰期间,N-末端脂化信号序列被裂解掉并且脂肪酸(最常见为三个棕榈酰部分(“Pam₃”))酶促地共价连接至N-末端半胱氨酸残基(硫原子“S”由箭头指示)多肽链的其余残基。位于Pam₃Cys残基的C-末端,由“Xn”表示。(改编自Bouchon等(1997) Analytical Biochemistry 246:52-61。)

[0381] 图5来自免疫的小鼠的抗体与疏螺旋体属螺旋体的细胞表面的结合。用1μg以下指示的抗原中的每一种以两周的间隔免疫小鼠三次,并且在最后一次剂量之后一周收集血清:OspA血清型1至6的脂化的且带His-标签的全长OspA蛋白;单独的Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1或Lip-S5D1-S6D1;或者以1:1:1比率组合的Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1和Lip-S5D1-S6D1(“组合疫苗”)。通过细胞染色和流式细胞术测试若干血清稀释液以获知与疏螺旋体细胞表面的结合。减去在对从用单独的Al(OH)₃佐剂免疫的对照小鼠收集的血清进行染色时观察到的荧光强度值,以解释非特异性结合。(使用的疏螺旋体为:伯氏疏螺旋体,OspA血清型1,菌株N40;阿氏疏螺旋体,OspA血清型2,菌株“C”;伽氏疏螺旋体,OspA血清型3,菌株“D”;巴伐利亚疏螺旋体,OspA血清型4,菌株Fin;伽氏疏螺旋体,OspA血清型5,菌株“E”;伽氏疏螺旋体,OspA血清型6,菌株“B”。)

[0382] 表1. 具有不同布置的二硫键的未脂化的、带His-标签的阿氏疏螺旋体K78突变血清型2 OspA片段的热稳定性。将具有不同半胱氨酸键类型(参见表A-4)的突变血清型2 OspA片段溶解于50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH 8.0)中,并且测试与野生型血清型2 OspA片段(S2D0)相比的热稳定性。二硫键的存在导致与野生型血清型2 OspA片段相比解链

温度增加。

[0383]	血清型 2 OspA 突变片段	SEQ ID NO:	解链温度(°C)
	S2D0-His*	1	47.6
	S2D1-His	2	70.4
	S2D2-His	3	54.6
	S2D3-His	4	58.6
	S2D4-His	5	58.4
	S2D5-His	6	53.8

[0384] *对于命名,参见表A-4和表A-5。

[0385] 表2.减小剂量的未脂化的带His-标签的突变血清型2 OspA片段抵抗通过蜱攻击方法进行的阿氏疏螺旋体(血清型2)感染的保护能力。测试五种未脂化的带His-标签的突变血清型2 OspA片段在两种不同剂量(30 μ g和5 μ g)下的保护能力,将其与野生型血清型2 OspA片段比较。用单独的Al(OH)₃佐剂免疫的小鼠组或者用未脂化的全长血清型2 OspA免疫的小鼠组分别用作阴性对照和阳性对照。所有抗原均为带His-标签的并且未脂化的。所提供的数据合并了在相同条件下进行的若干个实验的结果。

免疫原	蜱攻击 (OspA血清型2: 阿氏疏螺旋体, 菌株IS1)	3 × 30 μ g (11次实验)	3 × 5 μ g (4次实验)
		感染数量/总数	感染数量/总数
单独的Al(OH) ₃ 佐剂	蜱(OspA-ST2)	58/62	20/23
全长OspA K78-His (SEQ ID NO: 209)	蜱(OspA-ST2)	1/72	1/25
S2D0-His (SEQ ID NO: 1)	蜱(OspA-ST2)	15/20	8/16
S2D1-His (SEQ ID NO: 2)	蜱(OspA-ST2)	1/26	1/25
S2D2-His (SEQ ID NO: 3)	蜱(OspA-ST2)	0/26	4/26
S2D3-His (SEQ ID NO: 4)	蜱(OspA-ST2)	0/34	1/21
S2D4-His (SEQ ID NO: 5)	蜱(OspA-ST2)	2/30	4/27
S2D5-His (SEQ ID NO: 6)	蜱(OspA-ST2)	5/35	2/11

[0387] 表3.减小剂量的脂化的带His-标签的突变血清型2 OspA片段抵抗通过蜱攻击方法进行的阿氏疏螺旋体感染的保护能力。测试具有不同二硫键类型的三种脂化的带His-标签的突变血清型2 OspA片段在三种不同剂量(3.0 μ g、1.0 μ g和0.3 μ g)下的保护能力。用单独的Al(OH)₃佐剂免疫的小鼠组或者用未脂化的全长血清型2 OspA免疫的小鼠组分别用作阴

性对照和阳性对照。所提供的数据合并了在相同条件下进行的若干个实验的结果。

[0388]	免疫原	蜱攻击 (OspA 血清型 2 : 阿氏疏螺旋体 , 菌株 IS1)	3 × 3.0 μg (5 次实验)	3 × 1.0 μg (5 次实验)	3 × 0.3 μg (4 次实验)
			感染数量/ 总数	感染数量/ 总数	感染数量/ 总数
[0389]	单独的 Al(OH) ₃ 佐剂 (所有剂量的对照)	蜱(OspA-ST2)	58/59	-	-
	全长 OspA K78-His (SEQ ID NO:209)	蜱(OspA-ST2)	0/14	0/21	1/20
	Lip-S2D1-His (SEQ ID NO:141)	蜱(OspA-ST2)	0/17	5/31	1/29
	Lip-S2D3-His (SEQ ID NO:143)	蜱(OspA-ST2)	1/15	1/12	5/19
	Lip-S2D4-His (SEQ ID NO:144)	蜱(OspA-ST2)	0/8	0/25	0/34

[0390] 表4. 本发明的突变OspA异二聚体抵抗通过针攻击方法或蜱攻击方法进行的体内疏螺旋体攻击的保护能力。以两周的间隔用指定剂量的OspA异二聚体或单独的Al(OH)₃佐剂免疫小鼠组三次。所使用的免疫原为Lip-S1D1-S2D1-His(用疏螺旋体OspA-ST1攻击, 实验1-3)、单独的Lip-S1D1-S2D1-His、Lip-S4D1-S3D1-His和Lip-S5D1-S6D1-His(用疏螺旋体OspA-ST2攻击, 实验4-6)、Lip-S4D1-S3D1(用疏螺旋体OspA-ST4攻击, 实验7和8)以及Lip-S5D1-S6D1-His(用疏螺旋体OspA-ST5攻击, 实验9和10; 用疏螺旋体OspA-ST6攻击, 实验11和12)。在最后一次免疫之后两周通过所指示的蜱攻击模型或针攻击模型攻击免疫的小鼠。

免疫原	剂量	针攻击 (OspA-血清型 1: 狭 义伯氏疏螺旋体, 菌株 N40)	感染数量/总数		
			实验 1	实验 2	实验 3
[0391] Lip-S1D1-S2D1-His (SEQ ID NO: 49)	3 × 5.0 μg	针 (OspA-ST1)	0/10***	0/9***	4/10**
单独的 Al(OH) ₃ 佐 剂	-	针 (OspA-ST1)	10/10	8/10	10/10
免疫原	剂量	蜱攻击 (OspA-血清型 2: 阿 氏疏螺旋	实验 4	实验 5	实验 6

[0392]

		体, 菌株 IS1)			
Lip-S1D1-S2D1-His (SEQ ID NO: 49)	3 × 2.0 μg	蛭 (OspA-ST2)	0/10***	0/9***	0/6***
Lip-S4D1-S3D1-His (SEQ ID NO: 81)	3 × 2.0 μg	蛭 (OspA-ST2)	0/9***	2/7*	0/6***
Lip-S5D1-S6D1-His (SEQ ID NO: 65)	3 × 2.0 μg	蛭 (OspA-ST2)	0/7***	0/9***	0/6***
单独的 Al(OH) ₃ 佐 剂	-	蛭 (OspA-ST2)	9/9	8/8	7/7
免疫原	剂量	针攻击 (OspA-血 清型 4: 巴 伐利亚疏 螺旋体, 菌 株 Scf)	实验 7	实验 8	
Lip-S4D1-S3D1 (Seq ID No: 194)	3 × 5.0 μg	针 (OspA-ST4)	2/10**	1/10***	-
单独的 Al(OH) ₃ 佐 剂	-	针 (OspA-ST4)	9/10	9/10	-
免疫原	剂量	针攻击 (OspA-血 清型 5: 伽 氏疏螺旋 体)	实验 9	实验 10	
Lip-S5D1-S6D1-His (SEQ ID NO: 65)	3 × 5.0 μg	针 (OspA-ST5)	1/10	2/10	-
单独的 Al(OH) ₃ 佐 剂	-	针(ST5)	6/10	6/10	-
免疫原	剂量	针攻击 (OspA-血 清型 6: 伽 氏疏螺旋 体)	实验 11	实验 12	
Lip-S5D1-S6D1-His (SEQ ID NO: 65)	3 × 5.0 μg	针 (OspA-ST6)	2/10**	2/10***	-
单独的 Al(OH) ₃ 佐 剂	-	针 (OspA-ST6)	9/10	10/10	-

[0393] P-值; 费希尔精确检验, 双尾。*显著性 (<0.05), **高显著性 (<0.01), ***极高显著性 (<0.001)

[0394] 表5. 本发明的突变OspA异二聚体组合疫苗抵抗OspA血清型1和血清型2疏螺旋体攻击的保护能力。以两周的间隔用指定剂量的免疫原或单独的Al(OH)₃佐剂免疫小鼠组三次。所使用的免疫原为突变OspA异二聚体Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1和Lip-S5D1-S6D1的1:1:1组合(组合疫苗)、Lip-S1D1-S2D1、Lip-OspA1-His以及嵌合OspA ST1/ST2。在最后一次免疫之后两周通过蜱攻击方法(ST2, 实验13和14)或针攻击方法(ST1, 实验15和16)攻击免疫的小鼠。

免疫原	剂量	蜱攻击 (OspA 血清型 2 : 阿氏疏螺旋体 , 菌株 IS1)	感染数量/总数	
			实验 13	实验 14
Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID No: 186)	3 × 5.0 μg	蜱(OspA-ST2)	0/6***	0/7**
组合疫苗: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID No: 186) Lip-S4D1-S3D1 (Seq ID No: 194) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID No: 190)	3 × 5.0 μg 3 × 5.0 μg 3 × 5.0 μg	蜱(OspA-ST2)	0/9***	0/6**
单独的 Al(OH) ₃ 佐剂	-	蜱(OspA-ST2)	7/7	6/7
免疫原	剂量	针攻击 (OspA-血清型 1 : 狭义伯氏疏螺 旋体, 菌株 ZS7)	实验 15	实验 16
Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID No: 186)	3 × 1.0 μg	针(OspA-ST1)	0/10** *	0/10* **
Lip-OspA1-His (Seq ID No: 210)	3 × 1.0 μg	针(OspA-ST1)	0/10** *	0/10* **
嵌合 OspA ST1/ST2 (Seq ID No: 212)	3 × 1.0 μg	针(OspA-ST1)	0/10** *	0/10* **
组合疫苗: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID	3 × 1.0 μg 3 × 1.0 μg	针(OspA-ST1)	0/10** *	0/10* **
No: 186) Lip-S4D1-S3D1 (Seq ID No: 194) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID No: 190)	3 × 1.0 μg			
单独的 Al(OH) ₃ 佐剂	-	针(OspA-ST1)	10/10	10/10

[0397] P-值;费希尔精确检验,双尾。*显著性(<0.05),**高显著性(<0.01),***极高显著性(<0.001)

实施例

[0398] 实施例1.突变血清型20spA片段的热稳定性的评估

[0399] 实验程序

[0400] 热稳定性

[0401] 通过由Pantoliano等(J.Biomol Screen 6:429-440 (2001))所描述的基于荧光的热漂移测定来确定未脂化的突变血清型20spA片段单体的解链温度(T_m)。使用荧光染料SYPRO[®] Orange蛋白凝胶染色剂(作为DMSO中的5000x浓缩物由美国Sigma公司供应)来监测蛋白质解折叠。在每个孔中,合并7.5 μ L SYPRO[®] Orange(由储备溶液1:1000稀释)和17.5 μ L蛋白在缓冲液中的溶液(1 μ g或2 μ g)。在CFX96实时检测系统(Bio-Rad,USA)中将蛋白样品以0.2 $^{\circ}$ C/10s的速率从25 $^{\circ}$ C加热至95 $^{\circ}$ C,并且监测荧光变化。分别利用490nm和575nm的激发波长和发射波长测量荧光强度。使用Bio-Rad CFX Manager 2.0程序确定 T_m 。在以下四种不同缓冲系统中测量未脂化的带His-标签的血清型20spA突变片段的 T_m 值:50mM Tris-HCl、150mM NaCl (pH 9.0);50mM Tris-HCl、150mM NaCl (pH 8.0);PBS (pH 7.4);以及25mM HEPES、150mM NaCl (pH 6.5),使用未脂化的血清型20spA野生型片段(S2D0)作为对照。

[0402] 结果

[0403] 在所有情况下,具有引入的半胱氨酸键的突变血清型20spA片段的 T_m 高于野生型血清型20spA片段(S2D0)(参见表1)。在四种不同缓冲系统中测试的 T_m 具有类似结果(溶解于50mM Tris-HCl、150mM NaCl (pH 8.0)中的蛋白质的数据示出在表1中),这指示蛋白质稳定性在宽的pH范围内是类似的。此结果证明了引入的二硫键使0spA片段稳定的假设。

[0404] 实施例2.未脂化的带His-标签的突变血清型20spA片段单体在蜚攻击方法(ST2,阿氏疏螺旋体)中的保护能力的评估

[0405] 实验程序

[0406] 重组蛋白的克隆和表达

[0407] GenScript,USA对野生型血清型20spA片段以及具有半胱氨酸键类型1-5的突变血清型20spA片段(分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6)进行密码子优化以用于大肠杆菌表达。出于纯化的目的,在未脂化的突变血清型20spA片段的C-末端加His-标签。将基因片段克隆到pET28b(+)载体(Novagen,USA),即含有卡那霉素抗性表达盒以及T7启动子的载体中。通过添加IPTG在37 $^{\circ}$ C下在BL21Star[™](DE3)细胞(Invitrogen,USA)中表达单体。在4h之后通过离心收集细胞并且在进一步处理之前将沉淀在-70 $^{\circ}$ C下保存12个月。

[0408] 未脂化的带His-标签的野生型0spA片段单体蛋白和突变0spA片段单体蛋白的纯化

[0409] 通过高压均质化来机械破坏细胞并且将含有带His-标签的0spA片段的可溶级分应用于Ni-琼脂糖柱(Ni Sepharose[™] 6Fast Flow;GE Healthcare,United Kingdom)并且以咪唑梯度(0-250mM)洗脱带His-标签的0spA片段。在凝胶过滤柱(Superdex 200,GE

Healthcare) 上,随后在缓冲液交换柱 (Sephadex G-25,GE Healthcare) 上进一步纯化合并的级分。基于分析尺寸排阻柱和反相色谱法合并带His-标签的OspA片段峰。在无菌过滤之后,将纯化的蛋白质保存在-20℃下,直到配制制剂为止。

[0410] 小鼠的免疫

[0411] 对于所有研究,使用雌性C3H/HeN (H-2^k) 小鼠 (Harlan, Italy)。在每次攻击之前,通过尾静脉对五只8周大的小鼠组进行取血,并且制备并合并免疫前的血清。在十五次单独的实验中测试五种未脂化的突变血清型20spA片段蛋白(分别为S2D1-5、SEQ ID NO:2、3、4、5和6)。以两周的间隔施用三次100μL皮下(s.c.)免疫。所使用的剂量分别为30μg和5μg的相应蛋白,分别在第11次实验和第4次实验中测试。所有制剂均包含最终浓度为0.15%的氢氧化铝(Al(OH)₃)。在第三次免疫之后一周,收集血液并且制备超免疫血清。在每次实验中,包括配制有Al(OH)₃的PBS注射的一个组作为阴性对照并且一个小鼠组用来自阿氏疏螺旋体菌株K78的野生型C-末端OspA片段(SEQ ID NO:1) S2D0免疫。在每次动物研究中,包括用来自阿氏疏螺旋体菌株K78的未脂化的全长野生型OspA蛋白(SEQ ID NO:209)(也配制有0.15% Al(OH)₃)免疫的另一组作为阳性对照。所有动物实验均根据奥地利法规(BGB1Nr.501/1989)进行并且由“Magistratsabteilung58”批准。

[0412] 对免疫的小鼠的蜱攻击以及血清和组织的收集(在本文中也称为“蜱攻击方法”)

[0413] 在最后一次免疫之后两周对免疫的小鼠进行蜱攻击。为了用阿氏疏螺旋体攻击免疫的小鼠,用Veet[®]膏(Reckitt Benckiser,英国)去除每只小鼠背部的毛发并且用强力胶(Pattex,德国)将小型通风容器粘到皮肤上。之后,将感染阿氏疏螺旋体菌株IS1的一只或两只鬣子硬蜱若虫应用于每只小鼠,允许其附着并进食至耗竭。每天监测每只单独的蜱的进食状态,并且在最终读出中仅包括从中收集到至少一只完全进食的蜱的小鼠。在从中收集一只或两只完全进食的蜱的小鼠之间并没有区别。

[0414] 在蜱应用之后六周,通过眼窝出血法收集血液并且制备最后的血清,并且将所述血清用于VlsE ELISA分析以确定感染的状态。然后,通过颈脱位法处死小鼠,并从每只小鼠收集一只耳朵,对其进行DNA提取并经受嵌套式PCR分析,以鉴别组织内的疏螺旋体。

[0415] 感染读出

[0416] 在实验的最终读出中仅包括其中应用的蜱进食完全并且可进行收集的小鼠。在蜱应用之后6周处死小鼠并且收集器官和最后的血清。最后的感染读出是基于两种不同的分析(靶向16S-23S基因间隔区的嵌套式PCR和VlsE (IR6) ELISA,如以下详细描述)。

[0417] 靶向16S-23S基因间隔区的嵌套式PCR

[0418] 根据制造商的说明使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen,德国)对来自每只小鼠的一只耳朵进行DNA提取和纯化,其中具有以下修改。每只耳朵在60℃下在PCR级别的重组蛋白酶K(Roche,14-22mg/mL)中消化过夜。在50μL无菌去离子水中洗脱DNA,并将其保存在-20℃下,直到进一步分析为止。作为阴性对照,在每次DNA提取和纯化中包括一个空白纯化柱,并且使洗脱液经受嵌套式PCR。通过嵌套式PCR程序对所有DNA提取物筛查疏螺旋体DNA的存在,所述程序包括使用引物进行94℃持续30s、56℃持续30s和72℃持续60s的40次循环;正向引物5'-GTATGTTTAGTGAGGGGGTG-3'(SEQ ID NO:26)和反向引物5'-GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG-3'(SEQ ID NO:27)。从反应体积10μL中,将1μL用作嵌套式PCR反应的模板。嵌套式PCR步骤包括使用引物进行94℃持续30s、60℃持续30s和72℃持续60s的

25次循环;正向嵌套引物5'-AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG-3' (SEQ ID NO:28) 和反向嵌套引物5'-GTCTGATAAACCTGAGGTCGGA-3' (SEQ ID NO:29)。在最后的反应体积中,在含有溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶上分离5μL并且在UV-光下观察条带。

[0419] 在每次PCR分析中,使用从阿氏疏螺旋体菌株K78的体外生长培养基中纯化的DNA作为阳性对照模板。此外,使用PBS而不是提取的DNA作为阴性对照。在含有溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶上分离5微升的最终产物并且在UV-光下观察条带。

[0420] 使用可变主要蛋白质样序列E蛋白(VlsE)的恒定区6(IR6)进行ELISA

[0421] 将源于伽氏疏螺旋体菌株IP90的序列的生物素化25-聚体肽(MKKDDQIAAAMVLRGMAKDGQFALK) (SEQ ID NO:30) 用于分析(Liang FT等(1999) J Immunol.163:5566-73)。用100μL/孔(1μg/mL)的在补充有0.1%Tween 20的PBS(PBS/0.1T)中的生物素化肽涂覆链霉亲和素预涂覆的96-孔ELISA板(Nunc,Denmark)。在4℃下将所述板孵育过夜。在用所述肽涂覆之后,将所述板用PBS/0.1T洗涤一次。然后在室温(RT)下用100μL/孔的PBS+2%BSA封闭所述板一小时,之后再次用PBS/0.1T洗涤。在PBS+1%BSA中的1:200、1:400和1:800稀释液下测试攻击后的血清与所述肽的反应性。在RT下将板孵育90min,之后用PBS/0.1T洗涤三次。然后,每个孔接收50μL与PBS+1%BSA中的HRP(Dako,Denmark)缀合的1.3μg/mL多克隆兔抗小鼠IgG。然后在RT下将板孵育1h。在用PBS/0.1T洗涤三次之后,添加ABTS(50μL/孔)作为底物(Sigma-Aldrich,USA),并且允许颜色显影30min。在405nm处测量吸光度。对所有血清测试两次;阴性对照包括PBS而非血清,并且板不用所述肽涂覆。将来自小鼠的对于阿氏疏螺旋体感染显示为培养阳性的血清用作阳性对照。

[0422] 结果

[0423] 蜱攻击方法中的保护水平

[0424] 在测试的两个剂量(30μg和5μg,参见表2)下对于所有五种稳定的OspA阿氏疏螺旋体片段均观察到高水平的保护。在PBS对照组中的高感染率指示这些蜱以高频率感染。另外,阳性对照,即来自阿氏疏螺旋体菌株K78的未脂化全长OspA,具有非常高的保护性。这些对照组一起指示实验读出的高可靠性。

[0425] 在表2中总结了来自测试30μg剂量(总计11次实验)和5μg剂量(总计4次实验)的实验的保护结果。用于验证感染的两种方法即VlsE ELISA和嵌套式PCR给出几乎相同的结果(数据未示出),这表明这些读出方法用于评估蜱攻击方法中的感染的稳健性。

[0426] 实施例3.脂化的加His-标签的突变血清型2OspA片段单体抵抗通过蜱攻击方法(ST2,阿氏疏螺旋体)进行的体内疏螺旋体攻击的保护能力的评估

[0427] 实验程序

[0428] 脂化的带His-标签的突变OspA片段蛋白的克隆和表达

[0429] 具有半胱氨酸键类型1、3和4的血清型2突变OspA片段(分别为SEQ ID NO:141、143和144)通过添加源于OspA的并且在C-末端后面直接跟着CKQN肽(SEQ ID NO:211)的脂化信号序列(SEQ ID NO:14)以提供用于脂化的N-末端半胱氨酸进行修饰。出于纯化的目的,所有突变OspA片段均为在C-末端加组氨酸标签的。将基因片段克隆到pET28b(+)载体(Novagen),即含有卡那霉素抗性表达盒以及T7启动子的载体中。在BL21Star™(DE3)细胞(Invitrogen)中表达脂化的单体,并且在通过IPTG诱导之后,将细胞的生长温度从37℃降低至25℃,以促进蛋白质的有效翻译后加工。在4h之后通过离心收集细胞并且在进一步处

理之前将沉淀在-70℃下保存12个月。

[0430] 脂化的带His-标签的野生型OspA片段单体蛋白和突变OspA片段单体蛋白的纯化

[0431] 通过高压均质化来机械破坏细胞,并且通过相分离使用Triton X-114作为洗涤剂在液相中富集脂化的带His-标签的OspA片段单体多肽。然后,将稀释的洗涤剂相(20倍至30倍)应用于Ni-琼脂糖柱(Ni Sepharose™ 6Fast Flow;GE Healthcare)并且通过咪唑梯度(0-250mM)洗脱来洗脱脂化的带His-标签的OspA片段。在凝胶过滤柱(Superdex 200,GE Healthcare)上,随后在缓冲液交换柱(Sephadex G-25,GE Healthcare)上进一步纯化合并的级分。基于分析尺寸排阻柱和反相色谱法合并脂化的带His-标签的OspA片段峰。在无菌过滤之后,将纯化的蛋白质保存在-20℃下,直到配制制剂为止。

[0432] 小鼠的免疫

[0433] 如以上所述地表达并纯化三种脂化的突变OspA蛋白(Lip-S2D1-His、Lip-S2D3-His和Lip-S2D4-His)。如实施例2所述地使用单独的A1(OH)₃-佐剂和未脂化的全长血清型20spA分别作为阴性和阳性对照进行体内保护研究。所有免疫原均配制有0.15%A1(OH)₃。用含有3.0μg、1.0μg或0.3μg抗原的制剂以两周的间隔皮下注射小鼠三次并且在最后一次免疫之后两周用阿氏疏螺旋体感染的蜱(菌株IS1)攻击小鼠。在蜱攻击之后六周处死小鼠并且评估感染。

[0434] 结果

[0435] 蜱攻击方法中的保护水平

[0436] 所有三种脂化的突变OspA片段甚至在最低测试剂量(表3)下赋予非常高的抵御阿氏疏螺旋体攻击的保护水平。在单独的A1(OH)₃-佐剂免疫的小鼠中感染率为高的,这指示这些蜱以高频率被感染。阳性对照抗原,即来自阿氏疏螺旋体菌株K78的全长未脂化OspA,也具有非常高的保护性。总之,这些对照组指示感染方法的高可靠性并因此给予在用脂化的突变OspA片段免疫之后观察到的结果的高可信性。

[0437] 实施例4.本发明的突变OspA异二聚体抵抗通过针攻击方法或蜱攻击方法进行的体内疏螺旋体攻击的保护能力的评估

[0438] 实验程序

[0439] 脂化的带His-标签的突变OspA片段异二聚体的克隆和表达

[0440] GenScript,USA对来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31、阿氏疏螺旋体菌株K78、伽氏疏螺旋体菌株PBr、巴伐利亚疏螺旋体菌株PBi、伽氏疏螺旋体菌株PHEi以及伽氏疏螺旋体菌株DK29的突变OspA片段单体进行密码子优化以用于大肠杆菌表达。来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA的hLFA-1-样表位(aa 164-174,SEQ ID NO:17)由来自阿氏疏螺旋体菌株K78的非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND(SEQ ID NO:18)置换。添加到突变OspA片段异二聚体的脂化信号序列是源于大肠杆菌主要外膜脂蛋白Lpp,并且在C-末端后面直接跟着CSS肽,以提供用于脂化的N-末端半胱氨酸。突变OspA片段异二聚体通过经由21个氨基酸的接头序列融合如以上所述的不同突变OspA片段单体来产生,所述接头来源于来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA的N-末端半部分的两个分开的环区域("LN1";aa 65-74和aa 42-53,具有氨基酸交换D53S,SEQ ID NO:184)。出于纯化的目的,使用His-标签构建异二聚体。将基因片段克隆到pET28b(+)载体(Novagen),即含有卡那霉素抗性表达盒以及T7启动子的载体中。在BL21Star™(DE3)细胞(Invitrogen)中表达稳定的异二聚体的脂蛋白,并且在通过

IPTG诱导之后,将细胞的生长温度从37℃降低至25℃,以促进蛋白质的有效翻译后加工。在4h之后通过离心收集细胞并且在进一步处理之前将沉淀在-70℃下保存12个月。

[0441] 脂化的带His-标签的突变OspA片段异二聚体的纯化

[0442] 通过高压均质化来机械破坏细胞,并且通过相分离使用Triton X-114作为洗涤剂在液相中富集脂化的带His-标签的突变OspA片段异二聚体。然后,将稀释的洗涤剂相(20倍至30倍)应用于Ni-琼脂糖柱(Ni Sepharose™6Fast Flow;GE Healthcare)并且通过咪唑梯度(0-250mM)洗脱来洗脱脂化的带His-标签的OspA异二聚体。在凝胶过滤柱(Superdex 200,GE Healthcare)上,随后在缓冲液交换柱(Sephadex G-25,GE Healthcare)上进一步纯化合并的级分。基于分析尺寸排阻柱和反相色谱法合并脂化的带His-标签的突变OspA异二聚体峰。在无菌过滤之后,将纯化的异二聚体保存在-20℃下,直到配制制剂为止。

[0443] 脂化的不带His-标签的突变OspA片段异二聚体的克隆和表达

[0444] 使用如以上所述制备的构建体用于通过经由PCR扩增引入终止密码子来产生不带His-标签的构建体。将基因片段克隆到pET28b(+)载体(Merck Millipore),即含有卡那霉素抗性表达盒以及T7启动子的载体中。在BL21Star™(DE3)细胞(Invitrogen)中表达稳定的异二聚体的脂蛋白,并且在通过IPTG诱导之后,将细胞的生长温度从37℃降低至25℃,以促进蛋白质的有效翻译后加工。在4h之后通过离心收集细胞并且在进一步处理之前将沉淀在-70℃下保存12个月。

[0445] 脂化的不带His-标签的突变OspA片段异二聚体的纯化

[0446] 通过高压均质化来机械破坏细胞,并且通过相分离使用Triton X-114作为洗涤剂在液相中富集脂化的突变OspA片段异二聚体。然后,使稀释的洗涤剂相经受以非结合模式操作的阴离子交换色谱法。将所得的液流装载到羟磷灰石柱(Bio-Rad)上并且通过线性盐梯度从柱中洗脱脂化的蛋白质。使洗脱液在非结合模式的DEAE-琼脂糖柱(GE Healthcare)上,随后在用于缓冲液交换的凝胶过滤柱(Superdex 200,GE Healthcare)上进行进一步纯化。基于分析尺寸排阻柱和SDS-PAGE合并脂化的突变OspA异二聚体峰。在无菌过滤之后,将纯化的异二聚体保存在-20℃下,直到配制制剂为止。

[0447] 小鼠的免疫

[0448] 对于所有研究,使用雌性C3H/HeN小鼠(Janvier,France)。在每次攻击之前,通过面静脉对十只8周大的小鼠的组进行取血,并且制备并合并免疫前的血清。以两周的间隔施用每次100μL皮下(s.c.)免疫,施用三次。每个剂量包含表4(剂量)所指示的免疫原的量,并配制有最终浓度为0.15%的氢氧化铝($Al(OH)_3$)。在第三次免疫之后一周,从面静脉收集血液并且制备超免疫血清。在每个实验中,包括用单独的 $Al(OH)_3$ 免疫的一组作为阴性对照。所有动物研究均根据奥地利法规(BGB1Nr.501/1989)进行并且由“Magistratsabteilung 58”批准。

[0449] 对免疫的小鼠的蜱攻击以及血清和组织的收集(在本文中也称为“蜱攻击方法”)

[0450] 为了用阿氏疏螺旋体攻击免疫的小鼠,用Veet®膏(Reckitt Benckiser)去除每只小鼠背部的毛发并且用强力胶(Pattex)将小型通风容器粘到皮肤上。之后,将感染阿氏疏螺旋体菌株IS1的一只或两只鬣子硬蜱若虫应用于每只小鼠,允许其附着并进食,直到它们完全饱胀并掉落。每天监测每只单独的蜱的进食状态,并且在最终读出中仅包括从中收集到至少一只完全进食的蜱的小鼠。

[0451] 使用体外生长的疏螺旋体对免疫小鼠进行的针攻击

[0452] 在最后一次免疫之后两周,用在100 μ L疏螺旋体生长培养基(BSK II)中稀释的疏螺旋体s.c.攻击小鼠。攻击剂量为菌株相关的,单种菌株的毒力通过用于确定ID₅₀的攻击实验进行评估。用于针攻击实验的剂量范围为ID₅₀的20倍至50倍。

[0453] 小鼠的处死和材料的收集

[0454] 在用指定的疏螺旋体物种进行针攻击之后四周或者在用阿氏疏螺旋体进行蜱攻击之后六周,通过颈脱位法处死小鼠。通过眼窝出血法收集血液并且制备最后的血清,并且将所述血清用于VlsE ELISA以确定感染的状态。此外,从每只小鼠收集一只耳朵,并且提取DNA并使其经受用于鉴别疏螺旋体的定量PCR(qPCR)。最后的感染读出是基于两种不同的分析(VlsE ELISA和靶向recA的qPCR)。

[0455] 使用VlsE的恒定区6(IR6)的ELISA

[0456] 将源于伽氏疏螺旋体菌株IP90的序列的生物素化25-聚体肽(MKKDDQIAAAMVLRGMAKDGQFALK)用于分析(Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT. An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. J Immunol. 1999; 163: 5566-73)。用100 μ L/孔(1 μ g/mL)在补充有0.1% Tween 20的PBS(PBS/0.1T)中的肽涂覆链霉亲和素预涂覆的96-孔ELISA板(Nunc)。在4 $^{\circ}$ C下将所述板孵育过夜。在用所述肽涂覆之后,将所述板用PBS/0.1T洗涤一次。然后,在室温(RT)下用100 μ L/孔PBS+2% BSA封闭所述板一小时,之后再次用PBS/0.1T洗涤。用PBS+1% BSA中的1:200、1:400和1:800稀释液测试攻击后的血清与所述肽的反应性。在RT下将板孵育90min,之后用PBS/0.1T洗涤三次。然后,每个孔接收50 μ L与PBS+1% BSA中的HRP(Dako)缀合的1.3 μ g/mL多克隆兔抗小鼠IgG。然后在RT下将板孵育1h。在用PBS/0.1T洗涤三次之后,添加ABTS(50 μ L/孔)作为底物(Sigma-Aldrich),并且允许颜色显影30min。在405nm处测量吸光度。所有血清均测试两次。阴性对照包括PBS而非血清,并且所述板不用所述肽涂覆。将来自小鼠的对于阿氏疏螺旋体感染显示为培养阳性的血清用作阳性对照。

[0457] 靶向recA的qPCR

[0458] 针对recA基因设计寡核苷酸引物,其方式为所述寡核苷酸引物可用于qPCR中用于鉴别引起莱姆疏螺旋体病的所有相关疏螺旋体物种(正向引物:CATGCTCTTGATCCTGTTTA;反向引物:CCCATTCTCCATCTATCTC)。将recA片段从狭义伯氏疏螺旋体菌株N40克隆到pET28b(+)中,以在每次反应中用作标准。从小鼠耳朵提取的染色体DNA 1:8稀释于水中,以便减小用未稀释DNA观察到的基体效应。针对每次实验制备由10 μ L SSoAdvancedTM SYBR[®] Green Supermix、0.3 μ L的每种引物(10 μ M)和7.4 μ L水组成的主体液混合物。在微量滴定板中将18 μ L主体混合物与2 μ L稀释的从膀胱或耳朵中提取的DNA混合,并且使用CFX96实时PCR检测系统(Bio-Rad, USA)扩增所述DNA。使DNA在95 $^{\circ}$ C下持续3分钟,随后进行95 $^{\circ}$ C持续15秒和55 $^{\circ}$ C持续30秒的50次循环进行变性。在扩增之后,制备DNA以用于解链曲线分析,所述解链曲线分析是通过在95 $^{\circ}$ C下持续30秒随后在55 $^{\circ}$ C持续2分钟进行变性来实现的。通过在55 $^{\circ}$ C下孵育5秒(其中每次循环增加0.5 $^{\circ}$ C)并且在95 $^{\circ}$ C下孵育5秒来进行解链曲线分析。在每个板上,包括四组无模板对照(NTC)以及其中模板拷贝数目范围为10至10,000的两份标准曲线。

[0459] 结果

[0460] 在12次单独的实验中测试脂化的突变OspA片段异二聚体的保护能力。用狭义伯氏疏螺旋体菌株N400spA血清型1 (ST1, 针攻击) 或阿氏疏螺旋体菌株IS10spA血清型2 (ST2, 蜱攻击) 各自在三次实验中攻击小鼠, 或者用巴伐利亚疏螺旋体菌株Scf OspA血清型4 (ST4, 针攻击)、伽氏疏螺旋体菌株“A”OspA血清型5 (ST5, 针攻击) 或伽氏疏螺旋体菌株“B”OspA血清型6 (ST6, 针攻击) 各自在两次实验中攻击小鼠。在所有实验中, 用单独的A1 (OH)₃佐剂免疫的小鼠组用作阴性对照组。对于用蜱进行的攻击, 将1-2只蜱应用于每只小鼠并且在最终读出中仅包括从中至少一只蜱进食直到完全饱胀的小鼠。然而, 在从中收集一只或两只完全进食的蜱的小鼠之间并没有区别。在表4中总结了来自十二次实验的保护数据。

[0461] 与阴性对照组相比, 脂化的带His-标签的OspA异二聚体 (Lip-S1D1-S2D1-His) 在所有六次实验中显示出针对OspA血清型1和OspA血清型2攻击的高度统计上显著的保护 (费希尔精确检验, 双尾)。意外的是, 用Lip-S4D1-S3D1-His和Lip-S5D1-S6D1-His进行免疫也赋予抵抗OspA血清型2攻击 (实验4-6) 的高保护能力, 这指示使用其它血清型的突变OspA片段进行免疫可具有交叉保护效应。此外, 使用Lip-S4D1-S3D1进行免疫赋予了抵抗用OspA血清型4疏螺旋体进行的针攻击 (实验7和8) 的统计上显著的保护。最后, 用Lip-S5D1-S6D1-His进行免疫赋予了抵抗用OspA血清型5进行的针攻击 (实验9和10) 和用OspA血清型6进行的针攻击 (实验11和12) 的保护。使用VlsE ELISA与recA qPCR的组合来确定每只小鼠的感染状态。当至少一种方法给出阳性结果时, 小鼠被视为感染的。

[0462] 总之, 用本发明的突变OspA片段异二聚体多肽进行免疫赋予了抵抗所测试的所有疏螺旋体血清型的保护并且在一些情况下还可提供交叉保护。

[0463] 与阴性对照组相比, 脂化的带His-标签的OspA异二聚体 (Lip-S1D1-S2D1-His) 在所有六次实验中显示出抵抗OspA血清型1和OspA血清型2攻击的高度统计上显著的保护 (费希尔精确检验, 双尾)。意外的是, 用Lip-S4D1-S3D1-His和Lip-S5D1-S6D1-His进行免疫也赋予针对OspA血清型2攻击 (实验4-6) 的高保护能力, 这指示使用其它血清型的突变OspA片段进行免疫可具有交叉保护效应。此外, 使用Lip-S4D1-S3D1进行免疫赋予了抵抗用OspA血清型4疏螺旋体进行的针攻击 (实验7和8) 的统计上显著的保护。最后, 用Lip-S5D1-S6D1-His进行免疫赋予了抵抗用OspA血清型5进行的针攻击 (实验9和10) 和OspA血清型6进行的针攻击 (实验11和12) 的保护。使用VlsE ELISA与recA qPCR的组合来确定每只小鼠的感染状态。当至少一种方法给出阳性结果时, 小鼠被视为感染的。

[0464] 总之, 用本发明的突变OspA片段异二聚体多肽进行免疫赋予了抵抗所测试的所有疏螺旋体血清型的保护并且在一些情况下还可提供交叉保护。

[0465] 实施例5. 本发明的突变OspA异二聚体的1:1:1组合疫苗抵抗通过针攻击方法或蜱攻击方法进行的体内OspA血清型1和血清型2疏螺旋体攻击的保护能力的评估

[0466] 实验程序

[0467] 小鼠的免疫

[0468] 对于所有研究, 使用雌性C3H/HeN小鼠 (Janvier, France)。在每次攻击之前, 通过面静脉对十只8周大的小鼠的组进行取血, 并且制备并合并免疫前的血清。以两周的间隔施用每次100μL s.c. 免疫, 施用三次。用由各自1μg的Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1和Lip-S5D1-S6D1组成的组合疫苗免疫小鼠组。在攻击实验中包括三种其它OspA基抗原: Lip-

OspA1-His (全长血清型10spA,脂化的且带his-标签的)、脂化的嵌合OspA ST1/ST2*和单独的Lip-S1D1-S2D1。阴性(安慰剂)对照为单独的A1 (OH)₃-佐剂。所有抗原均以具有最终浓度为0.15%的氢氧化铝(A1 (OH)₃)的PBS配制。

[0469] *(嵌合OspA ST1/ST2 (SEQ ID NO:212) 为由以下各项组成的OspA嵌合体:OspB (菌株B31) 的N-末端部分的前10个氨基酸、与血清型20spA的C-末端部分的最后201-255氨基酸融合的血清型10spA的氨基酸11-200,并且其中血清型10spA的hLFA-1-样序列(146-170) 被来自血清型20spA的同源序列置换。血清型20spA序列之后为由于在载体中的终止密码子前面的克隆位点(XhoI) 而添加的两个氨基酸。)

[0470] 在第三次免疫之后一周,从面静脉收集血液并且制备超免疫血清。所有动物实验均根据奥地利法规(BGB1Nr.501/1989) 进行并且由“Magistratsabteilung 58”批准。

[0471] 使用体外生长的疏螺旋体对免疫的小鼠进行的针攻击

[0472] 在最后一次免疫之后两周,用在100μL生长培养基(BSKII) 中稀释的疏螺旋体属螺旋体*s.c.*攻击小鼠。攻击剂量为菌株相关的,单种菌株的毒力通过用于确定ID₅₀的攻击实验进行评估。用于针攻击实验的剂量范围为ID₅₀的20倍至50倍。在针攻击之后四周,处死小鼠,并且收集血液和组织以用于确定感染状态的读出方法。

[0473] 对免疫的小鼠的蜱攻击以及血清和组织的收集(在本文中也称为“蜱攻击方法”)

[0474] 为了用阿氏疏螺旋体攻击免疫的小鼠,用Veet[®] 膏(Reckitt Benckiser,英国) 去除每只小鼠背部的毛发并且用强力胶(Pattex,德国) 将小型通风容器粘到皮肤上。之后,将感染阿氏疏螺旋体菌株IS1的一只或两只蓖子硬蜱若虫应用于每只小鼠,允许其附着并进食,直到它们完全饱胀并掉落。监测每只单独的蜱的进食状态,并且在最终读出中仅包括从中收集至少一只完全进食的蜱的小鼠。

[0475] 结果

[0476] 将不带His-标签的脂化的突变OspA片段异二聚体以1:1:1比率组合并且测试其抵抗疏螺旋体攻击的保护能力。用阿氏疏螺旋体(ST2,菌株IS1,蜱攻击) 或用狭义伯氏疏螺旋体(ST1,菌株ZS7,针攻击) 各自在两次实验中攻击免疫的小鼠。其它OspA基抗原包括在所有四次实验中的Lip-S1D1-S2D2以及在实验15和16中的Lip-OspA1-His和脂化的嵌合OspA ST1/ST2。用单独的A1 (OH)₃佐剂免疫的小鼠组在每次实验中用作阴性对照组。对于用蜱进行的攻击,将1-2只蜱应用于每只小鼠并且在最终读出中仅包括从中至少一只蜱进食直到完全饱胀的小鼠。然而,在从中收集一只或两只完全进食的蜱的小鼠之间并没有区别。在表5中总结了来自四次实验的保护数据。

[0477] 与阴性对照组相比,在所有四次攻击实验中,包含1:1:1比率的三种脂化的突变OspA片段异二聚体的组合疫苗赋予统计上显著的保护(费希尔精确检验,双尾)。使用V1sE ELISA与recA qPCR的组合来确定每只小鼠的感染状态。当至少一种方法给出阳性结果时,小鼠被视为感染的。

[0478] 实施例6来自用突变OspA片段异二聚体免疫的小鼠的血清的抗体与疏螺旋体的细胞表面的结合

[0479] 实验程序

[0480] 小鼠的免疫

[0481] 对于所有研究,使用雌性C3H/HeN小鼠。在每次攻击之前,通过面静脉对十二只8周

大的小鼠的组进行取血,并且制备并合并免疫前的血清。以两周的间隔施用每次100 μ L s.c.免疫,施用三次。每个剂量包含1 μ g的每种相应蛋白质:Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1和Lip-S5D1-S6D1(组合疫苗),或者以最终浓度为0.15%的氢氧化铝作为佐剂的1 μ g脂化的全长OspA蛋白(ST1-ST6,如所指示的)或1 μ g单独的OspA异二聚体(Lip-S1D1-S2D1、Lip-S4D1-S3D1或Lip-S5D1-S6D1,如所指示的)。阴性(安慰剂)对照为单独的Al(OH)₃-佐剂。在第三次免疫之后一周,从面静脉收集血液并且制备超免疫血清。所有动物实验均根据奥地利法规(BGB1Nr.501/1989)进行并且由“Magistratsabteilung 58”批准。

[0482] 评估与疏螺旋体的结合的流式细胞术

[0483] 将螺旋体(1×10^6)与等体积的4%多聚甲醛混合并且在室温下在96-孔板(Nunc1on 96U,Nunc)中孵育2小时。将所述板2,000g离心5分钟并且丢弃上清液。用具有2%BSA的150 μ L HBSS(HBSS-B)洗涤细胞,如上所述地进行离心,并且丢弃上清液。通过在56 $^{\circ}$ C下将小鼠血清孵育35分钟来加热灭活它们。热灭活的血清于HBSS-B中稀释加并且通过使用Costar spin-X离心管过滤器(0.22 μ m,Corning,USA)4,000g离心3分钟来进行无菌过滤。将螺旋体溶解于100 μ L血清中并且在室温下孵育45分钟。将所述板以2,000g离心15分钟并且丢弃上清液。将细胞用150 μ L HBSS-B洗涤一次并且然后溶解于100 μ L HBSS-B中。将一微升二抗(PE缀合的山羊抗小鼠IgG,Beckman Coulter,USA)添加到细胞中并且在室温下在黑暗中孵育45分钟。将螺旋体用150 μ L HBSS-B洗涤一次并且然后溶解于含有2.5 μ M SYTO-17DNA染料的200 μ L HBSS中,并且在室温下在黑暗中孵育10分钟。染色的螺旋体通过以2000g离心5分钟来沉淀并且然后溶解于200 μ L HBSS中。用FC500(Beckman Coulter)流式细胞仪测量标记的螺旋体,分选SYTO-17阳性事件。从利用来自异二聚体免疫的组的血清获得的值中减去利用来自安慰剂免疫的组的血清获得的值,以考虑非特异性结合。

[0484] 结果

[0485] 在不同疏螺旋体表达所有六种OspA血清型的情况中观察到来自超免疫小鼠血清的抗体的结合,这表明响应于所有抗原而产生的抗体是具有功能活性的并且可原位结合天然OspA。荧光强度在大的血清稀释液范围内呈线性。对于大部分OspA血清型,对于异二聚体产生的血清所观察到的荧光强度与对于用脂化的全长OspA产生的血清所观察到的荧光强度是比得上的。

[0486] 实施例7制剂研究

[0487] 为了优化稳定性,进行关于本发明的组合疫苗的制剂的研究。结合氢氧化铝和抗原,在不同浓度下测试不同类型的缓冲液和稳定剂。确定了在pH 6.7 $\pm$ 0.2下的具有各自40 μ g/mL的三种异二聚体(总计120 μ g蛋白质)、10mM磷酸钠、150mM氯化钠、10mM L-甲硫氨酸、5%蔗糖、0.05%Tween 20(聚山梨醇酯20)以及0.15%(w/v)氢氧化铝的最佳制剂。#

[0488] 序列

[0489] SEQ ID NO:1

[0490] S2D0-His:阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2野生型序列的位置131-273的氨基酸,C-末端His标签(GLEHHHHHHH)

[0491] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLKSKEIAKSGETVVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH

[0492] SEQ ID NO:2

[0493] S2D1-His:具有二硫键类型1(aa 182和269)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0494] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCNALKGLE
HHHHHH

[0495] SEQ ID NO:3

[0496] S2D2-His:具有二硫键类型2(aa 182和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0497] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACKGLE
HHHHHH

[0498] SEQ ID NO:4

[0499] S2D3-His:具有二硫键类型3(aa 244和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0500] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0501] SEQ ID NO:5

[0502] S2D4-His:具有二硫键类型4(aa 141和241)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0503] ELSAKTMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0504] SEQ ID NO:6

[0505] S2D5-His:具有二硫键类型5(aa 165和265)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0506] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNCTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTCDELKNALKGLE
HHHHHH

[0507] SEQ ID NO:7

[0508] S2D6-His:具有二硫键类型6(aa 185和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0509] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTCTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACKGLE
HHHHHH

[0510] SEQ ID NO:8

[0511] S2D7-His:具有二硫键类型7(aa 199和223)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0512] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTIEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTC
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTCTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0513] SEQ ID NO:9

[0514] S2D8-His:具有二硫键类型8(aa 243和262)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0515] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTCTVQKYDSAGTNLEGTAVECKTLDDELKNALKGLE
HHHHHH

[0516] SEQ ID NO:10

[0517] S2D9-His:具有二硫键类型9(aa 184和204)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0518] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGCVTLSKEIAKSGEVTV
ALNDCNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0519] SEQ ID NO:11

[0520] S2D10-His:具有二硫键类型10(aa 201和214)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清
型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0521] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTV
ACNDTNTTQATKKTCAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0522] SEQ ID NO:12

[0523] S2D11-His:具有二硫键类型11(aa 246和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清
型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0524] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVCKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0525] SEQ ID NO:13

[0526] S2D12-His:具有二硫键类型12(aa 167和178)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清
型2的aa 131-273,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0527] ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTCEGKVANDKVTCEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLE
HHHHHH

[0528] SEQ ID NO:14

[0529] 疏螺旋体OspA脂化信号

[0530] MKKYLLGIGLILALIA

[0531] SEQ ID NO:15

[0532] 疏螺旋体OspB脂化信号

[0533] MRLLIGFALALALIG

- [0534] SEQ ID NO:16
- [0535] 大肠杆菌1pp脂化信号
- [0536] MKATKLVLGAVILGSTLLAG
- [0537] SEQ ID NO:17
- [0538] 来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的hLFA-1-样序列
- [0539] GYVLEGLTAE
- [0540] SEQ ID NO:18
- [0541] 来自阿氏疏螺旋体菌株K78的非-hLFA-1-样序列
- [0542] NFTLEGKVAND
- [0543] SEQ ID NO:19
- [0544] 阿氏疏螺旋体(菌株K78;OspA血清型2)
- [0545] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVDKIELKGTSKDNNGSGVLEGTGKDDKSKAKLTIADDLSKTTFELFKEDGKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKSTLTISVNSKKTTLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEQTAVEIKTLDELKNALK
- [0546] SEQ ID NO:20
- [0547] 狭义伯氏疏螺旋体(菌株B31,OspA血清型1)
- [0548] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKDNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLGGTTLEVFKEGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNKEGVESEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYVLEGLTAEKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK
- [0549] SEQ ID NO:21
- [0550] 伽氏疏螺旋体(菌株PBr,OspA血清型3)
- [0551] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSKDNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIFKEDGKTLVSRKVNSKDKSSTEEKFNKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTEGTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELKAALK
- [0552] SEQ ID NO:22
- [0553] 巴伐利亚疏螺旋体(菌株PBi,OspA血清型4)
- [0554] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSMATVDKLELKGTSKDNNGSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVNSKDKSSIEEFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
- [0555] SEQ ID NO:23
- [0556] 伽氏疏螺旋体(菌株PHei,OspA血清型5)
- [0557] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSKDNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSSTEEKFNKEGEISEKTI VRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVTLSKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLELKNALK

- [0558] SEQ ID NO:24
- [0559] 伽氏疏螺旋体(菌株DK29,0spA血清型6)
- [0560] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKD
NNGSGTLEGEKTDKSKVKSTIADDLSQTKFEIFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNGKGETSEKTIVRANGTRLE
YTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLKVTEGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTST
LTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK
- [0561] SEQ ID NO:25
- [0562] 伽氏疏螺旋体(菌株T25,0spA血清型7)
- [0563] MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKD
NNGSGVLEGVKAASKAKLTIADDLSQTKFEIFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNDKGKLESEKVVTRANGTRLE
YTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGETKLTVEAGTVTLSKNISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTST
LTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSPAIEIKDLEALKAALK
- [0564] SEQ ID NO:26
- [0565] 正向引物
- [0566] GTATGTTTAGTGAGGGGGTG
- [0567] SEQ ID NO:27
- [0568] 反向引物
- [0569] GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG
- [0570] SEQ ID NO:28
- [0571] 正向嵌套引物
- [0572] AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG
- [0573] SEQ ID NO:29
- [0574] 反向嵌套引物
- [0575] GTCTGATAAACCTGAGGTCGGA
- [0576] SEQ ID NO:30
- [0577] 25-聚体肽
- [0578] MKKDDQIAAMVLRGMAKDGQFALK
- [0579] SEQ ID NO:31
- [0580] 小鼠抗微生物肽前体
- [0581] RLAGLLRKGGEKIGELKKIGQKIKNFFQKLVPQPE
- [0582] SEQ ID NO:32
- [0583] 5'-(dIdC)₁₃-3'
- [0584] dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC
- [0585] SEQ ID NO:33
- [0586] KLK肽
- [0587] KLKLLLLLKLK
- [0588] SEQ ID NO:34
- [0589] 阿氏疏螺旋体(菌株K78,血清型2),0spA aa 126-273
- [0590] FNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKS

GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNA
LK

[0591] SEQ ID NO:35

[0592] 阿氏疏螺旋体(菌株K78,血清型2),OspA aa 131-273

[0593] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0594] SEQ ID NO:36

[0595] 肽接头

[0596] GGGGGGGG

[0597] SEQ ID NO:37

[0598] 肽接头

[0599] GGGGGGGGGGGG

[0600] SEQ ID NO:38

[0601] 肽接头

[0602] GAGA

[0603] SEQ ID NO:39

[0604] 肽接头

[0605] GAGAGAGA

[0606] SEQ ID NO:40

[0607] 肽接头

[0608] GAGAGAGAGAGA

[0609] SEQ ID NO:41

[0610] 肽接头

[0611] GGGSGGGS

[0612] SEQ ID NO:42

[0613] 肽接头

[0614] GGGSGGGS

[0615] SEQ ID NO:43

[0616] S1D4-S2D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型1和OspA血清型2的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0617] FNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVKEGTVTLSKNISKS
GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNA
LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLE
VKEGTVTLSKEIAKSGETVVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLE
GTAVEIKTLDELKNALK

[0618] SEQ ID NO:44

[0619] Lip-S1D4-S2D4_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型1和OspA血清型2的融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列

NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0620] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAA
ATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAGACCA
CCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGA

[0621] GCAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCA
AAAAGACGGCAGCTTGGAAGTCAAGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCAAAAAGACCAAAGATCTGGTC
TTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAAAGTGAAGGCTCTGCGGTGGAAT
CACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAA
ACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGGCGAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAA
CTGGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAA
AGTCGCCAATGACAAAGTCACCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAGAAATTGCAAAATCGGGTG
AAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCT
ACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAAACCACGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAA
ATACGATAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCTGGACGAAGTGAACGACGCGCTGA
AA

[0622] SEQ ID NO:45

[0623] Lip-S1D4-S2D4_His_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型1和OspA血清型2
的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,N-末端酯化,LN1接头序列,由非-hLFA-
1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0624]

LioCSSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVKEGTVTL SKNISKSGE
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSTLTITVNSKTKDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK
GTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVK
EGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGT
AVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH

[0625] SEQ ID NO:46

[0626] Lip-S1D4-S2D4_His_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型1和OspA血清型2
的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序
列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174,C末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0627] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAA
ATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAGACCA
CCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAAT
GATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGACGGCAGCTTGGAAGTCAAGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAA
TTCAAAAAGACCAAAGATCTGGTCTTACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCA
AACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGGCGAAAAC
GATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACTGGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAGCGAAAGAAGTTC

TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTG
TCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAC
CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCA
AACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACC
CTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0628] SEQ ID NO:47

[0629] S1D1-S2D1_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型1和OspA血清型2的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0630] FNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKS
GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNA
LKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLE
VKCGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTTLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLE
GTAVEIKTLDELCNALK

[0631] SEQ ID NO:48

[0632] Lip-S1D1-S2D1_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型1和OspA血清型2的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌lpp脂化信号, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0633] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCTGGAATACACCGGCATCAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCA
CCCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAAT
GATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAACCGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAA
TAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCA
AACTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAAC
GATGACGCGTGAAAACGGCACCAAACTGGAATATACGGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTG
TCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAC
CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCA
AACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACC
CTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA

[0634] SEQ ID NO:49

[0635] Lip-S1D1-S2D1_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型1和OspA血清型2的异二聚体融合蛋白, 用于添加脂质的N-末端CSS, N-末端酯化, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0636]

LipCSSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGE
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVK

CGTVTLSEKIEAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGT
AVEIKTLDELNALKGLEHHHHHH

[0637] SEQ ID NO:50

[0638] Lip-S1D1-S2D1_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型1和OspA血清型2的异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174, C末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0639] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATACACCGGCATCAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCA
CCCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAAT
GATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAAACCGCAGCTTGAAGTCTGAGCAGCTGACCATACCGTTAA
TAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAAACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCA
AACTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAC
GATGACGCGTGAAAACGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTG
TCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAAC
CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACACGCAGCTGGTCTTCACCA
AACAAGATACGATACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACC
CTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0640] SEQ ID NO:51

[0641] S3D4-S4D4_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0642] FNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTEGTVTLSEKISK
SGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKECTITVQYNRAGNALEGSPA

[0643] EIKDLAELKAALKGTSKNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKE
VLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVF
TKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

[0644] SEQ ID NO:52

[0645] Lip-S3D4-S4D4_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型3和OspA血清型4的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, LN1接头序列

[0646] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCAAAGTGTGCAAAAAAGTGGTACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACACGAAATCAA
AAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAA
CCAACTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGGTCGCACTG
AATGATACCGAAACACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAGGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAA
GAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAATGCACGATACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTA
ATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGTCGGAAAA

AACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAC
TCCTGAAAGATTTTGTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT
CTGAGCAAACATATTCCGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAA
GACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTCA
CGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAAATGATTCCGCAGGTACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAA
ACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAG

[0647] SEQ ID NO:53

[0648] Lip-S3D4-S4D4_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,N-末端脂化,LN1接头序列,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0649]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGTVTL SKNISKSG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKS DTS TLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPA EIKDLAELKAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLKV
TEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEG
NAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH

[0650] SEQ ID NO:54

[0651] Lip-S3D4-S4D4_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0652] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCCTGGAATACACCGAAATCAA
AAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAA
CCAACTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTG
AATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAA
GAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTA
ATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATCAACGCTAAAGGTGAACTGTGCGAAAA
AACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAG
TCCTGAAAGATTTTGTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT
CTGAGCAAACATATTCCGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAA
GACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTCA
CGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAAATGATTCCGCAGGTACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAAATCAAA
ACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAGGGTCTCGAGCAOACCACCACCACCAC

[0653] SEQ ID NO:55

[0654] S3D1-S4D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0655] FNEKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGTVTL SKNISK
SGEITVALNDTETTPADKKTGEWKS DTS TLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA EIKDLAELCA

ALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTL
KVTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNL
EGNAVEIKTLDELNALK

[0656] SEQ ID NO:56

[0657] Lip-S3D1-S4D1_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型3和OspA血清型4的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列

[0658] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAGGAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCTGGAATACACGGAATCAA
AAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAA
CCAACTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTG
AATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAA
GAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTA
ATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAA
AACAAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGAGCGAAAA
AACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAG
TCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGTT
CTGAGCAAACATATTCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAA
GACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTCA
CGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAA
ACCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAG

[0659] SEQ ID NO:57

[0660] Lip-S3D1-S4D1_His_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, N-末端脂化, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHH)

[0661]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTGTVTL SKNISKSG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKS DTSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGS PAEIKDLAELCAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKV
TCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEG
NAVEIKTLDELNALKGLEHHHHHH

[0662] SEQ ID NO:58

[0663] Lip-S3D1-S4D1_His_t:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHH)
ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGCTTCAACGA
AAAGGGCAAACCTGTCGGAAGGAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCTGGAATACACGGAATCAAAACGATG
GTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAACTG
ACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATAC

CGAAACCACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGC
AGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAATGCTCTG
GAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGG
CTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGAGCGAAAAAACGATCC
TGCGTGCGAATGGCACCCGTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAA
GATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAA
ACATATTCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAAGACGGGCA
AATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAA
GATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTGAAATCAAAACCCTGGA
TGAAGTGTGTAATGCTCTGAAGGGTC

[0664] TCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0665] SEQ ID NO:59

[0666] S5D4-S6D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型5和OspA血清型6的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0667] FNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLKVTEGTVTL SKNISK
SGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNA
LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTL
KVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNL
EGKAVEITTLKELKNALK

[0668] SEQ ID NO:60

[0669] Lip-S5D4-S6D4_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型5和OspA血清型6的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列

[0670]

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGCTTCAACGA
AAAGGGCGAAATCAGTGAAAAAACCATTTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGTCTGGAATATACCGACATCAAGAGCGATA
AAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTG
AAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACAC
CGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGA
AAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTACCAATCTGGAA
GGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTC
TGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTC
GCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATGCACGGATATCAAGTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGAT
T T T A C G C T G G A A G G T A C C C T G G C A G C A G A C G G T A A A C C A C G C T G A A G G T G A C
GGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCA
CGCCTGTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAAACG
AAGAATCTGGTGTTACCAAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAA
AGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAA

[0671] SEQ ID NO:61

[0672] Lip-S5D4-S6D4_His_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型5和OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,N-末端脂化,LN1接头序列,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0673]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLKVTEGTVTLSKNISKSG
EITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK
GTSDKNNSGSGKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLKV
TEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELKNALKGLEHHHHHH

[0674] SEQ ID NO:62

[0675] Lip-S5D4-S6D4_His_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型5和OspA血清型6的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0676] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAAACCATGTGCGTGCGTGTGGCACCCGTCTGGAATATACCGACATCAA
GAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAAC
GATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT
CTGTCAA

[0677] AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAA
AGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTC
ACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTAC
CACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCAACCACCACCAC

[0678] SEQ ID NO:63

[0679] S5D1-S6D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0680] FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLKVTCGTVTLSKNISK
SGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNA
LKGTSDKNNSGSGKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTL
KVTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNL
EGKAVEITTLKELCNALK

[0681] SEQ ID NO:64

[0682] Lip-S5D1-S6D1_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0683] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAA
ATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGAC
CATCGTGCCTGCGAACGGTACCCGCTGGAATATACGGACATTAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTT
CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCTGCTACGAAAAA
GACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTAACCTCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCA
CCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAA

[0684] SEQ ID NO:65

[0685] Lip-S5D1-S6D1_His_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,N-末端脂化,LN1接头序列,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0686]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTGTVTLKNIKSKG
EITVALDDTDSSGNKKSQTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKV
TCGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHHH

[0687] SEQ ID NO:66

[0688] Lip-S5D1-S6D1_His_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0689] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAA
ATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGAC
CATCGTGCCTGCGAACGGTACCCGCTGGAATATACGGACATTAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTT
CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCTGCTACGAAAAA
GACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTAACCTCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCA

CCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0690] SEQ ID NO:67

[0691] S2D4-S1D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型2和OspA血清型1的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174

[0692] FNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKS
GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNA
LKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLV
VKEGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLE
GSAVEITKLDEIKNALK

[0693] SEQ ID NO:68

[0694] Lip-S2D4-S1D4_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型2和OspA血清型1的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0695] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAACGATGACGCGTAATGCGGCACCAAACCTGGAATATACGGAAATGAA
AAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA
CCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAAAGAAATGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
CAGCAAGAAAAACCACGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACCGATAGTGCGGGTACC
AACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAA
CAATGGCTCTGGTAGCAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGAAAAAA
TCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAATCGGATGGCAGCGCAAAGCGAAGGAAGTT
CTGAAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCT
GAGCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAACCTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGA
CGGCAGCTTGGAACCTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCAAAAAGACCAAAGATCTGGTCTTCACG
AAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCTTTATGACAGCAACGGTACCAAACCTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAA
ACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAA

[0696] SEQ ID NO:69

[0697] Lip-S2D4-S1D4_His_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型2和OspA血清型1的异二聚体融合蛋白, 用于添加脂质的N-末端CSS, N-末端酯化, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0698]

LipCSSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVK
EGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEIKNALKGLEHHHHHH

[0699] SEQ ID NO:70

[0700] Lip-S2D4-S1D4_His_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型2和OspA血清型1的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0701] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACT

[0702] GGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCCGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGA
AGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCGTGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAAGAAATTGCAAAAT
CGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAA
ACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAATGTACGATCACCGT
GCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCCTGGACGAACTGAAAAACG
CCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAAC
GAAAAAGGCGAAGTCTCGGAAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAAATCGGA
TGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAGACCACCCTGG
TGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACC
GACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGACGGCAGCTTGGAACCTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAA
AAAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAAACCTGG
AAGGCTCTGCGGTGGAATCAGGAACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC
CAC

[0703] SEQ ID NO:71

[0704] S2D1-S1D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型2和OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0705] FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLKSKEIAKS
GEVTVLNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTTLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCA
LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLV
VKCGTVTLKSNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLE
GSAVEITKLDEICNALK

[0706] SEQ ID NO:72

[0707] Lip-S2D1-S1D1_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型2和OspA血清型1的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0708] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAACACGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAA
AAGCGATGGCACCCGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA
CCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
TAGCAAGAAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCA

ACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACCCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAAT
CATTACCCGCGCAGACGGCAGCCCGCCTGGAATACACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTG
AGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAAAC
CGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGA
AAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAACCTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAA
CTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAA

[0709] SEQ ID NO:73

[0710] Lip-S2D1-S1D1_His_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型2和OspA血清型1
的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列
NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174, N-末端脂化, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0711]

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVK
CGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEICNALKGLEHHHHHHH

[0712] SEQ ID NO:74

[0713] Lip-S2D1-S1D1_His_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型2和OspA血清型1
的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1
接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa64-174, C-末端His标
签 (GLEHHHHHHH)

[0714] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGCGCGAAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAAACCTGGAATATACGAAATGAA
AAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA
CCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
TAGCAAGAAAACACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCA
ACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACCCCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAAT
CATTACCCGCGCAGACGGCAGCCCGCCTGGAATACACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTG
AGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAAAC
CGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGA
AAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAACCTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAA
CTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0715] SEQ ID NO:75

[0716] S4D4-S3D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚

体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0717] FNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNA LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKL TVTEGTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNAL EGSPAIEIKDLAELKAALK

[0718] SEQ ID NO:76

[0719] Lip-S4D4-S3D4_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型4和OspA血清型3的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0720] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC TTCAACGCTAAAGGTGAACTGTGCGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATACACGGAATCAA GTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCA CGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTCTGAGCAAACATATTCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC GATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAAGACGGGCAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAA CTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGGTACCA ACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAATCAAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTAAACGATAAGGGCAAACGTGCAAAAAAGT GGTCAACCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTC TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA GACCGGCGAATGGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA CCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAGTATAATCGTGCCGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAG GACCTGGCGGAACCTGAAGGCGGCACTGAAA

[0721] SEQ ID NO:77

[0722] Lip-S4D4-S3D4_His_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0723]

LipCSSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNSGE ITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK GTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTV TEGTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEG SPAIEIKDLAELKAALKGLEHHHHHHH

[0724] SEQ ID NO:78

[0725] Lip-S4D4-S3D4_His_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0726] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC

TTCAACGCTAAAGGTGAACTGTCGGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATACACGGAATCAA
GTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCA
CGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATTCGGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC
GATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAAAGACGGGCAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAA
CTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGGTACCA
ACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAATCAAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTAAACGATAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGT
GGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACACCGAAATCAAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
GACCGGCGAATGGAAGGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA
CCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAG
GACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0727] SEQ ID NO:79

[0728] S4D1-S3D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0729] FNAKGELSEKTIILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTCGTVVLSKHIPNS
GEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDEL CNA
LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLSKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKL
TVTCGTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNAL
EGSPAELKD LAELCAALK

[0730] SEQ ID NO:80

[0731] Lip-S4D1-S3D1_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型4和OspA血清型3的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列

[0732] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGGAGGTTGCTCAAGC
TTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCTGGAATACACCGAAATCAA
ATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCA
CGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATTCGGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC
GATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAAGACGGGCAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCACTCAA
CTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCA
ACCTGGAAGGCAATGCCGTGAAATCAAAAACCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTAAACGATAAGGGCAAACCTGTCGAAAAAGT
GGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCTGGAATACACCGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACG
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
GACCGGCGAATGGAAGGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA
CCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAG
GACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAA

[0733] SEQ ID NO:81

[0734] Lip-S4D1-S3D1_His_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0735]

LipCSSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTCTGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKTKNI VFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDEL CNALKGTS DKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGK LSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFAL EGT LTDGGETKLT VTCGTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGIEWKSDTSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA EIKDLAELCAALKGLEHHHHHHH

[0736] SEQ ID NO:82

[0737] Lip-S4D1-S3D1_His_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0738]

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGCTTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGC GAATGGCACCCGCTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAGACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAAGATACGATCACCGTTCAAAAAATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTGAAATCAAAACCCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTTAACGATAAGGGCAAAGTGTGCGAAAAAGTGGTCACCGCGCAAATGGCACCCGCTGGAATACACGGAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAAGTACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAACA CGATCACCGTG CAGAACTATAATCGTGCCGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0739] SEQ ID NO:83

[0740] S6D4-S5D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型6和OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0741] FNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTL EGT LAADGKTTLKVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLE GKAVEITTLKELKNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEI SEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTL EGT LAADGKTTLKVTEGTVTLSKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLE GKAVEITTLKELKNALK

[0742] SEQ ID NO:84

[0743] Lip-S6D4-S5D4_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型6和OspA血清型5的中

间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0744] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGATATCAA
GTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGCGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAA
AACCATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGCTGGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAACCGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAA

[0745] ACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACCTATGATAGCGCAGGTACCAAT
CTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAA

[0746] SEQ ID NO:85

[0747] Lip-S6D4-S5D4_His_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型6和OspA血清型5
的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标
签(GLEHHHHHH)

[0748]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLKVTEGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLK
VTEGTVTLKSNISKSGETIVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELKNALKGLFH HHHHHH

[0749] SEQ ID NO:86

[0750] Lip-S6D4-S5D4_His_nt:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型6和OspA血清型5
的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1
接头序列,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0751] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGATATCAA
GTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGCGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAA
AACCATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGCTGGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAACCGGTAAAGCGAAGGAAG

TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCA
CGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0752] SEQ ID NO:87

[0753] S6D1-S5D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6和OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0754] FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLKVTCGTVVLSKNILK
SGEITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCN
ALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTT
LKVTCGTVTLSKNISKSGETITVALDDTSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNL
EGKAVEITTLKELCNALK

[0755] SEQ ID NO:88

[0756] Lip-S6D1-S5D1_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6和OspA血清型5的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0757] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATATACGGACATTAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAA
AACCATCGTCCGCGTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTG

[0758] GAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGTCCAAA
AACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTG
GGATTACGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATA
CGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAA
CTGTGTAATGCTCTGAAA

[0759] SEQ ID NO:89

[0760] Lip-S6D1-S5D1_His_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6和OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0761]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLKVTCGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLK

VTCGTVTL SKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHH

[0762] SEQ ID NO:90

[0763] Lip-S6D1-S5D1_His_nt:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6和OspA血清型5的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0764] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGC GTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATATACGGACATTAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCTGTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAA
AACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCA
CGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAAACTATGACAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0765] SEQ ID NO:91

[0766] S1D4-S2D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型1和具有二硫键类型1的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0767] FNEKGEVSEKIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTL SKNISK
GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWN SGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGS AVEITKLDEIKNA
LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTM TRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLE
VKCGTVTL SKETIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLE
GTAVEIKTLDEL CNALK

[0768] SEQ ID NO:92

[0769] Lip-S1D4-S2D1_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型1和具有二硫键类型1的OspA血清型2的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0770] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAATCATTACCCGTGCTTGGCGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAA
ATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAGACCA
CCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAAT
GATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGACGGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAA

TTCCAAAAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCA
AACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCAGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAC
GATGACGCGTGAAAACGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTG
TCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAC
CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCA
AACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACC
CTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAA

[0771] SEQ ID NO:93

[0772] Lip-S1D4-S2D1_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型1和具有二硫键类型1的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0773]

LipCSSFNEKGVESEKII TRACGTRLEYTG I KSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTL SKNISKSGE
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTM TRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVK
CGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDITVQKYDSAGTNLEGT
AVEIKTLDEL CNALKGLEHHHHHHH

[0774] SEQ ID NO:94

[0775] Lip-S1D4-S2D1_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型1和具有二硫键类型1的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0776] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCTCGGAAAAATCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAA
ATCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAGACCA
CCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAAT
GATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGACGGCAGCTTGAAGTCTGAGCAGCTGACGCTGACCATACGTTAA
TTCCAAAAGACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCA
AACTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCAGAAACTGGATGAAATCAAAAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAC
GATGACGCGTGAAAACGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTG
TCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAC
CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCA
AACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACC
CTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0777] SEQ ID NO:95

[0778] S1D1-S2D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型1和具有二硫键类型4的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0779] FNEKG EVSEK I I TRADGTRLEYTG I KSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTL SKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS AVFITKLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTL SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWD SKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0780] SEQ ID NO:96

[0781] Lip-S1D1-S2D4_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型1和具有二硫键类型4的OspA血清型2的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0782] ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATACACCGGCATCAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCAACCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAACCGCAGCTTGGAACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAACTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAACCGGCGCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAACACGCAGCTGGTCTTCACCAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAA

[0783] SEQ ID NO:97

[0784] Lip-S1D1-S2D4_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型1和具有二硫键类型4的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174, N-末端脂化, C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0785]

LipCSSFNEKG EVSEK I I TRADGTRLEYTG I KSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTL SKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS AVEITKLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTL SKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWD SKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH

[0786] SEQ ID NO:98

[0787] Lip-S1D1-S2D4_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型1和具有二硫键类型4的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0788] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAATCATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCTGGAATACACCGGCATCAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAACCA
CCCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAAT
GATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAAACCGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAA
TAGCAAGAAAAACAAAGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAAACCCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCA
AACTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAGGCGAACTGTGGCGAAAAAC
GATGACGCGTGAATGCGGCACCAAACTGGAATATACGAAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTG
TCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAAC
CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAACAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCA
AACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGGGGTACCAACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACC
CTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0789] SEQ ID NO:99

[0790] S3D4-S4D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0791] FNEKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTEGTVTL SKNISK
SGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGP AEIKDLAELKA
ALKGTSKDNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADK TTL
KVTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNL
EGNAVEIKTLDEL CNALK

[0792] SEQ ID NO:100

[0793] Lip-S3D4-S4D1_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0794] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCAAAGTGTGCAAAAAAGTGGTCACCCGCGTTGTGGCACCCGCCTGGAATACACCGAAATCAAA
AACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAAC
CAAAGTACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGA
ATGATACCGAAACACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTC AAAG
AACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAA
TGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAAA
ACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGAGCGAAAAA

ACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGT
CCTGAAAGATTTTGTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTC
TGAGCAAACATATTCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAG
ACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTCAC
GAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAAA
CCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAG

[0795] SEQ ID NO:101

[0796] Lip-S3D4-S4D1_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型3和具有二硫键类型1的
OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, N-末端脂化,
C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0797]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGTVTL SKNI SKSG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGS PAEIKDLAELKAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLKV
TCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEG
NAVEIKTLDELNALKGLEHHHHHHH

[0798] SEQ ID NO:102

[0799] Lip-S3D4-S4D1_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型3和具有二硫键类型1的
OspA血清型4的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-
末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0800] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCAGAAAAAGTGGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACACCGAAATCAA
AAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAA
CCAACTGACCGTGACGGAAGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTG
AATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAA
GAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTA
ATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATCAACGCTAAAGGTGAACTGAGCGAAAA
AACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAG
TCCTGAAAGATTTTGTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTT
CTGAGCAAACATATTCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAA
GACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTCA
CGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAA
ACCCTGGATGAACTGTGTAATGCTCTGAAGGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0801] SEQ ID NO:103

[0802] S3D1-S4D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清
型4的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0803] FNEKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGTVTL SKNISK
SGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGS PA

[0804] EIKDLAELCAALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

[0805] SEQ ID NO:104

[0806] Lip-S3D1-S4D4_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0807] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCTGGAATACACGAAATCAA AACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGA ACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGCTAAAGGTGAACTGTGCGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGTTCTGAGCAAACATATTCCGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAA GACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTCA CGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGGTACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAATCAAA ACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAG

[0808] SEQ ID NO:105

[0809] Lip-S3D1-S4D4_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0810]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKS DTTSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGS PAEIKDLAELCAALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNAL KGLEHHHHHHH

[0811] SEQ ID NO:106

[0812] Lip-S3D1-S4D4_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0813] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGCTTCAACGAAAAGGGCAAACCTGTCGGAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCTGGAATACACGAAATCAA AACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTG

AATGATACCGAAACACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAA
GAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTA
ATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAGGCACTAGTGACAAA
AACAAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCACGCTAAAGGTGAACTGTGCGAAAA
AACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATACACGGAAATCAAGTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAG
TCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT
CTGAGCAAACATATTCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAA
GACGGGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTCA
CGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAAATGATTCCGCGAGGTACCAACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAATCAAA
ACCCTGGACGAACTGAAAAATGCTCTGAAGGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0814] SEQ ID NO:107

[0815] S5D4-S6D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型5和具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0816] FNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVTEGTVTLNISK
SGEITVALDDTDSSGNKKSCTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNA
LKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTL
KVTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNL
EGKAVEITTLKELCNALK

[0817] SEQ ID NO:108

[0818] Lip-S5D4-S6D1_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型5和具有二硫键类型1的OspA血清型6的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0819] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAAACCATTTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGTCTGGAATATACCGACATCAA
GAGCGATAAACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTACGAAAGATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGAC
CATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCTGGAATATACGGACATTAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTT
CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAA
GACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCA
CCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAA

[0820] SEQ ID NO:109

[0821] Lip-S5D4-S6D1_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型5和具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,

C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0822]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTEGTVTL SKNISKSG
EITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKV
TCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALKGLEHHHHHH

[0823] SEQ ID NO:110

[0824] Lip-S5D4-S6D1_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型5和具有二硫键类型1的
OspA血清型6的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-
末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0825] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAATCAGTGAAAAAACCATTTGTGCGTGTGGCAGCCGCTCTGGAATATACCGACATCAA
GAGCGATAAAACGGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAATGCACGATCACCGTGAAAACCTATGATAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGAC
CATCGTGTGCGTGCAGACGGTACCCGCTGGAATATACGGACATTAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTT
CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCTGTCTACGAAAAA
GACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCA
CCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGC

[0826] ACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTCTC
GAGCACCACCACCACCACCAC

[0827] SEQ ID NO:111

[0828] S5D1-S6D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型5和具有二硫键类型4的OspA血清
型6的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0829] FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLFGTLAADGKTTLKVTCGTVTL SKNISK
SGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNA
LKGTSDKNNGSGSKEKNKDGYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTL
KVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNL
EGKAVEITTLKELKNALK

[0830] SEQ ID NO:112

[0831] Lip-S5D1-S6D4_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型5和具有二硫键类型4的OspA
血清型6的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂
质的N-末端CSS, LN1接头序列

[0832] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC

TTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAA
ATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTACAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAAAC
GATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT
CTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAA
GACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCA
CCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGGCGTTGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAA

[0833] SEQ ID NO:113

[0834] Lip-S5D1-S6D4_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型5和具有二硫键类型4的
OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,
C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0835]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTCTVTLKNIKSKG
EITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK
GTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTIKSDGDGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVT
EGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGWDSKTSTLIISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGK
AVEITTLKELKNALKGLEHHHHHHH

[0836] SEQ ID NO:114

[0837] Lip-S5D1-S6D4_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型5和具有二硫键类型4的
OspA血清型6的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-
末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0838] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAA
ATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTG
GATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTACCTGGGATTACAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAA
TCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCA
ATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAAAC
GATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATACACGGATATCAAGTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCC
TGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTT
CTGTCAA

[0839] AAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAA

AGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTC
ACCAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTAC
CACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0840] SEQ ID NO:115

[0841] S2D4-S1D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型2和具有二硫键类型1的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0842] FNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKS
GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNA
LKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLV
VKCGTVTLTKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLE
GSAVEITKLDEICNALK

[0843] SEQ ID NO:116

[0844] Lip-S2D4-S1D1_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型2和具有二硫键类型1的OspA血清型1的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0845] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAACGATGACGCGTAATGCGGCACCAAACCTGGAATATACGGAAATGAA
AAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA
CCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
CAGCAAGAAAAACCGCAGCTGGTCTTACCAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCA
ACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAT
CATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCTGGAATACACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAAACACCCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTG
AGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAACCTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAAAC
CGCAGCTTGGAACCTCAGGCACCTCGACGCTGACCATACGGTTAATAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGA
AAGAAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAACCTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAA
CTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAA

[0846] SEQ ID NO:117

[0847] Lip-S2D4-S1D1_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型2和具有二硫键类型1的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174, N-末端脂化, C-末端His标签 (GLEHHHHH)

[0848]

LipCSSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKG
CGTVTLTKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAWNSGTSTLTI TVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEICNALKGLEHHHHHH

[0849] SEQ ID NO:118

[0850] Lip-S2D4-S1D1_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型2和具有二硫键类型1的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0851] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAACGATGACGCGTGAATGCGGCACCAAAGTGAATATACGAAATGAA
AAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA
CCCTGGAAGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTGTCAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
CAGCAAGAAAAACACGCAGCTGGTCTTCACCAAAACAATGTACGATCACCGTGCAGAAATACGATAGTGCGGGTACCA
ACCTGGAAGGCACCGCTGTTGAAATCAAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCAGCGAAAAAAT
CATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCTGGAATACACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCAACCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTG
AGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAACCTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAAAC
CGCAGCTTGGAACCTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAACCAAAGATCTGGTCTTCACGA
AAGAAAAACACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAACCTGGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAA
CTGGATGAAATCTGTAATGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0852] SEQ ID NO:119

[0853] S2D1-S1D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型2和具有二硫键类型4的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0854] FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLKSKEIAKS
GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTI SVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCA
LKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLV
VKEGTVTLTKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAWNSGTSTLTI TVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLE
GSAVEITKLDEIKNALK

[0855] SEQ ID NO:120

[0856] Lip-S2D1-S1D4_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型2和具有二硫键类型4的OspA血清型1的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa164-174

[0857] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTCGGCGAAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAAAGTGAATATACGAAATGAA
AAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA

CCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
TAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACC
AACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAAACCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAA
CAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGAAAAAA
TCATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAATTCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTT
CTGAAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCT
GAGCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGA
CGGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAAAAAGACCAAAGATCTGGTCTTCACG
AAAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAAACCTGGAAGGCTCTGCGGTGGAATCACGAA
ACTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAA

[0858] SEQ ID NO:121

[0859] Lip-S2D1-S1D4_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型2和具有二硫键类型4的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0860]

LipCSSFNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCLNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVK
EGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEIKNALKGLEHHHHHHH

[0861] SEQ ID NO:122

[0862] Lip-S2D1-S1D4_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型2和具有二硫键类型4的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0863] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGAAAAAGGCGAACTGTGGCGAAAAACGATGACGCGTGAAAACGGCACCAAACCTGGAATATACGGAATGAA
AAGCGATGGCACCGGTAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCA
CCCTGGAAGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAAAGAAATTGCAAAATCGGGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAAC
GATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAA
TAGCAAGAAAACCACGCAGCTGGTCTTCACCAAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCA
ACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAAACCTGGACGAACTGTGTAACGCCCTGAAAGGCACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTCTCGGAAAAAAT
CATTACCCGTGCTTGCGGCACCCGTCTGGAATACACCGGCATTAATTCGGATGGCAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGATAAGACCACCCTGGTGGTGAAAGAAGGCACCGTTACGCTG
AGCAAAAACATTAGTAAGTCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAAAAGAC
GGCAGCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATTCCAAAAAGACCAAAGATCTGATCTTCACGA

AAGAATGCACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAACGGTACCAAACCTGGAAGGCTCTGCGGTGGAAATCACGAAA
CTGGATGAAATCAAAAATGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0864] SEQ ID NO:123

[0865] S4D4-S3D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型4和具有二硫键类型1的OspA血清型3的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0866] FNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNS
GEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQQYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNA
LKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKL
TVTCGTVTLNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNAL
EGSPAEDLAELCAALK

[0867] SEQ ID NO:124

[0868] Lip-S4D4-S3D1_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型4和具有二硫键类型1的OspA血清型3的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列

[0869] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGCTAAAGGTGAACTGTCGAAAAAACCATCCTGCGCGGTGTGGGACCCGCTGGAATACACGGAATCAA
GTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCA
CGCTGAAGGTGACGGAAGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATCCGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC
GATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAAGACGGGCAAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAA
CTCGAAAAAGACCAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCAGGTACCA
ACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAATCAAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTTAACGATAAGGGCAAACCTGTCGAAAAAGT
GGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCCTGGAATACACGGAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACCTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACG
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
GACCGGCGAATGGAAGGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA
CCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAG
GACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAA

[0870] SEQ ID NO:125

[0871] Lip-S4D4-S3D1_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型4和具有二硫键类型1的OspA血清型3的异二聚体融合蛋白, 用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, 用于添加脂质的N-末端CSS, N-末端脂化, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0872]

LipCSSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNSGE
ITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSG

[0873] KAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTCTGTVTLNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLT
ISKNSQPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAELKDLAELCAALKGLEHHHHHH

[0874] SEQ ID NO:126

[0875] Lip-S4D4-S3D1_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型4和具有二硫键类型1的OspA血清型3的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHH)

[0876] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGCTAAAGGTGAACTGTCGAAAAAACCATCCTGCGCGCCTGTGGCACCCGCTGGAATACACGAAATCAA
GTCGGACGGCACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGAGAAAAGCA
CGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC
GATAGCAATTCTACGCAGGCGACCAAAAAAGACGGGCAAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAA
CTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTACGAAGGAATGCACGATCACCGTTCAAAAATATGATTCCGCGAGGTACCA
ACCTGGAAGGCAACGCTGTGGAATCAAAACCTGGACGAACTGAAAAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTTAACGATAAGGGCAAACGTGTCGAAAAAGT
GGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCTGGAATACACGAAATCAAAACGATGGTAGCGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACGTACCGTGACGTGCGGCACCGTTACG
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
GACCGGCGAATGGAAGGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA
CCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAG
GACCTGGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0877] SEQ ID NO:127

[0878] S4D1-S3D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型4和具有二硫键类型4的OspA血清型3的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0879] FNAKGELSEKTIILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTCGTVVLSKHIPNS
GEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDEL CNA
LKGTSDKNNSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKL
TVTEGTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNAL
EGSPAIEIKDLAELKAALK

[0880] SEQ ID NO:128

[0881] Lip-S4D1-S3D4_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型4和具有二硫键类型4的OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列

[0882] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCTGGAATACACCGAAATCAA
ATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCA
CGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATCCGAACTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC
GATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAAGACGGGCAAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAA
CTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCA
ACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAAACCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTTAACGATAAGGGCAAACGTGTCAGAAAAAGT
GGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACACCGAAATCAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACGTACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG

CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
GACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA
CCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAG
GACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAA

[0883] SEQ ID NO:129

[0884] Lip-S4D1-S3D4_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型4和具有二硫键类型4的
OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, N-末端脂化,
C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0885]

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTCGTVVLSKHIPNSGE
ITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLT
TEGTVTLNLSKISKSGETITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEG
SPAEIKDLAELKAALKGLEHHHHHHH

[0886] SEQ ID NO:130

[0887] Lip-S4D1-S3D4_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型4和具有二硫键类型4的
OspA血清型3的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-
末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0888] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGTCTGGAATACACCGAAATCAA
ATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCA
CGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATTCGGAACCTCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAAC
GATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAAGACGGGCAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAA
CTCGAAAAAGACCAAAAAATATTGTGTTCACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCA
ACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAAACCCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAAC
AATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTTAACGATAAGGGCAAACGTGTCAGAAAAAGT
GGTCACCCGCGCTTGTGGCACCCGCTGGAATACACCGAAATCAAAACGACGGCTCGGGCAAAGCGAAGGAAGTTC
TGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACCAAACGTACCGTGACGGAAGGCACCGTTACG
CTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAAATCACGGTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
GACCGGCGAATGAAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCA
CCAAAGAATGCACGATCACCGTGCAGAACTATAATCGTGCCGGTAATGCTCTGGAAGGCTCCCCGGCTGAAATCAAG
GACCTGGCGGAACTGAAGGCGGCACTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0889] SEQ ID NO:131

[0890] S6D4-S5D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型6和具有二硫键类型1的OspA血清
型5的异二聚体融合蛋白, LN1接头序列

[0891] FNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILK
SGEITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKN
ALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTT
LKVTCGTVTLNLSKISKSGETITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNL

EGKAVEITTLKELCNALK

[0892] SEQ ID NO:132

[0893] Lip-S6D4-S5D1_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型6和具有二硫键类型1的OspA血清型5的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0894] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGATATCAA
GTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAAGATTTTAGGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAA
AACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCCTGGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGATTACGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCA
CGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAA

[0895] SEQ ID NO:133

[0896] Lip-S6D4-S5D1_His_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型6和具有二硫键类型1的OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0897]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLKVTEGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLK
VTCGTVTLNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALGLEHHHHHHH

[0898] SEQ ID NO:134

[0899] Lip-S6D4-S5D1_His_nt:具有二硫键类型4的OspA血清型6和具有二硫键类型1的OspA血清型5的异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌1pp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0900] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGTGAAAAACGATTGTTTCGCGCCTGTGGCACCCGCCTGGAATACACGGATATCAA
GTCGGATGGTTCGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGGAAGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGACAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAAAGAATGCACGATCACCGTTCAACGCTATGATAGTGGGGCA

CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCTCAGAAAA
AACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCTGGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGATTACGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCA
CGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0901] SEQ ID NO:135

[0902] S6D1-S5D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型6和具有二硫键类型4的OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,LN1接头序列

[0903] FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLVKTCGTVVLSKNILK
SGEITAAALDDSDTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCN
ALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTT
LVKTEGTVTLNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSCTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNL
EGKAVEITTLKELKNALK

[0904] SEQ ID NO:136

[0905] Lip-S6D1-S5D4_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型6和具有二硫键类型4的OspA血清型5的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,大肠杆菌lpp脂化信号,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列

[0906] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCTGGAATATACGGACATTAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAA
AACCATTGTGCGTGCGTGTGGCACCCGTCTGGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAACGGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCA
CGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGT

[0907] ACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAA

[0908] SEQ ID NO:137

[0909] Lip-S6D1-S5D4_His_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型6和具有二硫键类型4的OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0910]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLKVTCGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLK
VTEGTVTLTKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELKNALKGLEHHHHHHH

[0911] SEQ ID NO:138

[0912] Lip-S6D1-S5D4_His_nt:具有二硫键类型1的OspA血清型6和具有二硫键类型4的
OspA血清型5的异二聚体融合蛋白的编码序列, 大肠杆菌1pp脂化信号, 用于添加脂质的N-
末端CSS, LN1接头序列, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0913] ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAAGC
TTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCCTGGAATATACGGACATTAA
ATCGGACGGCAGCGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAA
CCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCACCGCAGCTCTG
GATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGT
CAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCA
CCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAA
AACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAATCAGTGAAAA
AACCATTGTGCGTGCGTGTCGACCCGCTCTGGAATATACCGACATCAAGAGCGATAAACGGGTAAAGCGAAGGAAG
TTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACCACGCTGAAGGTGACCGAAGGTACCGTT
ACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAA
GAGCGGTACCTGGGACTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTGGTCTTCA
CGAAAGAATGCACGATCACCGTGCAAACTATGATAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACC
ACGCTGAAAGAACTGAAGAATGCTCTGAAAGGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

[0914] SEQ ID NO:140

[0915] Lip-S2D0-His:阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2野生型序列的位置131-273的
氨基酸, 用于添加脂质的N-末端CKQN, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0916]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLKSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEH
HHHHH

[0917] SEQ ID NO:141

[0918] Lip-S2D1-His:具有二硫键类型1(aa 182和269)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血
清型2的aa 131-273, 用于添加脂质的N-末端CKQN, C-末端His标签 (GLEHHHHHH)

[0919]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLKSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCNALKGLEH
HHHHH

[0920] SEQ ID NO:142

[0921] Lip-S2D2-His:具有二硫键类型2(aa 182和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0922]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACKGLEH
HHHHH

[0923] SEQ ID NO:143

[0924] Lip-S2D3-His:具有二硫键类型3(aa 244和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0925]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDELKNALKGLEH
HHHHH

[0926] SEQ ID NO:144

[0927] Lip-S2D4-His:具有二硫键类型4(aa 141和241)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0928]

LipCKQNELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEH
HHHHH

[0929] SEQ ID NO:145

[0930] Lip-S2D5-His:具有二硫键类型5(aa 165和265)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0931]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNCTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTCDELKNALKGLEH
HHHHH

[0932] SEQ ID NO:146

[0933] Lip-S2D6-His:具有二硫键类型6(aa 185和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0934]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTCTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACKGLEH
HHHHH

[0935] SEQ ID NO:147

[0936] Lip-S2D7-His:具有二硫键类型7(aa 199和223)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0937]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTCA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTCTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEH

HHHHH

[0938] SEQ ID NO:148

[0939] Lip-S2D8-His:具有二硫键类型8(aa 243和262)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0940]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTCTVQKYDSAGTNLEGTAVECKTLDELKNALKGLEHHHHH

[0941] SEQ ID NO:149

[0942] Lip-S2D9-His:具有二硫键类型9(aa 184和204)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0943]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGCVTLSKEIAKSGEVTVALNDCNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHH

[0944] SEQ ID NO:150

[0945] Lip-S2D10-His:具有二硫键类型10(aa 201和214)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0946]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVACNDTNTTQATKKTCAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHH

[0947] SEQ ID NO:151

[0948] Lip-S2D11-His:具有二硫键类型11(aa 246和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0949]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVCKYDSAGTNLEGT_CVEIKTLDELKNALKGLEHHHHH

[0950] SEQ ID NO:152

[0951] Lip-S2D12-His:具有二硫键类型12(aa 167和178)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN,C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[0952]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTCEGKVANDKVTCEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHH

[0953] SEQ ID NO:153

[0954] Lip-S2D0:阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2野生型序列的位置131-273的氨基酸,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0955]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0956] SEQ ID NO:154

[0957] Lip-S2D1:具有二硫键类型1(aa 182和269)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0958]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCNALK

[0959] SEQ ID NO:155

[0960] Lip-S2D2:具有二硫键类型2(aa 182和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0961]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACK

[0962] SEQ ID NO:156

[0963] Lip-S2D3:具有二硫键类型3(aa 244和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0964]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDELKNALK

[0965] SEQ ID NO:157

[0966] Lip-S2D4:具有二硫键类型4(aa 141和241)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0967]

LipCKQNELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0968] SEQ ID NO:158

[0969] Lip-S2D5:具有二硫键类型5(aa 165和265)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0970]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNCTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTCDELKNALK

[0971] SEQ ID NO:159

[0972] Lip-S2D6:具有二硫键类型6(aa 185和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2
的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0973]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTCTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACK

[0974] SEQ ID NO:160

[0975] Lip-S2D7:具有二硫键类型7(aa 199和223)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0976]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTCA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTCTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0977] SEQ ID NO:161

[0978] Lip-S2D8:具有二硫键类型8(aa 243和262)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0979]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLWVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTCTVQKYDSAGTNLEGTAVECKTLDELKNALK

[0980] SEQ ID NO:162

[0981] Lip-S2D9:具有二硫键类型9(aa 184和204)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0982]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGCVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0983] SEQ ID NO:163

[0984] Lip-S2D10:具有二硫键类型10(aa 201和214)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0985]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTWMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
CNDTNTTQATKKTCAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0986] SEQ ID NO:164

[0987] Lip-S2D11:具有二硫键类型11(aa 246和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0988]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVCKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0989] SEQ ID NO:165

[0990] Lip-S2D12:具有二硫键类型12(aa 167和178)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273,用于添加脂质的N-末端CKQN

[0991]

LipCKQNELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTCEGKVANDKVTCEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA
LNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0992] SEQ ID NO:166

[0993] S2D0:阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2野生型序列的位置131-273的氨基酸

[0994] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGEVTVA

ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[0995] SEQ ID NO:167

[0996] S2D1:具有二硫键类型1(aa 182和269)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[0997] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCNALK

[0998] SEQ ID NO:168

[0999] S2D2:具有二硫键类型2(aa 182和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1000] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACK

[1001] SEQ ID NO:169

[1002] S2D3:具有二硫键类型3(aa 244和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1003] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTICVQKYDSAGTNLEGTCVEIKTLDELKNALK

[1004] SEQ ID NO:170

[1005] S2D4:具有二硫键类型4(aa 141和241)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1006] ELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1007] SEQ ID NO:171

[1008] S2D5:具有二硫键类型5(aa 165和265)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1009] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNCTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTCDELKNALK

[1010] SEQ ID NO:172

[1011] S2D6:具有二硫键类型6(aa 185和272)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1012] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTCTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNACK

[1013] SEQ ID NO:173

[1014] S2D7:具有二硫键类型7(aa 199和223)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1015] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETC
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTCTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1016] SEQ ID NO:174

[1017] S2D8:具有二硫键类型8(aa 243和262)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1018] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTCTVQKYDSAGTNLEGTAVECKTLDELKNALK

[1019] SEQ ID NO:175

[1020] S2D9:具有二硫键类型9(aa 184和204)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1021] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGCVTLTSKEIAKSGETV
ALNDCNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1022] SEQ ID NO:176

[1023] S2D10:具有二硫键类型10(aa 201和214)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1024] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLTSKEIAKSGETV
ACNDTNTTQATKKTCAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1025] SEQ ID NO:177

[1026] S2D11:具有二硫键类型11(aa 246和259)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1027] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLTSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVCKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1028] SEQ ID NO:178

[1029] S2D12:具有二硫键类型12(aa 167和178)的阿氏疏螺旋体菌株K780spA血清型2的aa 131-273

[1030] ELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTCEGKVANDKVTCEVKEGTVTLTSKEIAKSGETV
ALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1031] SEQ ID NO:179

[1032] 狭义伯氏疏螺旋体(菌株B31,血清型1),0spA_aa 126-273,具有来自血清型10spA的置换的hLFA-样序列

[1033] FNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSTKNISKS
GEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNA
LK

[1034] SEQ ID NO:180

[1035] 伽氏疏螺旋体(菌株PBr,血清型3),0spA_aa 126-274

[1036] FNDKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVEGTVTLSTKNISK
SGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKA
ALK

[1037] SEQ ID NO:181

[1038] 巴伐利亚疏螺旋体(菌株PBi,血清型4),0spA_aa 126-273

[1039] FNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLKVTEGTVVLSKHIPNS
GEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNA
LK

[1040] SEQ ID NO:182

[1041] 伽氏疏螺旋体(菌株PHei,血清型5),0spA_aa 126-273

[1042] FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLIKVTEGTVTLSTKNIS

KSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKN
ALK

[1043] SEQ ID NO:183

[1044] 伽氏疏螺旋体(菌株DK29,血清型6),OspA_aa 126-274

[1045] FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDF TLEGT LAADGKTTLKVTEGTVVLSKNILK
SGEITAAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKN
ALK

[1046] SEQ ID NO:184

[1047] 由来自狭义伯氏疏螺旋体菌株B31的OspA-N-末端半部分的两个分开的环区域构建
的LN1肽接头(aa 65-74和aa 42-53,在位置53处的氨基酸交换:D53S)

[1048] GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS

[1049] SEQ ID NO:185

[1050] Lip-S1D4-S2D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型1和OspA血清型2的异
二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列
NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174

[1051]

LipCSSFNEKG EVSEKIIITRACGTRLEYTG IKS DGS GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGE
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELS AKTMTRECGTKLEYTEMKSDGT

[1052] GKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKS GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLT
ISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

[1053] SEQ ID NO:186

[1054] Lip-S1D1-S2D1_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型1和OspA血清型2的异二聚体
融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置
换的OspA血清型1的aa 164-174, N-末端脂化

[1055]

LipCSSFNEKG EVSEKIIITRADGTRLEYTG IKS DGS GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGE
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEICNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELS AKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEV
CGTVTLSKEIAKS GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGT
AVEIKTLDELCNALK

[1056] SEQ ID NO:187

[1057] Lip-S3D4-S4D4_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体
融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS, LN1接头序列, N-末端脂化

[1058]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFAL EGTLDGGETKLT VTEGTVTLSKNISKSG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKS DTSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGS PAEIKDLAELKAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFAL EGT LAADKTTLKV
TEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEG

NAVEIKTLDELKNALK

[1059] SEQ ID NO:188

[1060] Lip-S3D1-S4D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型3和OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1061]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTGTVTLNISKSG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAEIKDLAELCAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTLRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVK
TCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEG
NAVEIKTLDELKNALK

[1062] SEQ ID NO:189

[1063] Lip-S5D4-S6D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型5和OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1064]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVTEGTVTLNISKSG
EITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVK
TEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELKNALK

[1065] SEQ ID NO:190

[1066] Lip-S5D1-S6D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1067]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVTCGTVTLNISKSG
EITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVK
TCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALK

[1068] SEQ ID NO:191

[1069] Lip-S2D4-S1D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型2和OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化

[1070]

LipCSSFNEKGELSAKTMTRCGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLNISKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVK
EGTVTLNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEIKNALK

[1071] SEQ ID NO:192

[1072] Lip-S2D1-S1D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型2和OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化

[1073]

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVK
CGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEICNALK

[1074] SEQ ID NO:193

[1075] Lip-S4D4-S3D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1076]

LipCSSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGE
ITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLT
TEGTVTLSKNISKSGETVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEG
SPAELKDLAELKAALK

[1077] SEQ ID NO:194

[1078] Lip-S4D1-S3D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型4和OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1079]

LipCSSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTCGTVVLSKHIPNSGE
ITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLT
TCGTVTLSKNISKSGETVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEG
SPAELKDLAELCAALK

[1080] SEQ ID NO:195

[1081] Lip-S6D4-S5D4_aa:两者均具有二硫键类型4的OspA血清型6和OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1082]

LipCSSFNKGGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLK
VTEGTVTLSKNISKSGETVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELKNALK

[1083] SEQ ID NO:196

[1084] Lip-S6D1-S5D1_aa:两者均具有二硫键类型1的OspA血清型6和OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1085]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLKVTCGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLK
VTCGTVTLSKNISKSGETIVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALK

[1086] SEQ ID NO:197

[1087] Lip-S1D4-S2D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型1和具有二硫键类型1的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化

[1088]

LipCSSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGTVTLSKNISKSGET
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVK
CGTVTLSKEIAKSGETVVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGT
AVEIKTLDELKNALK

[1089] SEQ ID NO:198

[1090] Lip-S 1D1-S2D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型1和具有二硫键类型4的OspA血清型2的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化

[1091]

LipCSSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLSKNISKSGET
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEICNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVK
EGTVTLSKEIAKSGETVVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGT
AVEIKTLDELKNALK

[1092] SEQ ID NO:199

[1093] Lip-S3D4-S4D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1094]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTEGTVTLSKNISKSG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEGSPAEIKDLAELKAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTLRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALLEGTLAADKTTLKV
TCGTVVLSKHIPNSGETIVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEG
NAVEIKTLDELKNALK

[1095] SEQ ID NO:200

[1096] Lip-S3D1-S4D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型3和具有二硫键类型1的OspA血清型4的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1097]

LipCSSFNEKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTTCGTVTLSKNIKSKG
EITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTITISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNAKGELSEKTILRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTTLKV
TEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKVVDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLE
GNAVEIKTLDELKNALK

[1098] SEQ ID NO:201

[1099] Lip-S5D4-S6D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型5和具有二硫键类型1的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1100]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTTLKVTEGTVTLSKNIKSKG
EITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTTLKV
TCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALK

[1101] SEQ ID NO:202

[1102] Lip-S5D1-S6D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型5和具有二硫键类型4的OspA血清型6的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1103]

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTTLKVTCGTVTLS

[1104] KNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGK
AVEITTLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTL
LEGTLAADGKTTTLKVTEGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECT
ITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK

[1105] SEQ ID NO:203

[1106] Lip-S2D4-S1D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型2和具有二硫键类型1的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化

[1107]

LipCSSFNEKGELSAKMTRECGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAVVDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQCTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGKSDGS

[1108] GKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVCGTVTLSKNIKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLT
ITVNSKKTDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEICNALK

[1109] SEQ ID NO:204

[1110] Lip-S2D1-S1D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型2和具有二硫键类型4的OspA血清型1的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,由非-hLFA-1-样序列NFTLEGKVAND置换的OspA血清型1的aa 164-174,N-末端脂化

[1111]

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGE
VTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKIIITRACGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVK
EGTVTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKECTITVQQYDSNGTKLEGS
AVEITKLDEIKNALK

[1112] SEQ ID NO:205

[1113] Lip-S4D4-S3D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型4和具有二硫键类型1的OspA血清型3的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1114]

LipCSSFNAKGELSEKTI LRACGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGE
ITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKECTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLT
TCGTVTLSKNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEG
SPAEIKDLAELCAALK

[1115] SEQ ID NO:206

[1116] Lip-S4D1-S3D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型4和具有二硫键类型4的OspA血清型3的中间和最终异二聚体融合蛋白的编码序列,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1117]

LipCSSFNAKGELSEKTI LRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTCGTVVLSKHIPNSGE
ITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELNALK
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLSEKVVTRACGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLT
TEGTVTLSKNISKSGETIVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKECTITVQNYNRAGNALEG
SPAEIKDLAELKAALK

[1118] SEQ ID NO:207

[1119] Lip-S6D4-S5D1_aa:具有二硫键类型4的OspA血清型6和具有二硫键类型1的OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1120]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRACGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSKNILKSG
EITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKECTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLV
VTCGTVTLSKNISKSGETIVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELCNALK

[1121] SEQ ID NO:208

[1122] Lip-S6D1-S5D4_aa:具有二硫键类型1的OspA血清型6和具有二硫键类型4的OspA血清型5的异二聚体融合蛋白,用于添加脂质的N-末端CSS,LN1接头序列,N-末端脂化

[1123]

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTCGTVVLSKNILKSG

EITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNAL
KGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEISEKTIVRACGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTLAADGKTTLK
VTEGTVTL SKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKTKQLVFTKECTITVQNYDSAGTNLEG
KAVEITTLKELKNALK

[1124] SEQ ID NO:209

[1125] 阿氏疏螺旋体(菌株K78;OspA血清型2)aa 17-273,去除的脂化信号序列(aa 1-16:MKKYLLGIGLILALIA),C-末端His标签(GLEHHHHHH)

[1126] CKQNVSSLDEKNSASVDLP GEMKVLVSKEKDKDGKYS LKATVDKIELKGTSDKDNGSGVLEGT KDDKSK
AKLTIADDLSKTTTFELFKEDGKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGELSAKTM TRENGTKLEYTEMK

[1127] SDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTL SKEIAKS GEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKT
STLTISVNSKKTTLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKGLEHHHHHHH

[1128] SEQ ID NO:210

[1129] 伯氏疏螺旋体(OspA血清型1,菌株ZS7)aa 17-273,去除的脂化信号序列(aa 1-16:MKKYLLGIGLILALIA),C-末端His标签(LEHHHHHH)

[1130] CSSFKQNVSSLDEKNSVSDLP GEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTS DKNNGSGVLEGVKAD
KSKVKLTISDDL GQTTLVFKEDGKTLVSKKVT SKDKS STEEFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTG IKS DSGSGKAK
EVLKG YVLEGTLTAEKTTLVVKEGTVTL SKNISKSGEVS VELNDTDSSAATK KTA AWNSGTSTLTITVNSK KTKDLV
FTKENTITVQQYDSNGTKLEGS AVEITKLDEIKNAL KLEHHHHHHH

[1131] SEQ ID NO:211

[1132] 来自OspA的含半胱氨酸肽

[1133] CKQN

[1134] SEQ ID NO:212

[1135] 嵌合OspA血清型1/血清型2,N-末端脂化

[1136]

LipCAQKGAESIGSVSDLP GEMKVLVSKEKDKNGKYDLIATVDKLELKGTS DKNNGSGVLEGVKTNKSKVKLTISD
DLGQTTLVFKEDGKTLVSKKVT SKDKS STEEFNEKGEVSEKIIITMADGTRLEYTG IKS DGTGKAKYVLKNFTLEG
KVANDKTTLEVKEGTVTL SMNISKSGEVS VELNDTDSSAATK KTA VWNSKTSTLTISVNSK KTTQLVFTKQDTITVQ
KYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKLE

[1137] SEQ ID NO:213

[1138] 伽氏疏螺旋体菌株T25 OspA血清型7的位置126-274的氨基酸

[1139] FNDKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGETKLTVEAGTVTL SKNISE
SGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSPAEIKDLEALKA
ALK

[1140] SEQ ID NO:214

[1141] 用于疏螺旋体的RecA基因的正向寡核苷酸引物

[1142] CATGCTCTTGATCCTGTTTA

[1143] SEQ ID NO:215

[1144] 组氨酸标签

[1145] GLEHHHHHHH

[1146] SEQ ID NO:216

[1147] 用于疏螺旋体的RecA基因的反向寡核苷酸引物

[1148] CCCATTTCTCCATCTATCTC

[1149] 整个本申请中所引用的所有文献(包括参考文献、发布的专利、公布的专利申请以及共同未决的专利申请)的全部内容特此以引用的方式明确并入。

[illegible]

图 1

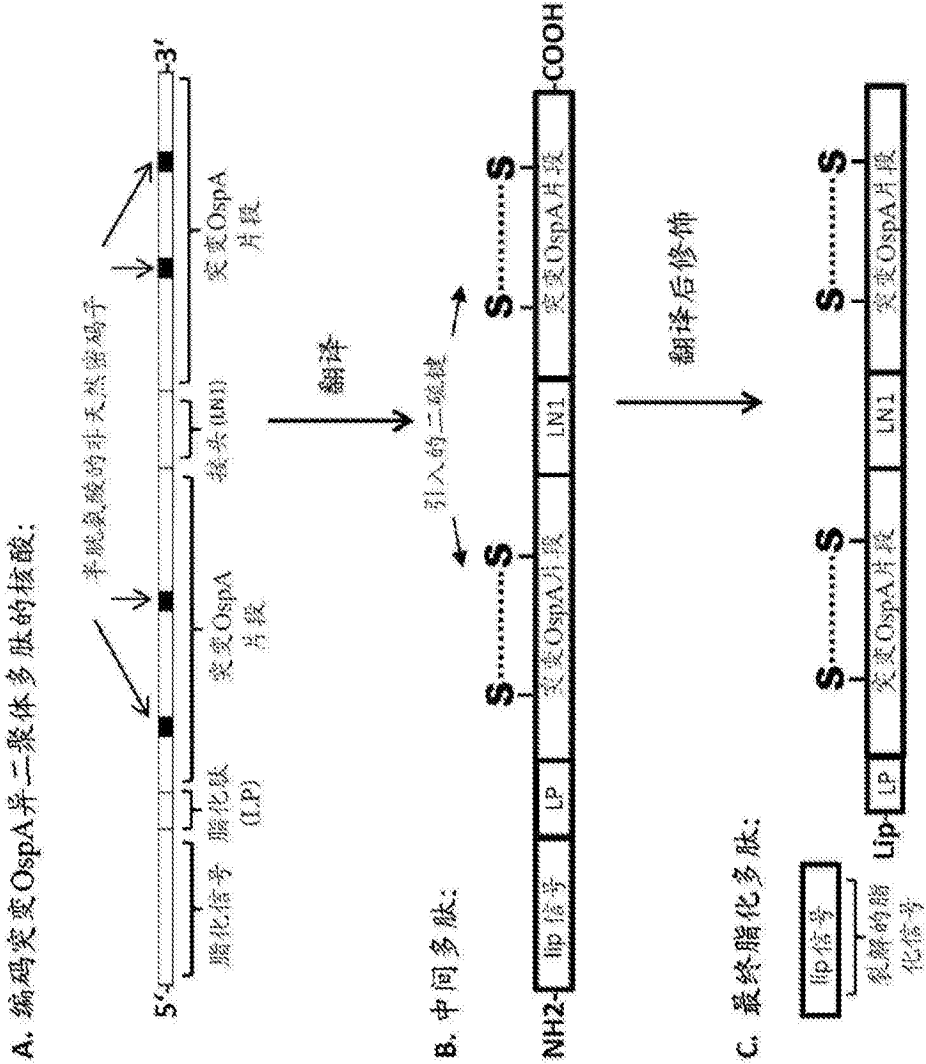


图2

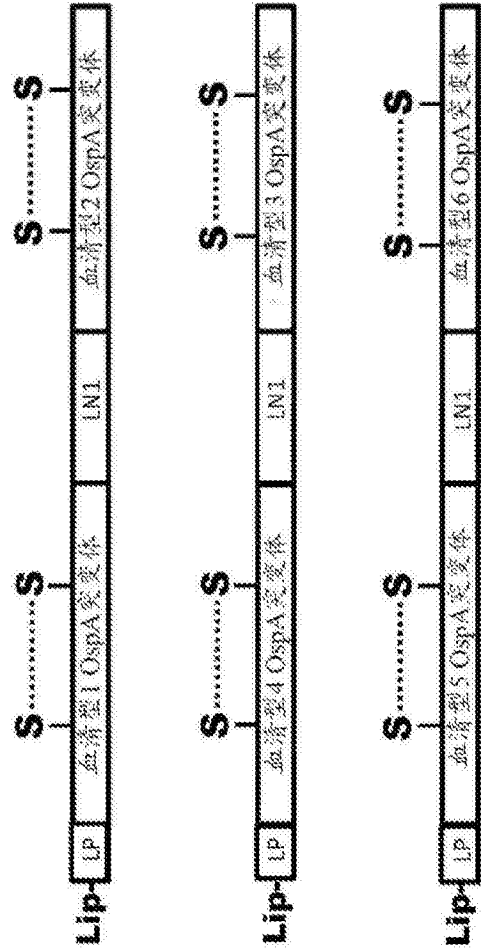


图3

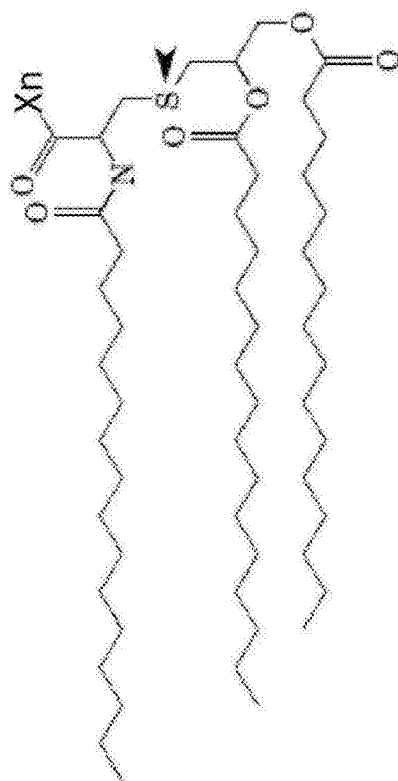


图4

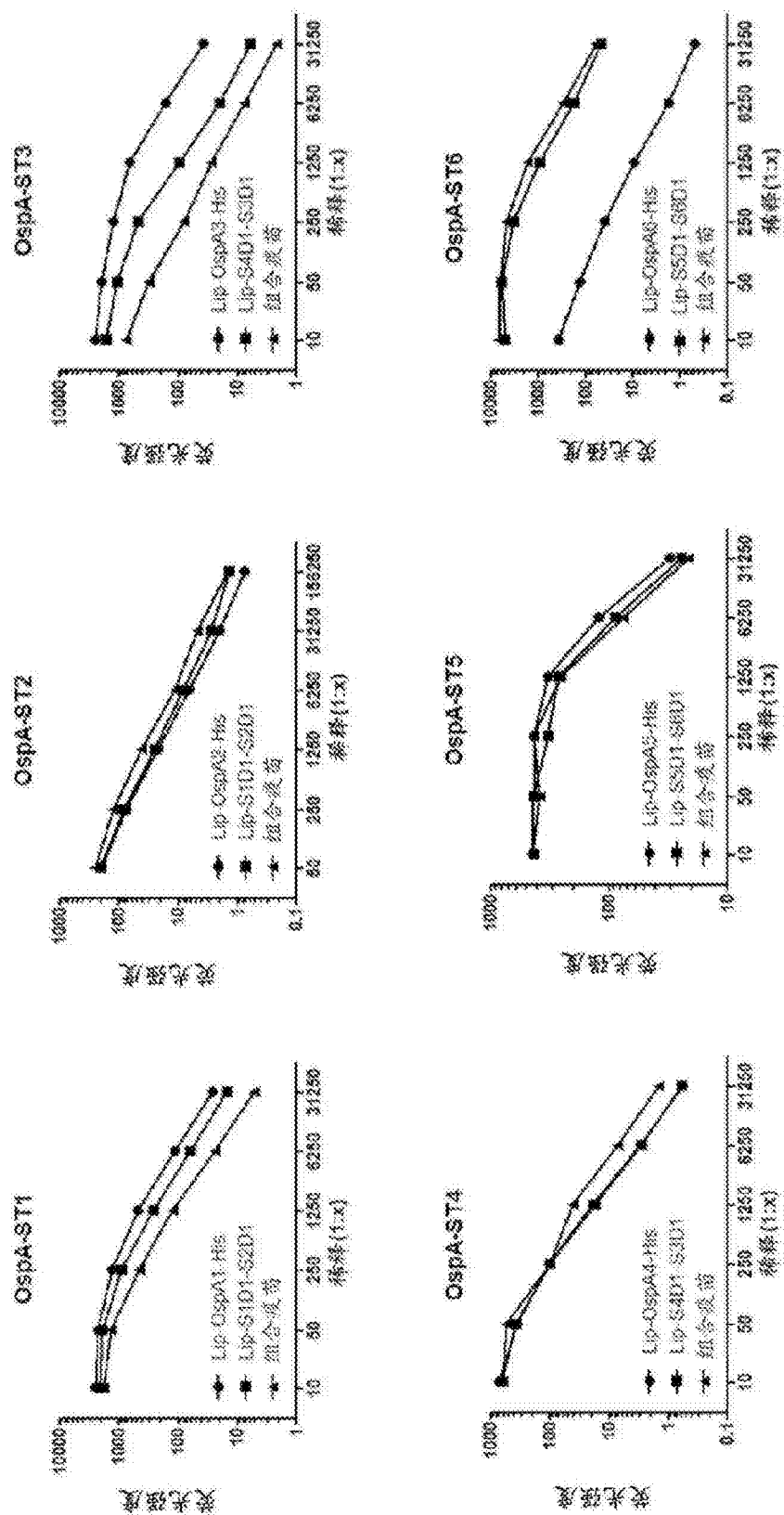


图5