

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 939**

51 Int. Cl.:

C07K 14/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2018** **PCT/EP2018/059533**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2018** **WO18189372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2018** **E 18719098 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 3609911**

54 Título: **Polipéptidos de OspA multivalentes y métodos y usos relacionados con los mismos**

30 Prioridad:

13.04.2017 EP 17166483

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

30.01.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LUNDBERG, URBAN;
MEINKE, ANDREAS;
NAYAK, ABHIJEET y
SCHÜLER, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 957 939 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de OspA multivalentes y métodos y usos relacionados con los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a constructos y a composiciones para su uso como tratamientos profilácticos o terapéuticos contra infecciones por *Borrelia*. En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido inmunogénico, a un ácido nucleico que codifica para el mismo, a una composición farmacéutica que comprende el mismo y al polipéptido inmunogénico, al ácido nucleico o a la composición farmacéutica para su uso como medicamento, en particular una vacuna, o para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia*, así como a un método de diseño de un antígeno OspA multivalente.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La borreliosis de Lyme (LB), o enfermedad de Lyme, es la enfermedad transmitida por garrapatas más habitualmente notificada en Europa y Norteamérica. La enfermedad está provocada por la espiroqueta de tipo Gram negativo transmitida por artrópodos, *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s.l.*). *Borrelia* pertenece a la familia *Spirochaetaceae*, que se subdivide en los géneros médicamente importantes *Treponema*, *Leptospira* y *Borrelia*. *B. burgdorferi s.l.* es una bacteria de tipo Gram negativo vigorosamente móvil, con forma de espiral, de aproximadamente 10-20 µm de longitud y 0,2-0,5 µm de anchura, que crece en condiciones microaerófilas. La pared celular de las espiroquetas consiste en una membrana citoplásmica inmediatamente rodeada por peptidoglicano y varios flagelos y además por una membrana externa asociada débilmente. Las espiroquetas se transmiten por garrapatas *Ixodes spp.* de cuerpo duro en un ciclo enzoótico complejo que incluye principalmente aves y pequeños mamíferos. La transmisión se produce durante la alimentación de la garrapata, cuando la garrapata infectada transmite las espiroquetas al torrente sanguíneo del huésped. Cuando los seres humanos contraen la infección, puede seguir un espectro de manifestaciones clínicas distintas, que van desde infección localizada temprana de la piel (eritema migratorio) hasta infección diseminada progresiva del sistema nervioso (neuroborreliosis), la piel (acrodermatitis crónica atrófica), el corazón (carditis de Lyme) y las articulaciones (artritis de Lyme). *B. burgdorferi s.l.* consiste en al menos 17 genoespecies en todo el mundo. La genoespecie *B. garinii* puede dividirse adicionalmente en varios serotipos basándose en la unión de anticuerpos monoclonales a la proteína A de la superficie externa (OspA).

En la mayoría de los países, la borreliosis de Lyme no es una enfermedad de declaración obligatoria y no se dispone de datos exactos relativos a las tasas de incidencia anuales. En Europa, cuatro genoespecies de *B. burgdorferi s.l.*, que representan seis serotipos (ST) de OspA diferentes, son responsables de la mayor parte de los casos clínicos en seres humanos; *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.; OspA ST1), *B. afzelii* (OspA ST2), *B. garinii* (OspA ST3, ST5 y ST6) y *B. bavariensis* (OspA ST4). Se estima que el número de casos de LB en Europa es de al menos 200.000 al año, pero debido a la falta de sistemas de adquisición de datos y vigilancia centralizada y, junto con el hecho de que la LB no es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de los países europeos, es muy probable que este número todavía sea una subestimación. En los EE. UU., los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) estiman que los casos de LB anuales son de entre 288.000 y 329.000, estableciendo de ese modo que la LB es una carga asistencial principal con un impacto económico sustancial. La creciente incidencia de casos a nivel mundial es un argumento a favor de que el desarrollo de una vacuna multivalente reduciría la debilitante carga asistencial y económica de la enfermedad a nivel mundial.

Los esfuerzos por desarrollar una vacuna de subunidades para la prevención de borreliosis de Lyme se han centrado en gran parte en el uso de la proteína A de la superficie externa (OspA) de *Borrelia* como antígeno. Las vacunas basadas en OspA se han estudiado exhaustivamente en entornos preclínicos y clínicos. Al menos dos vacunas monovalentes (LYMERix™, SmithKline Beecham e ImuLyme, Pasteur Mérieux-Connaught) basadas en la OspA de longitud completa de *B. burgdorferi s.s.* (OspA ST1) se han evaluado en ensayos clínicos, habiéndose autorizado la primera vacuna para su uso en seres humanos desde 1998 hasta 2002. Adicionalmente, también se sometió a prueba en ensayos clínicos una vacuna recombinante que comprende tres antígenos OspA quiméricos que cubren seis serotipos de OspA (Wressnig N. *et al.*, 2013, Lancet Infect. Dis. 13(8):680-689 y Wressnig N. *et al.*, 2014, Clin. Vaccine Immunol. 21(11):1490-1499).

Un candidato a vacuna hexavalente contra LB desarrollada por Valneva Austria GmbH se basa en la mitad C-terminal de seis serotipos de OspA diferentes (OspA ST1-ST6) unidos entre sí para formar tres proteínas de fusión heterodiméricas, conteniendo cada heterodímero fragmentos de OspA de dos serotipos de *Borrelia* diferentes (Comstedt *et al.*, 2014, PLoS One 9(11):e113294; Comstedt *et al.*, 2015, Vaccine 33(44):5982-8; documento WO 14/006226 y documento WO15/104396). Esta vacuna contra LB representa un avance en el campo ya que el número de proteínas en la formulación de vacuna se ha reducido a tres en lugar de seis; no obstante, en el procedimiento de producción todavía están implicados costes y complejidad considerables.

Por consiguiente, en una realización, un objeto de la presente invención fue proporcionar una vacuna mejorada contra la borreliosis de Lyme, particularmente un polipéptido multivalente ampliamente protector para su uso como

vacuna contra la borreliosis de Lyme, preferiblemente con un número limitado de antígenos requeridos. Preferiblemente, la vacuna se produce fácilmente al tiempo que es protectora, segura y más eficaz que las terapias existentes y/o proporciona protección contra más de una especie de *Borrelia* o serotipo de OspA. Más preferiblemente, se deseaba proporcionar un único antígeno en la formulación de vacuna final sin comprometer la protección contra la mayoría de las especies de *Borrelia* clínicamente relevantes y los serotipos de OspA asociados con la LB en seres humanos.

SUMARIO DE LA INVENCION

El objeto se resolvió proporcionando polipéptidos quiméricos basados en un fragmento de OspA de armazón que se altera para contener porciones inmunogénicas de OspA que se derivan de serotipos diferentes (abreviados en el presente documento "ST"). A la luz de la complejidad, para el desarrollo de una vacuna contra la borreliosis de Lyme, los inventores han aplicado un enfoque de conformación de superficie basado en estructura, que selecciona como diana los seis serotipos de OspA clínicamente más relevantes (ST1-ST6) de las especies *Borrelia* que provocan borreliosis de Lyme. "Conformación de superficie", tal como se usa en el presente documento, significa la alteración racional de aminoácidos presentes en la superficie de un fragmento C-terminal de OspA. Esta alteración de determinados residuos de aminoácido de superficie se usa en el presente documento para diseñar fragmentos de OspA quiméricos que contienen parches inmunogénicos (es decir, epítomos o porciones de epítomos) en la estructura de superficie tridimensional que corresponden a serotipos de OspA distintos; es decir, para producir un antígeno OspA multivalente, por ejemplo, en suma, representando regiones de dos, tres o más serotipos en su superficie. La mitad C-terminal de OspA, que es la parte de OspA que está expuesta en la superficie de la espiroqueta *Borrelia*, se ha usado para la conformación de superficie. La secuencia de OspA de *B. afzelii* (OspA ST2) que representa el ST más prevalente que provoca LB en Europa se ha usado como "estructura principal conservada" o "armazón estructural" para las proteínas quiméricas dadas a conocer en el presente documento. La superficie del fragmento de OspA se ha dividido en regiones denominadas en el presente documento "parches" y se han intercambiado aminoácidos de las regiones individuales (véase el ejemplo 1). Tal como se usa en el presente documento, el antígeno OspA multivalente, en virtud de contener epítomos de dos o más serotipos de OspA, también puede denominarse "quimeras" o "quimeras multivalentes" o "antígenos multivalentes".

En el transcurso de la invención, el concepto de conformación de superficie se abordó examinando la estructura cristalina tridimensional de OspA ST1 (Li *et al.*, 1997, PNAS 94(8):3584-9). El procedimiento de conformación de superficie se describe en el presente documento para el dominio C-terminal de OspA, pero también podría aplicarse, por ejemplo, para el diseño de OspA multivalente de longitud completa. En primer lugar, se caracterizaron residuos de aminoácido en la región C-terminal de OspA ST2 basándose en su accesibilidad aparente en la estructura de proteína (basándose en la estructura cristalina de ST1) en relación con la superficie; es decir, expuestos ("+"), parcialmente expuestos ("O") o enterrados ("-") (véase la **figura 2**). Para la clasificación "enterrados", la estructura también se comprobó con respecto al empaquetamiento de cadenas laterales en el núcleo. Se conservaron los residuos que participaban en la estructura compacta de "núcleo" de empaquetamiento de cadenas laterales hidrófobas de ST2. A continuación, se evaluó adicionalmente cada residuo usando un factor de escala para penalizaciones de interferencia por residuo en la etapa de selección de combinación, teniendo en cuenta la interferencia entre atribuciones de parches vecinos. Los factores de escala fueron 0, 0,5 y 1 para enterrados, parcialmente expuestos y expuestos, pero distinguiendo entre parcialmente expuestos y expuestos, con efecto sobre la clasificación de las combinaciones posibles. Para los residuos parcialmente expuestos, la decisión de incluirlos como "expuestos" no fue inequívoca, pero se tomó de manera conservadora, es decir, la clasificación del residuo puede haberse adaptado basándose en información adicional. Por ejemplo, en algunos casos, un residuo parcialmente expuesto particular puede considerarse o bien "expuesto" o bien "enterrado" dependiendo del ángulo de observación.

En una etapa adicional, se examinó el fragmento de OspA en cuanto a "parches", es decir, áreas en la superficie de la molécula plegada que comprenden epítomos potenciales/conocidos (es decir, sitios de unión de anticuerpo tales como, por ejemplo, LA-2 para el serotipo 1 para el que se dispone de una estructura cristalina, PDB 1FJ1) o epítomos conocidos en el campo proporcionados a partir de una diversidad de métodos con diversos detalles, entre ellos perturbación por desplazamiento químico de RMN, experimentos de mutaciones puntuales, competencia de anticuerpos, análisis de péptidos lineales y/o predicción de epítomos. Un parche, tal como se usa en el presente documento, significa un área en la superficie de la molécula de OspA que comprende una región potencialmente inmunogénica, es decir, un epítomo o un epítomo parcial, preferiblemente una región que contiene una huella de anticuerpo parcial o completa, es decir, un sitio de unión de anticuerpo. El parche puede ser de aproximadamente 400-2000 angstroms cuadrados ($\text{\AA}^2$), de manera preferible de aproximadamente 500-1800 $\text{\AA}^2$, de manera más preferible de entre aproximadamente 600-1600 $\text{\AA}^2$, incluso de manera más preferible de aproximadamente 800-1200 $\text{\AA}^2$.

Tal como se usa en el presente documento, un epítomo de OspA específico quiere decir el área de unión a OspA de un anticuerpo específico y, en particular, se define en el presente documento como el área de unión en OspA de cualquier anticuerpo que compite en al menos el 50% con un anticuerpo específico que se sabe que es específico para dicha área de unión. En general, un epítomo tiene una longitud de aproximadamente cinco o seis aminoácidos. A este respecto, una secuencia de proteína de longitud completa típica contiene muchos epítomos diferentes contra

los que pueden unirse anticuerpos distintos. Para cualquier secuencia de proteína dada, múltiples anticuerpos únicos reconocerán de manera general la proteína. Cada uno de estos anticuerpos se une a un epítipo específico ubicado en esa proteína. Dentro de una secuencia de proteína, pueden hallarse tanto 1) epítopos continuos, que están formados por, o definidos por, secuencias de aminoácidos lineales dentro de la proteína como 2) epítopos discontinuos, que existen sólo cuando la proteína se pliega para dar una conformación particular y regiones más distales de la secuencia primaria se disponen en proximidad entre sí. Los epítopos de OspA preferibles incluyen los asociados con la protección y/o los correspondientes a los sitios de unión mapeados de anticuerpos monoclonales descritos en la bibliografía, así como regiones de unión adicionales notificadas para el fragmento C-terminal de OspA ST1 (Sears JE, *et al.* 1991. Molecular mapping of Osp-A mediated immunity against *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. J. Immunol. 147:1995-2000; Wilske B, *et al.* 1992. Molecular analysis of the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* for conserved and variable antibody binding domains. Med. Microbiol. Immunol. 181:191-207; Jiang W, *et al.* 1994. Purification of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) and analysis of antibody binding domains. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1:406-12).

Luego se aplicaron los hallazgos de la estructura tridimensional C-terminal de OspA ST1 de PDB 1OSP (un complejo con Fab 184.1, que se une al extremo C-terminal y muestra el extremo C-terminal inalterado por cambios conformacionales a partir de la unión de anticuerpos), por ejemplo, clasificación, posición espacial y atribución a áreas de superficie definidas de los residuos de aminoácido, al fragmento homólogo de OspA ST2 (véase la **figura 2**). Este fragmento, usado como estructura principal para diseñar el antígeno OspA multivalente, se alteró *in silico* de diversas maneras. La estructura principal comprendía además la adición de al menos dos residuos de cisteína para la introducción de un enlace disulfuro para estabilizar la estructura tridimensional del fragmento de OspA.

Dentro de un parche, se reemplazan los residuos que están expuestos para representar una superficie del serotipo/genotipo diana, mientras que se conservan los residuos enterrados con su cadena lateral inaccesible. Los residuos enterrados a menudo representan aminoácidos hidrófobos y a menudo están estrechamente empaquetados. En esta calidad contribuyen a definir el plegamiento de la proteína, que en el caso de OspA ST1-6 es altamente homólogo. No cambiar los residuos inaccesibles evita situaciones en las que los residuos centrales enterrados de parches adyacentes que representan características de serotipos/genotipos divergentes se intercambiarían de manera inadecuada conduciendo a distorsiones de plegamiento.

La atribución de parches adyacentes puede optimizarse teniendo en cuenta que, dependiendo de la elección de las atribuciones de serotipo a los parches, pueden surgir situaciones en las que se altera la orientación espacial relativa de residuos conflictivos en parches adyacentes. El término "conflictivo", tal como se usa a este respecto, significa que, en la superficie, un residuo está cerca de un parche adyacente que es diferente de la atribución real de serotipo/genotipo. Se usó un enfoque programático para atribuir puntuaciones de penalización más altas a combinaciones que tienen más residuos conflictivos. Esto puede lograrse hallando sistemáticamente, para todos los parches, los residuos conflictivos y aplicando un esquema de puntuación que tiene en cuenta el rango de exposición y la distancia entre residuos conflictivos tal como se define por los átomos de C-alfa para definir un valor de corte para el cálculo. La puntuación se repite para todas las combinaciones de serotipos/genotipos deseados que van a representarse en el polipéptido multivalente.

Se examinaron *in silico* una variedad de diseños de fragmentos de ST2 multivalentes. Para la prueba de principio, se seleccionaron dos disposiciones de parche (disposiciones 1 y 2, **figuras 1A y B**, respectivamente) y se sintetizaron y sometieron a prueba los polipéptidos variantes 1-4 (disposición 1) y variantes 5-6 (disposición 2) (véase la **figura 2**). Las variantes tal como se describen en los ejemplos representan sólo ejemplos finitos de las muchas posibilidades con respecto a la definición de parche de superficie de OspA y no deben considerarse limitativos. Estas seis proteínas quiméricas poseen combinaciones de aminoácidos expuestos en superficie que representan múltiples serotipos de OspA. Se evaluaron las seis variantes para determinar la inmunogenicidad midiendo la respuesta de anticuerpos específicos mediante ELISA y para determinar anticuerpos de unión a OspA funcionales mediante unión a superficie de *Borrelia* y un ensayo de inhibición de crecimiento (véanse los ejemplos 2 a 4).

En resumen, sólo los cuatro fragmentos monoméricos de OspA multivalentes con un enlace disulfuro de tipo β (enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína introducidos en las posiciones de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 182 y 269 de OspA serotipo 2) demostraron ser significativamente protectores en modelos de sensibilización de ratón. Sorprendentemente, no parecía que la presencia de un enlace disulfuro de tipo α (enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína introducidos en las posiciones de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 244 y 259 de OspA serotipo 2) fuera favorable para la presentación tridimensional de los epítopos inmunogénicos contenidos en la secuencia primaria.

Las cuatro quimeras multivalentes que tienen un enlace disulfuro de tipo β (variantes 2, 3, 5 y 6) confirieron una protección significativa en ratones sensibilizados con garrapatas infectadas con *B. burgdorferi* s.s. (OspA ST1), *B. afzelii* (OspA ST2) y *B. bavariensis* (OspA ST4), así como sensibilizaciones por aguja con *B. burgdorferi* s.s. (OspA ST1) y dos cepas de *B. garinii* (OspA ST5 y ST6) cultivadas *in vitro* (**tabla 2**). El estudio demuestra un novedoso enfoque de vacuna de OspA multivalente que tiene el potencial de lograr una amplia protección con un único antígeno, haciendo también que el procedimiento de desarrollo de vacuna de OspA sea menos complejo y más rentable.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido inmunogénico que comprende un dominio C-terminal de OspA alterado, concretamente estabilizado, que comprende al menos tres epítomos de OspA específicos, cada uno de cepas de *Borrelia* distintas que provocan borreliosis de Lyme; es decir, un antígeno OspA multivalente, en el que dicho dominio C-terminal de OspA puede inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a la totalidad de dichas cepas de *Borrelia* distintas, y en el que el dominio C-terminal de OspA se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y variantes inmunogénicas de las mismas que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80% con al menos una de SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. Este enfoque proporciona una modalidad para abordar una pluralidad de serotipos de OspA clínicamente relevantes en el contexto de un polipéptido inmunogénico. Además, tales antígenos OspA multivalentes pueden combinarse en heterómeros, tales como, por ejemplo, heterodímeros o heterotrímeros, para proporcionar múltiples epítomos de manera simultánea y posiblemente protección frente a múltiples cepas y/o serotipos y/o especies de *Borrelia* patógena. En una realización preferida, dichos heterómeros proporcionan epítomos de al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho especies y/o cepas de *Borrelia* distintas, preferiblemente al menos seis, lo más preferiblemente seis exactamente. En una realización, los heterómeros están unidos mediante péptidos ligadores. En una realización preferida, los heterómeros están lipidados de manera N-terminal. Tal como se usa en el presente documento, "epítopo" quiere decir una región inmunogénica que corresponde a al menos un sitio de unión parcial de al menos un anticuerpo, preferiblemente más de un anticuerpo. La alteración con respecto a su forma nativa de un fragmento C-terminal de OspA, que también puede denominarse en el presente documento "armazón", puede lograrse mediante la combinación de subfragmentos en serie del fragmento de OspA de especies o cepas de *Borrelia* diferentes, por ejemplo, la fusión de secuencias de aminoácidos adyacentes derivadas de cepas de *Borrelia* diferentes. Este enfoque se describe en detalle en el documento WO2015/104396. Adicionalmente, en una realización preferida, un fragmento C-terminal de armazón de OspA derivado de una especie o cepa de *Borrelia* puede alterarse de manera racional en su estructura introduciendo mutaciones puntuales en ubicaciones clave con el fin de recrear epítomos conocidos a partir de una o más especies o cepas o serotipos de *Borrelia* distintos adicionales. En un aspecto, el fragmento C-terminal de OspA se estabiliza mediante la introducción de al menos un enlace disulfuro no nativo. En una realización preferida, el fragmento C-terminal de OspA se estabiliza mediante la introducción de exactamente un enlace disulfuro no nativo.

Tal como se usa en el presente documento, un fragmento C-terminal de OspA quiere decir una parte C-terminal de la proteína OspA completa que comprende o consiste en aproximadamente el 50-60% de los aminoácidos C-terminales, de manera preferible aproximadamente el 55% de los aminoácidos C-terminales. Lo más preferiblemente, el fragmento C-terminal de OspA comprenderá o consistirá en aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 126-273, usando la OspA de *B. afzelii* (SEQ ID NO: 74) como secuencia de referencia. Tal como se usa en el presente documento, un fragmento C-terminal de OspA que se pliega en una estructura tridimensional estable, ya sea de manera espontánea o debido a la introducción de mutaciones estabilizantes, por ejemplo, enlaces de cisteína, también se denomina dominio C-terminal de OspA. En particular, un dominio C-terminal de OspA, tal como se usa en el presente documento, quiere decir la parte extracelular completa de OspA, tal como, por ejemplo, el fragmento que consiste en los aminoácidos 126-273 de OspA de *B. afzelii* (SEQ ID NO: 7) o un equivalente funcional de la misma que tiene al menos el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de identidad de secuencia usando un método de alineación global tal como el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J of Mol Biol. 48 (3): 443-53). El dominio C-terminal de OspA se estabiliza, preferiblemente mediante la introducción de dos residuos de cisteína, preferiblemente en las posiciones entre aproximadamente los aminoácidos 180 a 184 y 267 a 271, lo más preferiblemente en los aminoácidos 182 y 269. Tal como se usa en el presente documento, "equivalente funcional" quiere decir mantener al menos inmunogenicidad específica.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a las quimeras (antígenos multivalentes) de OspA anteriores y a variantes de las mismas. En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido inmunogénico que comprende una OspA C-terminal (i) y/o una OspA C-terminal (ii), en el que

- la OspA C-terminal (i) es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO: 10, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- la OspA C-terminal (ii) es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

Como siguiente etapa, se unieron las proteínas quiméricas de una de las combinaciones para formar una proteína de fusión con el objetivo de tener sólo una proteína en la formulación final, logrando de ese modo una amplia protección con un único antígeno. La vacuna de fusión proporciona una protección significativa contra sensibilizaciones con *B. burgdorferi* s.s. (OspA ST1) crecida *in vitro* y garrapatas infectadas con *B. afzelii* (OspA ST2), demostrando una eficacia alta (véanse los ejemplos 5 y 6).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a estas proteínas de fusión, concretamente a un polipéptido inmunogénico que comprende un péptido (i) y un péptido (ii), en el que

- el péptido (i) es un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
- el péptido (ii) es un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

A continuación, se proporcionan detalles sobre los aspectos mencionados anteriormente de la presente invención:

Borrelia es un género de bacterias del filo espiroquetas. *Borrelia* provoca enfermedades transmitidas por vectores, fiebre recurrente y enfermedad de Lyme, dependiendo de la especie. *Borrelia* se transmite principalmente por garrapatas, pero algunas especies se transmiten por piojos. En la actualidad hay 36 especies conocidas de *Borrelia*. De las 36 especies conocidas de *Borrelia*, se sabe que al menos 13 de estas especies provocan la enfermedad de Lyme (LD) o borreliosis y se transmiten por garrapatas. Las principales especies de *Borrelia* que provocan la enfermedad de Lyme son *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii*. El término *B. burgdorferi* s.l. (*sensu lato*) engloba al menos 17 especies de *Borrelia* (tabla A-1 del documento WO 2015/104396 A1). Estas especies se encuentran en diferentes regiones geográficas, y viven en la naturaleza en ciclos enzoóticos que implican garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* (también denominado complejo *Ixodes persulcatus*) y una amplia variedad de huéspedes animales. Cuatro especies de *Borrelia* son responsables de la mayoría de las infecciones en seres humanos: *B. burgdorferi* s.s. (*sensu stricto*), *B. afzelii*, *B. bavariensis* y *B. garinii*. Recientemente se ha identificado *B. mayonii*, una especie adicional que provoca LB en seres humanos (Pritt *et al.*, 2016, Lancet Infect. Dis. 16:556-64). Otras tres especies, *B. lusitanae*, *B. bissettii* y *B. spielmanii*, se han detectado ocasionalmente en seres humanos, pero su papel en la borreliosis de Lyme es incierto en la actualidad. Todavía están identificándose nuevas especies de *Borrelia*.

Tal como se detalló anteriormente, la proteína A de la superficie externa (OspA) de *Borrelia* es una lipoproteína inmunogénica abundante de *Borrelia* de particular interés debido a su potencial como candidato a vacuna. OspA de *B. burgdorferi* s.l. es una lipoproteína básica que tiene una masa molecular de aproximadamente 28 kDa y se codifica en un plásmido lineal. Se expresa por las espiroquetas sólo cuando se encuentra en el intestino de la garrapata vector. Durante la alimentación de la garrapata, la sangre entrante a partir del huésped da como resultado cambios ambientales en el intestino de la garrapata, lo que hace que las espiroquetas regulen por disminución la OspA. Después de la regulación por disminución de la OspA, las espiroquetas migran a las glándulas salivales de la garrapata vector y, desde allí, al huésped. Los diferentes entornos del huésped que encuentran las espiroquetas necesitan su regulación diferencial de expresión de proteínas para la infección y supervivencia en los diversos medios. Por tanto, los anticuerpos contra OspA producidos mediante la vacunación no combaten la infección en el cuerpo del huésped, sino que más bien entran en el intestino de la garrapata cuando realiza la ingesta de sangre. Por tanto, los anticuerpos neutralizan las espiroquetas y bloquean la migración de bacterias desde el intestino primitivo medio hasta las glándulas salivales de la garrapata, la ruta a través de la cual *Borrelia* entra en el huésped vertebrado. Por tanto, los anticuerpos específicos contra OspA previenen la transmisión de *Borrelia* desde la garrapata vector hasta el huésped humano.

Un aspecto importante de la proteína OspA es la presencia de un resto lipídico N-terminal; es decir, ácidos grasos con una longitud de cadena de entre aproximadamente C14 y C20 con o sin dobles enlaces, unidos a un residuo de cisteína N-terminal, una característica que potencia la inmunogenicidad de la proteína OspA. Se ha demostrado que los péptidos sintéticos poco inmunogénicos inducen respuestas de anticuerpos más fuertes cuando están lipidados; por ejemplo, cuando se acoplan de manera covalente a Pam₃Cys (Bessler y Jung, 1992, Research Immunology 143:548-552; véase también la **figura 8**), una sustitución de ácido graso hallada en el extremo amino-terminal de muchas lipoproteínas bacterianas que se sintetizan con una secuencia señal que especifica la unión de lípidos. Adicionalmente, se demostró que el resto Pam₃Cys potencia las respuestas inmunitarias de OspA en ratones, parcialmente a través de su interacción con TLR-2/1 (Yoder, *et al.*, 2003, Infection and Immunity 71:3894-3900). Por tanto, se esperaría que la adición de un resto lipídico N-terminal a una quimera, a una proteína de fusión o a un derivado de OspA potencie la inmunogenicidad y la capacidad protectora.

Tal como se detalla en el presente documento, los polipéptidos inmunogénicos de la presente invención se caracterizan por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se refiere a una proteína, también denominada variante 2, con un enlace disulfuro de tipo β (indicado por *). Comprende epítomos derivados de ST1, ST4 y ST5 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTVAADKVTLKVTC*GTVTLISK
HIPNSGEITVELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSNGTN
LEGKAVEITTLKELC*NALK (SEQ ID NO: 9)

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 se refiere a una proteína, también denominada variante 3, con un enlace disulfuro de tipo β (indicado por *). Comprende epítomos derivados de ST1, ST4 y ST5 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

FNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTLKVTC*GTVTLS
KNISKSGETVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTKQLVFTKEDTITVQNYDSNGT
NLEGKAVEITTLKELC*NALK (SEQ ID NO: 10)

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 se refiere a una proteína, también denominada variante 5, con un enlace disulfuro de tipo β (indicado por *). Comprende epítomos derivados de ST2, ST3 y ST6 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKC*GTVTL
SKEIAKSGETVALNDTNTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAG
TNLEGSPAIEKDLAELC*AALK (SEQ ID NO: 12)

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se refiere a una proteína, también denominada variante 6, con un enlace disulfuro de tipo β (indicado por *). Comprende epítomos derivados de ST2, ST3 y ST6 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKC*GTVTL
SKEIAKSGETVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKTKNLVFTKEDTITVQNYDSA
GTNLEGSPAIEKDLAELC*AALK (SEQ ID NO: 13)

Los péptidos anteriores y las variantes de los mismos pueden dividirse en dos grupos. Según la presente invención, un péptido del grupo (i), también denominado péptido (i), incluye un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Un péptido del grupo (ii), también denominado péptido (ii), incluye un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

La identidad de secuencia, tal como se conoce en la técnica y tal como se usa en el presente documento, es la relación entre dos o más secuencias peptídicas o polipeptídicas (de aminoácidos), tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad significa el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, tal como se determina por la coincidencia entre las cadenas de tales secuencias. La identidad puede calcularse fácilmente. Si bien existen varios métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o dos secuencias polipeptídicas, el término lo conocen bien los expertos en la técnica (por ejemplo, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG (Devereux, J. *et al.*, 1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. *et al.*, 1990).

En realizaciones preferidas de aspectos de la presente invención,

- la variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93% o el 94%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente el 97%, más preferiblemente el 98%, incluso más preferiblemente el 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; O
- la variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93% o el 94%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente el 97%, más preferiblemente el 98%, incluso más preferiblemente el 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; O
- la variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93% o el 94%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente el 97%, más preferiblemente el 98%, incluso más preferiblemente el 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; O
- la variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93% o el 94%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente el 97%, más preferiblemente el 98%, incluso más preferiblemente el 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Según la presente invención, los péptidos i) y/o ii) están comprendidos en un polipéptido inmunogénico. El término "inmunogénico" en el contexto de un compuesto o una composición significa que el compuesto o la composición inmunogénicos tiene la propiedad de inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de superficie externa A (proteína OspA). En determinados aspectos, el compuesto o la composición inmunogénicos tiene la propiedad de inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a *Borrelia*. En aspectos particulares, el compuesto o la composición inmunogénicos tienen la propiedad de inducir la producción de anticuerpos que neutralizan *Borrelia*. En algunos aspectos, los anticuerpos son producidos por un animal. En aspectos adicionales, el animal es un mamífero. En aspectos incluso adicionales, el mamífero es un ser humano.

El término "péptido" o "polipéptido" se refiere a una molécula biológica de cadenas de monómeros de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos (amida). Los enlaces químicos covalentes se forman cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de otro. Los (poli)péptidos de la presente invención son cadenas de aminoácidos continuas y no ramificadas. El (poli)péptido de la presente invención comprende un enlace de cisteína. El enlace de cisteína es un enlace disulfuro de tipo β , es decir, un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína en las posiciones de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 182 y 269 de OspA serotipo 2.

El polipéptido inmunogénico de la presente invención puede comprender o consistir en:

- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9,
- un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 9,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,
- un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 10,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,
- un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 12,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y/o
- un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 13.

El polipéptido inmunogénico de la presente invención también puede ser una proteína de fusión que comprende o que consiste en un péptido (i) y un péptido (ii) y opcionalmente un ligador para unir el péptido (i) al péptido (ii). La proteína de fusión puede comprender o consistir en:

- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un ligador Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un ligador Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente,
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un ligador Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente, o
- un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente Y un ligador Y un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una variante inmunogénica de la misma tal como se definió anteriormente.

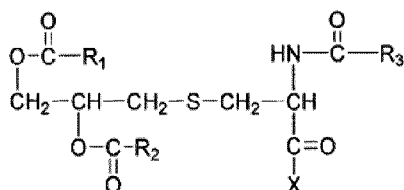
En una realización preferida de la presente invención, el péptido (i) es N-terminal con respecto al péptido (ii) o el péptido (ii) es N-terminal con respecto al péptido (i) en la proteína de fusión de la presente invención. Según esto, las disposiciones de proteína de fusión a modo de ejemplo anteriores pueden entenderse como una enumeración de los componentes (péptido (i), péptido (ii) y opcionalmente el ligador) desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal o desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal.

Tal como se detalló anteriormente, la proteína de fusión puede comprender un ligador, que conecta el péptido (i) y el péptido (ii). Un ligador es una secuencia de aminoácidos más bien corta empleada para conectar dos péptidos. Debe diseñarse con el fin de evitar cualquier impacto negativo sobre los péptidos, su interacción en sujetos que van a tratarse o vacunarse o sobre su capacidad protectora. Se prefieren ligadores cortos de como máximo 23 aminoácidos, particularmente de como máximo 21 aminoácidos, particularmente de como máximo

15 aminoácidos, especialmente de como máximo 12 u 8 aminoácidos. Más preferiblemente, el uno o más ligadores está(n) compuesto(s) por aminoácidos pequeños con el fin de reducir o minimizar las interacciones con los péptidos, tales como glicina, serina y alanina. Preferiblemente, el péptido (i) y el péptido (ii) se unen mediante una secuencia ligadora, particularmente en la que dicha secuencia ligadora comprende o consiste en

5 ANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFE (SEQ ID NO: 32). Sin embargo, el péptido (i), el ligador y el péptido (ii) pueden unirse entre sí mediante puentes peptídicos cortos de como máximo 10, 9, 8, 7, 6 ó 5 aminoácidos cada uno, preferiblemente de como máximo 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos. Alternativamente, el péptido (i) y el péptido (ii) se unen entre sí directamente sin ningún ligador o puente peptídico.

10 Según la presente invención, el polipéptido inmunogénico puede ser una proteína lipitada, también denominada lipoproteína, en el que los restos lipídicos, junto con el grupo glicerol, también se denominan "Lip". Según la invención, Lip comprende de uno a tres lípidos tales como alquilo C₁₄₋₂₀ y/o alquenilo C₁₄₋₂₀ unidos a un glicerol y un grupo amino de una cisteína N-terminal del polipéptido de la invención, o preferiblemente en el que Lip es un resto de fórmula (I) a continuación,



15

Fórmula (I),

20 en la que uno de R₁, R₂ o R₃ es alquilo o alquenilo C₁₄₋₂₀, y cada uno de los demás es, independientemente, alquilo C₁₄₋₂₀ o alquenilo C₁₄₋₂₀, y X es una secuencia de aminoácidos unida al residuo de cisteína mostrado en la fórmula (I). Más preferiblemente, Lip más la cisteína N-terminal del polipéptido es N-palmitoil-S(2RS)-2,3-bis-(palmitoiloxi)propilcisteína (también denominada en el presente documento "Pam₃Cys"; véase la **figura 8**) y está conectada a través del carbonilo C de la cisteína a dicha secuencia de aminoácidos de la invención. En la fórmula (I) anterior, R¹, R² y R³ serían restos palmitoil y X es una secuencia de aminoácidos unida al residuo de cisteína.

25

Según esto, el polipéptido inmunogénico según la presente invención puede comprender una secuencia señal de lipitación N-terminal. La lipitación de una proteína con una secuencia señal de lipitación N-terminal, tal como las presentes en un polipéptido de OspA activo, se produce en el vector de expresión de *E. coli* mediante la acción gradual de las enzimas diacilgliceril transferasa, señal peptidasa II y transacilasa, respectivamente. La primera etapa es la transferencia de un diacilglicérido al grupo sulfhidrilo de la cisteína de la prolipoproteína sin modificar, seguido de la escisión del péptido señal mediante la señal peptidasa II y, finalmente, la acilación del grupo amino de la cisteína N-terminal de la apolipoproteína. El resultado es la colocación de un lípido y un grupo glicerol con dos lípidos adicionales unidos en un residuo de cisteína N-terminal del polipéptido. La secuencia señal de lipitación, que se escinde durante la lipitación, no está presente en la secuencia polipeptídica final. Una secuencia señal de lipitación preferida es MKATKLVLGAVILGSTLLAGCSS (SEQ ID NO: 30). Cuando se escinde la secuencia señal de lipitación de SEQ ID NO: 30, los tres residuos más C-terminales (CSS) de SEQ ID NO: 30 permanecen en el extremo N-terminal del polipéptido, lo que da como resultado un residuo de cisteína N-terminal lipitado seguido de dos residuos de serina.

30

40 Para los fines de purificación o detección, el péptido inmunogénico también puede comprender una secuencia de marcador o etiqueta. Los marcadores adecuados incluyen, sin limitación, una etiqueta (por ejemplo, etiqueta de 6 His (o HexaHis), etiqueta Strep, etiqueta HA, etiqueta c-myc o glutatión S-transferasa (etiqueta GST). Preferiblemente, la etiqueta es LEHHHHHH (SEQ ID NO: 75) o HHHHHH (SEQ ID NO: 31), especialmente HHHHHH (SEQ ID NO: 31).

45

Los dominios C-terminales de OspA y los polipéptidos inmunogénicos preferidos de la presente invención incluyen los de SEQ ID NO: 9, 10, 12 ó 13, las variantes lipitadas con o sin etiqueta de His C-terminal de SEQ ID NO: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 ó 25, la proteína de fusión lipitada V3-L2-V5 con o sin etiqueta de His C-terminal de SEQ ID NO: 26 ó 28, respectivamente. La proteína de fusión de OspA multivalente lipitada V3-L2-V5 también se denomina indistintamente en el presente documento "Lip-V3-L2-V5".

50

Un polipéptido inmunogénico muy preferido de la presente invención es una proteína de fusión que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 (Lip-V3-L2-V5). La proteína de fusión lipitada comprende un péptido CSS N-terminal lipitado ("LipCSS"), que permanece después del procesamiento proteolítico a partir de una secuencia señal de lipitación en el extremo N-terminal (SEQ ID NO: 30), la variante 3 (SEQ ID NO: 10; indicada por subrayado), el ligador L2 (SEQ ID NO: 32; cursiva) y la variante 5 (SEQ ID NO: 12, indicada por subrayado discontinuo) tal como sigue:

55

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTCLKVTCG
VTLSKNISKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQQLVFTKEDTITVQNY
DSNGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGTSANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFEKYSFNEKGELSAKTM
TRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSGETVA
LNDTNTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPAIEKDL
AELCAALK (SEQ ID NO: 28)

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para el polipéptido inmunogénico de la presente invención.

Para los fines de la invención, el término "ácido(s) nucleico(s)" se refiere de manera general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado incluyendo regiones/formas monocatenarias y bicatenarias.

El término "ácido nucleico que codifica para un polipéptido", tal como se usa en el presente documento, engloba polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica para un péptido o polipéptido de la invención. El término también engloba polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican para el péptido o polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por un fago integrado, una secuencia de inserción integrada, una secuencia de vector integrada, una secuencia de transposón integrada, o debido a edición de ARN o reorganización de ADN genómico) junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

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

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

Además, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden modificarse por ingeniería usando métodos generalmente conocidos en la técnica con el fin de alterar las secuencias codificantes de polipéptidos por una variedad de motivos, incluyendo, pero sin limitarse a, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, pueden usarse intercambio de ADN mediante fragmentación aleatoria y reensamblaje por PCR de fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos para modificar por ingeniería las secuencias de nucleótidos. Además, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio para insertar nuevos sitios de restricción, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme o introducir mutaciones, etc.

"Molécula de ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a cualquier molécula de ácido ribonucleico o molécula de ácido desoxirribonucleico, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por tanto, por ejemplo, molécula de ácido nucleico, tal como se usa en el presente documento, se refiere al menos a ADN monocatenario y bicatenario, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más normalmente, bicatenarios, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Tal como se usa en el presente documento, el término molécula de ácido nucleico incluye moléculas de ADN o ARN tal como se describieron anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, las moléculas de ADN o ARN con estructuras principales modificadas por motivos de estabilidad o por otros motivos son una "molécula de ácido nucleico" en el sentido en que se entiende este término en el presente documento. Además, las especies de ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar sólo dos ejemplos, también son moléculas de ácido nucleico tal como se definen en el presente documento. Se apreciará que se han realizado una gran variedad de modificaciones a las moléculas de ADN y ARN que sirven para muchos fines útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término molécula de ácido nucleico, tal como se usa en el presente documento, abarca tales formas modificadas de manera química, enzimática o metabólica de moléculas de ácido nucleico, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células simples y complejas, entre otras. El término molécula de ácido nucleico también engloba moléculas de ácido nucleico cortas a menudo denominadas oligonucleótido(s). Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento.

Los ácidos nucleicos según la presente invención pueden sintetizarse de manera química. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de *Borrelia* y modificarse mediante métodos conocidos por el experto en la técnica. Lo mismo se aplica a los polipéptidos según la presente invención.

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

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

Ácidos nucleicos preferidos son los que codifican para los polipéptidos inmunogénicos de la presente invención, particularmente los de SEQ ID NO: 9, 10, 12 ó 13, las variantes lipidadas con o sin una etiqueta de His C-terminal de SEQ ID NO: 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 ó 25, la proteína de fusión lipitada V3-L2-V5 con o sin una etiqueta de His C-terminal de SEQ ID NO: 26 ó 28, respectivamente. Un ácido nucleico muy preferido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 29.

Los productos de la presente invención, particularmente los polipéptidos inmunogénicos y los ácidos nucleicos, se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y pueden purificarse hasta homogeneidad. El término "aislado", tal como se usa en el presente documento, significa separado "por la mano del hombre" a partir de su estado natural; es decir, si se produce en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural o un polipéptido presente de manera natural en un organismo vivo en su estado natural no está "aislada", pero la misma molécula de ácido nucleico o polipéptido separada de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislada", tal como se emplea el término en el presente documento. Como parte o después del aislamiento, tales moléculas de ácido nucleico pueden unirse a otras moléculas de ácido nucleico, tales como moléculas de ADN, para la mutagénesis, para formar genes de fusión y para la propagación o expresión en un huésped, por ejemplo. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, solas o unidas a otras moléculas de ácido nucleico tales como vectores, pueden introducirse en células huésped, en cultivo o en organismos completos. Introducidas en células huésped, en cultivo o en organismos completos, tales moléculas de ADN todavía estarán aisladas, tal como se usa el término en el presente documento, porque no estarían en su entorno o forma natural. De manera similar, las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos pueden presentarse en una composición, tal como formulaciones de medio, disoluciones para la introducción de moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, por ejemplo, en células, composiciones o disoluciones para reacciones químicas o enzimáticas, por ejemplo, que no son composiciones que se producen de manera natural, y, en ellas permanecen como moléculas de ácido nucleico o polipéptidos aislados dentro del significado de ese término tal como se emplea en el presente documento.

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

El ácido nucleico de la invención puede unirse a un promotor inducible de manera que, cuando se induce el promotor, se expresa un polipéptido codificado por el ácido nucleico. En una realización preferida, el vector es pET28b(+) (<http://www.addgene.org/vector-database/2566/>). Preferiblemente, dicho vector comprende un promotor inducible, que se activa mediante la adición de una cantidad suficiente de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) preferiblemente al medio de crecimiento. Opcionalmente, está a una concentración de entre 0,1 y 10 mM, 0,1 y 5 mM, 0,1 y 2,5 mM, 0,2 y 10 mM, 0,2 y 5 mM, 0,2 y 2,5 mM, 0,4 y 10 mM, 1 y 10 mM, 1 y 5 mM, 2,5 y 10 mM, 2,5 y 5 mM, 5 y 10 mM. Alternativamente, el promotor puede inducirse mediante un cambio en la temperatura o el pH.

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

Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas Gram negativas, tales como células de *E. coli*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*,

Erwinia, *Francisella*, *Helicobacter*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*. En una realización, la célula huésped es una célula de *Escherichia coli*. En una realización preferida, la célula huésped es una célula de *E. coli* BL21(DE3) o una célula de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Preferiblemente, la célula huésped es *E. coli*.

Alternativamente, también pueden usarse células bacterianas Gram positivas. Puede usarse una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. En una realización, el vector se deriva de plásmidos bacterianos. De manera general, para la expresión a este respecto, puede usarse cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un huésped. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, las expuestas en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (citado anteriormente).

Las células pueden hacerse crecer a presión selectiva, tal como en presencia de antibióticos, preferiblemente kanamicina. Alternativamente, las células pueden hacerse crecer en ausencia de antibióticos.

Puede usarse una gran variedad de vectores de expresión para expresar los polipéptidos según la presente invención. De manera general, para la expresión a este respecto, puede usarse cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar ácidos nucleicos para producir un polipéptido en un huésped. Según esto, el vector puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico, un vector de fago monocatenario o bicatenario o un vector viral de ARN o ADN monocatenario o bicatenario. Los plásmidos de partida dados a conocer en el presente documento están disponibles comercialmente, están disponibles para el público o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles mediante la aplicación de rutina de procedimientos publicados bien conocidos. En determinados aspectos, entre los vectores preferidos se encuentran aquellos para la expresión de las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos según la presente invención. De manera convencional, pueden usarse constructos de ácido nucleico en células huésped para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, los polipéptidos según la presente invención pueden producirse de manera sintética mediante sintetizadores de péptidos convencionales.

Además, un vector que comprende el ácido nucleico de la presente invención puede estar comprendido en una célula huésped. Los ejemplos representativos de células huésped apropiadas incluyen bacterias tales como estreptococos, estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; hongos tales como levadura y *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de mamífero tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 o de melanoma de Bowes; y células vegetales. Preferiblemente, la célula huésped es *E. coli*. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando ARN derivado del constructo de ADN de la presente invención.

Con el fin de expresar la secuencia de aminoácidos deseada prácticamente introduciendo el vector que comprende el ácido nucleico según la presente invención en una célula huésped, el vector puede contener, además de la secuencia de ácido nucleico según la presente invención, otras secuencias para controlar la expresión (por ejemplo, secuencias promotoras, secuencias terminadoras y secuencias potenciadoras) y marcadores génicos para seleccionar microorganismos, células de insecto, células de cultivo animal, o similares (por ejemplo, genes de resistencia a la neomicina y genes de resistencia a la kanamicina). Además, el vector puede contener la secuencia de ácido nucleico según la presente invención en forma repetida (por ejemplo, en tándem). El vector puede construirse basándose en procedimientos que se usan de manera convencional en el campo de la ingeniería genética.

Las células huésped pueden cultivarse en un medio apropiado, y la proteína según la presente invención puede obtenerse a partir del producto de cultivo. La proteína según la presente invención puede recuperarse del medio de cultivo y purificarse de manera convencional.

Por consiguiente, la presente divulgación describe un procedimiento para producir una célula que expresa un polipéptido inmunogénico según la presente invención, que comprende transformar o transfectar una célula huésped adecuada con el vector según la presente invención, o un procedimiento para producir el polipéptido inmunogénico según la presente invención, que comprende expresar la molécula de ácido nucleico según la presente invención.

El método para producir el polipéptido inmunogénico tal como se definió anteriormente puede estar caracterizado por las siguientes etapas:

- introducir un vector que codifica para el polipéptido inmunogénico según la invención en una célula huésped,
- hacer crecer la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicho polipéptido inmunogénico,
- homogeneizar dicha célula huésped, y
- someter el homogeneizado de células huésped a etapas de purificación.

Un método alternativo para producir un polipéptido tal como se definió anteriormente está caracterizado por las

siguientes etapas:

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

Un método todavía adicional para producir un polipéptido tal como se definió anteriormente está caracterizado por las siguientes etapas:

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende

- (i) el polipéptido inmunogénico según la presente invención y/o el ácido nucleico según la presente invención; y
- (ii) opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica es una composición destinada para su uso en el campo farmacéutico o como producto farmacéutico. Opcionalmente puede contener cualquier portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como sustancias tampón, estabilizadores o principios activos adicionales, especialmente componentes conocidos en relación con composiciones farmacéuticas y/o producción de vacunas. En general, la naturaleza de los excipientes dependerá del modo particular de administración que esté empleándose. Tales portadores pueden incluir, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debe adecuarse al modo de administración. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden habitualmente, como vehículo, líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol, o similares. Además de portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que van a administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de regulación de pH, y similares.

Un portador o excipiente preferible para los polipéptidos según la presente invención en sus diversas realizaciones, o una molécula de ácido nucleico según la presente invención, es un compuesto inmunoestimulador tal como un adyuvante para estimular adicionalmente la respuesta inmunitaria al polipéptido según la presente invención o una molécula de ácido nucleico codificante del mismo.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante. La elección de un adyuvante adecuado para mezclarse con toxinas bacterianas o conjugados preparados usando los procedimientos de la invención está dentro del conocimiento del experto en la técnica. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también pueden ser otras sales metálicas tales como las de calcio, magnesio, hierro o zinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos derivatizados de manera catiónica o aniónica, o polifosfacenos. En una realización preferida, a la composición farmacéutica se le añade un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Se prefiere particularmente el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio, y los antígenos generalmente se adsorben a estas sales. Preferiblemente, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración final del 0,15%. Un adyuvante de fosfato de aluminio útil es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una razón molar PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92. Otro adyuvante útil en la presente invención es una sal de aluminio que puede proporcionar una composición acuosa que tiene menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa. Un adyuvante a base de aluminio útil adicional es ASO_4 , una combinación de hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A (MPL).

Pueden usarse compuestos inmunoestimuladores en las composiciones de la invención. Preferiblemente, el compuesto inmunoestimulador en las composiciones farmacéuticas según la presente invención se selecciona del grupo de sustancias policatiónicas, especialmente péptidos policatiónicos, moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladoras, preferiblemente desoxinucleótidos inmunoestimuladores, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, MF59, sales de aluminio, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, compuestos neuroactivos, especialmente hormona de crecimiento humana, o combinaciones de los mismos.

Tal como se detalló anteriormente, la composición farmacéutica puede comprender un estabilizador. El término

“estabilizador” se refiere a una sustancia o excipiente de vacuna que protege la composición inmunogénica de la vacuna frente a condiciones adversas, tales como las que se producen durante el calentamiento o la congelación, y/o prolonga la estabilidad o la vida útil de almacenamiento de la composición inmunogénica en una condición o un estado estable e inmunogénico. Los ejemplos de estabilizadores incluyen, pero no se limitan a, azúcares, tales como sacarosa, lactosa y manosa; alcoholes de azúcares, tales como manitol; aminoácidos, tales como glicina o ácido glutámico; y proteínas, tales como albúmina sérica humana o gelatina.

En una realización, la composición comprende fosfato de sodio entre 5 mM y 50 mM, cloruro de sodio entre 100 y 200 mM, L-metionina entre 5 mM y 25 mM, sacarosa entre el 2,5% y el 10%, Tween-20 (polisorbato-20) entre el 0,01% y el 0,1% e hidróxido de aluminio y entre el 0,1% y el 0,2% (p/v). Más preferiblemente, la formulación comprende fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, L-metionina 10 mM, sacarosa al 5%, Tween 20 al 0,05% e hidróxido de aluminio al 0,15% (p/v) a pH $6,7 \pm 0,2$. Incluso más preferiblemente, la formulación comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres heterodímeros de OspA mutantes según la invención. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende fosfato de sodio, cloruro de sodio, L-metionina, sacarosa y polisorbato-20 (Tween-20) a un pH de $6,7 \pm 0,2$. Preferiblemente, la composición farmacéutica también comprende hidróxido de aluminio, preferiblemente a una concentración del 0,15%. En otra realización preferida, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende L-metionina.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de cualquier manera conveniente eficaz, incluyendo, por ejemplo, administración por las vías tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal o intradérmica, entre otras. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea o intramuscular, lo más preferiblemente intramuscular. En terapia o como producto profiláctico, el agente activo de la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un individuo como composición inyectable, por ejemplo, como dispersión acuosa estéril, preferiblemente isotónica.

Alternativamente, la composición, preferiblemente la composición farmacéutica, puede formularse para aplicación tópica, por ejemplo, en forma de pomadas, cremas, lociones, pomadas oculares, colirios, gotas para los oídos, enjuague bucal, apósitos y suturas impregnados y aerosoles, y puede contener aditivos convencionales apropiados, incluyendo, por ejemplo, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, y emolientes en pomadas y cremas. Tales formulaciones tópicas también pueden contener portadores convencionales compatibles, por ejemplo, bases de crema o pomada, y etanol o alcohol oleílico para lociones. Tales portadores pueden constituir desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 98% en peso de la formulación; más habitualmente constituirán hasta aproximadamente el 80% en peso de la formulación.

Además de la terapia descrita anteriormente, las composiciones de esta invención pueden usarse generalmente como agente de tratamiento de heridas para prevenir la adhesión de bacterias a proteínas de la matriz expuestas en el tejido de la herida y para su uso profiláctico en el tratamiento dental como alternativa a, o junto con, la profilaxis con antibióticos.

La composición farmacéutica de la invención incluye kits que comprenden una o más formulaciones farmacéuticas para la administración a un sujeto envasadas de una manera que se facilite su uso para la administración a sujetos. En una realización preferida, los kits comprenden la formulación en un volumen final de 2 ml, más preferiblemente en un volumen final de 1 ml.

Los kits pueden ser para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas para líquidos y liojeringas).

Además, un kit de este tipo puede incluir una formulación farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o un péptido terapéutico) envasada en un recipiente tal como una botella o un frasco sellado, con una etiqueta adherida al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o de la composición en la puesta en práctica del método. En una realización, la formulación farmacéutica se envasa en el recipiente de manera que la cantidad de espacio de cabeza en el recipiente (por ejemplo, la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del recipiente) es muy pequeña. Preferiblemente, la cantidad de espacio de cabeza es insignificante (es decir, casi nula).

El kit puede contener un primer recipiente que tiene una composición proteica o peptídica terapéutica y un segundo recipiente que tiene una disolución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición. La formulación farmacéutica puede envasarse en forma de dosificación unitaria. Opcionalmente, el kit incluye además un dispositivo adecuado para administrar la formulación farmacéutica según una vía específica de administración. El kit puede contener una etiqueta que describe el uso de las formulaciones farmacéuticas. La composición farmacéutica de la invención puede mezclarse previamente en un vial, preferiblemente en una jeringa.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende el polipéptido inmunogénico que comprende o

que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 28 (Lip-V3-L2-V5) y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede contener una variedad de antígenos diferentes. Ejemplos de antígenos son organismos muertos o atenuados, subfracciones de estos organismos, proteínas o, en su forma más sencilla, péptidos. Los antígenos también pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario en forma de proteínas o péptidos glicosilados y también pueden ser o contener polisacáridos o lípidos. Pueden usarse péptidos cortos, ya que las células T citotóxicas (CTL) reconocen los antígenos en forma de péptidos cortos, habitualmente de 8-11 aminoácidos de longitud, junto con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las células B pueden reconocer epítomos lineales tan solo de 4 a 5 aminoácidos, así como estructuras tridimensionales (epítomos conformacionales).

En una realización de la invención, la composición farmacéutica comprende además al menos un antígeno adicional de *Borrelia* o un patógeno distinto de *Borrelia* (denominada de manera genérica en el presente documento "vacuna o composición farmacéutica de combinación"). En una realización preferida, el al menos un antígeno adicional se deriva de una especie de *Borrelia* que provoca borreliosis de Lyme. En diversos aspectos, el al menos un antígeno adicional se deriva de otro patógeno, preferiblemente un patógeno transmitido por garrapatas. En un aspecto adicional, el patógeno provoca fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, ehrlichiosis granulocítica humana (HGE), fiebre de Sennetsu, ehrlichiosis monocítica humana (HME), anaplasmosis, fiebre botonosa, rickettsiosis por *Rickettsia parkeri*, enfermedad exantémica asociada con garrapatas del sur (STARI), fiebre maculosa por *Helvetica*, rickettsiosis por 364D, fiebre maculosa africana, fiebre recurrente, tularemia, fiebre por garrapatas de Colorado, encefalitis transmitida por garrapatas (TBE, también conocida como FSME), fiebre hemorrágica de Crimea y el Congo, fiebre Q, fiebre hemorrágica de Omsk, enfermedad de la selva de Kyasanur, encefalitis de Powassan, enfermedad por virus Heartland o babesiosis. En un aspecto adicional, la enfermedad es encefalitis japonesa.

En una realización adicional, el al menos un antígeno adicional se deriva de un patógeno transmitido por vector, preferiblemente un patógeno transmitido por garrapatas. Preferiblemente, el antígeno adicional procede de un patógeno transmitido por garrapatas, particularmente en el que el patógeno transmitido por garrapatas se selecciona del grupo que comprende *Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia turicatae*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia parkeri*, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Coxiella burnetii* y *Borrelia lonestari*, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV), virus de la fiebre por garrapatas de Colorado (CTFV), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea y el Congo (CCHFV), virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur (KFDV), virus Powassan, virus Heartland, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV) y *Babesia* spp.

En una realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención y a un antígeno adicional tal como se definió anteriormente, en el que el al menos un antígeno adicional está comprendido en una segunda composición, particularmente en el que la segunda composición es una vacuna, preferiblemente una vacuna contra la encefalitis transmitida por garrapatas, una vacuna contra la encefalitis japonesa o una vacuna contra la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas. La primera composición también puede ser una vacuna. La vacuna o composición farmacéutica de combinación de la invención comprende cualquier composición comentada en el presente documento en combinación con al menos una segunda composición (vacuna). En algunos aspectos, la segunda composición de vacuna protege contra una enfermedad transmitida por vector, preferiblemente una enfermedad transmitida por garrapatas. En diversos aspectos, la segunda composición de vacuna tiene un esquema de inmunización estacional compatible con la inmunización contra la infección por *Borrelia* o borreliosis de Lyme. En otros aspectos, las vacunas de combinación son útiles en la prevención de múltiples enfermedades para su uso en ubicaciones geográficas donde estas enfermedades son prevalentes.

En un aspecto, la segunda composición es una vacuna seleccionada del grupo que consiste en una vacuna contra la encefalitis transmitida por garrapatas, una vacuna contra la encefalitis japonesa y una vacuna contra la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas. En un aspecto preferido, la composición de vacuna es FSME-IMMUN® (Baxter), Encepur® (GSK Vaccines), EnceVir® (Microgen NPO) o TBE Moscow Vaccine® (Instituto de Poliomieltis y Encefalitis Viral Chumakov de la Academia Rusa de Ciencias Médicas). En otro aspecto preferido, la composición de vacuna es IXIARO®/JESPECT® (Valneva SE), JEEV® (Biological E, Ltd.) o IMOJEV® (Sanofi Pasteur).

En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además una sustancia inmunoestimuladora, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en polímeros policatiónicos, especialmente péptidos policatiónicos, oligodesoxinucleótidos (ODN) inmunoestimuladores, especialmente oligo(dIdC)₁₃ (SEQ ID NO: 40), péptidos que contienen al menos dos motivos LysLeuLys, especialmente el péptido KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 39), compuestos neuroactivos, especialmente la hormona de crecimiento humana, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, adyuvantes completos o incompletos de Freund, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la sustancia inmunoestimuladora es una combinación o bien de un polímero policatiónico y desoxinucleótidos inmunoestimuladores o bien de un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys y desoxinucleótidos inmunoestimuladores, preferiblemente una combinación de KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 39) y oligo(dIdC)₁₃ (SEQ ID NO: 40). Más preferiblemente, dicho péptido policatiónico es poliarginina.

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

En otro aspecto, la presente invención se refiere al polipéptido inmunogénico de la invención, al ácido nucleico de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento, particularmente como vacuna.

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para proteger a un mamífero, especialmente a un ser humano, susceptible a la infección por *Borrelia* o para tratar a un mamífero, especialmente a un ser humano, con una infección por *Borrelia*, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o a través de la mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o administración a través de la mucosa a los aparatos digestivo/alimentario, respiratorio o genitourinario. Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como dosis única, los componentes de la misma también pueden administrarse conjuntamente al mismo tiempo o en momentos diferentes.

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

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

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere al polipéptido inmunogénico de la invención, al ácido nucleico de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia*, particularmente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. mayonii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* o *B. sinica*, preferiblemente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* o *B. garinii*.

En relación con esto, cabe destacar que las diversas especies de *Borrelia*, incluyendo *B. burgdorferi* s.l., comprenden varias especies y cepas incluyendo las dadas a conocer en el presente documento. Una enfermedad relacionada con, provocada por o asociada con la infección bacteriana que va a prevenirse y/o tratarse según la presente invención incluye la borreliosis de Lyme (enfermedad de Lyme). Otros aspectos, síntomas, fases y subgrupos de la borreliosis de Lyme así como grupos específicos de pacientes que padecen tal enfermedad tal como se da a conocer en el presente documento, incluyendo en la parte de introducción, se incorporan al presente documento como referencia. Más específicamente, la borreliosis de Lyme se produce de manera general en fases, con remisión y empeoramientos con una manifestación clínica diferente en cada fase. La fase 1 de infección temprana consiste en infección localizada de la piel, seguido en el plazo de días o semanas por la fase 2, infección diseminada, y de meses a años más tarde por la fase 3, infección persistente. Sin embargo, la infección es variable; algunos pacientes tienen sólo infecciones localizadas de la piel, mientras que otros muestran sólo manifestaciones tardías de la enfermedad, tales como artritis.

Tratamiento o tratar es el intento de remedio de un problema de salud, habitualmente tras un diagnóstico. Un tratamiento trata un problema, y puede conducir a su cura, pero los tratamientos a menudo mejoran un problema sólo mientras se sigue con el tratamiento, especialmente en enfermedades crónicas. Las curas son un subconjunto de tratamientos que revierten las enfermedades por completo o terminan los problemas médicos de manera permanente. Prevención o prevenir es un modo de evitar una lesión, afección o enfermedad en primera instancia, y de manera general no ayudará a alguien que ya esté enfermo (aunque hay excepciones). Un tratamiento o una cura se aplica después de que ya se haya iniciado un problema médico, mientras que la prevención se aplica antes de que el problema médico sea detectable. El tratamiento o la prevención puede ser en cualquier sujeto, particularmente un mamífero tal como gato, perro, rata, ratón, vaca, caballo, conejo o primate, especialmente en un ser humano.

Prevención o prevenir se refiere a medidas tomadas para prevenir enfermedades, en lugar de curarlas o tratar sus síntomas. El término se diferencia en cuanto al método con la medicina curativa y paliativa. En el contexto de la presente invención, prevención de borreliosis de Lyme significa que se previene el desarrollo de borreliosis de Lyme antes de que cualquier signo o síntoma de la enfermedad sea detectable, es decir, en una fase en la que el sujeto todavía está sano con respecto a borreliosis de Lyme.

En el contexto de infección por *Borrelia*, prevenir la borreliosis de Lyme se refiere a una situación en la que, por ejemplo, se inhibe o previene la invasión de *Borrelia* al huésped, la supervivencia de *Borrelia* en el huésped infectado y/o la migración de *Borrelia* a órganos secundarios etc., mientras que tratamiento se refiere a una situación en la que la espiroqueta *Borrelia* han entrado en el huésped y se ha replicado, pero en la que se inhibe la replicación

adicional de la espiroqueta *Borrelia*. En el contexto de borreliosis de Lyme, prevención se refiere a una situación en la que se previene o inhibe la manifestación de la enfermedad en un sujeto o paciente infectado, mientras que tratamiento se refiere a una situación en la que el sujeto o paciente muestra signos y síntomas de borreliosis de Lyme, que posteriormente se mejoran.

También se da a conocer un método de tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia* en un sujeto que lo necesita que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido inmunogénico de la invención, del ácido nucleico de la invención o de la composición farmacéutica de la invención. Tales métodos pueden comprender la etapa de administrar cualquiera de las composiciones de vacuna comentadas en el presente documento o cualquiera de las vacunas de combinación comentadas en el presente documento al sujeto en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la infección por *Borrelia* o borreliosis de Lyme.

El término "sujeto" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, al que se le proporciona un tratamiento o un método según la presente invención. Para el tratamiento de esas infecciones, afecciones o estados patológicos que son específicos de un animal específico, tal como un paciente humano, el término paciente se refiere a ese animal específico. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano; sin embargo, el uso médico de la composición también puede incluir animales tales como aves de corral incluyendo pollos, pavos, patos o gansos, animales de ganado tales como caballos, vacas u ovejas, o mascotas tales como perros o gatos.

El término "cantidad eficaz" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir una cantidad de la presente composición farmacéutica que puede usarse para producir un resultado deseado cuando se usa en la presente invención. En numerosos aspectos de la presente invención, el término cantidad eficaz se usa junto con tratamiento o prevención. En otros aspectos, el término cantidad eficaz se refiere simplemente a una cantidad de un agente que produce un resultado que se observa que es beneficioso o útil, incluyendo en métodos según la presente invención donde se busca el tratamiento o la prevención de una infección por *Borrelia*.

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

La descripción proporciona un método para inmunizar un animal o ser humano contra una infección por un organismo *Borrelia*, que comprende la etapa de administrar a dicho animal o ser humano una cantidad eficaz del polipéptido inmunogénico de la invención, del ácido nucleico de la invención o de la composición farmacéutica de la invención, en el que la cantidad eficaz es adecuada para provocar una respuesta inmunitaria en dicho animal o ser humano. Tales métodos pueden comprender la etapa de administrar cualquiera de las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna comentadas en el presente documento al sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunológica. En determinados casos, la respuesta inmunológica comprende la producción de un anticuerpo anti-OspA. El método comprende inducir una respuesta inmunológica en un individuo a través de terapia génica o de otro modo, por ejemplo, vacunación, administrando un polipéptido o ácido nucleico según la presente invención *in vivo* con el fin de estimular una respuesta inmunológica para producir anticuerpos o una respuesta de células T mediada por células, ya sean células T productoras de citocinas o células T citotóxicas, para proteger a dicho individuo frente a la enfermedad, ya esté establecida o no esa enfermedad dentro del individuo.

Se da a conocer un método para estimular una respuesta inmunitaria en un animal o ser humano contra un organismo *Borrelia*, en el que el método comprende la etapa de administrar a dicho animal o ser humano una cantidad eficaz del polipéptido inmunogénico de la invención, del ácido nucleico de la invención, del vector de la invención o de la composición farmacéutica de la invención, en el que la cantidad eficaz es adecuada para estimular la respuesta inmunitaria en dicho animal o ser humano.

En métodos preferidos, el organismo *Borrelia* se selecciona del grupo que comprende *B. burgdorferi*, particularmente *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. mayonii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* o *B. sinica*, preferiblemente *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* o *B. garinii*.

En el presente documento, los inventores pretenden que los términos "que comprende", "comprender" y "comprende" puedan sustituirse opcionalmente por los términos "que consiste en", "consistir en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso. El término "comprende" significa "incluye". Por tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprender" y "que comprende", implican la inclusión de un compuesto o una composición indicados (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, anticuerpo) o una etapa, o un grupo de compuestos o etapas, pero sin excluir cualquier otro compuesto, composición, etapa o grupo de los mismos. De manera similar, las palabras "comprender", "contener" y "englobar" deben interpretarse de manera inclusiva en vez de exclusiva. La abreviatura "e.g." se deriva de *exempli gratia* en latín, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por tanto, la abreviatura "e.g." es

sinónimo con el término “por ejemplo”.

La invención no se limita a la metodología, a los protocolos y a los reactivos particulares descritos en el presente documento porque pueden variar. Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos, y cualquier acrónimo usado en el presente documento, tienen los mismos significados que entiende normalmente un experto habitual en la técnica en el campo de la invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, en el presente documento se describen los métodos y materiales preferidos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las figuras, las tablas, los ejemplos y la lista de secuencias siguientes, a partir de los cuales pueden extraerse características, realizaciones y ventajas adicionales.

Figuras

Figura 1. (A) Representación esquemática de la división de la superficie molecular en antígenos OspA multivalentes de la invención, en este caso modelados en el contexto de la estructura cristalina de la región (dominio) C-terminal de serotipo 1 (registro de PDB 1OSP). Aprovechando la alta conservación de plegamiento entre los serotipos 1-6 de OspA, todas las variantes (variantes 1-6) en el estudio se construyeron usando la región C-terminal de OspA ST2 de *B. afzelii* como armazón estructural (aa 126-273, SEQ ID NO: 7). Las modificaciones de superficie siguieron un esquema con dos disposiciones diferentes (“disposición 1” y “disposición 2”) de áreas que definen la división de superficie (también denominadas “parches”) modificándose cada una para presentar residuos de superficie del serotipo respectivo. La disposición 1 comprende los parches A, B, C, D y E, que en OspA serotipo 1 contienen sitios de unión (es decir, epítopos o epítopos parciales) de los anticuerpos monoclonales LA-2 (parche A), 336 (parche B), 105.5 (parche C), residuos esenciales del epítipo para el anticuerpo monoclonal 4C10C2, así como un epítipo lineal [LE] basado en la unión de anticuerpos de sueros de pacientes (parche D) y una combinación del sitio de unión de anticuerpo monoclonal CIII78 y el dominio de unión intestinal de garrapatas (TGBD) de OspA (parche E). La disposición 2 comprende los parches A, F, G y H, que se basan en los residuos de unión de OspA serotipo 1 correspondientes de LA-2 (parche A), una forma ampliada de la región de unión para el AcM 336 (parche F, una versión ampliada del parche B de la disposición 1), LE como partes de las regiones de unión de los AcM 105.5 y 4C10C2 (parche G) y una forma ampliada del TGBD (parche H, una versión ampliada del parche E de la disposición 1). **(B)** Las variantes 1-4 se basan en la disposición 2. En la superficie del parche A, los residuos se mutaron para representar ST1, y en el parche F para representar ST5 en las cuatro variantes. El parche G se pobló con residuos de superficie de ST5 en las variantes 1 y 2 y con residuos de superficie para ST4 en las variantes 3 y 4. El parche H se pobló con residuos de superficie de ST4 en las variantes 1 y 2 y de ST5 en las variantes 3 y 4. Las variantes 1 y 4 se estabilizaron mediante la introducción de un enlace disulfuro “de tipo alfa”; es decir, los aminoácidos 244 y 259 se reemplazaron por residuos de cisteína. Las variantes 2 y 3 se estabilizaron mediante la introducción de un enlace disulfuro “de tipo beta”; es decir, los aminoácidos 182 y 269 se reemplazaron por residuos de cisteína. Las variantes 5 y 6 se basan en la disposición 1. El parche A se pobló con residuos de superficie de OspA ST6 de *B. garinii* en la variante 5 y de OspA ST2 de *B. afzelii* en la variante 6. Los parches B, C, D y E se poblaron con residuos de superficie para residuos de OspA ST3 de *B. garinii*, OspA ST2 de *B. afzelii* y OspA ST6 de *B. garinii*, respectivamente. Las variantes 5 y 6 se estabilizaron mediante la introducción de un enlace disulfuro “de tipo beta”.

Figura 2. Alineación de secuencias que compara las variantes 1 a 6 del antígeno OspA multivalente con la secuencia del armazón del fragmento C-terminal de OspA de *B. afzelii* (OspA ST2, aa 126-273, SEQ ID NO: 7, cepa de *B. afzelii* K78, AJY72832.1) mostrando los residuos de aminoácido modificados (BLASTP). Los puntos representan aminoácidos conservados que no se alteraron. La ubicación relativa de los aminoácidos en la estructura tridimensional se muestra en la línea marcada como “exposición”. Aminoácidos expuestos en superficie “+”, parcialmente expuestos “o” y enterrados “-”. La ubicación de los residuos que constituyen los parches A-H de las dos disposiciones se proporciona en las líneas marcadas como “disposición 1” y “disposición 2”. La ubicación de los residuos de cisteína introducidos se muestra en las líneas marcadas como “tipo alfa” y “tipo beta”. También se proporciona la secuencia de aminoácidos del fragmento de OspA ST1, cuya estructura tridimensional se usó como referencia.

Figura 3. (A) Representación esquemática lineal del antígeno de fusión de OspA multivalente lipidado Lip-V3-L2-V5 de la invención. El polipéptido V3-L2-V5 comprende una fusión de las variantes 3 (V3; SEQ ID NO: 10) y 5 (V5; SEQ ID NO: 12) unidas entre sí con una secuencia ligadora de 23 aminoácidos (L2; SEQ ID NO: 32) derivada de una región de bucle de la proteína P66 de la cepa de *B. garinii* PBr. El antígeno OspA multivalente también comprende una secuencia señal de lipidación N-terminal de la lipoproteína principal de la membrana externa de *E. coli* para facilitar la lipidación del extremo N-terminal (indicado como “Lip-CSS” posterior al procesamiento) y una etiqueta de histidinas (6H) C-terminal opcional con fines de purificación. Se muestran los parches A-H tal como se representan en las figuras 1 y 2. También se muestra esquemáticamente la colocación de los enlaces de cisteína estabilizantes introducidos en las variantes 3 y 5. **(B)** Alineación de secuencias de las variantes 3 y 5 con la secuencia de armazón

estructural de ST2 del dominio C-terminal de OspA de *B. afzelii* K78 (aa 126-273 de AJY2832.1, SEQ ID NO: 7) mostraron los residuos de aminoácido modificados (BLASTP). La posición de los parches y las cisteínas introducidas se muestran tal como se describe en la figura 2. Adicionalmente, se incluye la secuencia del ligador L2, derivado de una región de bucle de P66 de la cepa de *B. garinii* PBr (SEQ ID NO: 18).

Figura 4. Medición de la respuesta de anticuerpos a candidatos a vacuna multivalente lipídada mediante ELISA. Se evaluó la inmunogenicidad de proteínas multivalentes individuales V1-V6 cuando se administraron tres veces a intervalos de dos semanas a una dosis de 5 µg y se formularon con hidróxido de aluminio al 0,15%. Los inmunoseros recogidos de ratones dos semanas después de la inmunización final se diluyeron en serie y se sometieron a prueba por duplicado. Las placas se recubrieron con fragmentos C-terminales del ST de OspA respectivo y se comparó la respuesta inmunitaria a los candidatos de OspA multivalente con la respuesta a FL-OspA de los serotipos respectivos. Los resultados se presentan como títulos medios geométricos (TMG) semimáximos con un intervalo de confianza del 95% y las líneas de puntos representan el límite de detección.

Figura 5. Estudios de unión a superficie de *Borrelia* para determinar anticuerpos funcionales inducidos por vacuna. Se sometió a prueba la funcionalidad de los anticuerpos generados mediante la vacunación con los candidatos de vacuna multivalente lipídada V2, V3, V5 y V6, tal como se destacan en la figura 4 anterior, en un ensayo de unión a superficie de *Borrelia*. La unión de anticuerpos inducidos por vacuna a OspA del serotipo correspondiente se comparó con los anticuerpos generados por la FL-OspA respectiva. El ensayo de unión a superficie se realizó con OspA ST1 de *B. burgdorferi* ZS7, OspA ST2 de *B. afzelii* Pra10, OspA ST4 de *B. bavariensis* PFin, OspA ST5 de *B. garinii* PHei y OspA ST6 KL11. Los resultados se presentan como intensidad de fluorescencia.

Figura 6. Las respuestas de anticuerpos específicas de serotipo al antígeno de fusión multivalente lipídado Lip-V3-L2-V5 se compararon con las respuestas a proteínas OspA lipídadas de longitud completa de los serotipos 1-6 (FL-OspA ST1-6). Se inmunizaron grupos de ratones C3H/HeNRj hembra de 5-8 semanas de edad por vía subcutánea con V3-L2-V5 (SEQ ID NO: 26; 3 µg; 0,3 µg; 0,03 µg y 0,003 µg) o con proteínas OspA de longitud completa individuales (SEQ ID NO: 1-6; 1 µg) tres veces a intervalos de dos semanas. Todos los antígenos se formularon con hidróxido de aluminio al 0,15%. Los inmunoseros se recogieron una semana después de la inmunización final para la cuantificación de anticuerpos IgG anti-OspA mediante ELISA. Las proteínas OspA C-terminales truncadas de los serotipos respectivos se usaron como antígenos de recubrimiento (serotipos 1-6 monoméricos; SEQ ID NO: 33-38). La inmunización con V3-L2-V5 provocó títulos de anticuerpo mayores que la inmunización con FL-OspA ST1 (A), ST4 (D), ST5 (E) o ST6 (F) y títulos de anticuerpo equivalentes en comparación con FL-OspA ST2 (B) y FL-OspA ST3 (C) en la dosis de inmunización más alta de 3 µg. Los títulos de anticuerpo provocados por V3-L2-V5 disminuyeron de manera dependiente de la dosis.

Figura 7. Comparación de anticuerpos funcionales provocados por la inmunización con el antígeno de fusión multivalente lipídado Lip-V3-L2-V5 frente a proteínas OspA lipídadas de longitud completa de cinco serotipos diferentes en ratones. Se evaluó la capacidad de V3-L2-V5 para generar anticuerpos funcionales mediante un ensayo de unión a superficie de *Borrelia*. Para estos ensayos *in vitro*, se usaron sueros de ratones inmunizados tres veces con la dosis más alta de V3-L2-V5 (3 µg) para su comparación con sueros de ratones inmunizados tres veces con 1 µg de la OspA de longitud completa de los serotipos respectivos. La inmunización con V3-L2-V5 generó una unión a superficie comparable a las espiroquetas que expresan OspA de ST1 (A), ST2 (B), ST4 (C) y ST5 (D) en comparación con las proteínas FL-OspA correspondientes. La unión a superficie de anticuerpos séricos frente a V3-L2-V5 a las espiroquetas que expresan OspA de ST6 (E) fue mayor que la unión de los anticuerpos séricos frente a FL-OspA ST6 (E).

Figura 8. Estructura química de Pam3Cys, un ejemplo de una cisteína sustituida con ácido graso, tal como se hallaría en el extremo N-terminal de los polipéptidos lipídados de la presente invención.

Figura 9. Títulos de anticuerpo generados para la proteína OspA de serotipo 3 tras la inmunización con vacunas multivalentes frente a OspA (véase también la **tabla 5**). Se inmunizaron ratones tres veces a intervalos de dos semanas con OspA ST3 con etiqueta de His de longitud completa (1 µg/dosis de Lip-OspA-ST3-His; SEQ ID NO: 3); con la vacuna de combinación de quimeras ("combo de quimeras": 1 µg/dosis de cada una de Lip-OspA ST1/ST2 quimérica-His, Lip-OspA ST5/ST3 quimérica-His y Lip-OspA ST6/ST4 quimérica-His); con la vacuna de combinación de heterodímeros ("combo de heterodímeros"; 1 µg/dosis de cada una de Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 y Lip-S5D1-S6D1); con la vacuna de combinación de heterodímeros BspHyb ("combo de het. BspHyb"; 1 µg/dosis de cada una de Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3BspHybD1 y Lip-S5D1-S6D1) o con la vacuna de combinación de heterodímeros BvaHyb ("combo de het. BvaHyb"; 1 µg/dosis de cada una de Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3BvaHybD1 y Lip-S5D1-S6D1). Todos los inmunógenos se formularon con hidróxido de aluminio al 0,15%. Los sueros se recogieron una semana después de la última dosis. Los títulos de anticuerpos IgG contra la proteína de ST3 de longitud completa se determinaron mediante ELISA.

Figura 10. Funcionalidad de anticuerpos de ratones inmunizados con vacunas multivalentes frente a OspA tal como se mide mediante la unión a la superficie celular. Se inmunizaron ratones como en la figura 9 anterior (véase también la **tabla 5**) y los sueros se recogieron y agruparon una semana después de la última dosis. Se sometieron a

prueba diluciones en serie de los sueros para determinar la unión *in vitro* a *Borrelia* mediante tinción celular seguido de citometría de flujo. Se restaron los valores de intensidad de fluorescencia medidos tras la tinción con sueros recogidos de ratones de control inmunizados con adyuvante de $\text{Al}(\text{OH})_3$ solo para representar la unión inespecífica. Las espiroquetas usadas en el ensayo de unión fueron *B. garinii*, OspA serotipo 3, cepa Fr.

5

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Declaración de ética: los experimentos con animales en el estudio se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación austríaca (Tierversuchsgesetz 2012, BGB1. I n.º 114/2012) y fueron aprobados por "Magistratsabteilung 58". Además, según el principio 3R, se restringió el número de animales usados en el estudio.

10

Diseño de constructos quiméricos: se analizó la superficie de proteína de OspA ST1 (estructura cristalina (PDB 1OSP) (Li *et al.*, PNAS, 1997. 94(8):3584-9) y se clasificaron los residuos en accesibles a la superficie, parcialmente accesibles y enterrados (**figura 2**). Las áreas de superficie se definieron en analogía a epítopos conocidos para representar mejor los posibles sitios de unión (a partir de ST1, **figura 1**). Los modelos de homología del dominio C-terminal (ST1-6, modificado mediante enlace disulfuro "beta") se relajaron en simulaciones mecánicas moleculares cortas (Gromacs/OPLS-AA) para verificar la integridad estructural (Open-source Pymol, <http://sourceforge.net/projects/pymol/>, DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, EE. UU. Disponible: <http://www.pymol.org>. 2002; Kiefer, F., *et al.*, The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nucleic Acids Res, 2009. 37(número de base de datos): págs. D387-92; Hess, B., *et al.*, GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. J Chem Theory Comput, 2008. 4(3): págs. 435-47; Kaminski, G.A., *et al.*, Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. The Journal of Physical Chemistry B, 2001. 105(28): págs. 6474-648743). Se observó que todos los modelos mostraron una alta conservación de plegamiento, que es un requisito previo para poder elegir el fragmento C-terminal de ST2 de OspA ST2 de *B. afzelii*, que consiste en los aminoácidos 126-273 (SEQ ID NO: 7) como armazón estructural para el enfoque de conformación de superficie. Los serotipos en los parches (posibles sitios de unión de anticuerpo; es decir, epítopos) se asignaron reemplazando los residuos expuestos pertenecientes al parche seleccionado como diana por el serotipo respectivo (por ejemplo, **figura 1B**).

15

20

25

30

Son posibles muchas combinaciones de disposiciones y combinaciones de atribución de parches. Preferiblemente, la interferencia de residuos cercanos en un parche adyacente que no coincide con la asignación real de un parche es baja. De manera programática, se determinó una puntuación calculando la distancia de residuos (tal como se define por la distancia $C_{\alpha i} - C_{\alpha j}$) de residuos interferentes. Se clasificaron las contribuciones de penalización para cada residuo distinto de ST2 en un parche con la distancia de residuos interferentes (región de intercambio 0,5 nm más 0,3 nm) y por su posición en la estructura tridimensional; es decir, enterrado, parcialmente expuesto o expuesto, a los residuos de aminoácido se les dio un factor de 0, 0,5 y 1, respectivamente, y se sumaron. Esto se repitió para cada parche en una disposición dada para proporcionar una puntuación para una combinación. La puntuación se repitió para cada combinación posible y se usó para una clasificación de una posible población de parches para facilitar la elección. Finalmente, la superficie expuso los residuos de aminoácido para una disposición de parches de combinación elegida y se sustituyeron las asignaciones, representando los serotipos de OspA de elección dentro de los parches individuales de la variante candidata.

35

40

Clonación molecular: las secuencias de aminoácidos de OspA usadas para diseñar las vacunas quiméricas se derivaron de *B. burgdorferi* serotipo 1 (aa 126-273, cepa B31, NP_045688.1), *B. afzelii* serotipo 2 (aa 126-273, cepa K78, AJY72832.1), *B. garinii* serotipo 3 (aa 126-274, cepa PBr, YP_002476925.1), *B. bavariensis* serotipo 4 (aa 126-273, cepa PBi, YP_063283.1), *B. garinii* serotipo 5 (aa 126-273, cepa PHei, CAA56544.1) y *B. garinii* serotipo 6 (aa 126-274, cepa DK29, CAA45010). Se muestra la alineación de secuencias de las variantes multivalentes en comparación con el dominio C-terminal de OspA ST2 de *B. afzelii* (armazón estructural), representándose los aminoácidos idénticos como puntos e indicándose los aminoácidos sustituidos (**figura 2**). La secuencia de nucleótidos de cada uno de los constructos híbridos se optimizó por codones y se sintetizó (Eurofins Scientific and GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific). Los constructos se digirieron con *HindIII* y *XhoI* y se clonaron en el vector de expresión pET28b(+) (Merck Millipore, EE. UU.) con una inclusión de una secuencia señal N-terminal de 23 aminoácidos para la lipidación (MKATKLVLGAVILGSTLLAGCSS; SEQ ID NO: 30) a partir de la lipoproteína principal de la membrana externa de *E. coli* y una etiqueta de histidinas (6xH) C-terminal. Dos variantes quiméricas, variante 3 y variante 5, se fusionaron junto con una secuencia ligadora de 23 aminoácidos (L2; ANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFE; SEQ ID NO: 32) para formar el heterodímero de OspA multivalente indicado como V3-L2-V5. La secuencia ligadora se derivó de una región de bucle de P66 (una porina de *Borrelia* principal) a partir de la cepa de *B. garinii* PBr (EED29356.1). Para la generación de la vacuna de fusión multivalente final (V3-L2-V5), se insertó la variante 3 (inmediatamente después de la secuencia señal de lipidación) en el vector pET28b(+) usando los sitios de restricción *HindIII* y *SpeI*, seguido de la secuencia ligadora usando los sitios de restricción *SpeI* y *SalI* y finalmente insertando la variante 5 usando los sitios de restricción *SalI* y *XhoI*.

45

50

55

60

Expresión y purificación de proteínas: la expresión y purificación de proteínas hasta la etapa de separación de fases con Triton X-114 se realizó tal como describen Comstedt y colaboradores (Comstedt *et al.*, 2015, Vaccine,

65

33(44):5982-8). En resumen, la inducción de expresión de proteínas se realizó a 25°C con IPTG 0,1 mM. Se añadió cóctel de inhibidores de proteasas II (PIC II: 2 ml de bestatina + 2 ml de AEBSF + 2 ml de E-64) al tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM; NaCl 500 mM; EDTA 5 mM a pH 8,0) y se llevó a cabo la lisis celular con un homogeneizador de alta presión (PANDA 2K). Se añadió Triton X-114 al lisado en bruto (a 0,06 veces el volumen de lisado en bruto) y se incubó la disolución a 4°C con agitación suave durante la noche y luego se centrifugó a 7000xg durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se incubó a 28°C durante 30 minutos. La fase lipídica se recuperó mediante centrifugación a 7000xg durante 40 minutos a 28°C. Las proteínas quiméricas con etiqueta de His se purificaron mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). En resumen, la fase lipídica se diluyó 1:20 en tampón de dilución de fase lipídica (Tris-HCl 50 mM (pH 8); NaCl 500 mM; Tween 20 al 0,05%; etanol al 10%) y se cargó en una columna con perlas de Ni²⁺-Sepharose (GE Healthcare; Ni Sepharose™ 6 Fast Flow) equilibrada con tampón de dilución de fase lipídica. Las proteínas con etiqueta de His unidas se eluyeron con un tampón de elución de imidazol (Tris-HCl 50 mM; NaCl 500 mM; Tween-20 al 0,05%; imidazol 100 mM) con concentraciones crecientes de imidazol (100 mM, 250 mM y 500 mM). Se usó el kit de factor-C recombinante PyroGene™ (Lonza) para determinar la concentración de endotoxina en las proteínas quiméricas lipídicas purificadas.

Inmunización y sensibilización: los estudios de inmunización y sensibilización se realizaron tal como describen Comstedt y colaboradores (Comstedt *et al.*, 2014, Plos One 9(11):e113294; Comstedt *et al.*, 2015, Vaccine, 33(44):5982-8). Las proteínas quiméricas lipídicas purificadas se formularon con hidróxido de aluminio al 0,15% (Alhydrogel, Brenntag) como adyuvante. Se inmunizaron por vía subcutánea grupos de 10 ratones C3H/HeNRj hembra por antígeno con 5 µg de candidatos a vacuna individuales. Se usaron 5 µg de proteína OspA de longitud completa como control positivo y al grupo de placebo se le inyectó adyuvante solo. Se realizaron tres inmunizaciones a intervalos de dos semanas y los inmunosueros se recogieron el día 7 después de la inmunización final. Dos semanas tras la inmunización final, los ratones se sensibilizaron con *Borrelia* o bien mediante inyección subcutánea o bien mediante sensibilización con garrapatas. Para la sensibilización con *B. burgdorferi* (ST1) y *B. garinii* (ST5 y ST6), se administraron por vía subcutánea espiroquetas que se hicieron crecer *in vitro* que expresan OspA (Comstedt *et al.*, 2014, Plos One, citado anteriormente; Comstedt *et al.*, 2015, Vaccine, citado anteriormente) a una dosis de 5x10⁴ espiroquetas en 100 µl por ratón. La expresión de OspA se confirmó mediante citometría de flujo, y para sensibilización sólo se usaron cultivos con al menos el 80% de las espiroquetas que expresan OspA en su superficie.

Se usaron garrapatas infectadas con *B. afzelii* (cepa IS1), *B. burgdorferi* (cepas Pra1) y *B. bavariensis* (cepa Marx1) para sensibilizar ratones tal como se describe en otros documentos (Comstedt *et al.*, 2014, Plos One, citado anteriormente). En cada ratón se aplicaron dos garrapatas para las cepas IS1 y Marx1 y tres garrapatas para la cepa Pra1. Los ratones con al menos una (IS1 y Marx1) o dos (Pra1) garrapatas completamente alimentadas se incluyeron en las mediciones posteriores. Los ratones se anestesiaron con isoflurano antes de la hematuria terminal y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se recogieron la vejiga urinaria y ambas orejas de cada ratón. El estado infeccioso de ratones individuales se confirmó mediante ELISA de VlsE y qPCR (para experimentos seleccionados) tal como se describe a continuación.

ELISA de OspA: los inmunosueros derivados de ratones después de la tercera inmunización se analizaron para determinar títulos de IgG específicos. Se realizó ELISA indirecto usando la proteína OspA truncada de serotipos respectivos como antígeno de recubrimiento. El ELISA se realizó tal como se describió previamente (Comstedt *et al.*, 2014, Plos One, citado anteriormente). En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos con 0,05 µg de proteína en 50 µl de PBS por pocillo durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 100 µl por pocillo con tampón de bloqueo (PBS con Tween-20 al 0,05% [PBST]) durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras de suero se diluyeron en serie y se sometieron a prueba por duplicado incubando durante una hora a temperatura ambiente después de la adición a las placas preparadas. Se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (DAKO) como anticuerpo secundario, se usó ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) como sustrato y se detuvo la reacción con SDS. Se leyó la absorbancia a 405 nm. Los títulos de anticuerpo se presentan como títulos semimáximos, que representan el recíproco de la dilución de suero correspondiente a la absorbancia media entre la dilución más alta y la más baja.

Tinción de superficie de *Borrelia*: las espiroquetas se tiñeron para determinar la expresión de OspA tal como se describió previamente (Comstedt *et al.*, 2014, Plos One, citado anteriormente). En resumen, las espiroquetas se fijaron mediante la adición de un mismo volumen de paraformaldehído al 4%. Los conjuntos de sueros inactivados por calor se diluyeron en serie (1:5) en tampón de lavado en una placa de dilución independiente. Los sueros diluidos se añadieron a las espiroquetas fijadas y se incubaron durante 45 minutos a TA. Se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE (Beckman Coulter, EE. UU.) como anticuerpo secundario y se usó LDS 751 (Life Technologies, EE. UU.) para teñir el ADN de las espiroquetas. Las espiroquetas teñidas se analizaron con un citómetro de flujo (FC 500 Cytomics, Beckman Coulter) seleccionando para acontecimientos de LDS 751 positivos.

Inhibición de crecimiento de *Borrelia*: se usó un ensayo de inhibición de crecimiento como ensayo funcional para los anticuerpos séricos (Comstedt *et al.*, Plos One, 2014, citado anteriormente). Los conjuntos de inmunosueros inactivados por calor se diluyeron en serie (1:5) y se incubaron con espiroquetas (de 1,0E+03 a 1,0E+04/pocillo) y complemento de cobaya al 1% en placas de 96 pocillos durante 3-5 días a 35°C con el 5% de CO₂. Las espiroquetas supervivientes se tiñeron con LDS 751 (Life Technologies). La cantidad de espiroquetas supervivientes se determinó

mediante citometría de flujo (FC 500 Cytomics, Beckman Coulter). Los valores se representan como título de inhibición de crecimiento que se define como el recíproco de la dilución de suero con al menos el 50% de reducción en el crecimiento.

ELISA de VisE: el ELISA con la región invariable 6 (IR6) de la proteína E de secuencia similar a proteína principal variable (VisE) se realizó tal como se describió previamente (Comstedt *et al.*, 2014, Plos One, citado anteriormente y documento WO14/006226). En resumen, las placas de 96 pocillos recubiertas previamente con estreptavidina se recubrieron con el péptido IR6 biotinilado de 25 aminoácidos de longitud (MKKDDQIAAMVLRGMAKDQGQFALK). Los sueros se diluyeron (1:2) y se sometieron a prueba por duplicado, usando anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (DAKO) como anticuerpo secundario. Se añadió ABTS como sustrato y se continuó la reacción durante 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 450 nm.

PCR cuantitativa: la detección de ADN de espiroquetas se realizó mediante amplificación por PCR de una parte del gen *recA* tal como se describió previamente (Comstedt *et al.*, Plos One 2014, citado anteriormente y documento WO14/006226; cebador directo: CATGCTCTTGATCCTGTTTA, cebador inverso: CCCATTTCTCCATCTATCTC). Se aisló el ADN de las vejigas usando el kit de sangre y tejido DNeasy de Qiagen (Alemania) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de gen *recA* de la cepa de *B. burgdorferi* N40 se diluyó en serie y se usó como patrón en cada reacción.

Estadística: el estado de infección de los ratones se basó en ELISA de VisE y PCR cuantitativa tal como se describió anteriormente. Todos los grupos se compararon con un grupo de placebo para la evaluación de infección/protección y se calculó la significación estadística con la prueba exacta de Fisher (bilateral), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, ns = no significativo.

Ejemplo 1. Diseño de vacunas quiméricas que representan múltiples serotipos de OspA en su superficie y expresados como proteínas individuales

Las variantes de OspA quiméricas dadas a conocer en el presente documento se diseñaron con el objetivo de presentar múltiples serotipos de OspA en un antígeno polipeptídico individual, reduciendo de ese modo el número de proteínas requeridas para lograr una amplia protección contra las principales especies patógenas de *Borrelia*. El enfoque de conformación de superficie presentado en este estudio usa, como un armazón estructural, el dominio C-terminal de OspA estabilizado truncado y con puente disulfuro de OspA ST2 de *B. afzelii* (aa 126-273; SEQ ID NO: 7). La región expuesta en superficie de este dominio C-terminal se dividió en ocho áreas solapantes denominadas parche A - parche H (**figuras 1A y B**) basándose en sitios de unión conocidos de anticuerpos monoclonales a OspA (ST1) de *B. burgdorferi*. Un parche, tal como se define en el presente documento, es un área en la molécula, ya sea continua o discontinua en la secuencia de aminoácidos primaria, que puede albergar un posible epítipo estructural; es decir, un sitio suficientemente grande como para cumplir con los requisitos para que pueda unirse un anticuerpo. Los residuos de aminoácido expuestos en superficie pueden reemplazarse entonces para representar la superficie seleccionada como diana dentro de un parche.

En los ejemplos proporcionados, el parche A se basa en la unión del anticuerpo monoclonal LA-2 (Ding *et al.*, 2000, J Mol Biol, 302(5):1153-64); el parche B se basa en el sitio de unión del AcM 336 (Koide, S., *et al.*, 2005, J Mol Biol, 350(2):290-9); el parche C se basa en la región de unión del AcM 105.5 (Koide *et al.*, citado anteriormente); el parche D representa porciones del sitio de unión del AcM 4C10C2 (Legros *et al.*, 2000, Protein Sci, 9(5):1002-10) y partes del epítipo lineal (LE) (Schubach *et al.*, 1991, Infect Immun, 59(6):1911-5); el parche F representa una versión ampliada del parche B e incluye el epítipo de 336 y partes del epítipo de 105.5; el parche G representa partes de los sitios de unión del AcM 105.5, del AcM 4C10C2 y de un epítipo lineal (LE) identificado a partir de muestras de suero de pacientes (Schubach, *et al.*, citado anteriormente); el parche E se basa en las regiones de unión del AcM CIII78 (Sears *et al.*, 1991, J. Immunol., 147(6):1995-2000) y el dominio de unión intestinal de garrapatas (TGBD) (Pal *et al.*, 2000, J. Clin. Invest., 106(4):561-9); el parche H representa una versión ampliada del parche E e incluye un epítipo de células T de ratón a partir de OspA denominado B4 (Zhong *et al.* 1996, Eur. J. Immunol., 26(11): 2749-57). Los parches A, B y C se definen como las áreas de superficie análogas que contienen sitios de unión conocidos de anticuerpos monoclonales contra OspA ST1. Además, los parches D-H se benefician de regiones de unión definidas de manera menos precisa de AcM e incluyen epítopos adicionales (por ejemplo, TGBD, LE y B4).

Los residuos de aminoácido expuestos en superficie en los parches descritos anteriormente se reemplazaron por residuos de tres de los seis serotipos de OspA principales (OspA ST1-ST6) con el fin de albergar múltiples serotipos en una molécula de proteína. Se construyeron seis quimeras, denominadas variante 1 - variante 6, y se centraron en el parche A - parche H (**figura 1**). El diseño de las variantes 1-4 se centró en el parche A, F, G y H (disposición 2) y los residuos de aminoácido de OspA ST1, ST4 y ST5 se representaron en la superficie (**figura 1B**). Las variantes 1 y 4 se estabilizaron introduciendo un enlace disulfuro de tipo α (es decir, enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína introducidos en posiciones de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 244 y 259 de OspA serotipo 2), mientras que las variantes 2 y 3 se estabilizaron introduciendo un enlace disulfuro de tipo β (es decir, enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína introducidos en posiciones de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 182 y 269 de OspA serotipo 2) (Comstedt *et al.*, 2014, PLoS One 9(11):e113294), con el fin de estudiar

el efecto de un posicionamiento diferente de los enlaces disulfuro sobre la inmunogenicidad y la eficacia de las quimeras multivalentes. La diferencia en las variantes 1-4 se representa con intercambios de serotipo en el parche G y H tal como se indica en la **figura 1B** con el objetivo de estudiar la diferencia en la inmunogenicidad así como en la eficacia de este conjunto de candidatos quiméricos con respecto a OspA ST4 y ST5. El diseño de las variantes 5 y 6 se basa en los parches A, B, C, D y E (es decir, disposición 1; **figura 1A**) y OspA ST2, ST3 y ST6 se representan en la superficie (**figura 1B**). Las variantes 5 y 6 se estabilizaron mediante un enlace disulfuro de tipo β introducido. La diferencia en estas dos variantes se representa mediante un intercambio de serotipo en el parche A tal como se ilustra en la **figura 1B**, para determinar el efecto de esta diferencia sobre la respuesta inmunitaria y la protección generadas contra OspA ST2 y OspA ST6.

El diseño de las variantes quiméricas con el enfoque de conformación de superficie tiene en cuenta epítomos protectores importantes descritos en la bibliografía tal como se definen mediante anticuerpos monoclonales respectivos (LA-2, CIII78, 336 y 105.5) y representa los residuos de aminoácido de serotipos de OspA prevalentes en la superficie. Como ejemplo, en las variantes 1-4, el parche A se puebla con residuos de OspA ST1 (prevalente en EE. UU.), y en las variantes 5 y 6, con residuos de OspA ST2 y ST6 (prevalentes en Europa). Además, la asignación de serotipos diferentes a parches diferentes en estos dos conjuntos de quimeras multivalentes también permite la identificación de posibles epítomos inmunogénicos y protectores con respecto a serotipos distintos de OspA ST1. En general, el uso de un enfoque de conformación de superficie en este estudio permitió la expresión de múltiples serotipos (como parches) en la superficie de un antígeno individual, dando como resultado posteriormente un menor número de antígenos en la formulación de vacuna final. La **figura 2** muestra una alineación de secuencias de la variante 1 - variante 6 de OspA multivalente en comparación con la estructura principal conservada de un dominio C-terminal de OspA de *B. afzelii* K78 que define el armazón sin modificar.

Ejemplo 2. Los candidatos a vacuna multivalente inducen títulos de anticuerpo significativos contra todos los serotipos de OspA principales

Se piensa que las vacunas basadas en OspA protegen principalmente a través de la producción de anticuerpos circulantes que ingieren las garrapatas durante la ingesta de sangre. En el intestino primitivo medio de la garrapata, estos anticuerpos se unen a y neutralizan las espiroquetas, previniendo de ese modo la transmisión de patógenos y la posterior infección. A este respecto, la generación de altos títulos de anticuerpos tras la inmunización es muy importante. Por tanto, se evaluó la respuesta de anticuerpos generada por las variantes quiméricas contra los seis principales serotipos de OspA clínicamente relevantes (ST1 - ST6) con ELISA. Todas las inmunizaciones en este estudio se realizaron con los antígenos formulados con hidróxido de aluminio al 0,15%. Grupos de ratones C3H/HeNRj hembra de 5-8 semanas de edad se inmunizaron tres veces a intervalos de dos semanas con una dosis de 5 μ g de candidatos a vacuna individuales (variante 1 - variante 6).

Dado que las variantes multivalentes representan sólo la mitad C-terminal de OspA, las placas de ELISA de OspA se recubrieron con monómeros C-terminales truncados y estabilizados (ST1-ST6; SEQ ID NO: 33-38) y se comparó la respuesta inmunitaria con la respuesta a la inmunización con OspA de longitud completa de los serotipos respectivos (FL-OspA ST1-ST6; SEQ ID NO: 1-6, respectivamente).

Tal como se muestra en la **figura 4**, la variante 1 con el enlace disulfuro de tipo alfa indujo una respuesta de anticuerpos significativamente menor en comparación con las variantes 2, 3 y 4 con respecto a los títulos de ELISA de OspA ST1; sin embargo, la inmunogenicidad fue comparable con respecto a otros serotipos. La variante 4, también con un enlace disulfuro de tipo alfa, indujo una respuesta inmunitaria comparable a las variantes 1, 2 y 3 con respecto a todos los serotipos incluidos en los parches. Las variantes 2 y 3 indujeron títulos de anticuerpo comparables con respecto a FL-OspA ST1, FL-OspA ST4 y FL-OspA ST5 (serotipos homólogos representados en su superficie) y anticuerpos con reactividad cruzada comparables a FL-OspA ST6, respectivamente. Sin embargo, la respuesta inmunitaria fue menor en comparación con FL-OspA ST2 y ST3. Las variantes 5 y 6 indujeron títulos comparables a FL-OspA ST2, FL-OspA ST3 y FL-OspA ST6 (serotipos presentados en su superficie), así como anticuerpos con reactividad cruzada comparables a FL-OspA ST4. Sin embargo, estos candidatos indujeron una respuesta inmunitaria menor en comparación con FL-OspA ST1 y FL-OspA ST5, respectivamente.

Los resultados demostraron que la respuesta inmunitaria de las variantes multivalentes variaba según la distribución de serotipos en los diferentes parches representados en la superficie.

Ejemplo 3. Generación de anticuerpos funcionales por candidatos a vacuna de OspA multivalente

Las variantes multivalentes V2, V3, V5 y V6 se evaluaron adicionalmente para determinar su capacidad para inducir anticuerpos funcionales contra los principales serotipos de OspA clínicamente relevantes (ST1-ST6). La evaluación funcional se basó en la capacidad de los anticuerpos para unirse *in vitro* a *Borrelia* que expresa OspA ST1 - ST6 en su superficie, así como sometiendo a prueba la capacidad de los anticuerpos para inhibir el crecimiento de espiroquetas vivas *in vitro*. Las muestras de sueros agrupados inactivados por calor de ratones inmunizados con cada variante se sometieron a prueba en diluciones en serie de cinco veces para determinar su capacidad para unirse a espiroquetas que expresan OspA de los serotipos respectivos. Las variantes 1 y 4, estabilizadas con enlace disulfuro alfa, indujeron una unión a superficie muy baja con respecto a OspA ST1 ST2, ST4, ST5 y ST6 (datos no

mostrados). Tal como se muestra en la **figura 5**, la variante 2, con enlace disulfuro beta, generó una unión equivalente con respecto a FL-OspA ST1, pero se observó una unión más baja en comparación con FL-OspA ST2, FL-OspA ST4 y FL-OspA ST5. La variante 3, con enlace disulfuro beta, indujo una unión a superficie comparable en comparación con FL-OspA ST1 y FL-OspA 5, pero se observó una unión a superficie más baja en comparación con FL-OspA ST2 y FL-OspA 4. Las variantes 2 y 3 generaron ambas una fuerte unión en comparación con FL-OspA ST6 (que en general induce una unión baja). La variante 5 y la variante 6, con enlace disulfuro beta, demostraron una unión a superficie similar a FL-OspA ST2, y la variante 5 indujo una unión a superficie significativamente mayor que FL-OspA ST6. Las variantes 5 y 6 indujeron una unión comparable a FL-OspA ST4 y una unión más baja que FL-OspA ST5. Estas variantes no indujeron ninguna unión a superficie para OspA ST1 de *B. burgdorferi* s.s. Adicionalmente, ninguna de las variantes indujo una unión a superficie para OspA ST3 de *B. garinii*.

Además, el ensayo de inhibición se realizó con *Borrelia* que expresa OspA de serotipos respectivos en la superficie y se evaluó la cantidad de anticuerpos bactericidas necesarios para inhibir el crecimiento de las espiroquetas en presencia de complemento de cobaya al 1% (**tabla 1**).

Tabla 1. Anticuerpos funcionales generados por candidatos a vacuna de OspA multivalente tal como se determina en ensayos de inhibición de crecimiento.

Inmunosueros	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
FL OspA	1250	6250	6250	250	31250	<50
Variante 1 (α)	<50	<50	n.d.	<50	<50	50
Variante 2 (β)	1250	<50	<50	<50	1250	50
Variante 3 (β)	1250	<50	<50	<50	1250	50
Variante 4 (α)	<50	<50	n.d.	<50	50	50
Variante 5 (β)	<50	1250	250	250	250	1250
Variante 6 (β)	<50	1250	50	250	50	50

El ensayo de inhibición de crecimiento se realizó con las cepas de *B. burgdorferi* ZS7 (ST1), *B. afzelii* Pra10 (ST2), *B. garinii* PFr (ST3), *B. bavariensis* PFin (ST4) y *B. garinii* PHei (ST5) y KL11 (ST6). El título de inhibición de crecimiento (GI) se define como el recíproco de la dilución más baja que muestra una reducción de $\geq 50\%$ en el crecimiento bacteriano. n.d.=no realizado.

Tal como se muestra en la **tabla 1**, la variante 1 y la variante 4 no pudieron inhibir el crecimiento de ninguna de las cepas de *Borrelia* sometidas a prueba. La variante 2 y la variante 3 generaron títulos de inhibición de crecimiento (GI) comparables en comparación con FL-OspA ST1, mientras que ambas variantes generaron títulos de GI bajos en comparación con FL-OspA ST2 y FL-OspA ST5. Ninguna de las variantes 1 a 4 generaron un título de GI contra OspA ST4 de *B. bavariensis*. La variante 5 y la variante 6 indujeron títulos de GI equivalentes en comparación con FL-OspA ST4 y títulos de GI más bajos en comparación con FL-OspA ST2 y FL-OspA ST5. La variante 5 indujo títulos de GI más altos en comparación con las demás variantes.

Ejemplo 4. Los antígenos OspA multivalentes proporcionaron una protección significativa contra las especies de *Borrelia* y los serotipos de OspA principales patógenos para los seres humanos

Basándose en los datos de serología presentados anteriormente, se seleccionaron cuatro antígenos OspA multivalentes (variantes 2, 3, 5 y 6) para la evaluación de la protección contra cepas de *Borrelia* que expresan cinco serotipos de OspA principales (ST1, ST2, ST4, ST5 y ST6). La variante 1 y la variante 4 no continuaron dado que generaron niveles muy bajos de anticuerpos funcionales contra la mayoría de los serotipos de OspA usados en el estudio y también dieron como resultado rendimientos de proteína por debajo de los óptimos. Para el análisis de la protección, los ratones se inmunizaron con variantes V2, V3, V5 y V6 individuales y se sensibilizaron con garrapatas *I. ricinus* infectadas con OspA ST1 de *B. burgdorferi*, OspA ST2 de *B. afzelii* u OspA ST4 de *B. bavariensis* o por vía subcutánea con 5×10^4 *B. burgdorferi* de OspA ST1 o *B. garinii* de ST5 que se hicieron crecer *in vitro*. En el caso de la sensibilización con garrapatas, las garrapatas se monitorizaron hasta su desprendimiento y sólo se incluyeron los ratones con al menos una garrapata con respecto a ST2 o al menos dos garrapatas con respecto a ST1 y ST4 que se alimentaron durante >48 horas en la medición de infección final.

Tal como se muestra en la **tabla 2**, la variante 2 y la variante 3 demostraron una protección significativa contra los cuatro serotipos de OspA sometidos a prueba. La variante 5 y la variante 6 mostraron una protección parcial, no significativa, contra una sensibilización con garrapatas que albergan *B. burgdorferi* (OspA ST1). Sin embargo, las variantes 5 y 6 proporcionaron ambas una protección significativa contra sensibilizaciones con garrapatas infectadas con *B. afzelii* (OspA ST2) y *B. bavariensis* (OspA ST4).

Para la sensibilización por aguja, a los ratones se les inyectó por vía subcutánea dos semanas después de la inmunización final ZS7 (OspA ST1 de *B. burgdorferi*) o PHei (OspA ST5 de *B. garinii*) que se hicieron crecer *in vitro* para determinar la eficacia de las variantes multivalentes. La variante 2 y la variante 3 proporcionaron una protección del 100% contra una sensibilización con ZS7 (OspA ST1) (**tabla 2**). Sin embargo, V5 y V6 confirieron sólo una protección parcial, no significativa, contra una sensibilización con ZS7 (OspA ST1). Con respecto a la protección

contra una sensibilización con PHei (OspA ST5), la variante 2 y la variante 3 indujeron una protección muy significativa. A la inversa, la variante 5 y la variante 6 generaron una protección parcial, no significativa, contra una sensibilización con PHei (OspA ST5).

Tabla 2. Eficacia protectora de las variantes de OspA multivalentes lipidadas en comparación con proteínas OspA lipidadas de longitud completa en experimentos de sensibilización.

Inmunógeno	Serotipos	Dosis	Sensibilización con garrapatas			Sensibilización subcutánea		
			<i>B. burgdorferi</i> (ST1)	<i>B. afzelii</i> (ST2)	<i>B. bavariensis</i> (ST4)	<i>B. burgdorferi</i> (ST1)	<i>B. garinii</i> (ST5) (dos experimentos independientes)	Infectados/totales
FL-OspA	1, 2, 4 ó 5	5 µg	3/9*	1/7***	0/6***	0/10***	0/10***	0/10***
Variante 2	1, 4 y 5	5 µg	1/7**	3/8*	0/4**	0/10***	3/10**	4/10**
Variante 3	1, 4 y 5	5 µg	0/8***	4/10*	1/9**	0/10***	0/10**	1/10**
Variante 5	2, 3 y 6	5 µg	5/8 ^{ne}	1/9***	0/7***	9/10 ^{ns}	3/5 ^{ns}	8/10 ^{ns}
Variante 6	2, 3 y 6	5 µg	6/9 ^{ns}	1/9**	0/7***	7/10 ^{ns}	7/10 ^{ns}	9/10 ^{ns}
Placebo	-	-	12/14	13/14	9/10	10/10	8/10	10/10

Para el análisis de eficacia se administraron tres inmunizaciones a intervalos de dos semanas con polipéptidos (5 µg) formulados con hidróxido de aluminio al 0,15% o con hidróxido de aluminio al 0,15% solo (placebo). Quince días después de la tercera inmunización, los ratones se sensibilizaron con garrapatas criadas en laboratorio infectadas con *B. burgdorferi* (ST1; cepa Pra1), *B. afzelii* (ST2; cepa IS1) o *B. bavariensis* (ST4; cepa Marx1) o mediante inyección subcutánea, con 5×10^4 espiroquetas *B. burgdorferi* (ST1; cepa ZS7), *B. garinii* (ST5; cepa PHei) que se hicieron crecer *in vitro*. Para los experimentos de sensibilización con garrapatas, sólo se incluyeron los ratones con al menos una garrapata (ST2) o dos garrapatas (ST1 y ST4) que se alimentaron durante >48 horas en la medición. La significación estadística se calculó con la prueba exacta de Fisher (bilateral), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, ^{ns} no significativo.

Ejemplo 5. La vacuna de fusión multivalente genera una respuesta inmunitaria comparable así como anticuerpos funcionales contra las especies de *Borrelia* y los serotipos de OspA principales patógenos para los seres humanos

Los fragmentos de OspA multivalentes V2, V3, V5 y V6 demostraron altos niveles de protección contra especies de *Borrelia* clínicamente relevantes que expresan cinco serotipos de OspA diferentes (ST1, ST2, ST4, ST5 y ST6) (ejemplo 4, **tabla 2**). Para producir un único antígeno que pueda proporcionar protección contra múltiples serotipos de OspA principales, se seleccionó una combinación de los monómeros multivalentes V3+V5 para su análisis adicional. La variante 3 y la variante 5 se fusionaron junto con una secuencia ligadora de 23 aminoácidos derivada de una región de bucle de P66 (Bunikis J. *et al.* 1998, J. Bact. 180(7):1618-1623 y Ornstein K. *et al.* 2002, Clin. Diag. Lab. Imm. 9(6):1382-1384) de la cepa de *B. garinii* PBr, y se añadió un péptido señal de lipidación a la parte N-terminal. El constructo resultante se expresó como único polipéptido de fusión lipidado denominado V3-L2-V5 (también denominado "Lip-V3-L2-V5"). La **figura 3** muestra una representación esquemática lineal de V3-L2-V5 (**figura 3A**) y una alineación de secuencias de las variantes 3 y 5 (**figura 3B**) con la estructura principal conservada de un dominio C-terminal de *B. afzelii* (aa 126-273, SEQ ID NO: 7).

Se evaluó la inmunogenicidad de la proteína de fusión y se comparó con la de las proteínas OspA de longitud completa respectivas. Los ratones se inmunizaron con cuatro dosis de vacuna de V3-L2-V5 (3, 0,3, 0,03 y 0,003 µg/ratón) o la FL-OspA respectiva (ST1-ST6; 1 µg/ratón) tres veces a intervalos de dos semanas (todas con hidróxido de aluminio al 0,15%). Los inmunoseros se recogieron una semana después de la inmunización final para el análisis de anticuerpos IgG contra OspA mediante ELISA, así como ensayos de unión a superficie y de inhibición de crecimiento. Tal como se muestra en la **figura 6**, la vacuna de V3-L2-V5 generó títulos de anticuerpo más altos que cada una de las proteínas OspA individuales FL-OspA ST1, ST4, ST5 y ST6 y generaron títulos similares con respecto a las proteínas OspA individuales FL-OspA ST2 y ST3.

Se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos estimulados mediante la vacunación con V3-L2-V5 mediante unión a superficie de *Borrelia* *in vitro*, así como inhibición de crecimiento de *Borrelia*. Para estos ensayos *in vitro*, se usaron sueros agrupados de ratones inmunizados con una dosis de 3 µg de V3-L2-V5. Tal como se muestra en la **figura 7**, la inmunización con V3-L2-V5 generó una unión a superficie para espiroquetas que expresan OspA ST1, ST2, ST4 y ST5 que fue comparable con anticuerpos generados en respuesta a las proteínas FL-OspA (1 µg/ratón) del serotipo respectivo. La unión a superficie de sueros con V3-L2-V5 de las espiroquetas que expresan OspA ST6 en la superficie fue mayor en comparación con los ratones inmunizados con FL-OspA-ST6.

Tal como se muestra en la **tabla 3**, los títulos de inhibición de crecimiento generados mediante inmunización con V3-L2-V5 fueron más altos que los de las proteínas FL-OspA respectivas para espiroquetas que expresan OspA ST1, ST5 y ST6, comparables con respecto a las espiroquetas que expresan OspA ST2 y más bajos con respecto a OspA ST4.

Tabla 3. Anticuerpos funcionales generados por candidatos a vacuna de OspA quimérica tal como se determina mediante inhibición de crecimiento de *Borrelia*.

Inmunosueros	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
FL-OspA	250	6250	6250	31250	250	<50
V3-L2-V5	1250	1250	<50	6250	1250	250

La inhibición de crecimiento se analizó con las cepas de *B. burgdorferi* (ST1; cepa ZS7), *B. afzelii* (ST2; cepa Pra10), *B. garinii* (ST3; cepa PFr, *B. bavariensis* (ST4; cepa PFin), *B. garinii* (ST5; cepa PHei) y KL11 (ST6). El título de inhibición de crecimiento (GI) se define como el recíproco de la dilución más baja con una reducción de $\geq 50\%$ en el crecimiento bacteriano.

Ejemplo 6. La vacuna de V3-L2-V5 de fusión protege contra dos especies de *Borrelia* principales patógenas para los seres humanos de importancia mundial

La eficacia protectora de la vacuna de V3-L2-V5 se sometió a prueba contra las dos especies de *Borrelia* clínicamente más relevantes; es decir, *B. burgdorferi* (OspA ST1) y *B. afzelii* (OspA ST2). Para este estudio, V3-L2-V5 se comparó con las proteínas FL-OspA respectivas en una sensibilización por aguja con *B. burgdorferi* (OspA ST1) que se hicieron crecer *in vitro* y garrapatas infectadas con *B. afzelii* (OspA ST2). Tal como se muestra en la

tabla 4. V3-L2-V5 confirió una protección muy significativa contra *B. burgdorferi* (OspA ST1) a las tres dosis de inmunización más altas.

Tabla 4. Eficacia de la vacuna de fusión multivalente V3-L2-V5 en comparación con proteínas OspA de longitud completa contra una sensibilización por aguja de OspA ST1 de *B. burgdorferi* y una sensibilización con garrapatas con OspA ST2 de *B. afzelii*.

			Sensibilización por aguja <i>B. burgdorferi</i> (ST1)	Sensibilización con garrapatas <i>B. afzelii</i> (ST2)
	Serotipos	Dosis/ratón (con alumbre al 0,15%)	Número de ratones infectados/totales	Número de ratones infectados/totales
FL-OspA	ST1	1 µg	6/10 ^{ns}	-
FL-OspA	ST2	1 µg	-	0/18***
V3-L2-V5	ST1-6	3 µg	0/10***	0/9***
		0,3 µg	0/10***	0/9***
		0,03 µg	0/10***	0/9***
		0,003 µg	2/10*	6/9 ^{ns}
Placebo	-	-	8/10	15/16

Los ratones se sensibilizaron con garrapatas infectadas con *B. afzelii* (ST2; cepa IS1) o se les inyectó por vía subcutánea 5×10^4 *B. burgdorferi* (ST1; cepa ZS7) que se hicieron crecer *in vitro*. El estado de infección se evaluó después de cuatro semanas con ELISA de VlsE. Para los experimentos de sensibilización con garrapatas con *B. afzelii*, sólo se incluyeron los ratones con al menos una garrapata que se alimentó durante >48 horas en la medición. La significación estadística se calculó con la prueba exacta de Fisher (bilateral), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, ^{ns} no significativo.

De manera notable, tal como se muestra en la **tabla 4**, V3-L2-V5 demostró una protección significativa incluso a la dosis más baja de 3 µg, lo que demuestra una alta eficacia protectora contra una sensibilización con *B. burgdorferi* (OspA ST1). Para una sensibilización con garrapatas infectadas con *B. afzelii* (OspA ST2), se usó el mismo lote de garrapatas y, por tanto, se combinaron los resultados de dos experimentos diferentes. La vacunación con V3-L2-V5 proporcionó una protección del 100% contra una sensibilización con garrapatas infectadas con *B. afzelii* (OspA ST2), y la protección generada fue comparable a la de FL-OspA2. Los resultados indican una protección del 100% de la vacuna de proteína de fusión V3-L2-V5 en una dosis de antígeno más baja de 0,03 µg, lo que demuestra una alta eficacia del candidato, que fue mayor en comparación con FL-OspA ST1 contra una sensibilización por aguja con *B. burgdorferi* y comparable a FL OspA ST2 contra una sensibilización con garrapatas con *B. afzelii*.

Ejemplo 7. Inmunogenicidad de dominios C-terminales de OspA de serotipo 3 híbridos en el contexto de heterodímeros en una vacuna de combinación

Inmunización de ratones

Se usaron ratones C3H/HeN hembra para todos los estudios. Antes de las inmunizaciones, se extrajo sangre de grupos de diez ratones a través de la vena facial y se prepararon y agruparon inmunoseros previos. Se administraron tres inmunizaciones por vía s.c. de 100 µl cada una a intervalos de dos semanas. Los ratones se inmunizaron con 1 µg de la proteína OspA serotipo 3 de longitud completa de control o con 1 µg de cada una de las proteínas respectivas en las vacunas de combinación. El contenido de cada inmunógeno se detalla en la **tabla 5** a continuación. Todas las vacunas se formularon con hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) a una concentración final del 0,15%. Una semana después de la tercera inmunización, se extrajo sangre a partir de la vena facial y se prepararon inmunoseros. En cada experimento, se incluyó un grupo inmunizado con PBS formulada con $\text{Al}(\text{OH})_3$ como control negativo (grupo de placebo). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según la legislación austriaca (BGB1 n.º 501/1989) y fueron aprobados por "Magistratsabteilung 58".

ELISA de OspA

Se recubrieron placas de ELISA (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) con 50 ng (1 µg/ml) de proteína diluida en tampón de recubrimiento (PBS) por pocillo y se incubaron a 4°C durante de 16 a 72 horas. El antígeno de recubrimiento fue OspA ST3 lipídada de longitud completa con etiqueta de His en el extremo C-terminal (SEQ ID NO: 3). Se descartó el tampón de recubrimiento y se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo (BSA al 1%, Tween-20 al 0,5%, PBS) y se incubó a temperatura ambiental durante 1-2 horas. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl (sobreflujo) de PBST (Tween-20 al 0,1%, PBS). Se prepararon diluciones de cinco veces de los sueros en tampón de bloqueo y se añadieron 50 µl a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiental. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl (sobreflujo) de PBST. El anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa del rábano picante [HRP], DAKO, Dinamarca) se diluyó 1:2000 en tampón de bloqueo y se añadieron 50 µl a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiental. Las placas se lavaron tres

veces con 300 µl (sobreflujo) de PBST. Se usó ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), Sigma-Aldrich, EE. UU.) como sustrato para HRP, se añadieron 50 µl de ABTS a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de SDS al 1% y se leyó la absorbancia a 405 nm. Una placa se consideró como válida cuando la absorbancia del blanco estaba por debajo de 0,1. Una muestra era válida cuando la dilución más baja tenía una absorbancia por encima de 1,0 y la dilución más alta estaba por debajo de 0,1. Cuando se cumplían estos criterios, se determinó el título semimáximo. El título semimáximo es el recíproco de la dilución que corresponde a la absorbancia media entre las diluciones más alta y más baja.

Citometría de flujo

Se mezclaron espiroquetas (1×10^6) con un mismo volumen de paraformaldehído al 4% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos (Nuncion 96U, Nunc). La placa se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 g y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 150 µl de HBSS con BSA al 2% (HBSS-B), se centrifugaron tal como antes y se descartó el sobrenadante. Los sueros de ratón se inactivaron por calor mediante incubación a 56°C durante 35 minutos. Los sueros inactivados por calor se diluyeron en HBSS-B y se esterilizaron por filtración centrifugando a 4.000 g durante 3 minutos usando filtros de tubo de centrifuga Costar spin-X (0,22 µm, Corning, EE. UU.). Se disolvieron las espiroquetas en 100 µl de suero y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa se centrifugó durante 15 minutos a 2.000 g y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con 150 µl de HBSS-B y luego se resuspendieron en 100 µl de HBSS-B. Se añadió un microlitro de anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE, Beckman Coulter, EE. UU.) a las células y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en la oscuridad. Las espiroquetas se lavaron una vez con 150 µl de HBSS-B y luego se resuspendieron en 200 µl de HBSS que contenía 2,5 µM de colorante de ADN SYTO-17 y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se sedimentaron las espiroquetas teñidas centrifugando durante 5 minutos a 2.000 g y posteriormente se resuspendieron en 200 µl de HBSS. Se midieron las espiroquetas marcadas con un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter), se seleccionaron para acontecimientos positivos para SYTO-17.

Resultados

Se sometieron a prueba tres formulaciones de heterodímeros de OspA diferentes ("combo de het." y "combo de het. BvaHyb" y "combo de het. BspHyb"), así como una combinación de quimeras de OspA de longitud completa ("combo de quimeras"), para determinar la inmunogenicidad en ratones. OspA serotipo 3 de longitud completa sirvió como control positivo. Los hiperinmunosueros se analizaron mediante ELISA para determinar la reactividad contra OspA serotipo 3 de longitud completa (antígeno de recubrimiento), así como para determinar la unión a superficie de espiroquetas *Borrelia* que expresan OspA serotipo 3. Tal como se muestra en la **figura 9**, los resultados de ELISA indicaron que todas las combinaciones de vacuna estimularon respuestas de anticuerpo a OspA serotipo 3.

Tal como se muestra en la **figura 10**, la unión de anticuerpos a partir de hiperinmunosueros de ratón directamente a espiroquetas *Borrelia* se observó en el caso de *Borrelia garinii*, cepa Fr, que expresa OspA serotipo 3, lo que indica que los anticuerpos generados son funcionalmente activos y pueden unirse a OspA nativa *in situ*. La intensidad de fluorescencia fue lineal a lo largo de un amplio intervalo de diluciones de suero. La intensidad de fluorescencia observada en respuesta a la vacuna de combinación de heterodímeros mejorada contra espiroquetas fue comparable a las observadas en respuesta a la vacuna de combinación de heterodímeros y la vacuna de combinación de quimeras. De nuevo, de manera notable, con respecto a la unión a OspA serotipo 3 de espiroquetas *Borrelia*, los anticuerpos generados por combo de het. BvaHyb y combo de het. BspHyb, a pesar de su identidad de secuencia relativamente baja, eran comparablemente funcionales.

Tabla 5. Grupos de inmunización de vacuna de combinación. Todos los inmunógenos se formularon con hidróxido de aluminio al 0,15%.

Inmunógeno	Dosis a intervalos de 2 semanas
OspA serotipo 3 lipidada de longitud completa Lip-OspA3-His (SEQ ID NO: 3)	3 x 1,0 µg
Vacuna de combinación de quimeras (Combo de quimeras)	
Lip-OspA ST1/ST2 quimérica-His (SEQ ID NO: 69) Lip-OspA ST5/ST3 quimérica-His (SEQ ID NO: 70) Lip-OspA ST6/ST4 quimérica-His (SEQ ID NO: 71)	3 x 3 µg (1,0 µg cada una)
Vacuna de combinación de heterodímeros (Combo de het.)	
Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 50) Lip-S4D1-S3D1 (SEQ ID NO: 52) Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 54)	3 x 3 µg (1,0 µg cada una)

Vacuna de combinación de heterodímeros BvaHyb (Combo de het. BvaHyb) Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 50) Lip-S4D1-S3hybD1-Bva (SEQ ID NO: 48) Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 54)	3 x 3 µg (1,0 µg cada una)
Vacuna de combinación de heterodímeros BspHyb (Combo de BspHyb) Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 50) Lip-S4D1-S3hybD1-Bsp (SEQ ID NO: 72) Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 54)	3 x 3 µg (1,0 µg cada una)

Conclusiones

El análisis descrito en el presente documento de las variantes de fragmentos de OspA multivalentes demostró que podía lograrse una reducción del número de proteínas en la formulación de vacuna final sin comprometer la amplia protección contra las cepas clínicamente más relevantes de especies de *Borrelia* y serotipos de OspA patógenos. Con una única formulación de vacuna, pueden reducirse significativamente el coste y la complejidad de la producción de vacunas de OspA, siempre que se mantenga el rendimiento de producción.

La variante 1 y la variante 4, con enlaces disulfuro de tipo α fueron difíciles de producir, teniendo niveles de expresión de proteína y rendimiento bajos. Además, se observó que estas variantes generaron anticuerpos funcionales sólo a niveles mucho menores que los observados con la variante 2 y la variante 3, que están estabilizadas con el enlace disulfuro de tipo β . Aunque ninguna de las variantes mostró inhibición de crecimiento contra OspA ST4 de *B. bavariensis*, los títulos de la variante 2 y la variante 3 fueron significativamente mayores con respecto a OspA ST1 de *B. burgdorferi* y OspA ST5 de *B. garinii*. Estos resultados destacan la importancia de la posición del enlace disulfuro sobre la expresión, el rendimiento y la inmunogenicidad de los candidatos quiméricos y que la conservación del plegamiento apropiado de la proteína a temperaturas fisiológicas es importante.

Basándose en estos resultados, la variante 2 y la variante 3 se seleccionaron adicionalmente para estudiar la eficacia contra la sensibilización con las especies y los serotipos de *Borrelia* patógenos para los seres humanos principales. En la variante 2 y la variante 3, OspA ST5 y OspA ST4 se intercambiaron entre los parches G y H para estudiar el efecto sobre la inmunogenicidad, así como la protección generada contra estos serotipos. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa ni en la inmunogenicidad ni en la protección con respecto a la sensibilización con garrapatas con OspA ST4 de *B. bavariensis* o la sensibilización por aguja con OspA ST5 de *B. garinii* entre estas dos variantes.

La variante 5 y la variante 6 estabilizadas con el enlace disulfuro de tipo β , se diseñaron con un intercambio de serotipo en el parche A (es decir, ST6 en la variante 5 y ST2 en la variante 6) para estudiar el efecto sobre la inmunogenicidad, así como la protección generada contra estos dos serotipos. Con respecto a la inmunogenicidad, ambas variantes generaron respuestas inmunitarias similares a FL-OspA ST2, pero la respuesta inmunitaria a la variante 5 fue mayor en comparación con la variante 6 contra FL OspA ST6. Además, la variante 5 y la variante 6 también generaron una unión a superficie y un título de inhibición de crecimiento contra OspA ST2 de *B. afzelii* comparables.

La variante 2 y la variante 3 generaron títulos de anticuerpo y anticuerpos funcionales contra OspA ST2 de *B. afzelii* significativamente menores en comparación con la variante 5 y la variante 6, pero proporcionaron una protección significativa contra la sensibilización con garrapatas infectadas con OspA ST2 de *B. afzelii*. Estos datos sugieren que, incluso si la respuesta inmunitaria generada era menor, puede conferirse una protección cruzada significativa. Adicionalmente, comparando la variante 2 y la variante 3 con respecto a OspA ST2, los anticuerpos funcionales y la protección generados por la variante 3 fueron ligeramente mejores que los de la variante 2. Esto también sugiere un efecto de intercambio de serotipo entre estas variantes, aunque OspA ST2 no fuera el serotipo en cuestión. La variante 2 y la variante 3 generaron títulos de anticuerpo al nivel de la variante 5 y la variante 6 con respecto a OspA ST6 de *B. garinii*. Por tanto, la variante 2 y la variante 3 fueron reactivas de manera cruzada con OspA ST6 de *B. garinii* a pesar de no tener residuos de aminoácido específicos de serotipo ST6 en sus superficies. Además, la variante 5 y la variante 6, en comparación con la variante 2 y la variante 3, generaron títulos de anticuerpo y anticuerpos funcionales significativamente menores con respecto a OspA ST1 de *B. burgdorferi* s.s. y OspA ST5 de *B. garinii*. De manera similar, la variante 5 y la variante 6 no demostraron una protección significativa contra una sensibilización por aguja con OspA ST1 y ST5 o una sensibilización con garrapatas contra OspA ST1. Dado que la variante 5 y la variante 6 no incluyen residuos específicos de OspA serotipo ST1 o ST5 en su superficie, se observaron una reacción cruzada muy baja y una protección parcial no significativa contra estos serotipos. A la inversa, la variante 5 y la variante 6, a pesar de no presentar residuos de OspA ST4 de *B. bavariensis* en la superficie, generaron títulos de anticuerpo similares y más anticuerpos funcionales en comparación con la variante 2 y la variante 3. La variante 5 y la variante 6 también demostraron una protección muy significativa contra la

sensibilización con garrapatas infectadas con OspA ST4 de *B. bavariensis*, lo que sugiere que estas variantes son altamente reactivas de manera cruzada y protectoras contra OspA ST4 de *B. bavariensis*. Con respecto a OspA ST3 de *B. garinii*, la variante 2 y la variante 3 demostraron una menor respuesta inmunitaria en comparación con la variante 5 y la variante 6. Probablemente porque las variantes 2 y 3 no presentaban residuos de aminoácido de

OspA ST3 en ninguno de sus parches, se generaron anticuerpos con muy baja reacción cruzada.

Se observó que la variante 3 y la variante 5, como candidatos individuales, tenían una inmunogenicidad ligeramente mayor con respecto a OspA ST2 y OspA ST6 que la variante 2 o la variante 6. Por tanto, las variantes de fragmento de OspA V3 y V5 se unieron entre sí con una secuencia corta y flexible (23 aminoácidos) para producir una única proteína de fusión lipídada denominada V3-L2-V5. La secuencia ligadora usada en V3-L2-V5 es una secuencia corta de 23 aminoácidos de longitud (SEQ ID NO: 32), que se deriva de la proteína P66 de la cepa de *B. garinii* PBr. Se notifica que la secuencia de bucle es inmunogénica en seres humanos (Bunikis J. *et al.* 1998, citado anteriormente, y Ornstein K. *et al.* 2002, citado anteriormente). Las vacunas basadas en OspA son protectoras a través de anticuerpos circulantes que neutralizan las espiroquetas en el intestino primitivo medio de la garrapata. Por tanto, los anticuerpos que reconocen el ligador de P66 posiblemente podrían seleccionar como dianas espiroquetas que pueden no haberse neutralizado por anticuerpos contra OspA en el tejido del huésped para aumentar adicionalmente la eficacia de la vacuna de proteína de fusión.

El antígeno de fusión lipídado multivalente V3-L2-V5 generó mayores títulos de anticuerpo que las proteínas FL-OspA de OspA ST1, ST4, ST5 y ST6 y títulos de anticuerpo comparables con FL-OspA ST2 y ST3. Estos resultados demuestran que el antígeno lipídado multivalente individual V3-L2-V5 tiene el potencial de generar anticuerpos protectores contra todos los principales serotipos de OspA clínicamente relevantes. Estos datos se demuestran adicionalmente por los ensayos funcionales (tinción de superficie e inhibición de crecimiento) en los que la vacuna de fusión generada pudo inducir altos títulos de anticuerpos funcionales que podían unirse e inhibir el crecimiento de espiroquetas vivas *in vitro*. La vacuna de V3-L2-V5 demostró una protección del 100% contra la sensibilización por aguja con OspA ST1 de *B. burgdorferi* s.s. que se hicieron crecer *in vitro* y la sensibilización con garrapatas con OspA ST2 de *B. afzelii* en las primeras tres dosis de inmunización investigadas. Asombrosamente, V3-L2-V5 fue muy potente dado que se observó protección incluso con una dosis de 3 ng contra una sensibilización con OspA ST1 de *B. burgdorferi* s.s. que se hicieron crecer *in vitro* y una dosis de 30 ng contra una sensibilización con garrapatas infectadas con OspA ST2 de *B. afzelii*. La eficacia de la nueva vacuna fue mayor que la de la proteína FL-OspA ST1 y comparable con la de FL-OspA ST2 en los modelos de sensibilización respectivos. Los resultados presentados en el presente documento muestran una alta eficacia preclínica y una prueba de concepto de una nueva vacuna multivalente contra la borreliosis de Lyme con el potencial de lograr una amplia protección con una única proteína, con el potencial de simplificar el procedimiento de producción de vacunas de OspA y haciendo que sea más rentable.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

OspA de longitud completa Lip-FL-OspA1 de *Borrelia burgdorferi* B31 con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipídado
LipCSSFKQNVSSLDEKNSVSDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVK
ADKSKVKLTISDDLGGTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSDKSSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKS
DGSKGAKKEVLKGYVLEGLTAEKTTLVVKEGTVTLNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTST
LTITVNSKKTCDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 2

OspA de longitud completa Lip-FL-OspA2 de *Borrelia afzelii* K78 con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipídado
LipCSSFKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVDKIELKGTSKDNNGSGVLEGTK
DDKSKAKLTIADDLKSTTFELFKEDGKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEM
KSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLNISKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKT
STLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 3

OspA de longitud completa Lip-FL-OspA3 de *Borrelia garinii* PBr con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipídado
LipCSSFKQNVSSLDEKNSVSDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSKMATVEKLELKGTSKNSNGSGVLEGE
KADKSKAKLTISQDLNQTTFEIKEDGKTLVSRKVNSKDKSSSTEEKFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEI
KNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVEGTVTLNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSD
TSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 4

OspA de longitud completa Lip-FL-OspA4 de *Borrelia bavariensis* PBi con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y

péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKNSNGSGTLEGEK
SDKSKAKLTISEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVNSKDKSSIEEFNAKGELSEKTLRANGTRLEYTEIKSD
GTGKAKEVLKDFALEGTAAADKTTLVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLT
ISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 5

- 5 OspA de longitud completa Lip-FL-OspA5 de *Borrelia garinii* PHei con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLEATVEKLELKGTSKNNNGSGTLEGE
KTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSSTEEKFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKS
DKTGKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLVTEGTVVLSKNISKSGETVALDDTDSSGNKKSGETWDSGTSTL
TISKNRKTQKLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 6

- 10 OspA de longitud completa Lip-FL-OspA1 de *Borrelia garinii* DK29 con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGSGTLEGEK
TDKSKVKSTIADDLSQTKFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSSTEEKFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKS
DGSKAKEVLKDFLTLEGTAAADGKTTLVTEGTVVLSKNILKSGETAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTST
LTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 7

- 15 Secuencia de "armazón" de aminoácidos conservada de OspA ST2 de *B. afzelii* (K78)

FNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLSKEIAKSG
EVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTQKDTITVKQYDSAGTNLEGTAVEIKTLD
ELKNALK

SEQ ID NO: 8

Variante 1 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo alfa

- 20 FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTVAADKVTLKVTEGTVTLSKHIPNSGEIT
VELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTICVQNYDSNGTNLEGKCEVITTLKEL
NALK

SEQ ID NO: 9

Variante 2 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo beta

- 25 FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLTLEGTVAADKVTLKVTCGTVTLSKHIPNSGEIT
VELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEITTLKELCN
ALK

SEQ ID NO: 10

Variante 3 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo β

- 30 FNAKGELSEKTLRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTLKVTCGTVTLSKNISKSG
EITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQKLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEITTLKE
LCNALK

SEQ ID NO: 11

Variante 4 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo beta

- 35 FNAKGELSEKTLRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTLKVTEGTVTLSKNISKSG
EITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQKLVFTKEDTICVQNYDSNGTNLEGKCEVITTLKE
LKNALK

SEQ ID NO: 12

Variante 5 (ST2, 3, 6) con enlace de tipo beta

- 40 FNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSG
EVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPAEIKDLA
ELCAALK

SEQ ID NO: 13

Variante 6 (ST2, 3, 6) con enlace de tipo beta

- 40 FNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLSKEIAKSG
EVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPAEIKDLA
ELCAALK

SEQ ID NO: 14

Lip-Variante 1 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo alfa, etiqueta de His (HHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLEGTVAADKVTLKVTEGTVTLSKHIP
NSGEITVELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTICVQNYDSNGTNLEGKCVIEIT
LKEKLNALKHHHHHHH

SEQ ID NO: 15

Lip-Variante 2 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo beta, etiqueta de His (HHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLEGTVAADKVTLKVTCGTVTLSKHIP
NSGEITVELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEITT
LKELCNALKHHHHHHH

SEQ ID NO: 16

Lip-Variante 3 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo beta, etiqueta de His (HHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTLKVTCGTVTLSKN
ISKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQQLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEI
TTLKELCNALKHHHHHHH

SEQ ID NO: 17

Lip-Variante 4 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo alfa, etiqueta de His (HHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTLKVTEGTVTLSKNI
SKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQQLVFTKEDTICVQNYDSNGTNLEGKCVIEI
TTLKEKLNALKHHHHHHH

SEQ ID NO: 18

Lip-Variante 5 (ST2, 3, 6) con enlace de tipo beta, etiqueta de His (HHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLKVTCGTVTLSK
EIAKSGEVTVALNDTNTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPA
EIKDLAELCAALKHHHHHHH

SEQ ID NO: 19

Lip-Variante 6 (ST2, 3, 6) con enlace de tipo beta, etiqueta de His (HHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLKVTCGTVTLSK
EIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPA
EIKDLAELCAALKHHHHHHH

SEQ ID NO: 20

Lip-Variante 1 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo alfa y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLEGTVAADKVTLKVTEGTVTLSKHIP
NSGEITVELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTICVQNYDSNGTNLEGKCVIEIT
LKEKLNALK

SEQ ID NO: 21

Lip-Variante 2 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo beta y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLEGTVAADKVTLKVTCGTVTLSKHIP
NSGEITVELDDTDSSAATKKTAAWDSNTSTLTITVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEITT
LKELCNALK

SEQ ID NO: 22

Lip-Variante 3 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo beta y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTLKVTCGTVTLSKN
ISKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQQLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEI
TTLKEKLNALK

SEQ ID NO: 23

Lip-Variante 4 (ST1, 4, 5) con enlace de tipo alfa y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTCLKVTEGTVTLISKNI
SKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQKLVFTKEDTICVQNYDSNGTNLEGKCVET
TTLKELKNALK

SEQ ID NO: 24

Lip-Variante 5 (ST2, 3, 6) con enlace de tipo beta y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLISK
EIAKSGEVTVALNDTNTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPA
EIKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 25

Lip-Variante 6 (ST2, 3, 6) con enlace de tipo beta y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLISK
EIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPA
EIKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 26

Lip-V3-L2-V5-His6 (secuencia de proteína) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTCLKVTCGTVTLISKNI
ISKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQKLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEI
TTLKELCNALKGTSANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFEKYSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDG
TGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLISKI
EIAKSGEVTVALNDTNTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPA
EIKDLAELCAALKLEHHHHHHH

SEQ ID NO: 27

Lip-V3-L2-V5-His6 (secuencia de nucleótidos) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal

TGCTCAAGCTTCAATGCAAAAGGTGAACTGAGCGAAAAAACCATTCTGCGTGCAAATGGCACCCCGTC
TGGAATATACCGAAATCAAAAGTGATGGCACCGGTAAAGCAAAAGAAGTGCTGAAAGATTTTGCAC
TGGAAAGGCACCGTTGCAGCAGATGGTAAAGTTACCCTGAAAGTTACCTGTGGCACCGTGACCCTGAG
CAAAAACATTAGCAAAAGCGGTGAAATTACCGTTGCCCTGGATGATACCGATAGCAGCGCAGCAACC
AAAAAACCCGACGATGGGATAGCGGCACCAGCACCTGACCATTACCGTTAATAGTAAAAAACCA
AACAGCTGGTGTTTACCAAGAGGATACCATTACCGTTTACGAACTATGATAGCAATGGTACGAATCT
GGAAGGTAAAGCCGTTGAAATCACCACACTGAAAGAACTGTGTAATGCACTGAAAGGTACTAGTGCA
AATAATCAGGCAGGTGAGAAAAGCAGCGGTAGCACCCAGGCAACCACCCCGAATCTGACCTTTGAA
AAGTACTCATTTAACGAGAAAGGCGAGCTGTCAGCAAAAACCATGACCCGTGAAAATGGAACCAAC
TGGAATACACGGAAATGAAATCAGATGGTACAGGCAAAGCCAAAGAGGTCCTGAAAACTTCACCCT
GGAAGGGAAAGTTGCCAATGATAAAGTGACACTGGAAGTTAAATGTGGTACAGTTACACTGAGCAAA
GAAATTGCCAATCAGGTGAAGTGACCGTGGCACTGAATGATACAAATACCACCCGTGCCACAAAAA
AAACAGGTAAATGGGATAGTAAAACGAGCACACTGACAATTAGTGTGAATAGCCAGAAAACGAAAAA
CCTGGTGTTCACGAAAGAAGATACAATCACCCTACAGAATTATGATTCAGCAGGCACCAACCTGGAA
GGTTCACCGGCAGAAATTAAGATCTGGCCGAACGTGTGTGCAGCCCTGAAACTCGAGCACCACCAC
CACCACCAC

SEQ ID NO: 28

Lip-V3-L2-V5 (secuencia de proteína) con péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTVAADGKVTCLKVTCGTVTLISKNI
ISKSGEITVALDDTDSSAATKKTAAWDSGTSTLTITVNSKKTQKLVFTKEDTITVQNYDSNGTNLEGKAVEI
TTLKELCNALKGTSANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFEKYSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDG
TGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLISKI
EIAKSGEVTVALNDTNTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGSPA
EIKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 29

Lip-V3-L2-V5 (secuencia de nucleótidos)

TGCTCAAGCTTCAATGCAAAAGGTGAACTGAGCGAAAAAACCATTCTGCGTGCAAATGGCACCCGTC
 TGGAATATACCGAAATCAAAAGTGATGGCACCCGTTAAAGCAAAAGAAGTGCTGAAAGATTTTGCACCT
 GGAAGGCACCGTTGCAGCAGATGGTAAAGTTACCCTGAAAGTTACCTGTGGCACCCGTGACCCTGAG
 CAAAAACATTAGCAAAAGCGGTGAAATTACCGTTGCCCTGGATGATACCGATAGCAGCGCAGCAACC
 AAAAAAACCGCAGCATGGGATAGCGGCACCAGCACCCCTGACCATTACCGTTAATAGTAAAAAAACCA
 AACAGCTGGTGTTTACCAAAGAGGATACCATTACGGTTCAGAAGTATGATAGCAATGGTACGAATCT
 GGAAGGTAAAGCCGTTGAAATCACCACACTGAAAGAAGTGTGTAATGCACTGAAAGGTACTAGTGCA
 AATAATCAGGCAGGTGAGAAAAGCAGCGGTAGCACCCAGGCAACCACCCCGAATCTGACCTTTGAA
 AAGTACTCATTTAACGAGAAAAGGCGAGCTGTGAGCAAAAACCATGACCCGTGAAAATGGAACCAAAC
 TGGAATACACGGAAATGAAATCAGATGGTACAGGCAAAGCCAAAGAGGTCCCTGAAAACTTCACCCCT
 GGAAGGGAAAGTTGCCAATGATAAAGTGACACTGGAAGTTAAATGTGGTACAGTTACACTGAGCAAA
 GAAATTGCCAAATCAGGTGAAGTGACCGTGGCACTGAATGATACAAATACCACCCGTGCCACAAAAA
 AACAGGTAAATGGGATAGTAAACGAGCACACTGACAATTAGTGTGAATAGCCAGAAAACGAAAAA
 CCTGGTGTTCACGAAAGAAGATACAATCACCCTACAGAATTATGATTCAGCAGGCACCAACCTGGAA
 GTTCACCGGCAGAAATTAAGATCTGGCCGAACTGTGTGACGCCCTGAAA

SEQ ID NO: 30

Secuencia señal de 23 aminoácidos para la lipidación de *E. coli* que incluye un péptido CSS no escindido

5 MKATKLVLGAVILGSTLLAGCSS

SEQ ID NO: 31

Etiqueta de 6 histidinas

HHHHHH

10

SEQ ID NO: 32

Secuencia ligadora de 23 aminoácidos (L2)

ANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFE

15 SEQ ID NO: 33

Lip-ST1 monomérica (aa 126-273, cepa B31, NP_045688.1) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLNISK
 KSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSAVEIT
 KLDEICNALKLEHHHHHH

20 SEQ ID NO: 34

Lip-ST2 monomérica (aa 126-273, cepa K78, AJY72832.1) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLNISK
 EIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTA
 EIKTLDELCLNALKLEHHHHHH

25 SEQ ID NO: 35

Lip-ST3 monomérica (aa 126-274, cepa PBr, YP_002476925.1) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNDKGKLEKVVTRANTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALLEGTLTDGGETKLTVTTCGTVTLNISK
 NISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPA
 EIKDLAELCAALKLEHHHHHH

30 SEQ ID NO: 36

Lip-ST4 monomérica (aa 126-273, cepa PBI, YP_063283.1) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNAKGELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALLEGTLAADKTTLVKTCGTVVLSKHIP
 NSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKT
 LDELCLNALKLEHHHHHH

35 SEQ ID NO: 37

Lip-ST5 monomérica (aa 126-273, cepa PHei, CAA56544.1) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipidado

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLVKTCGTVTLNISK
 SKSGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEIT
 TLKELCNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 38

Lip-ST6 monomérica (aa 126-274, cepa DK29, CAA45010) con etiqueta de His (LEHHHHHH) C-terminal y péptido CSS N-terminal lipídado

LipCSSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLTLEGLAADGKTTLKVTCGTVVLSKN
ILKSGEITAALDDSDTTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEI
TTLKELCNALKLEHHHHHH

5

SEQ ID NO: 39

Péptido KLK

KLKLLLLLLKLK

10

SEQ ID NO: 40

oligo(dIdC)₁₃

dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC dIdC

SEQ ID NO: 41

15 S3BvaHybD1: fragmento C-terminal de OspA híbrida; aminoácidos de las posiciones 125-176 de *Borrelia valaisiana*, cepa VS116, y aminoácidos 177-274 de *Borrelia garinii*, cepa PBr, con enlace disulfuro de tipo 1 y T en la posición 233

FNEKGEVSEKILTRSNGTTLLEYSQMTDAENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGKTKLTVTCGTVTLSKNISKS
GEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDL
AELCAALK

20

SEQ ID NO: 42

OspA de *B. valaisiana* (cepa VS116), aa 125-176

FNEKGEVSEKILTRSNGTTLLEYSQMTDAENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGK

SEQ ID NO: 43

25 OspA de *B. garinii* (cepa PBr, serotipo 3), aa 177-274, con T en la posición 233, a partir de OspA de longitud completa (SEQ ID NO: 46)

TKLTVTCGTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQN
YNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 44

30 OspA de *B. valaisiana* (cepa VS116)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLVATVDKVELKGTSDKNN
GSGTLEGVKDDKSKVKLTISDDLGETKLETFKEDGTLVSRKVNFKDKSFTEEFNEKGEVSEKILTRSNGT
TLEYSQMTDAENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGKTTLKITEGTVTLSKHIKSGEVTVEINDTSSTPNTKKT
GKWDA NSTLTIIVDSKNKTKLVFTKQDTITVQSYNPAGNKLEGTAVEIKTLQELKNALK

SEQ ID NO: 45

OspA de *B. spielmanii* (cepa A14S), número de registro: AAD16455

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSGLDEKNSTSVDPGELKVLVSKEKDKDGKYSMATVDKLELKGTSKND
GSGVLEGVKADKSKVKLTISDHLSKTTFEVFKEDGTLVSRNVNSKDKSSTKEKFNEKGELSEKTLVRAN
GTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFLTLEGLANEKATLTVKEGTVTLSKNIDKSGEVTVALNDTDSTAATKKT
35 GAWDSKTSTLTITVNSKKTDLVFTKQDTITVQKYSAGTTLEGSAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 46

OspA de *B. garinii* (cepa PBr, OspA serotipo 3) con T en la posición 233 (registro de Embl ACL34827.1)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSKSN
GSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIFKEDGTLVSRKVNNSKDKSSTEEKFNDDKGLSEKVVTRAN
GTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVEGTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKK
40 TGEWKSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELKAALK

SEQ ID NO: 47

Lip-S4D1-S3hybD1-nt: secuencia codificante para las proteínas de fusión heterodiméricas intermedia y final de OspA serotipo 4 y OspA serotipo 3 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación de *E. coli* lpp, secuencia ligadora LN1, fragmento de OspA serotipo 3 que comprende los aminoácidos 125-176 de *B. valaisiana*, cepa VS116 (SEQ ID NO: 42), y los aminoácidos 177-274 de *B. garinii*, cepa PBr, serotipo 3 (SEQ ID NO: 43)

45

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAA
GCTTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGTCTGGAAT
ACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTCTGCTGGAAGG
TACCCTGGCGGCCGACAAAACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAACATAT
TCCGAATCTGGTGAAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAGACG
GGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTG
TGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCA
ATGCCGTCGAAATCAAAACCCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAACAA
TGGCTCTGGTAGCAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTGAGC
GAAAAATTCTGACCCGTAGCAATGGCACCACCTGGAATATAGCCAGATGACCGATGCAGAAAAATG
CAACCAAAGCAGTTGAAACCCTGAAAAACGGTATTAACTGCCTGGTAATCTGGTTGGTGGTAAAC
CAAAGTACCGTTACCTGTGGCACCCTGAGCAAAAAACATTAGCAAAAGCGGTGAAATTACC
GTGGCACTGAATGATACCGAAACCACACCGGCAGACAAAAAACCGGTGAATGGAAAAGCGATACC
AGCACCTGACCATTAGTAAAAATAGCCAGAAAAACAAACAGCTGGTGTTCACCAAAGAAAAACCAT
TACCGTGCAGAAATATAACCGTGCAGTAATGCACTGGAAGGTAGTCCGGCAGAAATTAAGATCTG
GCAGAACTGTGTGCAGCCCTGAAATAA

SEQ ID NO: 48

5 Lip-S4D1-S3hybD1-aa: proteína de fusión heterodimérica de OspA serotipo 4 y OspA serotipo 3, que comprende los aminoácidos 125-176 de *B. valaisiana*, cepa VS116 (SEQ ID NO: 42), y los aminoácidos 177-274 de *B. garinii*, cepa PBr, serotipo 3 (SEQ ID NO: 43) (también conocida como S3BvaHybD1), con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1, lipidación N-terminal
LipCSSFNAGKELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVKTCGTVVLSKHIP
NSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKT
LDELCLNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKILTRSNGTTLLEYSQMTDAENATKAVETLK
NGIKLPGNLVGGKTKLTVTCGTVTLKSNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTSTLTISKNSQKTK
QLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAEIKDLAELCAALK

10 SEQ ID NO: 49

Lip-S1D1-S2D1-nt: secuencia codificante para las proteínas de fusión heterodiméricas intermedia y final de OspA serotipo 1 y OspA serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación de *E. coli* lpp, secuencia ligadora LN1, aa 164-174 de OspA serotipo 1 reemplazados por secuencia NFTLEGKVAND no similar a hLFA-1
ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAA
GCTTCAACGAAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAACATTACCCGCGCAGACGGCACCCGCCTGGAAT
ACACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAG
GCAAAGTCGCAAATGATAAAACCACCCTGGTGGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACAT
TAGTAAATCCGGTGAAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAACC
GCAGCTTGGAAGTCAAGCACCTCGACGCTGACCATTACGGTTAATAGCAAGAAAAACCAAGATCTGG
TCTTCACGAAAGAAAAACCATCACGGTGCAGCAATATGACAGCAATGGTACCAAACTGGAAGGCTC
CGCTGTGGAAATCACGAAACTGGATGAAATCTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAAT
GGCTCTGGTAGCAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTGTGCG
GCGAAAACGATGACGCGTGAAAAACGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAAAAAGCGATGGCACC
GGTAAAGCGAAAGAAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCCAATGACAAAGTCACCC
TGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAGAAATTGCAAATCGGGTGAAGTGACCGTTG
CTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAACCGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTA
CGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAAACACGACGCTGGTCTTCACCAAAACAAGATACGATCAC
CGTGCAGAAATACGACAGTGCGGGTACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACCCTGGA
15 CGAACTGTGTAACGCCCTGAAA

SEQ ID NO: 50

20 Lip-S1D1-S2D1-aa: proteína de fusión heterodimérica de OspA serotipo 1 y OspA serotipo 2 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1, aa 164-174 de OspA serotipo 1 reemplazados por secuencia NFTLEGKVAND no similar a hLFA-1, lipidación N-terminal
LipCSSFNEKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGTVTLKSNIS
KSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKTKDLVFTKENTITVQKYDSNGTKLEGSVEIT
KLDEICNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSAKTMRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLK
NFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLKSKIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQ
LVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCLNALK

SEQ ID NO: 51

Lip-S4D1-S3D1-nt: secuencia codificante para las proteínas de fusión heterodiméricas intermedia y final de OspA

serotipos 4 y 3 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación de *E. coli* lpp, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAA
GCTTCAATGCTAAGGGGCGAACTGAGCGAAAAAACGATCCTGCGTGCGAATGGCACCCGCTCTGGAAT
ACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTCTGCTCTGGAAGG
TACCCTGGCGGCCGACAAAACACGCTGAAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATAT
TCCGAACTCTGGTGAATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAGACG
GGCAAATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAAAATATTG
TGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGGCACCAACCTGGAAGGCA
ATGCCGTGCGAAATCAAAACCCTGGATGAACTGTGTAACGCCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAACAA
TGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTAAACGATAAAGGGCAAACCTGTG
GAAAAAGTGGTCACCCGCGCAAATGGCACCCGCGCTGGAATACACGGAAATCAAAAACGATGGTAGC
GGCAAAGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTGAAACC
AACTGACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAGTCTGGTGAATCACGG
TCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAAGACCGGCGAATGGAAAAAGTGACACCT
CCACGCTGACCATTTCAAAGAACTCGCAGAAACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAGAAAAACACGAT
CACCGTGCAAGAACTATAATCGTGCCGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCT
GGCTGAACTGTGTGCGGCACTGAAA

5 SEQ ID NO: 52

Lip-S4D1-S3D1-aa: proteína de fusión heterodimérica de OspA serotipos 4 y 3 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNAGKELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLKVTCGTVVLSKHIP
NSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKT
LDELCLNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGKLSKVVTTRANSTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKG
FALEGLTLDGGETKLTVCCTVTLNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKPKQ
LVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

10

SEQ ID NO: 53

Lip-S5D1-S6D1-nt: secuencia codificante para las proteínas de fusión heterodiméricas intermedia y final de OspA serotipos 6 con enlace disulfuro de tipo 1, señal de lipidación de *E. coli* lpp, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTGCTCAA
GCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGCTAACGGCACCCGCGCTGGAAT
ACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGAAGGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGG
TACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCCTTACGCTGTCCAAAA
CATTAGTAAGTCCGGCGAAATCACGGTTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAG
CGGTACCTGGGATTCAGGCACCTCGACGCTGACCATTTCATAAAATCGTACGAAAACCAAGCAGCTG
GTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGGTACCAATCTGGAAGGCA
AAGCTGTGGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAA
TGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAAAGATGGCAAGTACTCATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAG
CGAAAAGACCATCGTGCGTGCGAACGGTACCCGCGCTGGAATATACGGACATTAATCGGACGGCAG
CGGCAAAGCAAAGGAAGTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAC
CACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTCGGGTGAAATCAC
CGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAGACCGGTAAATGGGATAGCAAGAC
CTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAAACGAAGAATCTGGTGTTACCAAGAAGATACG
ATCACCGTTCAACGCTATGACAGTGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCAG
CTGAAAGAACTGTGTAATGCTCTGAAA

15

SEQ ID NO: 54

Lip-S5D1-S6D1-aa: proteína de fusión heterodimérica de OspA serotipos 6 con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFLEGLAADGKTTLKVTCGTVTLNKN
SKSGEITVALDDTDSSGNKKSSTWDSSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEIT
TLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKD
FTLEGLAADGKTTLKVTCGTVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKSTLTISVNSQKTKNL
VFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK

20

SEQ ID NO: 55

S1D1

FNEKGGEVSEKIITRADGTRLEYTGKISDGSKGAKKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVKCGTVTLNISKSGE
VSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEI
CNALK

SEQ ID NO: 56

S2D1

FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTVTLNISKSG
EVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLD
ELCNALK

SEQ ID NO: 57

S3D1

FNDKGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCGTVTLNISKSG
GEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDL
AELCAALK

SEQ ID NO: 58

S4D1

FNAKGELSEKILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVKTCGTVTLNISKSGE
TVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDL
NALK

SEQ ID NO: 59

S5D1

FNEKGGEVSEKIVRANGTRLEYTDIKSDGTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVKTCGTVTLNISKSGE
TVALDDTDSSGNKKSSTWDSGTSTLTISKNRKTKQLVFTKEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKEL
NALK

SEQ ID NO: 60

S6D1

FNGKGETSEKIVRANGTRLEYTDIKSDGSKGAKKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVKTCGTVTLNISKSG
EITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTL
LCNALK

SEQ ID NO: 61

S3BvaHybD1 (Bva)

FNEKGGEVSEKILTRSNGTTLSEYSQMTDAENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGKTKLTVTCGTVTLNISKSG
GEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDL
AELCAALK

SEQ ID NO: 62

BvaD1 (fragmento C-terminal de Bva con enlace disulfuro introducido)

FNEKGGEVSEKILTRSNGTTLSEYSQMTDAENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGKTKLTITCGTVTLNISKSG
EVTVEINDTSSTPNTKKTGKWDSNTSTLTIVDSKNKTKLVFTKQDTITVQSYNPAGNKLEGTAVEIKTLQ
ELCNALK

SEQ ID NO: 63

S3BspHybD1 (Bsp): fragmento C-terminal de OspA híbrida; aminoácidos 126-175 de *Borrelia spielmanii* y aminoácidos 177-274 de *Borrelia garinii*, cepa PBr, con enlace disulfuro de tipo 1 y T en la posición 233

FNEKGELSEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFTLGTLANEKTLTVTCGTVTLNISKSGE
TVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAEL
CAALK

SEQ ID NO: 64

BspD1 (fragmento C-terminal de Bsp con enlace disulfuro introducido)

FNEKGELSEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFTLGTLANEKATLTVKCGTVTLNISKSGE
VTVALNDTDSTAATKKTGAWDSKTSTLTITVNSKKTDLVFTKQDTITVQKYDSAGTTLEGSAVEIKTLDL
CNALK

SEQ ID NO: 65

Señal de lipidación de OspA de *Borrelia*

MKKYLLGIGLILALIA

SEQ ID NO: 66

Señal de lipidación de OspB de *Borrelia*

MRLIGFALALALIG

5 SEQ ID NO: 67

Señal de lipidación de *E. coli* lpp

MKATKLVLGAVILGSTLLAG

SEQ ID NO: 68

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

GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS

SEQ ID NO: 69

15 OspA serotipo 1/serotipo 2 quimérica, lipidación N-terminal, con etiqueta de His, que incluye la secuencia señal de lipidación de OspB: MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 66) que se escinde durante el procesamiento

MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSDLPGEMKVLVSKEKDKNGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSG
VLEGVKTNSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIITMADGTRL
EYTGKSDGTGKAKYVLKNTFTLEGKVANDKTTLEVKEGTVTLNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAA
WNSKTSTLTISVNSKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 70

20 OspA serotipo 5/serotipo 3 quimérica, lipidación N-terminal, con etiqueta de His, que incluye la secuencia señal de lipidación de OspB: MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 66) que se escinde durante el procesamiento

MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSDLPGGMKVLVSKEKDKNGKYSLMATVEKLELKGTSKNNNGS
GTLEGEKTNKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGDKTLVSKKVTLDKSSSTEEKFNEKGEISEKTIVMANGTRL
EYTDIKSDGTGKAKYVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVTLNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSQTW
DSDTSTLTISKNSQTKQLVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 71

25 OspA serotipo 6/serotipo 4 quimérica, lipidación N-terminal, con etiqueta de His, que incluye la secuencia señal de lipidación de OspB: MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 66) que se escinde durante el procesamiento

MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSDLPGGMTVLVSKEKDKNGKYSLEATVDKLELKGTSKNNNGS
GTLEGEKTNKSKVKLTIAEDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLDKSSSTEEKFNEKGETSEKTIVMANGTRL
EYTDIKSDGSGKAKYVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVVLNISKSGEITVALDDSDTTQATKKTGK
WDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 72

30 Lip-S4D1-S3BspHybD1-aa: proteína de fusión heterodimérica de OspA serotipo 4 y OspA serotipo 3, que comprende los aminoácidos 125-175 de *B. spielmanii*, cepa A14S (SEQ ID NO: 73), y los aminoácidos 177-274 de *B. garinii*, cepa PBr, serotipo 3 (SEQ ID NO: 43), con enlace disulfuro de tipo 1, CSS N-terminal para la adición de lípidos, secuencia ligadora LN1, lipidación N-terminal

LipCSSFNAGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLVTCGTVVLSKHIP
NSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKT
LDELKNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGELSEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDF
TLEGTLANEKTKLTVTCGTVTLNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSNTSTLTISKNSQTKQLVF
TKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

35

SEQ ID NO: 73

OspA de *B. spielmanii* (cepa A14S), aa 126-175

FNEKGELSEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFTEGTLANEK

40 SEQ ID NO: 74

OspA de *B. afzelii* (cepa K78; OspA serotipo 2)

MKKYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLKATVDKIELKGTSKDN
GSGVLEGTKDDKSKAKLTIAEDLSKTTFELFKEDGDKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKGELSAKTMNTREN
GTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNTFTLEGKVANDKVTLEVKEGTVTLNISKSGEITVALNDTNTTQATK
KTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 75

45 Etiqueta de His alternativa

LEHHHHHH

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido inmunogénico que comprende un dominio C-terminal de OspA estabilizado, caracterizado porque dicho dominio C-terminal de OspA comprende al menos tres epítomos de OspA específicos cada uno de cepas de *Borrelia* distintas que provocan borreliosis de Lyme, en el que dicho dominio C-terminal de OspA puede inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a la totalidad de dichas cepas de *Borrelia* distintas, y en el que el dominio C-terminal de OspA se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y variantes inmunogénicas de las mismas que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80% con al menos una de SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
2. Polipéptido inmunogénico según la reivindicación 1, que comprende una OspA C-terminal (i) y/o una OspA C-terminal (ii), en el que
 - la OspA C-terminal (i) es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
 - la OspA C-terminal (ii) es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
3. Polipéptido inmunogénico según la reivindicación 2, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un péptido (i) y un péptido (ii), en el que
 - el péptido (i) es un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y
 - el péptido (ii) es un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o una variante inmunogénica de las mismas, en el que dicha variante inmunogénica tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
4. Polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las variantes inmunogénicas de SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 tienen una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, respectivamente.
5. Polipéptido inmunogénico según la reivindicación 3 ó 4, en el que péptido (i) es N-terminal con respecto al péptido (ii) o en el que péptido (ii) es N-terminal con respecto al péptido (i).
6. Polipéptido inmunogénico según la reivindicación 3 ó 5, en el que el péptido (i) y el péptido (ii) están unidos mediante una secuencia ligadora, particularmente en el que dicha secuencia ligadora comprende o consiste en ANNQAGQKSSGSTQATTPNLTFE (SEQ ID NO: 32).
7. Polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que comprende además una secuencia señal de lipidación N-terminal, particularmente en el que la secuencia señal de lipidación es MKATKLVLGAVILGSTLLAGCSS (SEQ ID NO: 30).
8. Polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido inmunogénico comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 28 (Lip-V3-L2-V5).
9. Ácido nucleico que codifica para el polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, particularmente en el que dicho ácido nucleico comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29.
10. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y/o el ácido nucleico según la reivindicación 9 y opcionalmente un adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende L-metionina y el adyuvante comprende hidróxido de aluminio.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 ó 11, que comprende además al menos un antígeno transmitido por vector adicional, particularmente en el que el al menos un antígeno transmitido por vector adicional se deriva del grupo que comprende *Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia turicatae*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia parkeri*, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Coxiella burnetii* y *Borrelia lonestari*, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV), virus de la fiebre por garrapatas de Colorado (CTFV), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea y el Congo (CCHFV), virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur (KFDV), virus Powassan, virus Heartland, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV) y *Babesia* spp., o particularmente en el que el al menos un antígeno transmitido por vector adicional está comprendido en una

segunda composición de vacuna, especialmente en el que la segunda composición de vacuna es una vacuna contra la encefalitis transmitida por garrapatas, una vacuna contra la encefalitis japonesa o una vacuna contra la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas.

- 5 13. Polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, ácido nucleico según la reivindicación 9 o composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para su uso como medicamento, particularmente como vacuna.
- 10 14. Polipéptido inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, ácido nucleico según la reivindicación 9 o composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección por *Borrelia*, particularmente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. mayonii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* o *B. sinica*, preferiblemente una infección por *B. burgdorferi* s.s., *B. bavariensis*, *B. afzelii* o *B. garinii*.
- 15 15. Método de diseño de un antígeno OspA multivalente comprendido en el polipéptido inmunogénico según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) proporcionar un armazón estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína OspA o un fragmento de la misma;
 - 20 b) identificar posibles epítopos inmunogénicos en la superficie de dicho armazón estructural mediante modelado *in silico* basado en la estructura cristalina de OspA ST1 (registro de PDB 1OSP);
 - c) alterar los aminoácidos de superficie dentro de uno o más de dichos posibles epítopos inmunogénicos en dicho armazón estructural para coincidir con la secuencia de uno o más serotipos diferentes de *Borrelia*.

Figura 1A

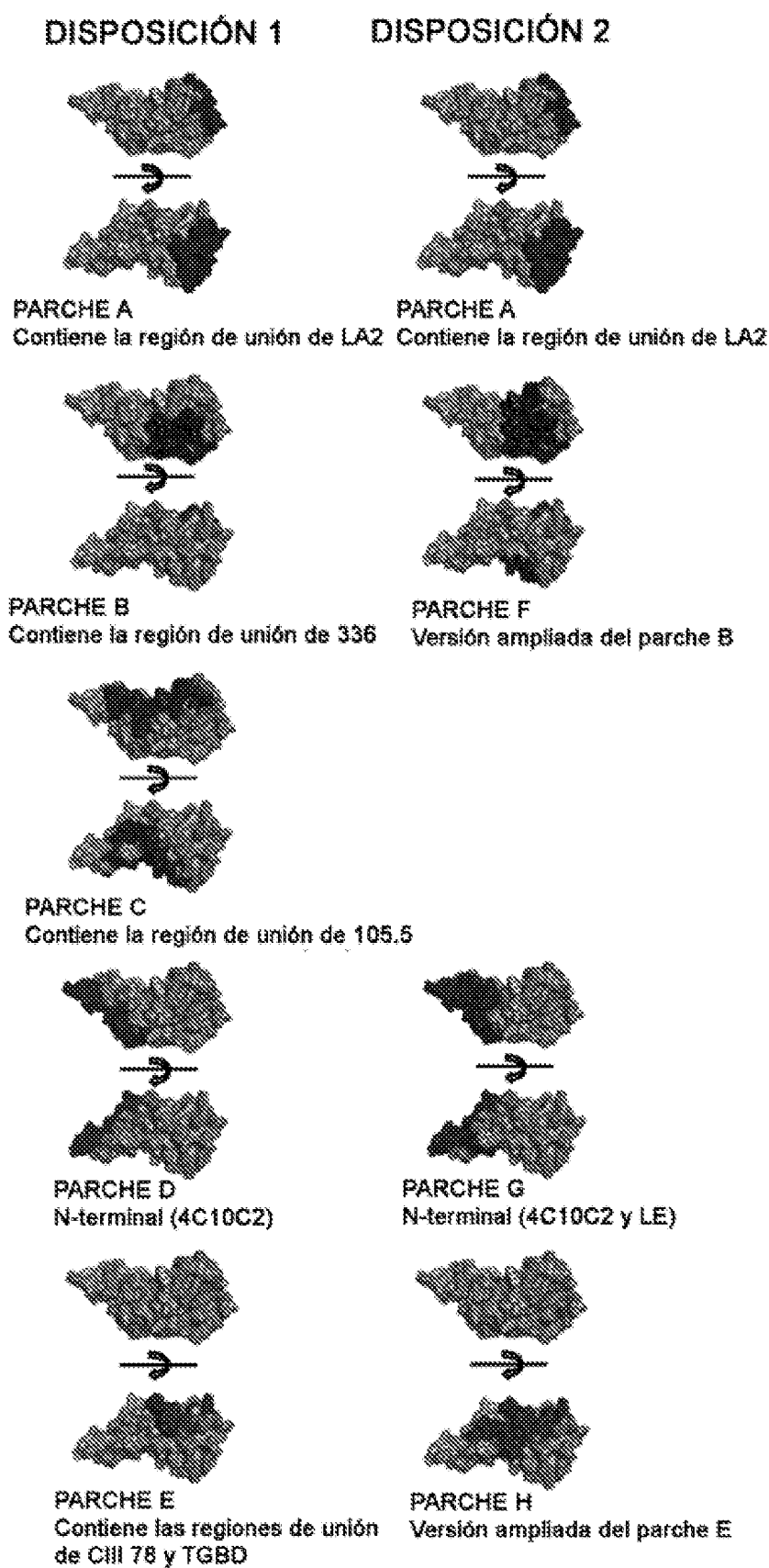
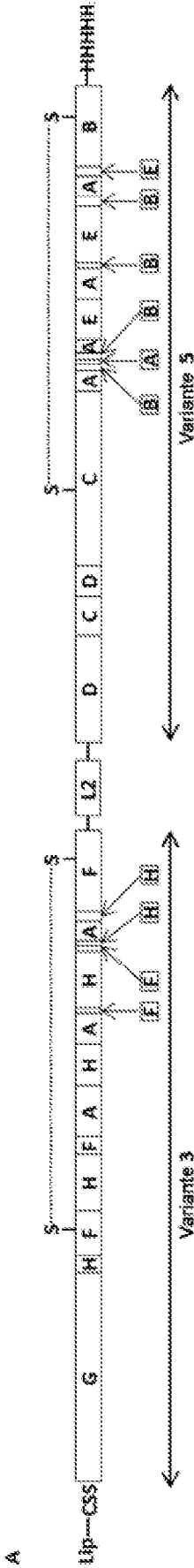


Figura 1B

Proteínas	Enlace disulfuro					
		Parche A	Parche F	Parche G	Parche H	
Variante 1	α	ST1	ST5	ST5	ST4	
Variante 2	β	ST1	ST5	ST5	ST4	
Variante 3	β	ST1	ST5	ST4	ST5	
Variante 4	α	ST1	ST5	ST4	ST5	
		Parche A	Parche B	Parche C	Parche D	Parche E
Variante 5	β	ST6	ST3	ST2	ST2	ST6
Variante 6	β	ST2	ST3	ST2	ST2	ST6

45

Figura 3



B

<i>E. afzelii</i> ST2 (PKo)	126	FNEKGELSAKTMTRNGTKLEYTEMKSDGSGAKAEVLKNFTLEKQVAND-KVTLEVKEGTVTLSEIAKSGEVTVALNDT	204
Tipo "beta"			
Variante 3	1	.A....E..IL.A...R....I.....D.A...T..A.G...K.TC.....N.S...I...D...80	
Disposición 2		GGGGGGGGGGGGGGGGGGG-G-GGGGGGGGGG-G-GGG-G-GGG-GGGH-H-F-FFFFF-H-H-HHHHHH-H-FFF	
Variante 5	1	R.....K.....Q...KN.....E.....N.....SPA...D.A..CA...148	
Disposición 1		DDDDDDDDDDDDDDDDDDDD-D-CC-CCCCCC-D-D-DD-C-CCC-CCCCC-C-C-C-CCCCC-C-C-C-79	
<i>E. afzelii</i> ST2 (PKo)	205	NTQTATKKGANDSKTSTLTISVNSKTTQLVFTQKDTITVQKVDGAGTNLEGTAVEIKTLDELKNAK	273
Tipo "beta"			
Variante 3	81	DSSA....A....G....T....K....E....N....N....K....T..K..C...149	
Disposición 2		AAAAAAAAAAAAAAAAHHHHH-H-AAAAAFTH-H-HHH-H-HHFTHAAAAAAAAHHHHHHH-FFFFF-FFF-F	
Variante 5	80	...R....K.....Q...KN.....E.....N.....SPA...D.A..CA...148	
Disposición 1		CAAAACACAAAEHEHEEE-E-AAAAABBE-E-EEE-E-EBEB-AAAAAE-BBBSBB-BBBSB-BBB-B	
L2 (P66 <i>B. garinii</i> FBr) 1	ANNQAGQKSSGSTQTATPNTLTFE	23	

Figura 4

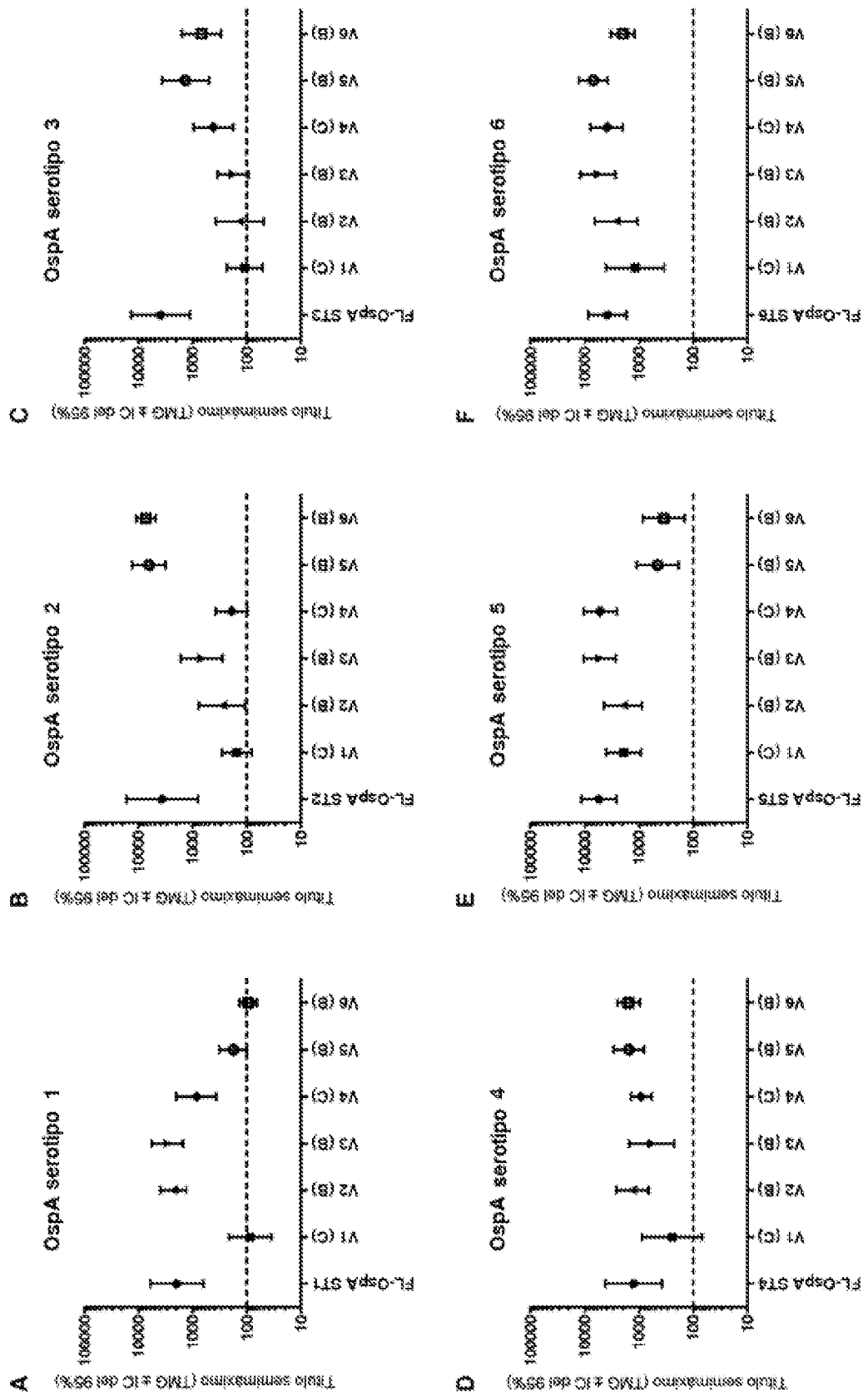


Figura 5

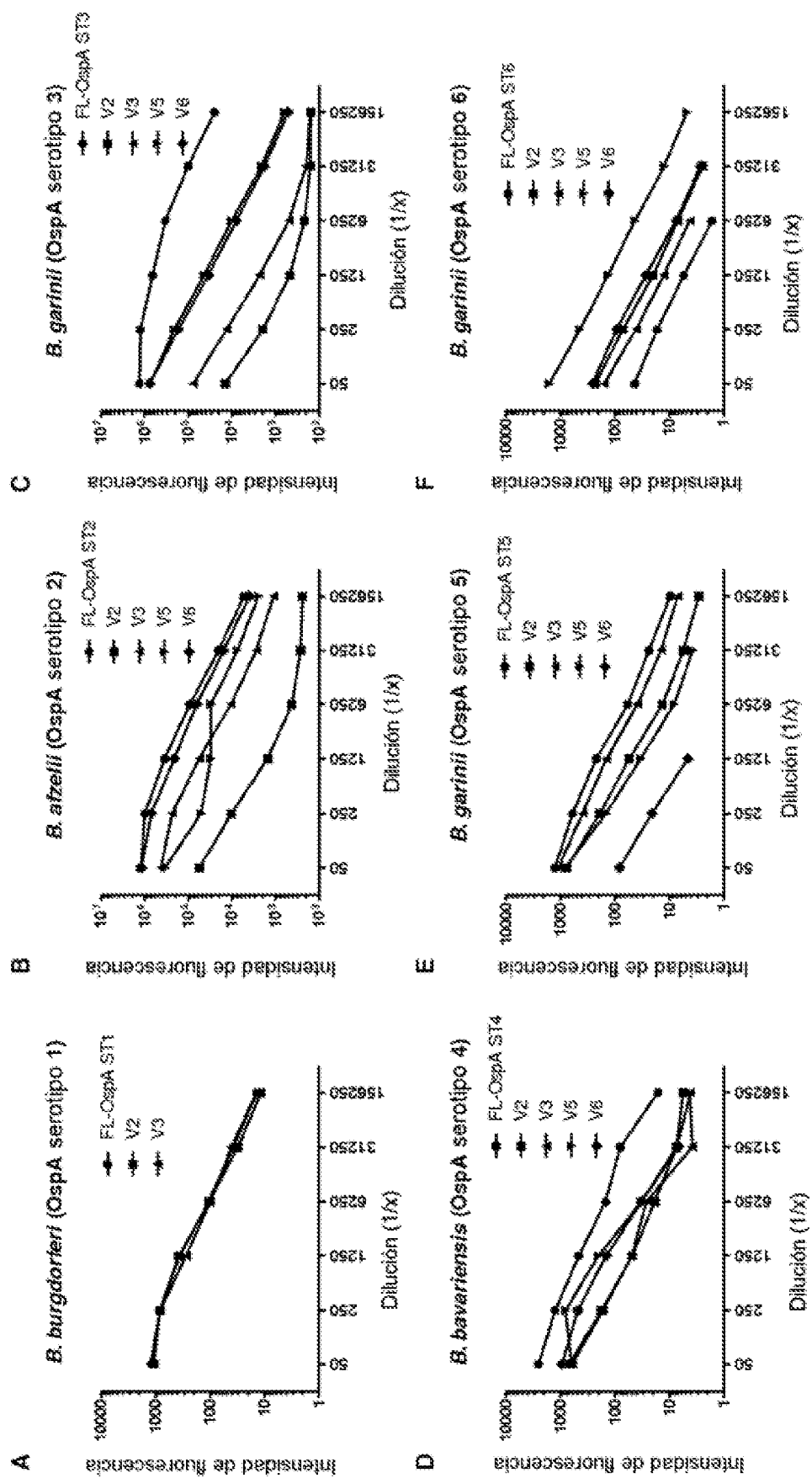


Figura 6

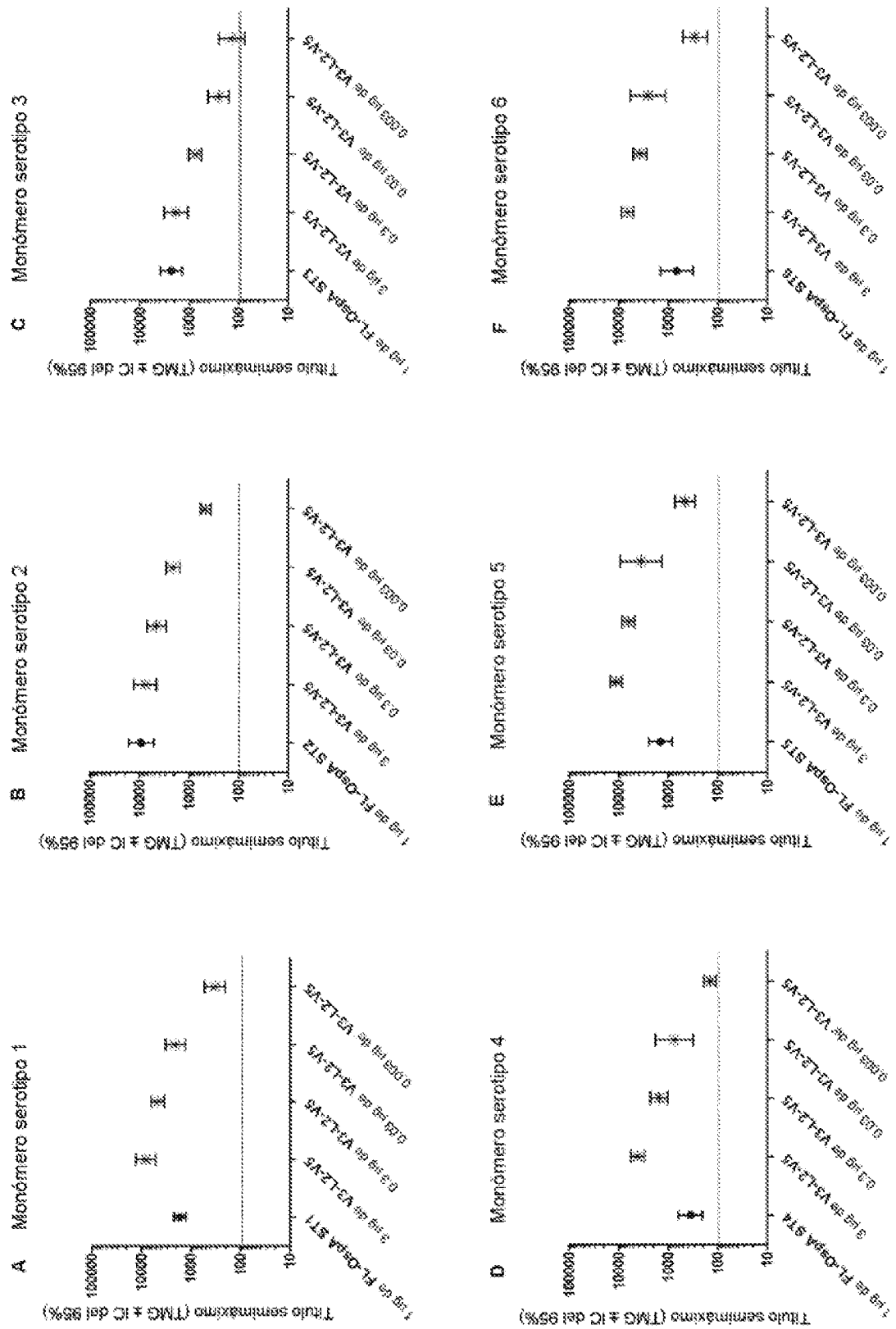


Figura 7

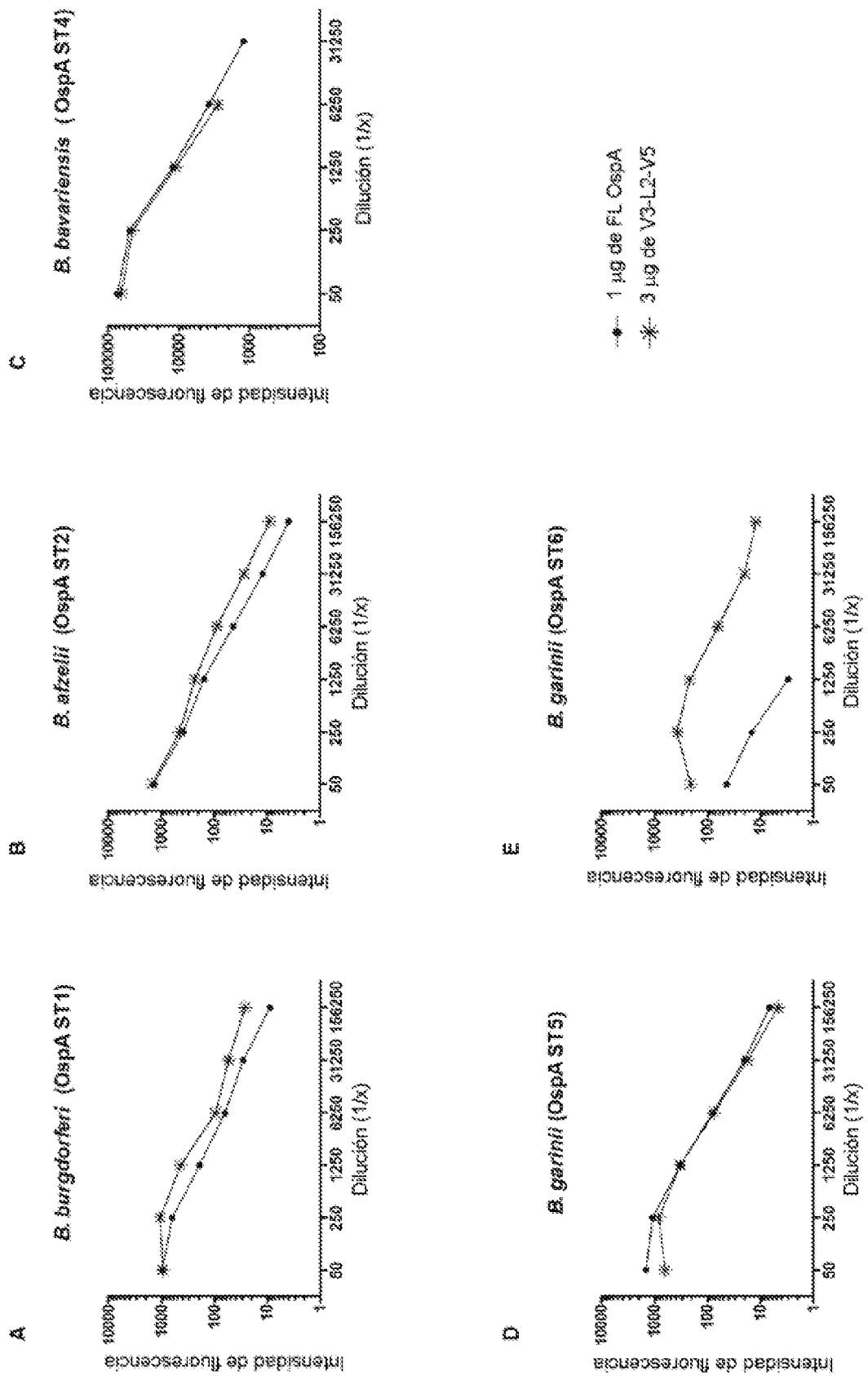


Figura 8

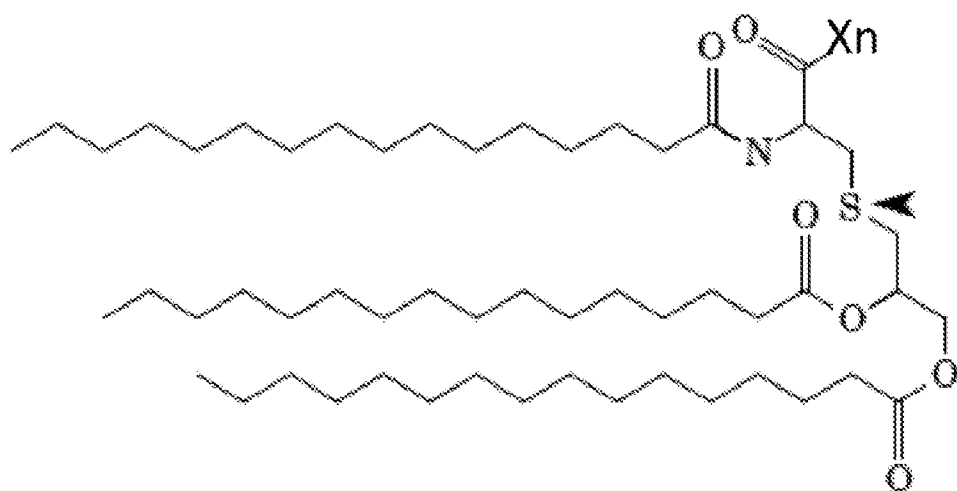


Figura 9

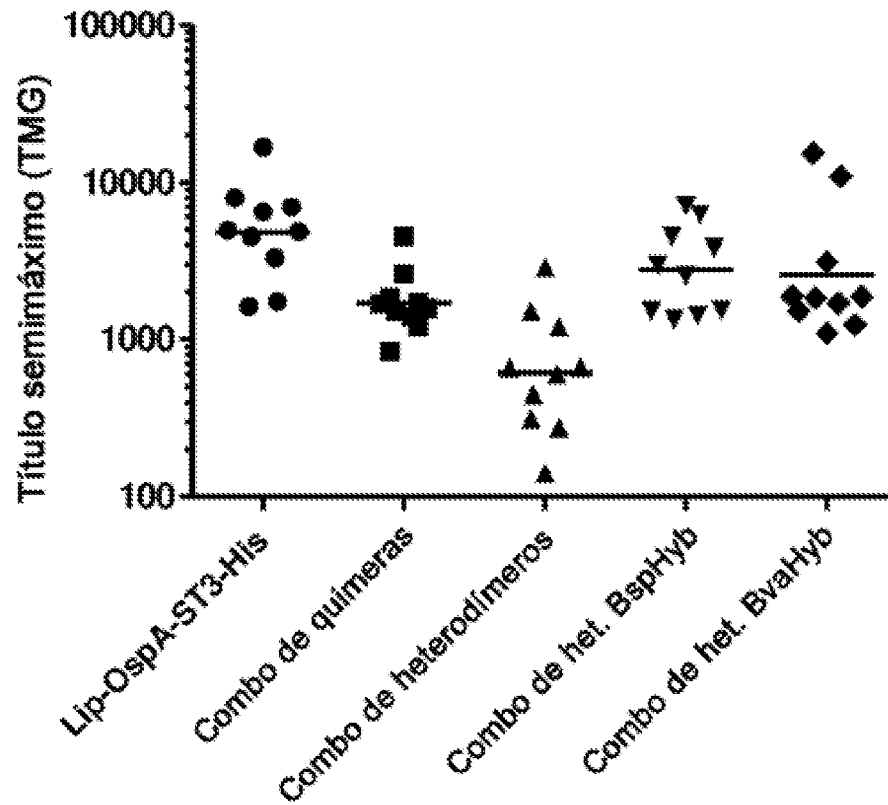


Figura 10

