

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034554**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.19

(21) Номер заявки
201691095

(22) Дата подачи заявки
2015.01.09

(51) Int. Cl. **C07K 14/20** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)

(54) МУТАНТНЫЕ ФРАГМЕНТЫ OspA И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **14150682.4**

(32) **2014.01.09**

(33) **EP**

(43) **2017.03.31**

(86) **PCT/EP2015/050365**

(87) **WO 2015/104396 2015.07.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАЛНЕВА АУСТРИА ГМБХ (AT)

(72) Изобретатель:
Лундберг Урбан, Шюлер Вольфганг (AT)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2011143617**
US-B1-6248562

LIVEY IAN ET AL.: "A New Approach to a Lyme Disease Vaccine", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, US, vol. 52, no. Supplement 3, 1 February 2011 (2011-02-01), pages S266-S270, XP008139263, ISSN: 1058-4838, DOI: 10.1093/CID/CIQ118, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.journals.uchicago.edu/CID/home.htm>, the whole document

MICHAEL G. SCHWENDINGER ET AL.: "Evaluation of OspA Vaccination-Induced Serological Correlates of Protection against Lyme Borreliosis in a Mouse Model", PLOS ONE, vol. 8, no. 11, 18 November 2013 (2013-11-18), page e79022, XP055178618, DOI: 10.1371/journal.pone.0079022, abstract

GERN L. ET AL.: "Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against Ixodes ricinus tick bites infected by Borrelia burgdorferi ss, Borrelia garinii and Borrelia afzelii", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 15, no. 14, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 1551-1557, XP004090340, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(97)00066-2, abstract

PÄR COMSTEDT ET AL.: "Design and Development of a Novel Vaccine for Protection against Lyme Borreliosis", PLOS ONE, vol. 9, no. 11, 19 November 2014 (2014-11-19), page e113294, XP055178614, DOI: 10.1371/journal.pone.0113294, the whole document

WO-A1-2014006226

(57) Изобретение относится к композициям и способам для профилактики и лечения инфекции Borrelia. В частности, изобретение относится к полипептиду, содержащему гибридный С-концевой фрагмент внешнего поверхностного белка А (OspA), нуклеиновой кислоте, кодирующей его, антителу, специфически связывающему его, фармацевтической композиции (в частности, для применения в качестве лекарственного средства или в способе лечения или профилактики инфекции Borrelia), содержащей полипептид, и/или нуклеиновую кислоту, и/или антитело, к способу лечения или профилактики инфекции Borrelia, а также к способу иммунизации субъекта.

B1**034554****034554****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для профилактики и лечения инфекции *Borrelia*. В частности, настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему гибридный С-концевой фрагмент внешнего поверхностного белка А (*OspA*), нуклеиновой кислоте, кодирующей его, антителу, специфически связывающему его, фармацевтической композиции (в частности, для применения в качестве лекарственного средства или в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*), содержащей полипептид, и/или нуклеиновую кислоту, и/или антитело, к способу лечения или профилактики инфекции *Borrelia*, а также к способу иммунизации субъекта.

Уровень техники

Боррелиоз Лайма, или болезнь Лайма, представляет собой наиболее распространенное переносимое клещами заболевание в Европе и Северной Америке. Данное заболевание вызвано инфицированием распространяемой членистоногими, похожей на грамотрицательную спирохетой, *Borrelia burgdorferi* в широком смысле (*B. burgdorferi* s.l.), и может поражать несколько органов или тканей, приводя к поражениям кожи, нарушению сердечной деятельности, мышечно-скелетным и неврологическим нарушениям. В большинстве стран боррелиоз Лайма не является заболеванием, которое подлежит регистрации; в силу этих обстоятельств точные данные относительно ежегодного количества случаев отсутствуют. В Соединенных Штатах возбудителем заболевания является *B. burgdorferi* в узком смысле (*B. burgdorferi* s.s.), и болезнь Лайма локализована в северо-восточных, среднеатлантических и верхних северо-центральных штатах. В 2010 году в целом около 30000 случаев боррелиоза Лайма было зарегистрировано в США Центрами по контролю и профилактике заболеваний (CDC). Обновленный доклад CDC в 2013 году, который учитывает диагностические данные из других источников, оценивает, что фактическое число новых случаев в год в Соединенных Штатах ближе к 300000 (<http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0819-lyme-disease.html>). В Европе основными возбудителями боррелиоза Лайма являются *B. afzelii* и *B. garinii*, а также *B. burgdorferi* s.s. и *B. bavariensis*, которые оказывают меньшее влияние, в зависимости от географического расположения. Распространенность боррелиоза Лайма в значительной мере варьирует в разных европейских странах и в целом увеличивается с запада к востоку. В большей части Европы число зарегистрированных случаев боррелиоза Лайма выросло с начала 1990-х гг. (например, в Чешской Республике, Эстонии, Литве; см. боррелиоз Лайма в Европе, отчет ВОЗ 2006 года), и географическое распространение случаев также расширилось.

Borrelia относится к семейству Spirochaetaceae, которое подразделяется на важные с медицинской точки зрения виды *Treponema*, *Leptospira* и *Borrelia*. *B. burgdorferi* s.l. представляет собой спиралевидную, очень подвижную грамотрицательную бактерию, составляющую около 10-20 мкм в длину и 0,2-0,5 мкм в ширину, которая растет в микроаэрофильных условиях. Стенка клетки спирохеты состоит из цитоплазматической мембраны, окруженной пептидогликаном и несколькими жгутиками, а затем слабо присоединенной внешней мембраной.

Боррелиоз Лайма, как правило, протекает в несколько стадий, которые характеризуются различными клиническими проявлениями, с эпизодами ремиссии и обострения. Стадия 1, ранняя инфекция, заключается в локализованной инфекции кожи, за которой через несколько дней или недель следует стадия 2, диссеминированная инфекция, и через месяцы или годы - стадия 3, хроническая инфекция. Тем не менее, инфекция является вариабельной; у некоторых пациентов присутствуют только локализованные инфекции кожи, тогда как у других болезнь проявляется только на более поздних стадиях, например, в виде артрита. Различные клинические синдромы боррелиоза Лайма также вызваны инфицированием разными видами *B. burgdorferi* s.l. *B. burgdorferi* s.s. чаще вызывает проявления болезни в суставах (артрит) и сердечные заболевания, *B. afzelii* вызывает преимущественно кожные симптомы (мигрирующую эритему; МЭ и атрофический хронический акродерматит; АХА), тогда как *B. garinii* влечет за собой большинство случаев нейроборрелиоза.

Локализованная инфекция: Наиболее распространенным симптомом стадии 1 инфекции является мигрирующая эритема, которая возникает у 70-80% инфицированных людей. За таким повреждением кожи часто следуют гриппоподобные симптомы, такие как миалгия, артралгия, головная боль и лихорадка. Эти неспецифические симптомы возникают у 50% больных с мигрирующей эритемой.

Диссеминированная инфекция: В ходе стадии 2 бактерии перемещаются в кровоток от места инфекции к периферическим тканям и органам. Неврологические, сердечно-сосудистые и артритные симптомы, которые возникают на данной стадии, включают менингит, нейропатию черепных нервов и перемежающийся воспалительный артрит.

Хроническая инфекция: Стадия 3 инфекции является хронической и длится от нескольких месяцев до нескольких лет после укуса клеща. Наиболее распространенным симптомом в Северной Америке является ревматоидный артрит, вызванный инфицированием *B. burgdorferi* s.s. Хроническое инфицирование центральной нервной системы *B. garinii* вызывает более тяжелые неврологические симптомы в ходе стадии 3, а хроническое инфицирование кожи *B. afzelii* приводит к атрофическому хроническому акродерматиту.

В некоторых группах риска, таких как фермеры, работники лесного хозяйства, пешие туристы, бегуны или курортники, доминирование серотипа и распространенность заболевания возрастают, так же

как и у детей в возрасте до 15 лет и взрослых в возрасте от 39 до 59 лет, независимо от пола. Такое увеличение частоты случаев боррелиоза Лайма связано с изменением лесной среды обитания, а также с общественными факторами. Экологические изменения, такие как фрагментация леса, привели к резкому сокращению охотящихся на грызунов хищников, таких как лисы и хищные птицы, что, в свою очередь, привело к росту популяции мышей, с последующим ростом популяции клещей. В последнее время неравномерное возобновление лесонасаждений увеличило количество оленей и, следовательно, количество клещей. Рост пригородов и все более широкое использование лесных угодий для отдыха, такого как кемпинг и пеший туризм, привели к тому, что люди более тесно соприкасаются с большим количеством клещей-переносчиков *Borrelia*. Все эти факторы, вместе взятые, способствовали более широкому распространению *Borrelia* и большей частоте случаев боррелиоза Лайма.

Противомикробные вещества являются основным способом лечения инфекции *Borrelia*. Используемый антибиотик зависит от стадии заболевания, симптомов и аллергии больного на лекарственные препараты. Длительность курса приема антибиотиков также зависит от стадии заболевания и выраженности симптомов. Раннюю стадию боррелиоза Лайма, как правило, лечат перорально тетрациклинами, такими как доксициклин, и полусинтетическими пенициллинами, такими как амоксициллин или пенициллин V. Артритные и неврологические нарушения лечат внутривенно большими дозами пенициллина G или цефтриаксона. До 30% больных боррелиозом Лайма не обнаруживают ранних характерных симптомов инфицирования *Borrelia*, что делает диагностику и лечение проблематичными. Курс приема антибиотиков может быть длительным (до нескольких месяцев) и иногда неэффективным, и поэтому этот вопрос обсуждается в сфере лечения *Borrelia*, в частности, на более поздних стадиях заболевания. Даже в случае эффективного лечения *Borrelia* у пациентов годами могут оставаться изнуряющая усталость, боль или неврологические симптомы, которые называют постлечебным синдромом болезни Лайма. В целом, применение антибиотиков может иметь нежелательные последствия, такие как развитие устойчивости у микроорганизмов-мишеней. В конце концов, антибиотикотерапия может эффективно лечить боррелиоз Лайма, но не обеспечивает защиту от последующих инфекций.

Моновалентная вакцина на базе серотипа 1-OspA (LYMErix™) была одобрена и присутствовала на рынке США для профилактики болезни Лайма, вызванной *Borrelia burgdorferi* s.s., но вакцина больше недоступна. Кроме того, гетерогенность последовательностей OspA для разных серотипов в Европе и в других регионах препятствует эффективной защите вакциной, которая основана на OspA только из одного серотипа.

Химерные молекулы OspA, содержащие проксимальный участок из одного серотипа OspA, вместе с дистальным участком из другого серотипа OspA, с сохранением антигенных свойств обоих родительских полипептидов, можно использовать в профилактике и лечении болезни или боррелиоза Лайма (WO 2011/143617, WO 2011/143623).

В данный момент на рынке отсутствуют профилактические лекарственные средства от боррелиоза Лайма, и, таким образом, в данной области техники существует потребность в разработке такого лекарственного средства, которое может обеспечивать эффективную защиту от *Borrelia*, присутствующих в США, Европе и других регионах, в частности в разработке лекарственного средства, которое может обеспечивать эффективную защиту от нескольких серотипов *Borrelia* одновременно. Содержащий серотип 3 OspA гетеродимер, Lip-S4D1-S3hybD1, по настоящему изобретению улучшает ранее раскрытый авторами изобретения гетеродимер, Lip-S4D1-S3D1 (см. WO 2014/006226) в плане как простоты производства, так и стимуляции специфических антител, при измерении посредством поверхностного связывания антитела со спирохетами *Borrelia* серотипа 3. Кроме того, более специфичное качество иммунного ответа на новый гетеродимер свидетельствует о том, что активность также улучшилась по сравнению с ранее раскрытым гетеродимером.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему гибридный фрагмент внешнего поверхностного белка A (OspA) *Borrelia*, нуклеиновой кислоте, кодирующей его, вектору, который содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты, и клетке-хозяину, содержащей такой вектор. Кроме того, данное изобретение относится к способу получения такого полипептида и к способу получения клетки, которая экспрессирует такой полипептид. Кроме того, данное изобретение относится к антителам, специфически связывающимся с таким полипептидом, клетке гибридомы, которая продуцирует такие антитела, способам получения таких антител, фармацевтической композиции, содержащей такой полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, вектору или антителу, применению такого полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или антитела для получения лекарственного средства или фармацевтической композиции (в частности, для применения в качестве вакцины или в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*), способам диагностики инфекции и способам лечения или профилактики инфекции *Borrelia*, а также способам иммунизации субъекта. В частности, данное изобретение относится к улучшенному полипептиду для иммунизации против *Borrelia* серотипа 3 в том аспекте, что данный полипептид является более подходящим для очистки и индуцирует более специфичный иммунный ответ на *Borrelia* по оценке посредством поверхностного связывания с *Borrelia* по сравнению с содержащим серотип 3 OspA конструктором, раскрытым авторами изобретения в предыдущей заявке WO 2014/006226.

Усилия по разработке субъединичной вакцины для профилактики боррелиоза Лайма были сконцентрированы в большой мере на применении внешнего поверхностного белка A (OspA) *Borrelia* в качестве антигена. *Borrelia* экспрессирует белок OspA только тогда, когда она находится в кишечнике клеща-переносчика. Таким образом, антитела к OspA, продуцируемые вакцинацией, не противостоят инфекции в организме, а, скорее, входят в кишечник клеща, когда он всасывает кровь. Там антитела нейтрализуют спирохеты и блокируют миграцию бактерий из средней кишки в слюнные железы клеща по маршруту, по которому *Borrelia* проникает в организм позвоночного хозяина. Таким образом, специфичные к OspA антитела предотвращают передачу *Borrelia* от клеща-переносчика к хозяину-человеку.

Липидизированная форма OspA из *B. burgdorferi* s.s., штамм ZS7, вместе с гидроксидом алюминия была коммерчески разработана в качестве вакцины против *Borrelia* (LYMErix™) компанией SmithKline Beecham, сейчас GlaxoSmithKline (GSK), для рынка США. Три дозы LYMErix™ на протяжении одного года были нужны для оптимальной защиты. После введения первых двух доз эффективность вакцины против боррелиоза Лайма составляла 49%, а после введения третьей дозы - 76%. Тем не менее, вскоре после выведения LYMErix™ на рынок она была отозвана с рынка в 2002 году. Приведенные причины заключались в проблемах практического применения вакцины, например необходимости бустерных инъекций ежегодно или через год, а также относительно высокой стоимости данного профилактического подхода по сравнению с лечением антибиотиками ранней стадии инфекции. Помимо этого, существовала озабоченность тем, что LYMErix™ могла спровоцировать аутоиммунные реакции в подгруппе популяции в результате гомологии последовательности с человеческим белком, хотя это не было доказано. Помимо этого, данная вакцина не обеспечивала перекрестной защиты от других клинически важных видов *Borrelia*.

Соответственно, в одном варианте реализации изобретения задачей настоящего изобретения было предложить улучшенную вакцину, например, для профилактики боррелиоза Лайма. Предпочтительно, чтобы вакцина была простой в плане производства, чтобы она при этом обеспечивала защиту, безопасность и более высокую эффективность в сравнении с существующими методами лечения и/или обеспечивала защиту более чем от одного вида *Borrelia*. Кроме того, в данной области техники хорошо известно, что разные пациенты по-разному реагируют на разные вакцинные композиции. Следовательно, в любом случае было бы явным преимуществом иметь альтернативные вакцины, доступные в качестве дополнительных вариантов для вакцинации против *Borrelia*.

Проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, решается с помощью полипептида, содержащего гибридный С-концевой фрагмент OspA, при этом данный гибридный фрагмент состоит из С-концевого домена белка OspA *Borrelia*, который состоит из фрагмента, полученного из белка OspA штамма *Borrelia*, отличного от *B. garinii*, штамм PBr, и второго фрагмента OspA из *B. garinii*, штамм PBr, и отличается от соответствующей последовательности дикого типа, по меньшей мере, введением по меньшей мере одной дисульфидной связи.

Неожиданно было обнаружено, что введение указанного гибридного С-концевого фрагмента OspA, содержащего последовательность из *B. valaisiana*, штамм VS116, слитую с последовательностью из серотипа 3 OspA (*B. garinii*, штамм PBr), с введенной дисульфидной связью, привело к получению гетеродимерного белка (Lip-S4D1-S3hybD1), который было легче очищать, и стимулировал более специфический иммунный ответ на серотип 3 OspA, чем гетеродимер Lip-S4D1-S3D1 из предыдущего изобретения авторов (WO 2014/006226). Как показано в примерах, гибридный С-концевой фрагмент OspA серотипа 3 по настоящему изобретению имеет предсказанный электростатический потенциальный изоконтур, который больше схож с другими фрагментами OspA из других серотипов, чем фрагмент OspA серотипа 3. Кроме того, гетеродимер (Lip-S4D1-S3hybD1), содержащий гибридный С-концевой фрагмент OspA серотипа 3, было легче очищать, что требовало меньше стадий для получения более высокого выхода, в сравнении с гетеродимером Lip-S4D1-S3D1 по предыдущему изобретению. Кроме того, несмотря на то, что наблюдаемые титры антител были сходными, антитела стимулировали улучшенной комбинированной вакциной на основе гетеродимера, более специфически связанной с экспрессирующим *Borrelia* серотипом 3 OspA, по сравнению с вакциной на основе гетеродимера по предыдущему изобретению. В конце концов, защитная способность *in vivo* у улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера была высокой в отношении четырех испытываемых серотипов *Borrelia*.

Подробное описание сущности изобретения

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему гибридный С-концевой фрагмент внешнего поверхностного белка А (OspA), при этом указанный гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит из слияния С-концевого домена двух различных OspA из штаммов *Borrelia* и отличается от соответствующего фрагмента дикого типа, по меньшей мере, введением по меньшей мере одной дисульфидной связи, например цистиновой. В частности, гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит из слияния аминокислот из белков OspA из штамма, отличного от *B. garinii*, штамм PBr, например, *B. valaisiana*, штамм VS116, или *B. spielmanii*; с аминокислотами из белка OspA *B. garinii*, штамм PBr, с введением по меньшей мере одной дисульфидной связи (цистиновой). В частности, полипептид содержит гибридный С-концевой фрагмент OspA (внешнего поверхностного белка А *Borrelia*), при этом гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит, из N- в С-концевом направлении из i) первого участка OspA, состоящего из аминокислот 125-176 или аминокислот 126-175 OspA из штамма *Borrelia*, отличного от соответствующего фрагмента *B. garinii*, штамм PBr, с SEQ ID NO: 8; и ii) второго участка OspA, состоящего из аминокислот 177-274 или аминокислот 176-274 (но наиболее предпочтительно аминокислот 177-274) OspA из *B. garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 8), при этом второй участок OspA является мутантным и цистин-стабилизированным в том аспекте, что он отличается от соответствующей последовательности дикого типа, по меньшей мере, заменой аминокислоты дикого типа в положении 182 SEQ ID NO: 8 цистеином и заменой аминокислоты дикого типа в положении 269 SEQ ID NO: 8 цистеином, и при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного второго фрагмента OspA; и при этом нумерация аминокислот и замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5).

В альтернативном варианте полипептид содержит гибридный С-концевой фрагмент OspA, при этом гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит, из N- в С-концевом направлении, из:

i) первого фрагмента OspA (также называемого первым участком OspA), состоящего из аминокислот 125-176 или аминокислот 126-175 OspA из штамма *Borrelia*, отличного от соответствующего фрагмента *B. garinii*, штамм PBr, с SEQ ID NO: 8; и

ii) второго фрагмента OspA (также называемого вторым участком OspA), состоящего из аминокислот 177-274 OspA из *B. garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 8), при этом второй фрагмент OspA отличается от соответствующей последовательности дикого типа заменой аминокислоты дикого типа в положении 182 SEQ ID NO: 8 цистеином и заменой аминокислоты дикого типа в положении 269 SEQ ID NO: 8, и при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного второго фрагмента OspA; и

при этом нумерация замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5).

Было установлено, что полипептид по данному изобретению может быть получен легко и эффективно (см. Пример 2). Его получение привело к увеличению выхода по сравнению с известными продуктами (см. Пример 2). Иммунизация полипептидом по данному изобретению вызвала более высокие уровни антител, специфичных к белку OspA в своей нативной форме, и, таким образом, представляет собой улучшенную вакцину (см. Пример 3). Кроме того, она обеспечила защиту от заражения *Borrelia* in vivo (см. Пример 4).

Borrelia представляет собой род бактерии типа спирохет. Она вызывает боррелиоз, зоонозное, трансмиссивное заболевание, переносимое главным образом клещами и иногда вшами, в зависимости от вида. В настоящее время существует 36 известных видов *Borrelia*. Известно, что 13 из 36 известных видов *Borrelia* вызывают болезнь или боррелиоз Лайма и переносятся клещами. Основными видами *Borrelia*, вызывающими болезнь Лайма, являются *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. Термин "*B. burgdorferi* s.l." охватывает по меньшей мере 13 видов *Borrelia* (табл. А-1). Эти виды встречаются в разных географических регионах и живут в природе в энзоотических циклах, которые включают комплекс клещей *Ixodes ricinus* (также называемый комплексом *Ixodes persulcatus*) и широкий диапазон животных-хозяев. Четыре вида *Borrelia* отвечают за большинство инфекций у человека: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii*. Три других вида, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* и *B. spielmanii*, были случайно обнаружены у человека, но их роль в развитии боррелиоза Лайма на данное время не определена. Новые виды *Borrelia* все еще регистрируются.

Таблица А-1

Патогенные виды (4)	Основной клещ-переносчик	Распространение
<i>Borrelia burgdorferi</i> (<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.)	<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes pacificus</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Северо-восточные/северо-центральные штаты США Западные штаты США Европа Азия
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Европа Азия
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Европа Азия
<i>Borrelia bavariensis</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Европа Азия
Минимально патогенные или непатогенные виды (9)	Основной клещ-переносчик	Распространение
<i>Borrelia andersonii</i>	<i>Ixodes dentatus</i>	Восточные штаты США
<i>Borrelia bissettii</i>	<i>Ixodes spinipalpis</i> <i>Ixodes pacificus</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Западные штаты США Европа
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes columnae</i>	Европа и Азия
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Европа
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Европа
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	Япония
<i>Borrelia tanukii</i>	<i>Ixodes tanuki</i>	Япония
<i>Borrelia turdi</i>	<i>Ixodes turdus</i>	Япония
<i>Borrelia sinica</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Китай

Как подробно описано выше, внешний поверхностный белок А (OspA) *Borrelia* представляет собой распространенный иммуногенный липопротеин *Borrelia*, который представляет особенный интерес из-за его потенциала в качестве кандидата на создание вакцины. OspA *B. burgdorferi* s.l. представляет собой основной липопротеин с молекулярной массой, составляющей около 30 кДа, и кодируется на линейной плазмиде. Важным аспектом белка OspA является его N-концевая липидизация; т.е. жирные кислоты с длиной цепи, составляющей от C₁₄ до C₁₉, с двойными связями или без них, присоединены к N-концевому остатку цистеина, особенность, которая увеличивает иммуногенность белка OspA. Было продемонстрировано, что слабо иммуногенные синтетические пептиды индуцируют более выраженные гуморальные иммунные ответы, если они липидизированы; например, если они ковалентно соединены с Pam₃Cys (Bessler and Jung, Research Immunology (1992) 143:548-552), жирнокислотным замещением, обнаруженным на аминоконце многочисленных бактериальных липопротеинов, которые синтезированы с сигнальной последовательностью, обуславливающей присоединение липида. Кроме того, было показано, что фрагмент Pam₃Cys усиливает иммунные ответы на OspA у мышей, частично в результате его взаимодействия с TLR-2/1 (Yoder, et al. (2003), Infection and Immunity, 71:3894-3900). Таким образом, ожидается, что липидизация C-концевого фрагмента OspA увеличит иммуногенность и защитную способность фрагмента.

Анализ штаммов *B. burgdorferi* s.l., полученных в Северной Америке и Европе, выявил, что OspA свойственна антигенная вариабельность и что несколько четких групп могут быть определены на основании серологических характеристик. Сообщалось о mAb к OspA, которые связываются со специфическими N- и C-концевыми антигенными детерминантами. Для идентификации иммунологически важных гипервариабельных доменов в OspA применяли рентгеноструктурную кристаллографию и ЯМР-анализ и картировали эпитоп LA-2 до C-концевых аминокислот 203-257 (Ding et al., Mol. Biol. 302:1153-64, 2000). Предыдущие исследования показали, что получение антител в отношении C-концевого эпитопа LA-2

коррелирует с защитным иммунитетом после вакцинации с применением OspA (Van Hoescke et al. Vaccine (1996) 14(17-18): 1620-6 и Steere et al., N. Engl. J. Med. (1998), 339:209-215). Антитела к LA-2 продемонстрировали блокировку передачи *Borrelia* от клеща к хозяину (Golde et al., Infect. Immun. (1997), 65(3):882-889). Эти исследования показали, что С-концевой участка белка OspA может быть достаточно для индукции защитного иммунитета. Следует отметить, что последовательность С-концевого участка OspA является менее высококонсервативной среди серотипов *Borrelia*, чем последовательность N-концевого участка (см. фиг. 1).

На основании информации, полученной из исследований, приведенных выше, в предыдущем изобретении (WO 2014/006226) наряду с другими применяли укороченные формы OspA, содержащие С-концевой участок (также называемый в данном документе как "фрагмент OspA" или "мономер"). Оказалось, что укороченные формы OspA обладают меньшими защитными свойствами, чем полноразмерный белок OspA. Тем не менее, в ходе предыдущего изобретения неожиданно было выявлено, что введение дисульфидной связи в укороченную форму (также называемую в данном документе как "мутантный фрагмент OspA", "цистин-стабилизированный фрагмент OspA", или "мутантный фрагмент", или "цистин-стабилизированный фрагмент") позволяет преодолеть указанный недостаток. Не ограничиваясь конкретным механизмом, считается, что улучшенная защита является следствием повышения стабильности фрагмента OspA, как показано в анализах с измерением термической стабильности.

В соответствии с предыдущим изобретением мутантный фрагмент OspA (также называемый в данном изобретении как второй фрагмент OspA) может быть получен из любых видов *Borrelia*; тем не менее, ввиду их распространенности в области медицины, в частности медицины человека, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii* являются предпочтительными. В соответствии с настоящим изобретением первый участок OspA получают из любого штамма *Borrelia*, за исключением *B. garinii*, штамм PBr, а второй участок получают из *B. garinii*, штамм PBr. Таким образом, гибридный фрагмент OspA получают из слияния аминокислот из OspA *B. garinii*, штамм PBr, с аминокислотами из OspA из любого вида *Borrelia*, за исключением *B. garinii*, штамм PBr (и, следовательно, аминокислотной последовательности, отличной от последовательности аминокислот из OspA из *B. garinii*, штамм PBr), в частности, из *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* и *B. bavariensis*, особенно *B. valaisiana*, штамм VS116. Первый участок OspA состоит из аминокислот 125-176 или аминокислот 126-175 OspA из штамма *Borrelia*, отличного от соответствующего фрагмента *B. garinii*, штамм PBr, с SEQ ID NO: 8, а второй участок OspA состоит из аминокислот 176-274 или наиболее предпочтительно аминокислот 177-274 OspA из *B. garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 8), при этом второй участок OspA является мутантным и цистин-стабилизированным в том аспекте, что он отличается от соответствующей последовательности дикого типа, по меньшей мере, заменой аминокислоты дикого типа в положении 182 SEQ ID NO: 8 цистеином и заменой аминокислоты дикого типа в положении 269 SEQ ID NO: 8 цистеином, и при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного второго фрагмента OspA; и при этом нумерация аминокислот и замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5). Тем не менее, дополнительные мутации по отношению к участкам дикого типа могут присутствовать в первом и втором участках по данному изобретению (см. также ниже). В предпочтительном варианте реализации изобретения указанные выше замены цистеином в положениях 182 и 269 являются единственными мутациями по отношению к дикому типу. В альтернативном варианте цистин-стабилизированные аминокислоты 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr, отличаются от них заменой остатка треонина в аминокислоте 233 OspA дикого типа *Borrelia garinii*, штамм PBr, только остатком пролина.

Предпочтительные примеры полипептидов включают

гибридный С-концевой фрагмент OspA, состоящий из аминокислот 125-176 из *B. valaisiana*, штамм VS116, и цистин-стабилизированных аминокислот 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 1); или

гибридный С-концевой фрагмент OspA, состоящий из аминокислот 126-175 из *B. spielmanii* и цистин-стабилизированных аминокислот 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 51).

Таким образом, в предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В альтернативном варианте полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

В одном варианте реализации изобретения второй участок OspA является идентичным относительно цистин-стабилизированных аминокислот 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr, но отличается от них заменой остатка треонина в аминокислоте 233 OspA дикого типа *Borrelia garinii*, штамм PBr, остатком пролина (SEQ ID NO: 7).

Четыре вида *Borrelia*: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii* могут быть дополнительно классифицированы в соответствии с их серотипами OspA, которые были определены посредством анализа с моноклональными антителами, специфичными к соответствующему белку OspA. Серотипы 1-7, ответственные за большинство инфекций *Borrelia* у человека, вместе с их уровнями распространенности, приведены в табл. А-2.

Обозначение серотипа и распространенность *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii*. Серотип *Borrelia*, выделенных из спинномозговой жидкости, или кожи человека, или из клещей-переносчиков, определяли посредством зондирования цельноклеточных лизатов моноклональными антителами мыши, каждое из которых являлось специфичным к конкретному эпитопу OspA (как описано в публикации Wilske et al., J. of Clin Microbiol (1993) 31(2):340-350 и представлено Baxter Bioscience в "Climate change effect on ticks and tick-borne diseases", Brussels, 6 Feb 2009).

Таблица А-2

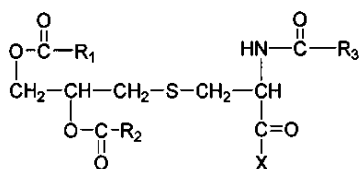
<i>Bud Borrelia</i>	Серотип OspA, определенный тестированием mAb	Распространенность при заболевании человека	Источник штамма для последовательности	SEQ ID NO:
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	11 %	B31	5
<i>B. afzelii</i>	2	63 %	K78	6
<i>B. garinii</i>	3	1,5 %	PBr	7,8
<i>B. bavariensis</i>	4	4 %	PBi	9
<i>B. garinii</i>	5	6 %	PHei	10
<i>B. garinii</i>	6	13 %	DK29	11
<i>B. garinii</i>	7	0,5 %	T25	12

Структура белка OspA из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31, была определена Li et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1997), 94:3584-3589). Она состоит из N-концевого (α -цепи 1-4) и центрального β -листов (α -цепи 5-14n [N-концевая часть]), листа цилиндрической части 1 (α -цепи от 14с [C-концевая часть] до 16), листа цилиндрической части 2 (α -цепи 17-21) и C-концевой α -спирали. Термин "C-концевой фрагмент OspA" или "C-концевой домен OspA", или "C-концевой домен", "фрагмент дикого типа", или "C-концевой участок" в отношении OspA, при использовании по тексту данного описания, должен обозначать C-концевую аминокислотную последовательность OspA, т.е. OspA, в котором отсутствует, по меньшей мере, N-концевой β -лист (в том числе α -цепи 1-4). В OspA из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31, N-концевой лист состоит из аминокислот 17-70 (после посттрансляционного отщепления сигнального пептида липидизации длиной в 16 аминокислот (ак)).

C-концевой фрагмент OspA по данному изобретению может также содержать сигнальную последовательность липидизации на N-конце, например сигнальную последовательность липидизации в виде аминокислот 1-16 OspA (SEQ ID NO: 13) или OspB (SEQ ID NO: 14) из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31, сигнальную последовательность липидизации из *E. coli*, называемую в данном документе как "сигнал липидизации lpp" (SEQ ID NO: 15), или любую другую сигнальную последовательность, например, как определено ниже.

Липидизация белка с N-концевой сигнальной последовательностью липидизации, такой как присутствующая на возникающем полипептиде OspA, происходит в векторе экспрессии *E. coli* под постадийным воздействием ферментов диацилглицеринтрансферазы, сигнальной пептидазы II и трансацилазы соответственно. Первая стадия представляет собой перенос диацилглицерида в сульфидрильную группу цистеина немодифицированного пролипопротеина с последующим отщеплением сигнального пептида сигнальной пептидазой II и в конце - ацилированием α -аминогруппы N-концевого цистеина аполипопротеина. Результатом является размещение одного липида и глицериновой группы с двумя дополнительными липидами, прикрепленными на N-концевом остатке цистеина полипептида. Сигнальная последовательность липидизации, которая отщепляется в ходе липидизации, отсутствует в конечной полипептидной последовательности.

Полипептиды представляют собой биологические молекулы цепей мономеров аминокислот, соединенных пептидными (амидными) связями. Ковалентные химические связи образуются, когда карбоксильная группа одной аминокислоты вступает в реакцию с другой аминогруппой. Полипептиды по настоящему изобретению представляют собой непрерывные и неразветвленные цепи аминокислот. Полипептид по настоящему изобретению содержит цистиновую связь. В соответствии с настоящим изобретением мутантный фрагмент OspA может представлять собой липидизированный белок, также называемый липопротеином, при этом липидные фрагменты вместе с группой глицерина также обозначены как "Lip". В соответствии с данным изобретением Lip содержит от одного до трех липидов, таких как C₁₄₋₂₀алкил и/или C₁₄₋₂₀алкенил, присоединенных к глицерину, и аминогруппу N-концевого цистеина полипептида по данному изобретению, или предпочтительно при этом Lip представляет собой фрагмент в соответствии с формулой (I)



Формула (I),

где один из R_1 , R_2 или R_3 представляет собой C_{14-20} алкил или алкенил и каждый из других независимо представляет собой C_{14-20} алкил или C_{14-20} алкенил;

X представляет собой аминокислотную последовательность, присоединенную к остатку цистеина, проиллюстрированному в формуле (I).

Более предпочтительно Lip плюс N-концевой цистеин полипептида представляет собой N-пальмитоил-S-(2RS)-2,3-бис-(пальмитоилокси) пропил цистеин (называемый в данном документе как "Pam₃Cys") и соединенный через карбонильный углерод цистеина с указанной аминокислотной последовательностью по данному изобретению. В указанной формуле (I) R_1 , R_2 и R_3 могут быть пальмитоильными фрагментами, а X - аминокислотной последовательностью, присоединенной к остатку цистеина.

В соответствии с данным изобретением в С-концевом домене OspA может отсутствовать, по меньшей мере, N-концевой домен, гомологичный относительно аминокислот 17-70 OspA из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31. Дополнительно, в С-концевом домене OspA по настоящему изобретению могут также отсутствовать дополнительные участки центрального листа, как определено Li с сотрудниками (Li et al., см. выше), в частности дополнительные цепи, такие как аминокислотные участки из аминокислоты 17-82, 93, 105, 118 или 119, предпочтительно 17-129, более предпочтительно 1-124, 1-125, 1-129 или 1-130 любой *Borrelia*, в частности *B. burgdorferi* s.s., штамм B31, или гомологичные участки белка OspA из вида *Borrelia*, отличного от *B. burgdorferi* s.s., штамм B31.

В контексте настоящего изобретения С-концевой домен OspA также называется "OspA фрагмент" или "фрагмент OspA".

Термин "мутантный С-концевой фрагмент OspA", или "мутантный фрагмент", или "мутантный фрагмент OspA" в контексте полипептида по настоящему изобретению и при использовании по тексту данного описания должен обозначать С-концевой фрагмент OspA, как определено выше и в данном документе, который отличается, по меньшей мере, от фрагмента дикого типа по меньшей мере двумя введенными остатками цистеина, которые могут образовывать дисульфидную связь, т.е. цистиновую. Без связи с указанной теорией предполагают, что дисульфидная связь стабилизирует фрагмент в конформации, что способствует индукции связывания антитела. Фолдинг С-концевого фрагмента дикого типа OspA демонстрирует уменьшение термостабильности в сравнении с полноразмерным белком (Koide et al., Structure-based Design of a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA, J. Mol. Biol. (2005) 350:290-299). По настоящему изобретению последовательность С-концевого домена *B. burgdorferi* s.s., штамм B31, OspA была проанализирована *in silico* с целью определения положений для введенных дисульфидных мостиков, которые могут увеличивать стабильность фолдинга данного С-концевого домена. Результаты анализа были перенесены в гомологичные фрагменты OspA других видов *Borrelia* с предположением, что фолдинг является консервативным для других видов.

Термин "гибридный С-концевой фрагмент OspA", или "гибридный фрагмент", или "гибридный фрагмент OspA" в контексте полипептида по настоящему изобретению и при использовании по тексту данного описания должен обозначать С-концевой фрагмент OspA, как определено выше и в данном документе, который отличается от фрагмента дикого типа в том аспекте, что:

а) гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит из слияния аминокислот из первого белка OspA из штамма, отличного от *B. garinii*, штамм PBr, например *B. valaisiana*, штамм VS116, или *B. spielmanii* (называемый первым участком OspA); с аминокислотами из второго белка OspA *B. garinii*, штамм PBr, с введением по меньшей мере одной дисульфидной связи (цистиновой) (называемый вторым участком OspA) и необязательно одной или более дополнительными мутациями; и

б) по меньшей мере два введенных остатка цистеина в гибридном С-концевом фрагменте OspA образуют дисульфидную связь, т.е. цистиновую, и при этом указанные введенные остатки цистеина вводят, как описано в данном документе и в соответствии с принципом WO 2014/006226; и

при этом гибридный С-концевой фрагмент OspA приводит к естественно свернутому фрагменту, как измерено, например, посредством эффективности связывания антител в результате вакцинации этим гибридным С-концевым фрагментом OspA, например, у мышей с антигеном серотипа 3 *Borrelia*, например, посредством тестирования связывания указанных антител (полученных после трех иммунизации) с поверхностью серотипа 3 *Borrelia* с помощью проточной цитометрии, например, как описано в примерах.

Как правило, дисульфидная связь может быть введена посредством введения одного или более, предпочтительно двух, остатков цистеина, при этом дисульфидная связь (мостик S-S) образуется между тиольными группами двух остатков цистеина, образуя аминокислотный цистин. Только один остаток

цистеина должен быть введен, если дисульфидная связь образуется с остатком цистеина, присутствующим во фрагменте OspA дикого типа. Два остатка цистеина вводят посредством аминокислотной замены. Замены представляют собой а) замены цистеином в положении 182 аминокислоты соответствующей аминокислотной последовательности OspA дикого типа и б) цистеином в положении 269 аминокислоты соответствующей аминокислотной последовательности OspA дикого типа, и при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного фрагмента OspA, образуя, таким образом, цистин. Нумерация замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5).

Мутантный или гибридный фрагмент OspA может также содержать дополнительные мутации по сравнению с диким типом. Как подробно описано выше, структура и поверхностный домен OspA известны в данной области техники. Соответственно, мутантный фрагмент может содержать дополнительные мутации, в частности, в местах, которые находятся не на поверхности белка и/или не вовлечены в иммунный ответ и, следовательно, не влияют на антигенный потенциал. Они могут включать одну или более делеций аминокислот, в частности небольшие (например, до 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислот) делеции, одну или более вставок аминокислот (в частности, C- или N-концевых), одну или более замен аминокислот, в частности одну или более консервативных замен аминокислот. Предпочтительно количество дополнительных мутаций в первом и втором участках относительно соответствующего дикого типа составляет не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, более предпочтительно 3 или 2, в особенности 1. Более предпочтительно дополнительная мутация(и) находится(ются) только во втором участке OspA. Предпочтительными мутациями являются замены, в особенности консервативные замены. Примеры консервативных замен аминокислот включают, без ограничения ими, замены, которые перечислены ниже:

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

Предпочтительные мутации включают изменения в выбранных участках фрагмента, например, где последовательность со сходством последовательности относительно функционально-ассоциированного антигена лимфоцитов человека (hLFA-1), который находится в *B. burgdorferi* s.s., является модифицированной, например заменена гомологичной последовательностью из белка OspA из другого вида *Borrelia*. Обоснованием данной модификации является уменьшение риска индукции иммунологической перекрестной реакции с белками человека. Другой предпочтительной мутацией является замена пролина треонином в положении 233 в полипептидной последовательности OspA из *B. garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 8). Возможно также добавление сигнальной последовательности для липидизации в конечный или промежуточный фрагмент или добавление маркерного белка (например, с целью идентификации или очистки).

В некоторых вариантах реализации изобретения мутантный или гибридный фрагмент OspA имеет аминокислотную последовательность, которая обладает 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности относительно фрагмента дикого типа. В другом варианте реализации изобретения последовательность отличается не более чем на 10, не более чем на 9, не более чем на 8, не более чем на 7, не более чем на 6, 5, 4, 3, 2, наиболее предпочтительно не более чем на 1% за счет вставки, делеции или замены в последовательности.

Идентичность, как известно в данной области техники и как применяется в данном документе, представляет собой соотношение между двумя или более полипептидными последовательностями, которое определяется посредством сравнения последовательностей. В данной области техники идентичность также означает степень родства между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, при соответствующих обстоятельствах, что определяется совпадением между лентами таких последовательностей. Идентичность может быть с легкостью вычислена. Хотя существует целый ряд способов измерения идентичности двух полинуклеотидов или двух полипептидных последовательностей, данный термин хорошо известен специалистам в данной области техники (например, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987). Предпочтительные способы определения идентичности разработаны с целью обеспечения наилучшего совпадения между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности кодируются в компьютерных программах. Предпочти-

тельные способы определения идентичности между двумя последовательностями с помощью компьютерной программы включают, без ограничения ими, пакет программ GCG (Devereux, J. et al., 1984), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. et al., 1990).

В противоположность мутантному или гибриднему фрагменту OspA, "фрагмент дикого типа" или "фрагмент OspA дикого типа" в контексте настоящего изобретения относится к природному фрагменту OspA *Borrelia*. Фрагмент дикого типа получен N-концевыми делециями, но он не содержит внутренних делеций (за исключением сигнальных последовательностей, как детально описано в данном документе) или мутаций. По сравнению с гибридным и мутантным фрагментом OspA фрагмент дикого типа состоит из идентичной части OspA (идентичной длины и из того же штамма OspA, и т.д.) и отличается лишь изменением (изменениями), подробно описанным (описанными) выше.

Полипептиды по данному изобретению.

Полипептид представляет собой единичный линейный полимер аминокислот, соединенных пептидными связями, в некоторых случаях также дисульфидными связями. В соответствии с настоящим изобретением полипептид может также содержать одну или более посттрансляционных модификаций, т.е. присоединенную биохимическую функциональную группу, такую как присоединенный ацетат, фосфат, липид или углевод, предпочтительно липид или липиды, присоединенные к N-концевому цистеину вместе с глицерином, более предпочтительно от 1 до 3 C₁₄₋₂₀алкильных или алкенильных фрагментов, еще более предпочтительно от 1 до 3 пальмитоильных групп, наиболее предпочтительно три пальмитоильные группы (Pam₃).

Полипептид по настоящему изобретению является таким, как определено выше, и содержит или состоит из гибридного С-концевого фрагмента OspA, при этом гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит, из N- в С-концевом направлении, из

i) первого участка OspA, состоящего из аминокислот первой С-концевой части OspA из штамма *Borrelia*, отличного от соответствующего фрагмента *B. garinii*, штамм PBr, с SEQ ID NO: 8, и начинается в положении около 125 или 126 и заканчивается в положении 175 или 176; и

ii) второго участка OspA, состоящего из второй С-концевой части OspA, которая непрерывно следует за первой С-концевой частью (например, если первая С-концевая часть заканчивается в положении 175, вторая С-концевая часть продолжается в положении 176 или если первая С-концевая часть заканчивается в положении 176, вторая С-концевая часть продолжается в положении 177 и т.д., тем не менее, также может быть, что одна или две или более, вплоть до 10 аминокислот могут быть удалены в зоне слияния двух С-концевых частей, например, и наиболее предпочтительно, если первая С-концевая часть заканчивается в положении 175, вторая С-концевая часть продолжается в положении 177), при этом второй фрагмент OspA отличается от соответствующей последовательности дикого типа заменой аминокислоты дикого типа в положении 182 SEQ ID NO: 8 цистеином и заменой аминокислоты дикого типа в положении 269 SEQ ID NO: 8 цистеином, и при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного второго фрагмента OspA, образуя цистеин (также называемый как "цистин-стабилизированный фрагмент OspA"); и

при этом нумерация аминокислот и замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5).

В дополнительном варианте реализации изобретения полипептид содержит или состоит из гибридного С-концевого фрагмента OspA, состоящего из аминокислот 125-176 из *B. valaisiana*, штамм VS116, и цистин-стабилизированных аминокислот 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 1).

В дополнительном варианте реализации изобретения полипептид содержит или состоит из гибридного С-концевого фрагмента OspA, состоящего из аминокислот 126-175 из *B. spielmanii* и цистин-стабилизированных аминокислот 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 51).

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид является таким, как определено в данном документе, и при этом второй участок OspA является идентичным относительно цистин-стабилизированных аминокислот 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr, но отличается от них заменой остатка треонина в аминокислоте 233 OspA дикого типа *Borrelia garinii*, штамм PBr, остатком пролина.

Полипептиды по данному изобретению, как определено выше, а также как определено в данном документе, относятся к титрам антител у иммунизированных животных, при этом указанные антитела демонстрируют улучшенное связывание с их соответствующими антигенами *in situ* по сравнению с соответствующими полипептидами предшествующего уровня техники (например, как определено в WO 2014/006226). Предпочтительно полипептид, содержащий гибридный С-концевой фрагмент OspA по данному изобретению, вызывает по меньшей мере 1,5-кратное увеличение, предпочтительно по меньшей мере 2-кратное увеличение, более предпочтительно по меньшей мере 3-кратное увеличение, еще более предпочтительно по меньшей мере 4-кратное увеличение, еще более предпочтительно по меньшей мере 5-кратное увеличение, наиболее предпочтительно по меньшей мере 10-кратное увеличение интенсивности флуоресценции, измеряемое с помощью проточной цитометрии и вызываемое антителами, выработанными после трех иммунизаций полипептидом, у мышей посредством связывания с поверхностью серотипа 3 *Borrelia* по сравнению с интенсивностью флуоресценции, вызываемой антителами, выработанными

ными к полипептиду, содержащему С-концевой домен белка OspA Borrelia, который отличается от соответствующей последовательности OspA дикого типа, по меньшей мере, добавлением по меньшей мере одной цистеиновой связи, более предпочтительно гетеродимерного белка Lip-S4D1-S3D1, как определено SEQ ID NO: 31, в частности, при этом увеличение может быть определено, как описано в Примере 3.

Кроме того, в дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид по данному изобретению, как определено выше и в данном документе, может быть получен с более высоким выходом с применением стандартных способов и требует меньше стадий очистки по сравнению с соответствующими полипептидами предшествующего уровня техники (например, как определено в WO 2014/006226). Предпочтительно полипептид, содержащий гибридный С-концевой фрагмент OspA по данному изобретению, демонстрирует по меньшей мере 1,5-кратное увеличение, предпочтительно по меньшей мере 2-кратное увеличение, более предпочтительно - по меньшей мере 3-кратное увеличение, еще более предпочтительно по меньшей мере 4-кратное увеличение, еще более предпочтительно по меньшей мере 5-кратное увеличение, наиболее предпочтительно по меньшей мере 10-кратное увеличение выхода продукции, измеряемое в миллиграммах на 1 г биомассы, по сравнению с полипептидом, содержащим С-концевой домен белка OspA Borrelia, который отличается от соответствующей последовательности OspA дикого типа, по меньшей мере, добавлением по меньшей мере одной цистеиновой связи, более предпочтительно гетеродимерного белка Lip-S4D1-S3D1, как определено SEQ ID NO: 31, в частности, при этом увеличение может быть определено, как описано в Примере 2.

Предпочтительно полипептид, содержащий гибридный С-концевой фрагмент OspA по данному изобретению, требует меньше стадий для очистки, чем полипептид, содержащий С-концевой домен белка OspA Borrelia, который отличается от соответствующей последовательности OspA дикого типа, по меньшей мере, добавлением по меньшей мере одной цистеиновой связи, более предпочтительно гетеродимерного белка Lip-S4D1-S3D1, как определено SEQ ID NO: 31; в частности требует по меньшей мере на одну стадию хроматографии меньше.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид содержит а) гибридный С-концевой фрагмент OspA, как определено выше и в данном документе, и б) мутантный фрагмент OspA.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид по данному изобретению содержит а) гибридный С-концевой фрагмент OspA, как определено в данном документе, и б) второй фрагмент OspA, при этом указанный фрагмент OspA является С-концевым в том аспекте, что он состоит из С-концевого домена белка OspA Borrelia и является мутантным и цистин-стабилизированным в том аспекте, что он отличается от соответствующей последовательности OspA дикого типа, по меньшей мере, заменой аминокислоты в положении 182 последовательности дикого типа цистеином и заменой аминокислоты в положении 269 последовательности дикого типа цистеином, и при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного фрагмента OspA; и, кроме того, при этом указанный мутантный фрагмент OspA начинается в положении 123, 124 или 125 и заканчивается в положении 273 или 274; и, кроме того, при этом нумерация аминокислот замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA B. burgdorferi s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5). В одном варианте реализации настоящего изобретения второй фрагмент OspA может представлять собой любой из мутантных С-концевых фрагментов OspA, как определено выше, например, в контексте предыдущего изобретения (WO 2014/006226).

В соответствии с настоящим изобретением указанный мутантный фрагмент OspA и гибридный фрагмент по данному изобретению не содержат (i) N-концевой лист, как определено выше, и (ii) необязательно одну или более дополнительных цепей центрального листа, как определено выше. Тем не менее, полипептид может содержать одну или более функциональных последовательностей, таких как сигнальная последовательность, например сигнальная последовательность липидизации или посттрансляционная модификация, такая как липидизация.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид по настоящему изобретению состоит из (i) одного или более мутантных фрагментов OspA, при этом по меньшей мере один из них представляет собой гибридный С-концевой фрагмент OspA по настоящему изобретению, необязательно соединенный линкерами, например, как определено ниже, или одного или более мутантных фрагментов OspA и гибридного С-концевого фрагмента OspA серотипа 3; и (ii) необязательно одной или более аминокислот, гетерологичных по отношению к OspA, в частности сигнальной последовательности; и (iii) необязательно посттрансляционной модификации, такой как липидизация.

Таким образом, в дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид по данному изобретению, как определено выше и в данном документе, может дополнительно содержать:

- i) полипептид, который является липидизированным, или при этом полипептид содержит сигнал липидизации, предпочтительно полученный из E. coli сигнал липидизации Ipp MKATKLVLGAVILGSTLLAG (SEQ ID NO: 15); и/или
- ii) полипептид, который содержит пептид сайта липидизации, направляемый N-концевым остатком цистеина в качестве сайта для липидизации, предпочтительно - CSS; и/или
- iii) полипептид, который содержит линкер между гибридным С-концевым фрагментом OspA и вто-

рым цистеин-стабилизированным фрагментом OspA,

в частности, при этом указанный линкер содержит, например, GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS (SEQ ID NO: 16).

В одном варианте реализации настоящего изобретения второй С-концевой фрагмент OspA представляет собой гибридный С-концевой фрагмент OspA по настоящему изобретению.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения полипептид содержит или состоит из гетеродимера Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27). Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 (гетеродимер Lip-S4D1-S3hybD1).

Полипептид по настоящему изобретению обладает защитной способностью. Как подробно описано выше, введение дисульфидной связи в гибридный и гибридный/мутантный фрагмент OspA, а также гибридная природа фрагмента OspA по данному изобретению увеличивают защитную способность полипептида по сравнению с полипептидом, содержащим соответствующий фрагмент без дисульфидной связи (связей) и гибридной природы фрагмента OspA. В некоторых вариантах реализации изобретения защитная способность увеличивается по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% по сравнению с полипептидом, содержащим соответствующий фрагмент без дисульфидной связи (связей) и гибридной природы фрагмента OspA.

Термин "защитная способность" характеризует способность защищать субъект от инфекции *Borrelia*. Относительно полипептида по данному изобретению, защитная способность относится к способности полипептида индуцировать иммунный ответ, который защищает субъекта от инфекции *Borrelia*. Защитная способность может быть проверена посредством введения субъекту полипептида таким образом, чтобы индуцировать иммунную реакцию на полипептид. В последующем субъект может быть заражен *Borrelia*. Реакцию субъекта на инфекцию контролируют. В частности, может быть определено присутствие *Borrelia* в организме субъекта. Например, полипептид обеспечивает защиту, если *Borrelia* не может быть обнаружена в организме субъекта.

Присутствие *Borrelia* может быть определено посредством выявления специфичных к *Borrelia* нуклеиновых кислот (например, посредством ПЦР) или специфичных к *Borrelia* антител (например, посредством ТИФА или вестерн-блоттинга) или посредством выявления непосредственно *Borrelia* (например, посредством культивирования органов или тканей в питательной среде и микроскопической проверки присутствия *Borrelia*). В частности, защитную способность ("pc"), которую регистрируют в процентном выражении, для конкретной дозы определяют, как указано ниже:

$$pc (\%) = [(\text{общее количество протестированных субъектов} - \text{количество субъектов,}$$

$$\text{инфицированных } Borrelia) / \text{общее количество протестированных субъектов}] \times 100$$

Разница в защитной способности (Δpc) может быть определена, например, посредством сравнения защитной способности (pc) мутантного фрагмента OspA с дисульфидной связью (связями) (pc[со связью]) с защитной способностью фрагмента OspA без дисульфидной связи (связей) (pc [без связи]). В соответствии с настоящим изобретением полипептиды, которые подлежат сравнению, отличаются только введением по меньшей мере одной дисульфидной связи. Изменение защитной способности (Δpc) посредством введения дисульфидной связи (связей) определяют следующим образом:

$$\Delta pc = (pc [\text{образец}] - pc [\text{контроль}])$$

$$\text{например, } \Delta pc = (pc [\text{со связью}] - pc [\text{без связи}])$$

Если Δpc больше нуля (>0) и если предположить, что все другие параметры (например, доза и количественное определение) являются одинаковыми, защитная способность образца (например, мутантного фрагмента OspA с дисульфидной связью (связями)) выше, чем защитная способность контроля (например, фрагмента OspA без дисульфидной связи (связей)). И наоборот, если Δpc меньше нуля (<0) и если предположить, что все другие параметры (например, доза и количественное определение) являются одинаковыми, защитная способность образца (например, мутантного фрагмента OspA с дисульфидной связью (связями)) меньше, чем защитная способность продукта сравнения (например, фрагмента OspA без дисульфидной связи (связей)).

Предпочтительно полипептид по настоящему изобретению оценивают относительно его защитной способности посредством анализа заражения *in vivo*, при этом мышей, иммунизированных полипептидом по данному изобретению или контролем плацебо, заражают *Borrelia*, которую вводят иммунизированным субъектам с помощью иглы для подкожных инъекций (способ заражения иглой) или вводят с помощью клеща-переносчика (способ заражения клещом).

Способ заражения иглой осуществляют для желаемого штамма *Borrelia* (например, *B. burgdorferi*, штамм ZS7) посредством подкожного введения *Borrelia* в дозе, составляющей от 20 до 50 раз инфекционной дозы (ID)₅₀, мышам, иммунизированным указанным первым полипептидом по первому аспекту

или соответствующим контролем (отрицательным) плацебо, таким как только буфер или адъювант, и сравнивая уровни инфицирования у зараженных мышей. ID₅₀ определяют как дозу, при которой инфицируются 50% зараженных мышей. Дозу *Borrelia* измеряют как количество бактерий. Доза заражения может варьироваться в широком диапазоне и зависит от штамма; таким образом, сначала должна быть оценена вирулентность штамма в ходе экспериментов по заражению для определения ID₅₀. Через 4 недели после заражения иглой собирают кровь и ткани для способов считывания данных для определения статуса инфицирования. Такие способы считывания данных могут представлять собой, например, ТИФА VlsE на сыворотках или кПЦР (количественную ПЦР) на собранных тканях для идентификации *Borrelia*, как описано в данном документе, или другие способы.

Способ заражения клещом осуществляют посредством а) переноса по меньшей мере одной нимфы клеща (например, *I. ricinus*), инфицированной *Borrelia* (например, *B. afzelii*, штамм IS1), на мышью, которая иммунизирована указанным первым полипептидом по первому аспекту; и б) переноса по меньшей мере одной инфицированной нимфы клеща на вторую мышью, которая иммунизирована указанным вторым полипептидом по первому аспекту; и в) сравнения уровня инфицирования у двух мышей, как правило, шесть недель после заражения. Предпочтительно анализ или испытание осуществляют на группе мышей для каждого испытуемого полипептида. Подходящее испытание также описано и проиллюстрировано в примерах. Оценка инфекционного статуса может быть осуществлена с помощью ТИФА VlsE на сыворотках или посредством кПЦР на ДНК, выделенной из собранных тканей, или с применением других подходящих способов.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения продукты по изобретению, такие как, например, полипептиды по изобретению, содержащие гибридный фрагмент OspA и предпочтительно мутантный С-концевой фрагмент OspA, при трехкратном введении субъекту в дозе, составляющей 30 мкг, предпочтительно 10 мкг, предпочтительно 5,0 мкг, предпочтительно 1,0 мкг, предпочтительно 0,3 мкг или менее, обладают защитной способностью на 50% или более, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, более предпочтительно на 90% или более, еще более предпочтительно на 95% или более и наиболее предпочтительно на 99% или более. В одном варианте реализации изобретения защитную способность оценивают посредством способа заражения *in vivo*, предпочтительно способа заражения клещом, более предпочтительно способа заражения иглой, например, как описано в примерах.

В предпочтительном варианте реализации изобретения разница в защитной способности (Δpc) между полипептидами по данному изобретению, содержащими гибридный С-концевой фрагмент OspA, и контролем (отрицательным) плацебо составляет по меньшей мере 50%, в частности, по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, при трехкратном введении субъекту в дозе, составляющей 30 мкг, предпочтительно 10 мкг, предпочтительно 5,0 мкг, предпочтительно 1,0 мкг, предпочтительно 0,3 мкг или менее.

В соответствии с настоящим изобретением первая часть гибридного OspA может быть получена из любого штамма *Borrelia*, отличного от *B. garinii*, штамм PBr, с SEQ ID NO: 8, в частности, из тех, которые указаны в данном документе, таких как *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* (не штамм PBr), *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* или *B. sinica*, *B. bavariensis*, предпочтительно -из *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* или *B. garinii*, или слияния фрагментов белка OspA из двух или более из этих видов. Предпочтительно OspA получен из *B. valaisiana*, в частности, штамма VS116 (SEQ ID NO: 4), но может быть получен из *B. afzelii*, в частности, штамма K78, серотипа 2 OspA (SEQ ID NO: 6); *B. burgdorferi* s.s., в частности, штамма B31, серотипа 1 OspA (SEQ ID NO: 5); *B. garinii*, в частности, штамма PBr, серотипа 3 OspA (SEQ ID NO: 8); *B. bavariensis*, в частности, штамма PBi, OspA серотипа 4 (SEQ ID NO: 9); *B. garinii*, в частности, штамма PHei, серотипа 5 OspA (SEQ ID NO: 10); *B. garinii*, в частности, штамма DK29, серотипа 6 OspA (SEQ ID NO: 11) или *B. garinii*, в частности, штамма T25, серотипа 7 OspA (SEQ ID NO: 12). Ниже приведены аминокислотные последовательности этих белков OspA (полноразмерные).

В соответствии с настоящим изобретением дисульфидная связь может быть также образована между остатками цистеина, которые были введены в любом положении фрагмента OspA, позволяя или обеспечивая надлежащий фолдинг фрагмента. Положения могут быть выбраны, как подробно описано выше, на основании известной структуры OspA. В предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид по данному изобретению содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь, введенную инсерцией остатка цистеина, в одном из остатков 182±3 и одном из остатков 269±3 (тип дисульфидной связи 1; "D1") *B. afzelii*, в частности *B. afzelii*, штамм K78, серотип 2 OspA, или гомологичные аминокислоты OspA из штамма *Borrelia*, отличного от *B. afzelii*, такого как *B. burgdorferi* s.s., в частности, штамм B31, серотип 1; *B. garinii*, в частности, штамм PBr, серотип 3; *B. bavariensis*, в частности, штамм PBi, серотип 4; *B. garinii*, в частности, штамм PHei, серотип 5; *B. garinii*, в частности, штамм DK29, серотип 6; *B. garinii*, в частности, штамм T25, серотип 7, или слияние аминокислот 125-176 OspA

B. valaisiana, штамм VS116, или аминокислот 126-175 *OspA B. spielmanii* и аминокислот 177-274 *B. garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 8).

Следует отметить, что

положение 182±3 представляет собой сокращение для положения 179, 180, 181, 182, 183, 184 или 185, предпочтительно – 182;

положение 269±3 представляет собой сокращение для положения 266, 267, 268, 269, 270, 271 или 272, предпочтительно 269.

В предпочтительном варианте реализации изобретения дополнительный мутантный фрагмент получен из аминокислот от положения 125, 126, 130 или 131 до положения 273 последовательности дикого типа *OspA B. afzelii*, штамм K78, серотип 2 (SEQ ID NO: 6), и отличается только введением по меньшей мере одной дисульфидной связи, в частности, при этом по меньшей мере одна дисульфидная связь расположена между положениями 182 и 269 (тип дисульфидной связи 1) или гомологичными фрагментами и положениями *OspA* из вида *Borrelia*, отличного от *B. afzelii*, такого как *B. burgdorferi* s.s., в частности, штамм B31, серотип 1; *B. garinii*, в частности, штамм PBr, серотип 3; *B. bavariensis*, в частности, штамм PBi, серотип 4; *B. garinii*, в частности, штамм PHei, серотип 5; *B. garinii*, в частности, штамм DK29, серотип 6 или *B. garinii*, в частности, штамм T25, серотип 7.

В дополнительном варианте реализации изобретения мутантный фрагмент может представлять собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, наиболее предпочтительно SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности относительно по меньшей мере одной из последовательностей с SEQ ID NO: 19-25, при этом остатки цистеина не заменены. Дополнительные подробности относительно мутаций и идентичности последовательностей приведены выше.

Как подробно описано выше, полипептид по настоящему изобретению может содержать сигнальные последовательности. Было продемонстрировано, что липидизация придает *OspA* полезные свойства. Соответственно, предпочтительными являются липидизированные формы полипептида по данному изобретению или полипептиды, которые содержат сигнал липидизации. В предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид по данному изобретению содержит сигнал липидизации, предпочтительно сигнал липидизации внешнего поверхностного белка *Borrelia*, *OspA* или *OspB* (SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно) или более предпочтительно сигнальную последовательность липидизации *Ipp* *E. coli* (SEQ ID NO: 15). Фрагмент *OspA* по данному изобретению, содержащий сигнал липидизации, липидизируется в ходе процессинга, и сигнальный пептид липидизации отщепляется; таким образом, сигнальный пептид отсутствует в зрелом липидизированном белке.

Липидизированные белки в соответствии с данным изобретением имеют метку "Lip" на N-конце, что указывает на добавление трех групп жирных кислот и глицерина в полипептид. Подходящие сигналы липидизации, как описано выше, включают MKKYLLGIGLILALIA (SEQ ID NO: 13), MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 14) и MKATKLVLGAVILGSTLLAG (SEQ ID NO: 15). Поскольку липидные фрагменты и глицерин присоединены к N-концевому остатку цистеина, который присутствует в полноразмерном белке *OspA* дикого типа, C-концевые фрагменты *OspA* для липидизации могут дополнительно содержать пептид, содержащий остаток цистеина, со следующими дополнительными аминокислотами. Например, такие последовательности, как CSS или CKQN (SEQ ID NO: 62), которые являются непосредственно C-концевыми по отношению к сигнальной последовательности липидизации, обеспечивают N-концевой остаток цистеина для липидизации при отщеплении сигнального пептида липидизации. Липидизированные пептиды, содержащие цистеин, присутствуют в конечном липидизированном полипептиде по данному изобретению.

Было выявлено, что белок *OspA B. burgdorferi* s.s. содержит последовательность со способностью к связыванию с рецептором Т-клеток, который также обладает способностью к связыванию с функционально-ассоциированным антигеном лимфоцитов человека (hLFA-1) (также называемым в данном документе как "hLFA-1-подобная последовательность"). Сходство этого участка *OspA* с hLFA-1 может приводить к иммунному ответу с перекрестной реактивностью при введении *B. burgdorferi* s.s. *OspA* субъекту-человеку и может индуцировать аутоиммунные заболевания, в частности аутоиммунный артрит, у предрасположенных индивидуумов. Соответственно, в предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид по данному изобретению не содержит последовательность со способностью к связыванию с рецептором Т-клеток, который обладает способностью к связыванию с функционально-ассоциированным антигеном лимфоцитов человека (hLFA-1), и, в частности, не содержит аминокислотную последовательность GYVLEGLTAE (SEQ ID NO: 17). В связи с этим hLFA-1-подобная последовательность, в частности аминокислотная последовательность GYVLEGLTAE (SEQ ID NO: 17), может быть заменена гомологичной последовательностью из белка *OspA* другого вида *Borrelia*, в частности, на NFTLEGKVAND (SEQ ID NO: 18).

В предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид по данному изобретению, содержащий по меньшей мере одну дисульфидную связь, по сути, проявляет такую же, как и указанный полипептид, защитную способность от инфекции *Borrelia* относительно по меньшей мере одного из полноразмерных белков OspA дикого типа, полученных по меньшей мере из одного штамма *Borrelia*, в частности *B. afzelii*, штамм K78, серотип 2 OspA (SEQ ID NO: 6); *B. burgdorferi* s.s., в частности, штамм B31, серотип 1 (SEQ ID NO: 5); *B. garinii*, в частности, штамм PBr, серотип 3 (SEQ ID №NO: 7 и 8); *B. bavariensis*, в частности, штамм PBi, серотип 4 (SEQ ID NO: 9); *B. garinii*, в частности, штамм PHei, серотип 5 (SEQ ID NO: 10); *B. garinii*, в частности, штамм DK29, серотип 6 (SEQ ID NO: 11) или *B. garinii*, в частности, штамм T25, серотип 7 (SEQ ID NO: 12).

Следует отметить, что дополнительные сведения о мутациях и идентичности последовательностей приведены выше.

Нумерация и SEQ ID NO: липидизированных гетеродимеров мутантного фрагмента OspA, описанных в настоящем изобретении показана в табл. А-3.

Таблица А-3

Липидизированный гетеродимер	SEQ ID NO:
мутантного фрагмента OspA*	
Lip-S1D1-S2D1	29
Lip-S5D1-S6D1	33
Lip-S4D1-S3D1	31
Lip-S4D1-S3hybD1	27

*S = Серотип (1-6) (см. табл. А-2);

S3hyb = слияние аминокислот 125-176 *B. valaisiana* и аминокислот 177-274 *B. garinii*, штамм PBr;

D1 = тип дисульфидной связи 1 (вставка остатков цистеина в положении 183 ± 3 и 270 ± 3);

Lip = липидизация: N-концевое введение остатков глицерина и жирных кислот.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид в соответствии с первым аспектом содержит по меньшей мере два или три мутантных фрагмента, которые соединены с помощью одного или более линкеров. Линкер представляет собой довольно короткую аминокислотную последовательность, применяемую для соединения двух фрагментов. Она должна быть сконструирована во избежание какого-либо отрицательного воздействия на фрагменты, их взаимодействие в организме субъектов, которые получают лечение или прививку, или их защитную способность. Предпочтительными являются короткие линкеры, составляющие не более 21 аминокислоты, в частности не более 15 аминокислот, в особенности не более 12 или 8 аминокислот. Более предпочтительно, чтобы один или более линкеров состояли из аминокислот небольшого размера с целью уменьшения или минимизации взаимодействия с фрагментами, такими как глицин, серин и аланин. Предпочтительным линкером является пептидный линкер "LN1", слияние двух отдельных петлевых участков N-концевой половины OspA из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (ак 65-74 и ак 42-53, с обменом аминокислот в положении 53 D53S), который обладает следующей последовательностью: GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS (SEQ ID NO: 16). Линкер может содержать сайт липидизации.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения полипептид в соответствии с первым аспектом содержит полипептид с полным размером, составляющим не более 500 аминокислот, содержащих два или три разных мутантных фрагмента, как определено в предпочтительных вариантах реализации изобретения по первому аспекту; или полипептид, который состоит, по сути, из двух или трех разных мутантных фрагментов, одного или двух линкеров и, необязательно, N-концевого цистеина; и/или полипептид, который состоит, по сути, из двух или трех разных мутантных фрагментов, N-концевого продолжения фрагмента, который состоит не более чем из 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислот, предпочтительно не более чем из 10, 9, 8, 7 или 6 аминокислот, еще более предпочтительно не более чем из 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоты, при этом N-концевое продолжение расположено непосредственно в N-концевом положении по отношению к фрагменту в соответствующем OspA *Borrelia*, и, необязательно, N-концевого цистеина. За N-концевым цистеином необязательно может следовать короткий пептидный линкер, составляющий 1-10 аминокислот в длину и который предпочтительно приобретает форму N-концевого пептида CSS.

Нуклеиновые кислоты по данному изобретению и родственные аспекты.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, как определено в данном документе и выше, в контексте настоящего изобретения. Нуклеиновая кислота может входить в состав вектора и/или клетки.

Данное изобретение дополнительно относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид по данному изобретению. В контексте данного изобретения термин "нуклеиновая кислота (кислоты)", как правило, относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК, в том числе одноцепочечные и двухцепочечные участки/формы.

Термин "нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид" при использовании по тексту данного документа охватывает полинуклеотиды, которые содержат последовательность, кодирующую пептид или полипептид по данному изобретению. Данный термин также охватывает полинуклеотиды, которые содержат один непрерывный участок или прерывистые участки, кодирующие пептид или полипептид (например, полинуклеотиды, прерванные интегрированным фагом, интегрированной инсерционной последовательностью, интегрированной векторной последовательностью, интегрированной последовательностью транспозона или в результате редактирования РНК или реорганизации геномной ДНК), вместе с дополнительными участками, которые также могут содержать кодирующие и/или не кодирующие последовательности.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что в результате вырожденности генетического кода существуют многочисленные нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептид, как описано в данном документе. Некоторые из этих полинуклеотидов имеют минимальное сходство с нуклеотидной последовательностью любого нативного (т.е. природного) гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые отличаются за счет различий в частоте использования кодона, специально рассматриваются настоящим изобретением, например полинуклеотиды, оптимизированные для селекции кодонов человека, и/или примата, и/или *E. coli*.

Последовательности, кодирующие желаемый полипептид, могут быть синтезированы, полностью или частично, с применением химических способов, хорошо известных в данной области техники (см. публикацию Caruthers, M.H. et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. p. 215-223 (1980), Horn et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. p. 225-232 (1980)). В альтернативном варианте, белок как таковой может быть получен с применением химических способов синтеза аминокислотной последовательности полипептида, или ее участка. Например, синтез пептида может быть осуществлен с применением различных твердо-фазовых методов (Roberge et al., Science 269:202-204 (1995)), а автоматизированный синтез может быть достигнут, например, посредством применения синтезатора пептидов ASI 431 A (Perkin Elmer, Пало-Альто, штат Калифорния).

Кроме того, полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть сконструированы с применением способов, как правило, известных в данной области техники, для изменения кодирующих полипептид последовательностей по разным причинам, в том числе, без ограничения ими, внесения изменений, которые модифицируют клонирование, процессинг и/или экспрессию продукта гена. Например, перестановка в ДНК посредством случайной фрагментации и вторичная ПЦР-сборка фрагментов гена и синтетических олигонуклеотидов могут быть применены для создания нуклеотидных последовательностей. Помимо этого, сайт-направленный мутагенез может быть применен для вставки новых сайтов рестрикции, изменения профиля гликозилирования, изменения предпочтения кодонов, получения сплайс-вариантов или введения мутаций и т. д.

В дополнительном аспекте изобретения настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту по данному изобретению, например, соединенную с индуцибельным промотором таким образом, что в случае индукции промотора экспрессируется полипептид, кодируемый данной нуклеиновой кислотой. В предпочтительном варианте реализации изобретения вектор представляет собой pET28b(+) (<http://www.addgene.org/vector-database/2566/>).

Дополнительный аспект данного изобретения включает указанный вектор, при этом индуцибельный промотор активируется добавлением достаточного количества ИПТГ (изопропил β -D-1-тиогалактопиранозида), предпочтительно к питательной среде. Необязательно, добавления осуществляются в концентрации, составляющей от 0,1 до 10 мМ, от 0,1 до 5 мМ, от 0,1 до 2,5 мМ, от 0,2 до 10 мМ, от 0,2 до 5 мМ, от 0,2 до 2,5 мМ, от 0,4 до 10 мМ, от 1 до 10 мМ, от 1 до 5 мМ, от 2,5 до 10 мМ, от 2,5 до 5 мМ, от 5 до 10 мМ. В альтернативном варианте промотор может быть индуцирован посредством изменения температуры или pH.

Молекула нуклеиновой кислоты, при использовании по тексту данного документа, как правило, относится к любой молекуле рибонуклеиновой кислоты или молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Таким образом, например, молекула нуклеиновой кислоты при использовании по тексту данного документа относится по меньшей мере к одно- и двухцепочечной ДНК, гибридным молекулам, содержащим ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или чаще - двухцепочечными, или к смеси одно- и двухцепочечных участков. При использовании по тексту данного документа термин "молекула нуклеиновой кислоты" охватывает молекулы ДНК или РНК, как описано выше, которые содержат одно или более модифицированных оснований. Таким образом, молекулы ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам, представляют собой "молекулы нуклеиновой кислоты" в соответствии с пониманием данного термина в данном документе. Кроме того, типы

ДНК или РНК, содержащие необычные основания, такие как инозин, или модифицированные основания, такие как тритилированные основания, и это только два примера, также являются молекулами нуклеиновой кислоты, как определено в данном документе. Следует принимать во внимание, что большое разнообразие модификаций было осуществлено в молекулах ДНК и РНК, которые служат многим полезным целям, известным специалистам в данной области техники. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" при использовании по тексту данного документа охватывает такие химически, ферментно или метаболически модифицированные формы молекул нуклеиновой кислоты, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток, в том числе, в частности, простых и сложных клеток. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает короткие молекулы нуклеиновой кислоты, часто называемые олигонуклеотидом (олигонуклеотидами). Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" взаимозаменяемо используются по тексту данного документа.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть химически синтезированными. В альтернативном варианте нуклеиновые кислоты могут быть выделены из *Borrelia* и модифицированы с помощью способов, известных специалисту в данной области техники. То же самое касается полипептидов по настоящему изобретению.

Кроме того, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть функционально соединенной с применением стандартных способов, таких как клонирование, с любой желаемой последовательностью (последовательностями), или регуляторной последовательностью *Borrelia*, или гетерологичной регуляторной последовательностью, гетерологичной лидерной последовательностью, гетерологичной маркерной последовательностью или гетерологичной кодирующей последовательностью, с образованием гибридного гена.

Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут существовать в форме РНК, такой как мРНК или кРНК, или в форме ДНК, в том числе, например, кДНК и геномной ДНК, полученной клонированием или полученной методами химического синтеза или их комбинацией. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной или одноцепочечной. Одноцепочечная ДНК может представлять собой кодирующую цепь, также известную как смысловая цепь, или может представлять собой не кодирующую цепь, также называемую антисмысловой цепью.

Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть введена в вектор или в клетку-хозяина. Соответственно, настоящее изобретение также относится к вектору или клетке-хозяину, предпочтительно *E. coli*, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Вектор может содержать упомянутую выше нуклеиновую кислоту таким образом, что вектор является реплицируемым и может экспрессировать белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, в клетке-хозяине.

Для рекомбинантного получения полипептидов по данному изобретению клетки-хозяева могут быть генетически сконструированы для инкорпорации систем экспрессии или их частей нуклеиновой кислоты по данному изобретению. Введение нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина может осуществляться способами, описанными во многих стандартных лабораторных пособиях, таких как Davis, et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) и Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), такими как кальций-фосфатная трансфекция, ДЭАЭ-декстран-опосредованная трансфекция, трансфекция, микроинъекция, опосредованная катионным липидом трансфекция, электропорация, конъюгация, трансдукция, введение при соскабливании, баллистическое введение и инфицирование.

Типичные примеры подходящих хозяев включают клетки грамотрицательных бактерий, такие как клетки *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*. В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli*. В предпочтительном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli* BL21 (DE3) или клетку *E. coli* BL21 StarTM (DE3).

В альтернативном варианте могут быть также применены клетки грамположительных бактерий. Большое разнообразие систем экспрессии может применяться для получения полипептидов по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения вектор получен из бактериальных плазмид. Как правило, любая система или вектор, подходящие для поддержки, разведения или экспрессии полинуклеотидов и/или экспрессии полипептида в хозяине, может быть применена для экспрессии в этом отношении. Подходящая последовательность ДНК может быть вставлена в систему экспрессии с помощью любого из множества известных и стандартных способов, таких как, например, способы, изложенные в публикации Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (см. выше).

В одном варианте реализации данного изобретения клетки выращивают в условиях селективного давления, таких как в присутствии антибиотиков, предпочтительно канамицина. В другом варианте реализации изобретения клетки выращивают при отсутствии антибиотиков.

Большое разнообразие векторов экспрессии может применяться для экспрессии полипептидов по настоящему изобретению. Как правило, любой вектор, подходящий для поддержки, разведения или экс-

прессии нуклеиновых кислот с целью экспрессии полипептида в хозяине, может быть применен для экспрессии в этом отношении. В соответствии с этим аспектом данного изобретения вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор, одно- или двухцепочечный фаговый вектор или вирусный вектор одно- или двухцепочечной РНК или ДНК. Исходные плазмиды, раскрытые в данном документе, являются коммерчески доступными, общедоступными или могут быть сконструированы из доступных плазмид стандартным применением известных опубликованных методик. Предпочтительными среди векторов в определенных отношениях являются векторы для экспрессии молекул нуклеиновых кислот и полипептидов по настоящему изобретению. Конструкты нуклеиновых кислот в клетках-хозяевах могут применяться обычным образом для получения генного продукта, кодируемого рекомбинантной последовательностью. В альтернативном варианте полипептиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с помощью обычных синтезаторов пептидов.

Помимо этого, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, которая содержит этот вектор. Типичные примеры подходящих клеток-хозяев включают бактерии, такие как стрептококки, стафилококки, *E. coli*, *Streptomyces* и *Bacillus subtilis*; грибы, такие как дрожжи и *Aspergillus*; клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, ВНК, 293 или клетки меланомы Боуэса; и клетки растений. Бесклеточные системы трансляции также могут применяться для получения таких белков с применением РНК, полученной из конструкта ДНК по настоящему изобретению.

Для экспрессии желаемой аминокислотной последовательности практически посредством введения вектора по настоящему изобретению в клетку-хозяина вектор может содержать, в дополнение к нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, другие последовательности для контроля экспрессии (например, промоторные последовательности, терминирующие последовательности и энхансерные последовательности) и генные маркеры для селекции микроорганизмов, клеток насекомых, клеточных культур животных или т.п. (например, гены устойчивости к неомицину и гены устойчивости к канамицину). Кроме того, вектор может содержать нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению в повторной форме (например, в тандеме). Вектор может быть сконструирован на основании методик, которые обычно применяют в области генной инженерии.

Клетки-хозяева могут культивироваться в подходящей среде, а белок по настоящему изобретению может быть получен из продукта культивирования. Белок по настоящему изобретению может быть выделен из питательной среды и очищен обычным способом.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу получения клетки, которая экспрессирует полипептид по настоящему изобретению, включающему трансформацию или трансфекцию подходящей клетки-хозяина вектором по настоящему изобретению, или к способу получения полипептида по настоящему изобретению, включающему экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В альтернативном варианте способ получения полипептида, как определено выше, может характеризоваться следующими стадиями:

- а) введение вектора, кодирующего полипептид, в клетку-хозяина;
- б) выращивание клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии указанного полипептида;
- в) гомогенизация указанной клетки-хозяина и
- г) проведение стадий очистки гомогената клетки-хозяина.

Данное изобретение дополнительно относится к способу получения полипептида, как определено выше, который характеризуется следующими стадиями:

- а) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в вектор;
- б) введение указанного вектора в клетку-хозяина;
- в) выращивание указанной клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии полипептида;
- г) гомогенизация указанной клетки-хозяина;
- д) обогащение полипептида в липидной фазе с помощью разделения фаз и
- е) дополнительная очистка на гель-фильтрационной колонке.

Данное изобретение дополнительно относится к способу получения полипептида, как определено выше, который характеризуется следующими стадиями:

- а) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в вектор;
- б) введение указанного вектора в клетку-хозяина;
- в) выращивание указанной клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии полипептида;
- г) гомогенизация указанной клетки-хозяина;
- д) обогащение полипептида в липидной фазе с помощью разделения фаз;
- е) очистка на гель-фильтрационной колонке и
- ж) необязательно, дополнительная обработка на буферообменной колонке.

Антитела по данному изобретению и родственные аспекты.

Проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, в дополнительном аспекте решается с помощью антитела или, по меньшей мере, его эффективной части, которые селективно связываются гибридным С-концевым фрагментом OspA, как определено в контексте настоящего изобретения, но не с первым участком OspA и вторым участком OspA по отдельности (т.е., если нет слияния с другим участком).

В предпочтительном варианте реализации изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения указанная эффективная часть содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab), фрагмент F(ab)N, фрагмент F(ab)₂ или фрагмент F_v или однодоменное антитело.

В еще одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело.

В еще одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В предпочтительном аспекте антитела по данному изобретению специфически связываются с полипептидами гибридного фрагмента OspA по данному изобретению, но не с первым участком OspA и вторым участком OspA по отдельности и не с соответствующими полипептидами фрагмента OspA дикого типа. В более предпочтительном аспекте антитело специфически связывается с дисульфидной связью мутантного фрагмента OspA по данному изобретению.

Термин "специфичность" относится к количеству разных типов антигенов или антигенных детерминант, с которыми может связываться конкретная антигенсвязывающая молекула или антигенсвязывающий белок (такой как нанотело или полипептид по данному изобретению). Специфичность антигенсвязывающего белка может быть определена на основании аффинности и/или avidности. Аффинность, представленная константой равновесия для диссоциации антигена с антигенсвязывающим белком (K_D), представляет собой меру прочности связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим участком на антигенсвязывающем белке: чем меньше значение K_D , тем сильнее прочность связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающей молекулой (в альтернативном варианте аффинность может быть также выражена в виде константы аффинности (K_A), которая представляет собой $1/K_D$).

Как будет понятно специалисту в данной области техники (например, на основании последующего описания в данном документе), аффинность может быть определена известным, по сути, способом, в зависимости от конкретного целевого антигена. Avidность представляет собой меру прочности связывания между антигенсвязывающей молекулой (такой как антитело или его эффективная часть по данному изобретению) и соответствующим антигеном. Avidность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и ее антигенсвязывающим участком на антигенсвязывающей молекуле, так и с количеством соответствующих участков связывания на антигенсвязывающей молекуле. Как правило, антигенсвязывающие белки (такие как антитело или его эффективная часть по данному изобретению) будут связываться со своим антигеном с константой диссоциации (K_D), составляющей от 10^{-5} до 10^{-12} М или меньше, предпочтительно - от 10^{-7} до 10^{-12} М или меньше и более предпочтительно - от 10^{-8} до 10^{-12} М (т.е. с константой ассоциации (K_A), составляющей от 10^5 до 10^{12} М⁻¹ или больше, предпочтительно от 10^7 до 10^{12} л/моль или больше и более предпочтительно от 10^8 до 10^{12} М⁻¹). Любое значение K_D , которое превышает 10^4 М (или любое значение K_A , составляющее менее 10^4 М⁻¹), как правило, рассматривается как указывающее на неспецифическое связывание. Предпочтительно последовательность моновалентного иммуноглобулина по данному изобретению будет связываться с желаемым антигеном с аффинностью, составляющей менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ, более предпочтительно менее чем 10 нМ, например менее чем 500 пМ. Специфическое связывание антигенсвязывающего белка с антигеном или антигенной детерминантой может быть определено любым подходящим известным, по сути, способом, в том числе, например, посредством анализа Скэтчарда и/или анализов конкурентного связывания, таких как радиоиммунологические анализы (РИА), иммуоферментные анализы (ИФА) и конкурентные сэндвич-анализы и их разнообразные варианты по сути, известные в данной области техники, а также другими способами, упомянутыми в данном документе.

Константа диссоциации может представлять собой фактическую или кажущуюся константу диссоциации, как будет понятно специалисту в данной области техники. Способы определения константы диссоциации будут известны специалисту в данной области техники и включают, например, методы, упомянутые в данном документе. В этом отношении также будет понятно, что может быть невозможным измерять константы диссоциации, составляющие более чем 10^{-4} или 10^{-3} М (например, 10^{-2} М). Необязательно, что также будет понятно специалисту в данной области техники, константа диссоциации (фактическая или кажущаяся) может быть вычислена на основании (фактической или кажущейся) константы ассоциации (K_A) с помощью соотношения [$K_D=1/K_A$].

Аффинность означает силу или стабильность молекулярного взаимодействия. Аффинность обычно приводится как K_D , или константа диссоциации, которая измеряется в единицах моль/л (или М). Аффинность также может быть выражена в виде константы ассоциации, K_A , которая равна $1/K_D$ и измеряется в

единицах (л/моль)⁻¹ (или М⁻¹). В настоящем описании стабильность взаимодействия между двумя молекулами (такими как аминокислотной последовательностью, нанотелом или полипептидом по данному изобретению и его предполагаемой мишенью) преимущественно будет выражена в показателях значения K_D их взаимодействия; при этом специалисту в данной области техники понятно, что с учетом соотношения $K_A = 1/K_D$, конкретизация силы молекулярного взаимодействия при значении K_D может также применяться для вычисления соответствующего значения K_A . Значение K_D характеризует силу молекулярного взаимодействия также с термодинамической точки зрения, так как она связана со свободной энергией (DG) связывания хорошо известным соотношением $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ (равноценно $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$), где R равняется газовой постоянной, T равняется абсолютной температурой и $\ln$ означает натуральный логарифм.

Значения K_D для биологических взаимодействий, которые считаются значимыми (например, специфическими), как правило, находятся в диапазоне от 10^{-10} М (0,1 нМ) до 10^{-5} М (10000 нМ). Чем сильнее взаимодействие, тем меньше значение K_D .

В предпочтительном варианте реализации изобретения K_D антитела по данному изобретению находится между 10^{-12} и 10^{-5} М, предпочтительно менее чем 10^{-6} , предпочтительно менее чем 10^{-7} М, предпочтительно менее чем 10^{-8} М, предпочтительно менее чем 10^{-9} М, более предпочтительно менее чем 10^{-10} М, еще более предпочтительно менее чем 10^{-11} М, наиболее предпочтительно менее чем 10^{-12} М.

K_D также может быть выражена в виде соотношения константы скорости диссоциации комплекса, обозначенной как k_{off} , к скорости его ассоциации, обозначенной как k_{on} (таким образом, что $K_D = k_{off}/k_{on}$ и $K_A = k_{on}/k_{off}$). Скорость диссоциации k_{off} выражается в единицах с⁻¹ (где с представляет собой обозначение секунды в единицах системы СИ). Скорость ассоциации k_{on} выражается в единицах М⁻¹·с⁻¹. Скорость ассоциации может варьировать от 10^2 до около 10^7 М⁻¹·с⁻¹, приближаясь к диффузионно-ограниченной константе скорости ассоциации для бимолекулярных взаимодействий. Скорость диссоциации связана с периодом полувыведения для данного молекулярного взаимодействия соотношением $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$. Скорость диссоциации может варьировать от 10^{-6} с⁻¹ (вблизи необратимого комплекса с $t_{1/2}$ нескольких дней) до 1 с⁻¹ ($t_{1/2} = 0,69$ с).

Аффинность молекулярного взаимодействия между двумя молекулами может быть измерена с помощью разных, по сути, известных техник, таких как хорошо известная техника поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с биодатчиком (см., например, публикацию Ober et al., Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001), где одна молекула иммобилизована на чипе биодатчика, а другая молекула проходит над иммобилизованной молекулой в условиях потока с получением измерений k_{on} , k_{off} и, следовательно, значений K_D (или K_A). Это может быть осуществлено, например, с применением хорошо известных приборов BIACORE.

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что измеренное значение K_D может соответствовать кажущейся K_D , если способ измерения каким-то образом влияет на естественную аффинность связывания целевых молекул, например, в результате действия искусственных объектов, связанных с покрытием на биодатчике одной молекулы. Также кажущаяся K_D может быть измерена, если одна молекула содержит больше одного участка распознавания для другой молекулы. В такой ситуации измеренная аффинность может зависеть от avidности взаимодействия с двумя молекулами.

Другой подход, который может быть применен для оценки аффинности, представляет собой методику двухстадийного ТИФА (твердофазный иммуоферментный анализ) по Friguet et al. (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985). Этот способ обеспечивает измерение жидкофазного равновесия связывания и позволяет избежать возможных препятствий, которые относятся к адсорбции одной из молекул на носителе, таком как пластмасса.

Тем не менее, точное измерение K_D может быть достаточно трудоемким; в силу этих обстоятельств часто определяют значения кажущейся K_D для оценки прочности связывания двух молекул. Следует отметить, что до тех пор, пока все измерения осуществляются последовательно (например, с сохранением условий анализа неизменными), измерения кажущейся K_D могут применяться в виде приближенной оценки настоящей K_D , и, следовательно, в данном документе K_D и кажущуюся K_D следует рассматривать как в равной степени важные или уместные.

И, наконец, следует отметить, что во многих ситуациях опытный ученый может оценить пригодность для определения аффинности связывания по отношению к некоторой эталонной молекуле. Например, для оценки прочности связывания между молекулами А и Б может быть использована, например, эталонная молекула В, которая, как известно, связывается с Б и которая приемлемым образом мечена флуорофорной или хромофорной группой или другим химическим фрагментом, таким как биотин, для простоты детектирования в ходе ТИФА или проточной цитометрии, или другого формата (флуорофор для флуоресцентной детекции, хромофор для детекции светопоглощения, биотин для стрептавидинопосредствованной детекции в ходе ТИФА). Как правило, поддерживают фиксированную концентрацию эталонной молекулы В, и концентрация А изменяется при определенной концентрации или количестве Б. В результате значение ингибирующей концентрации (IC)₅₀ получают в соответствии с концентрацией А, при которой сигнал, измеряемый для В при отсутствии А, делят пополам. При условии, что известна

$K_{D\text{ ref}}$, т.е. K_D эталонной молекулы, а также общая концентрация c_{ref} эталонной молекулы, кажущаяся K_D для взаимодействия А-В может быть получена из следующей формулы: $K_D = IC_{50} / (1 + c_{\text{ref}} / K_{D\text{ ref}})$. Следует отметить, что, если $c_{\text{ref}} \ll K_{D\text{ ref}}$, $K_D \approx IC_{50}$. При условии, что измерение IC_{50} осуществляется последовательно (например, с сохранением фиксированной c_{ref}) для связывающих веществ, которые сравниваются, прочность или стабильность молекулярного взаимодействия может быть оценена с помощью IC_{50} , и это измерение оценивается как эквивалент по отношению к K_D или по отношению к кажущейся K_D по всему тексту данного описания.

Другой аспект настоящего изобретения относится к линии клеток гибридомы, которая продуцирует антитело, как определено выше.

Проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, в дальнейшем решается с помощью способа получения антитела, как определено выше, который характеризуется следующими стадиями:

- а) инициация иммунного ответа у не относящегося к человеку животного посредством введения полипептида, как определено выше, указанному животному;
- б) извлечение биологической жидкости, содержащей антитело, из указанного животного;
- в) получение антитела посредством проведения дополнительных стадий очистки указанной биологической жидкости, содержащей антитело.

Данное изобретение дополнительно относится к способу получения антитела, как определено выше, который характеризуется следующими стадиями:

- а) инициация иммунного ответа у не относящегося к человеку животного посредством введения полипептида, как определено выше, указанному животному;
- б) извлечение селезенки или клеток селезенки из указанного животного;
- в) получение клеток гибридомы из указанной селезенки или клеток селезенки;
- г) отбор и клонирование клеток гибридомы, специфичных для указанного полипептида;
- д) получение антитела посредством культивирования указанных клонированных клеток гибридомы;
- е) необязательно, проведение дополнительных стадий очистки.

Фармацевтические композиции и соответствующие медицинские аспекты.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей:

- (i) полипептид по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению и/или антитело по настоящему изобретению;
- (ii) необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Соответственно, полипептид по настоящему изобретению, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, антитело по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут служить для применения в качестве лекарственного средства, в частности в качестве вакцины или для применения в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*, в частности инфекции *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* или *B. sinica*, предпочтительно инфекции *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* или *B. garinii*.

Предпочтительно композиция дополнительно содержит Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33), композиция дополнительно содержит Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29), композиция дополнительно содержит Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33) или композиция содержит Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29), Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33).

Еще один аспект относится к фармацевтической композиции, как определено выше, для применения в лечении или профилактике инфекции, вызванной видами *Borrelia*, более предпочтительно патогенными видами *Borrelia*, как описано в данном документе, более предпочтительно включающими *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii*.

Проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, решается в другом аспекте применением полипептида по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики инфекций, вызванных видами *Borrelia*, более предпочтительно патогенными видами *Borrelia*, как описано в данном документе, более предпочтительно включающими *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii*.

Фармацевтическая композиция может необязательно содержать любой фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, например буферные вещества, стабилизаторы или дополнительные действующие вещества, в частности компоненты, известные в части, касающейся производства фармацевтических композиций и/или вакцин. Предпочтительно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество включает L-метионин. Предпочтительно фармацевтическая композиция предназначена для применения в качестве лекарственного средства, в частности в качестве вакцины или для профилактики или лечения инфекции, вызванной видами *Borrelia*, более предпочтительно патогенными видами *Borrelia*, как описано в данном документе, более предпочтительно включающими *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. garinii*, и/или другими патогенами, антигены против которых были включены в состав вакцины. Предпочтительно фармацевтическая композиция для применения в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*, в частности инфекции *B. burgdorferi* s.s.,

B. garinii, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissetii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* или *B. sinica*, предпочтительно инфекции *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* или *B. garinii*.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант. Выбор подходящего адъюванта для смешивания с бактериальными токсинами или конъюгатами, выполненными с применением способов по данному изобретению, находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Подходящие адъюванты включают соль алюминия, такую как гидроксид алюминия или фосфат алюминия, но могут также включать другие соли металлов, такие как соли кальция, магния, железа или цинка, или могут представлять собой нерастворимую суспензию ацилированного тирозина или ацилированные сахара, катионно или анионно дериватизированные сахараиды, или полифосфазены. В предпочтительном варианте реализации изобретения адъювантом в фармацевтической композиции является гидроксид алюминия.

В дополнительном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит иммуностимулирующее вещество, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из поликатионных полимеров, в частности поликатионных пептидов, иммуностимулирующих олигодезоксинуклеотидов (ОДН), в частности олиго(dIdC)₁₃ (SEQ ID NO: 63), пептидов, содержащих по меньшей мере два мотива LysLeuLys, в частности пептида KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 61), нейроактивных соединений, в частности гормона роста человека, гидроксида алюминия, фосфата алюминия, полных или неполных адъювантов Фрейнда, или их комбинаций. Предпочтительно иммуностимулирующее вещество представляет собой комбинацию либо поликатионного полимера и иммуностимулирующих дезоксинуклеотидов, либо пептида, содержащего по меньшей мере два мотива LysLeuLys, и иммуностимулирующих дезоксинуклеотидов, предпочтительно комбинацию KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 61) и олиго(dIdC)₁₃ (SEQ ID NO: 63). Более предпочтительно указанный поликатионный пептид представляет собой полиаргинин.

В дополнительном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фосфат натрия, хлорид натрия, L-метионин, сахарозу и полисорбат-20 (Твин-20) при pH, составляющем 6,7±0,2. Предпочтительно фармацевтическая композиция также содержит гидроксид алюминия, предпочтительно в концентрации, составляющей 0,15%.

В одном варианте реализации изобретения препарат содержит от 5 до 50 мМ фосфата натрия, от 100 до 200 мМ хлорида натрия, от 5 до 25 мМ L-метионина, от 2,5 до 10% сахарозы, от 0,01 до 0,1% Твин-20 и от 0,1 до 0,2% (мас./об.) гидроксида алюминия. Более предпочтительно препарат содержит 10 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 10 мМ L-метионина, 5% сахарозы, 0,05% Твин-20 и 0,15% (мас./об.) гидроксида алюминия при pH, составляющем 6,7±0,2. Еще более предпочтительно препарат содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три гетеродимера мутантного OspA по данному изобретению.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит три гетеродимера, предпочтительно Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29), Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33). Предпочтительно три гетеродимера смешивают в молярном соотношении, составляющем 1:2:1, 1:3:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:2:2, 1:2:3, 1:3:2, 1:3:3, 2:1:1, 2:1:2, 2:1:3, 2:2:1, 2:3:1, 2:3:2, 2:3:3, 3:1:1, 3:1:2, 3:1:3, 3:2:1, 3:2:2, 3:2:3, 3:3:1, 3:3:2, наиболее предпочтительно 1:1:1.

В дополнительном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит два гетеродимера, предпочтительно Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33), Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29) и Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27) или Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33) в молярном соотношении, составляющем 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 2:3, 3:2, предпочтительно 1:1.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция или вакцина по данному изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный антиген из *Borrelia* или патогена, отличного от *Borrelia* (называется в общем в данном документе как "комбинированная фармацевтическая композиция или вакцина"). В предпочтительном варианте реализации изобретения по меньшей мере один дополнительный антиген получен из видов *Borrelia*, вызывающих боррелиоз Лайма. В разных аспектах по меньшей мере один дополнительный антиген получен из другого патогена, предпочтительно патогена, переносимого клещами. В дополнительном аспекте патоген вызывает пятнистую лихорадку Скалистых гор, гранулоцитарный эрлихиоз человека (ГЭЧ), лихорадку сеннецу, моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), анаплазмоз, средиземноморскую пятнистую лихорадку, риккетсиоз *Rickettsia parkeri*, южную ассоциированную с клещами сыпную лихорадку (STARI), пятнистую лихорадку, вызванную *Helvetica*, риккетсиоз 364D, африканский сыпной тиф, эпидемический возвратный тиф, туляремию, колорадскую клещевую лихорадку, клещевой энцефалит (ТБЕ, также известный как FSME), конго-крымскую геморрагическую лихорадку, австралийскую лихорадку Q, омскую геморрагическую лихорадку, киасанурскую лесную болезнь, энцефалит Повассан, вирусное заболевание Хартленда или бабеиоз. В дополнительном аспекте заболевание представляет собой японский энцефалит.

В дополнительном варианте реализации изобретения по меньшей мере один дополнительный антиген получен из трансмиссивного, предпочтительно переносимого клещами, патогена, выбранного из группы, включающей *Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia turicatae*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conori*, *Rickettsia helvetica*, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia sennetsu*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Neoehrlichia mikurensis*, *Coxiella burnetii* и *Borrelia lonestari*, вируса клещевого энцефалита (вируса TBEV, также известного как FSME), вируса колорадской клещевой лихорадки (CTFV), вируса конго-крымской геморрагической лихорадки (CCHFV), вируса омской геморрагической лихорадки (OHFV), вируса японского энцефалита (JEV) и видов *Babesia*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и дополнительный антиген, как определено выше, при этом по меньшей мере один дополнительный антиген состоит из второй композиции, в частности, при этом вторая композиция представляет собой вакцину, предпочтительно вакцину против клещевого энцефалита, вакцину против японского энцефалита или вакцину против пятнистой лихорадки Скалистых гор. Первая композиция может также представлять собой вакцину. Комбинированная фармацевтическая композиция или вакцина по данному изобретению включает любую композицию, рассматриваемую в данном документе, в комбинации, по меньшей мере, со второй (вакцинной) композицией. В некоторых аспектах вторая вакцинная композиция защищает от трансмиссивного заболевания, предпочтительно передаваемого клещами заболевания. В различных аспектах вторая вакцинная композиция имеет сезонную схему иммунизации, сравнимую с иммунизацией против инфекции *Borrelia* или боррелиоза Лайма. В других аспектах комбинированные вакцины пригодны для профилактики ряда заболеваний для применения в географических районах, где эти заболевания широко распространены.

В одном аспекте вторая композиция представляет собой вакцину, выбранную из группы, состоящей из вакцины против клещевого энцефалита, вакцины против японского энцефалита и вакцины против пятнистой лихорадки Скалистых гор. В предпочтительном аспекте вакцинная композиция представляет собой FSME-IMMUN® (Baxter), Encepur® (Novartis Vaccines), EnceVir® (Microgen NPO) или TBE Moscow Vaccine® (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова Российской академии медицинских наук). В другом предпочтительном аспекте вакцинная композиция представляет собой IXIARO®/JESPECT® (Valneva SE), JEEV® (Biological E, Ltd.) или IMOJEV® (Sanofi Pasteur).

Дополнительно предлагается фармацевтическая композиция, которая представляет собой вакцину, при этом указанная вакцина может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В предпочтительном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество представляет собой L-метионин.

Данное изобретение также включает иммуногенные композиции. В некоторых аспектах иммуногенная композиция по данному изобретению включает любую из композиций, рассматриваемых в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В разных аспектах иммуногенная композиция обладает свойством индуцировать продуцирование антитела, которое специфически связывается с внешним поверхностным белком А (OspA). В некоторых аспектах иммуногенная композиция обладает свойством индуцировать продуцирование антитела, которое специфически связывается с *Borrelia*. В конкретных аспектах иммуногенная композиция обладает свойством индуцировать синтез антитела, которое нейтрализует *Borrelia*. В некоторых аспектах антитело продуцируется животным. В дополнительных аспектах животное является млекопитающим. В других дополнительных аспектах млекопитающее является человеком.

Препараты вакцины, содержащие фармацевтические композиции по настоящему изобретению, могут применяться для защиты млекопитающего, восприимчивого к инфекции *Borrelia*, или лечения млекопитающего с инфекцией *Borrelia* посредством введения указанной вакцины системно или через слизистую оболочку. Такое введение может включать инъекцию внутримышечным, внутривенным, внутривнутренним или подкожным способом или введение через слизистую оболочку в ротовую полость/пищеварительный тракт, дыхательные пути или мочеполовой тракт. Хотя вакцина по данному изобретению может вводиться в однократной дозе, ее компоненты также могут быть введены совместно в одно и то же время или в разное время.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается набор вакцины, включающий флакон, содержащий фармацевтическую композицию по данному изобретению, необязательно в лиофилизированной форме, и дополнительно включающий флакон, содержащий адъювант, как описано в данном документе. Предполагается, что в этом аспекте данного изобретения адъювант будет применяться для разведения лиофилизированной иммуногенной композиции. В дополнительном аспекте фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть предварительно смешана во флаконе, предпочтительно в шприце.

Дополнительный аспект данного изобретения представляет собой способ профилактики или лечения инфекции *Borrelia* у субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты

по настоящему изобретению, антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Дополнительный аспект данного изобретения представляет собой способ иммунизации субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Еще один аспект относится к способу иммунизации животного или человека против инфицирования организмом *Borrelia*, включающему стадию введения указанному животному или человеку эффективного количества полипептида по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, при этом эффективное количество является подходящим для индукции иммунного ответа у указанного животного или человека.

Еще один аспект относится к способу стимуляции иммунного ответа у животного или человека против организма *Borrelia*, включающему стадию введения указанному животному или человеку эффективного количества полипептида по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, при этом эффективное количество является подходящим для стимуляции иммунного ответа у указанного животного или человека.

Предпочтительно организм *Borrelia* выбирают из группы, включающей *B. burgdorferi*, в частности *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* или *B. sinica*, предпочтительно - *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* или *B. garinii*.

В одном варианте реализации изобретения предлагается способ профилактики или лечения первичного и/или повторяющихся эпизодов инфекции *Borrelia*, включающий введение хозяину иммунопротективной дозы фармацевтической композиции или вакцины, или набора по данному изобретению.

Дополнительным аспектом изобретения является фармацевтическая композиция по данному изобретению для применения в лечении или профилактике боррелиозного заболевания. В одном варианте реализации изобретения предлагается фармацевтическая композиция для применения в лечении или профилактике инфекции *Borrelia*.

Дополнительный аспект данного изобретения представляет собой применение фармацевтической композиции или вакцины, или набора по данному изобретению в производстве лекарственных средств для лечения или профилактики инфекции *Borrelia*. В одном варианте реализации изобретения предлагается фармацевтическая композиция по данному изобретению для применения в производстве лекарственных средств для лечения или профилактики инфекции *Borrelia*.

Данное изобретение также включает способы индукции иммунологической реакции у субъекта. В разных аспектах такие способы включают стадию введения субъекту любой из иммуногенных композиций или вакцинных композиций, рассматриваемых в данном документе, в количестве, эффективном для индукции иммунологической реакции. В некоторых аспектах иммунологическая реакция включает продуцирование антитела к *OsprA*.

Данное изобретение включает способы профилактики или лечения инфекции *Borrelia* или боррелиоза Лайма у субъекта. В разных аспектах такие способы включают стадию введения субъекту любой из вакцинных композиций, рассматриваемых в данном документе, или любой из комбинированных вакцин, рассматриваемых в данном документе, в количестве, эффективном для профилактики или лечения инфекции *Borrelia* или боррелиоза Лайма.

Данное изобретение включает применение полипептидов, нуклеиновых кислот, антител, фармацевтических композиций или вакцин по данному изобретению для получения лекарственных средств. Другие родственные аспекты изобретения также предлагаются в данном изобретении.

Авторами изобретения предусмотрено, что термины "включающий (содержащий)", "включать (содержать)" и "включает (содержит)" в данном документе, необязательно, могут быть заменены терминами "состоящий из", "состоять из" и "состоит из" соответственно в каждом случае. Термин "содержит" означает "включает". Таким образом, если контекст не предусматривает иного, слово "включает (содержит)" и его вариации, такие как "включают (содержат)" и "включающий (содержащий)", следует понимать, как означающие включение указанного соединения или композиции (например, нуклеиновой кислоты, полипептида, антитела), или стадии, или группы соединений или стадий, но не исключающие любые другие соединения, композиции, стадии или их группы. Слово "например" применяется в данном документе, чтобы указать на неограничивающий пример.

Варианты реализации изобретения, в данном документе относящиеся к "вакцинным композициям" по данному изобретению, также применимы к вариантам реализации изобретения, относящимся к "фармацевтическим композициям" по данному изобретению, и наоборот.

Если не объяснено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой принадлежит данное описание. Определение распространенных терминов в молекулярной биологии может быть

найден в публикации Benjamin Lewin, Genes V, опубликованной Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, опубликованной Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); и Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, опубликованной VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1 -56081 -569-8).

Обозначения единственного числа подразумевают и множественное число, если только контекст четко не указывает на иное. Аналогичным образом, слово "или" предназначено включать "и", если только контекст четко не указывает на иное. Термин "множество" означает два или больше. Также следует понимать, что все размеры оснований или размеры аминокислот и все значения молекулярного веса или молекулярной массы, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и приведены с целью описания. Кроме того, цифровые ограничения, приведенные с учетом концентраций или уровней вещества, такого как антиген, могут быть приблизительными.

Предпочтительный носитель или вспомогательное вещество для полипептидов по настоящему изобретению в их разных вариантах реализации или для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляют собой иммуностимулирующее соединение, такое как адъювант для дополнительной стимуляции иммунного ответа на полипептид по настоящему изобретению или кодирующую его молекулу нуклеиновой кислоты.

Адъюванты или иммуностимулирующие соединения могут применяться в композициях по данному изобретению. Предпочтительно иммуностимулирующее соединение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению выбирают из группы поликатионных веществ, в частности поликатионных пептидов, иммуностимулирующих молекул нуклеиновых кислот, предпочтительно иммуностимулирующих дезокси-нуклеотидов, эмульсий типа "масло в воде" или "вода в масле", MF59, солей алюминия, полного адъюванта Фрейнда, неполного адъюванта Фрейнда, нейроактивных соединений, в частности, гормона роста человека или их комбинаций.

Применение адъюванта в виде гидроксида алюминия и/или фосфата алюминия является особенно предпочтительным, и антигены, как правило, адсорбируются на этих солях. Предпочтительно гидроксид алюминия присутствует в конечной концентрации, составляющей 0,15%. Приемлемым адъювантом на основе фосфата алюминия является аморфный гидрокси-фосфат алюминия с молярным соотношением PO_4/Al , составляющим от 0,84 до 0,92. Другой адъювант, применимый в настоящем изобретении, представляет собой соль алюминия, которая способна обеспечивать водную композицию, содержащую менее 350 ppb (частей на миллиард) тяжелых металлов в расчете на вес водной композиции. Другой приемлемый адъювант на основе алюминия представляет собой ASO_4 , комбинацию гидроксида алюминия и монофосфорил липида А (МФЛ).

Кроме того, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит по меньшей мере одно из следующих соединений или их комбинации: молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, полипептиды по настоящему изобретению в их разных вариантах реализации, вектор по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению и антигено по настоящему изобретению. В связи с этим любое из этих соединений может применяться в комбинации с нестерильным или стерильным носителем или носителями для применения с клетками, тканями или микроорганизмами, таким как фармацевтический носитель, подходящий для введения субъекту. Такие носители могут включать, без ограничения ими, солевой раствор, забуференный раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Препарат должен соответствовать способу введения.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Термин "стабилизатор" относится к веществу или вспомогательному веществу вакцины, которое защищает иммуногенную композицию вакцины от неблагоприятных условий, таких как условия, возникающие в ходе нагревания или замерзания, и/или продлевает стабильность или срок хранения иммуногенной композиции в стабильных и иммуногенных условиях или состоянии. Примеры стабилизаторов включают, без ограничения ими, сахара, такие как сахароза, лактоза и манноза; сахарные спирты, такие как маннит; аминокислоты, такие как глицин или глутаминовая кислота; и белки, такие как сывороточный альбумин человека или желатин.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены любым эффективным, удобным способом, включая, например, местное применение, пероральный, анальный, вагинальный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, интраназальный, интратрахеальный или внутрикожный способы, наряду с некоторыми другими. В предпочтительном варианте реализации изобретения фармацевтические композиции вводят подкожно или внутримышечно, наиболее предпочтительно внутримышечно.

В терапии или в качестве профилактического средства действующее вещество фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть введено индивидууму в виде композиции для инъекций, например в виде стерильной водной дисперсии, предпочтительно изотонической.

В альтернативном варианте композиции, предпочтительно фармацевтическая композиция, может быть изготовлена для местного применения, например, в форме мазей, лосьонов, глазных мазей, глазных капель, ушных капель, жидкости для полоскания рта, пропитанных повязок и шовных материа-

лов, а также аэрозолей и может содержать обычные подходящие добавки, в том числе, например, консерванты, растворители для содействия проникновению лекарственного средства, и смягчающие средства в виде мазей и кремов. Такие препараты для местного применения могут также содержать совместимые обычные носители, например основы кремов или мазей, а также этанол или олеиловый спирт для лосьонов. Содержание таких носителей может составлять от около 1 до около 98% по массе препарата; чаще оно будет составлять до около 80% по массе препарата.

В дополнение к описанной выше терапии, композиции по настоящему изобретению могут применяться, как правило, в качестве вещества для обработки ран, с целью предупреждения адгезии бактерий к матричным белкам, контактирующим с раненой тканью, и для профилактического применения в лечении зубов, в качестве альтернативы или в сочетании с антибиотикопрофилактикой.

В предпочтительном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция представляет собой вакцинную композицию. Предпочтительно такая вакцинная композиция обычно находится в инъекционной форме. Обычные адъюванты могут применяться для усиления иммунного ответа. Подходящая стандартная доза для вакцинации белковым антигеном для взрослых составляет от 0,02 до 3 мкг антигена на 1 кг массы тела и для детей от 0,2 до 10 мкг антигена на 1 кг массы тела, и такую дозу предпочтительно вводят от 1 до 3 раз с интервалами, составляющими 2-24 недели.

При указанном интервале дозы от соединений по данному изобретению не ожидается никакого неблагоприятного токсикологического воздействия, которое помешало бы их введению подходящим индивидуумам.

В качестве дополнительного аспекта изобретение включает наборы, содержащие один или более фармацевтических препаратов для введения субъекту, упакованные таким способом, который облегчает их применение для введения субъектам. В предпочтительном варианте реализации изобретения наборы содержат препарат в конечном объеме, составляющем 2 мл, более предпочтительно в конечном объеме, составляющем 1 мл.

В конкретном варианте реализации данное изобретение включает наборы для получения единицы введения однократной дозы. В разных аспектах каждый из наборов содержит первый контейнер, содержащий сухой белок, и второй контейнер, содержащий водный препарат. В пределах объема этого изобретения также включены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким наполнением или шприцы с лиофилизатом).

В другом варианте реализации изобретения такой набор содержит фармацевтический препарат, описанный в данном документе (например, композицию, содержащую терапевтический белок или пептид), упакованный в контейнер, такой как герметически закрытый флакон или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или вложенной в упаковку, на которой описано применение соединения или композиции при практической реализации этого способа. В одном варианте реализации изобретения фармацевтический препарат упакован в контейнер таким образом, чтобы размер свободного пространства в контейнере (например, количество воздуха между жидким препаратом и верхним краем контейнера) был очень малым. Предпочтительно, чтобы размер свободного пространства был незначительным (т.е., чтобы пространство почти отсутствовало).

В одном аспекте набор содержит первый контейнер, содержащий композицию терапевтического белка или пептида, и второй контейнер, содержащий физиологически приемлемый раствор для разведения композиции. В одном аспекте фармацевтический препарат упакован в стандартной лекарственной форме. Набор необязательно дополнительно содержит устройство, подходящее для введения фармацевтического препарата в соответствии с конкретным способом введения. В некоторых аспектах набор содержит этикетку, на которой описано применение фармацевтических препаратов.

Фармацевтическая композиция может содержать ряд разных антигенов. Примерами антигенов являются цельные убитые или ослабленные организмы, субфракции этих организмов, белки или, в их самой простой форме, пептиды. Антигены также могут быть распознаны иммунной системой в форме гликозилированных белков или пептидов и могут также представлять собой полисахариды или липиды или содержать их. Могут применяться короткие пептиды, так как цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ) распознают антигены в форме коротких, как правило, составляющих 8-11 аминокислот в длину пептидов в сочетании с главным комплексом гистосовместимости (ГКГС). В-клетки могут распознавать линейные эпитопы, составляющие только 4-5 аминокислот в длину, а также трехмерные структуры (конформационные эпитопы).

В предпочтительном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция по другому аспекту изобретения дополнительно содержит гипериммунный сывороточно-реакционный антиген против белка *Boagrelia* или его активного фрагмента или варианта, такого как, например, антигены, фрагменты и варианты, описанные в WO 2008/031133.

В соответствии с данным изобретением фармацевтическая композиция по другому аспекту может применяться в качестве лекарственного средства, в частности в качестве вакцины, в связи с заболеванием или патологическим состоянием, вызванным или ассоциируемым с *Boagrelia*.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может применяться в качестве лекарственного средства, в частности в качестве вакцины, в частности, в связи с заболеванием или патологи-

ческим состоянием, вызванным, связанным или ассоциируемым с *Borrelia*, более предпочтительно любыми патогенными видами *Borrelia* и более предпочтительно в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*, в частности инфекции *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. spielmanii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* или *B. sinica*, предпочтительно инфекции *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* или *B. garinii*.

В связи с этим следует отметить, что разные виды *Borrelia*, в том числе *B. burgdorferi* s.l., включают несколько видов и штаммов, в том числе виды и штаммы, раскрытые в данном документе. Заболевание, связанное, вызванное или ассоциируемое с бактериальной инфекцией, подлежащее профилактике и/или лечению по настоящему изобретению, включает боррелиоз Лайма (болезнь Лайма). Дополнительные аспекты, симптомы, стадии и подгруппы боррелиоза Лайма, а также конкретные группы пациентов, страдающих таким заболеванием, которые также описаны в данном документе, в том числе во вступительной части, включены в данный документ посредством ссылки. В частности, боррелиоз Лайма, как правило, протекает в несколько стадий, с ремиссией и обострениями и разными клиническими проявлениями на каждой стадии. Стадия 1, ранняя инфекция, заключается в локализованной инфекции кожи, за которой через несколько дней или недель следует стадия 2, диссеминированная инфекция, и через месяцы или годы - стадия 3, хроническая инфекция. Тем не менее, инфекция является вариативной; у некоторых пациентов присутствуют только локализованные инфекции кожи, тогда как у других болезнь проявляется только на более поздних стадиях, например, в виде артрита.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики инфекции *Borrelia* у субъекта, нуждающегося в этом, включающему стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с третьим аспектом.

Термин "субъект" применяется по тексту данного документа для описания животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека, для которого раскрывается лечение или способ по настоящему изобретению. Для лечения таких инфекций, состояний или патологических состояний, которые являются специфическими для конкретного животного, такого как пациент-человек, термин "пациент" означает такое конкретное животное. Предпочтительно субъект представляет собой человека; тем не менее, медицинское применение композиции может также включать животных, таких как домашние птицы, в том числе куры, индюки, утки или гуси, скот, в том числе лошади, коровы или овцы, или домашние животные, в том числе собаки или коты.

Термин "эффективное количество" применяется по тексту данного документа для описания количества присутствующей фармацевтической композиции, которое применяется для индукции желаемого результата, при применении в способе по настоящему изобретению. В многочисленных аспектах настоящего изобретения термин "эффективное количество" употребляется в сочетании с лечением или профилактикой. В других аспектах термин "эффективное количество" просто относится к количеству вещества, дающему результат, который рассматривается как благоприятный или положительный, в том числе и в способах по настоящему изобретению, претендующих на лечение или профилактику инфекции *Borrelia*.

Термин "эффективное количество" относительно описанных на настоящий момент соединений и композиций применяется по тексту данного документа для описания такого количества соединения по настоящему изобретению, которое вводят пациенту-млекопитающему, в частности, в том числе пациенту-человеку, страдающему от заболевания, связанного с *Borrelia*, для уменьшения или ингибирования инфекции *Borrelia*.

В предпочтительном варианте реализации изобретения способ иммунизации субъекта в соответствии с указанным выше аспектом включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по третьему аспекту настоящего изобретения.

Данный способ включает индуцирование иммунологической реакции у индивидуума с помощью генной терапии или иным образом, посредством введения полипептида или нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению *in vivo*, с целью стимуляции иммунологической реакции для продуцирования антител или клеточно-опосредованной реакции Т-клеток, либо цитокин-продуцирующих Т-клеток, либо цитотоксических Т-клеток, с целью защиты указанного индивидуума от заболевания, независимо от того, возникло уже заболевание у индивидуума или нет.

Продукты по настоящему изобретению, в частности полипептиды и нуклеиновые кислоты, предпочтительно предоставляются в выделенной форме и могут быть очищены до гомогенного состояния. Термин "выделенный" при использовании по тексту данного документа означает выделенный "человеком вручную" из его естественного состояния, т.е., если вещество встречается в природе, его модифицируют или извлекают из исходного окружения или осуществляют оба процесса. Например, природная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, в норме присутствующие в живом организме в его естественном состоянии, не являются "выделенными", но такая же молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, выделенные из материалов, которые окружают его в естественном состоянии, являются "выделенными", в том значении, в котором термин употребляется в данном документе. Как часть выделения или в последующем состоянии, такие молекулы нуклеиновых кислот могут быть присоединены к другим молекулам нуклеиновых кислот, таким как молекулы ДНК, например, с целью мутагенеза, с об-

разованием слитых генов и для разведения или экспрессии в организме хозяина. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, отдельно или присоединенные к другим молекулам нуклеиновых кислот, таким как векторы, могут быть введены в клетки-хозяева, в культуре или в цельных организмах. Введенные в клетки-хозяева в культуре или в цельных организмах, такие молекулы ДНК все еще являются выделенными в том значении, в котором данный термин употребляется в данном документе, поскольку их не может быть в естественной форме или окружении. Аналогичным образом, молекулы нуклеиновых кислот и полипептиды могут встречаться в композициях, таких как препараты среды, растворы для введения молекул нуклеиновых кислот или полипептидов, например, в клетки, композиции или растворы для химических или ферментативных реакций, например, которые не являются природными композициями, и, таким образом, остаются выделенными молекулами нуклеиновых кислот или полипептидами в пределах значения указанного термина, который применяется в данном документе.

Данное изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реактивами, описанными в данном документе, так как они могут меняться. Кроме того, терминология, используемая в данном документе, применяется только с целью раскрытия конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения. При использовании по тексту данного документа и прилагаемой формуле изобретения слова в единственном числе означают также множественное число, если из контекста явно не следует иное. Аналогичным образом, слова "включать", "содержать" и "охватывать" следует интерпретировать как обозначающие включение, а не исключение.

Если не определено иное, все технические и научные термины и любые акронимы, используемые в данном документе, имеют такие же значения, обычно понятные специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или равноценные раскрытым в данном документе, могут применяться в реализации данного изобретения на практике, предпочтительными способами и материалами являются описанные в данном документе.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется фигурами, таблицами, примерами и Перечнем последовательностей, из которых могут быть выведены последующие признаки, варианты реализации и преимущества. В связи с этим конкретные обсуждаемые модификации не следует интерпретировать как ограничивающие объем данного изобретения. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что разнообразные эквиваленты, изменения и модификации могут быть осуществлены без отклонения от объема изобретения, и, таким образом, следует понимать, что такие равноценные варианты реализации должны быть включены в данное изобретение.

В связи с настоящим изобретением:

Фиг. 1 иллюстрирует изоконтуры электростатического потенциала стабилизированных дисульфидной связью фрагментов OspA серотипов 1-6 и *B. valaisiana* (S1D1-S6D1 и BvaD1), а также мутантного слитого фрагмента OspA по данному изобретению, состоящего из аминокислот 125-176 *B. valaisiana*, штамм VS116, и аминокислот 177-274 *B. garinii*, штамм PBr, с введенной дисульфидной связью (S3hybD1).

Фиг. 2 иллюстрирует аминокислотное выравнивание Lip-S4D1-S3hybD1, гетеродимерного белка, содержащего мутантный слитый фрагмент OspA серотипа 3, по данному изобретению, относительно гетеродимерного белка Lip-S4D1-S3D1.

Фиг. 3 схематически иллюстрирует получение гетеродимеров мутантного фрагмента OspA в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 4 схематически иллюстрирует полипептидные компоненты фармацевтической композиции по настоящему изобретению, "улучшенной комбинированной вакцины", содержащей три разных гетеродимера мутантных OspA, в том числе Lip-S4D1-S3hybD1.

Фиг. 5 иллюстрирует химическую структуру Pam₃Cys, примера замещенного жирной кислотой цистеина, такого, который находился бы на N-конце липидизированных полипептидов по настоящему изобретению.

Фиг. 6 иллюстрирует титры антител IgG к белкам *Borrelia* OspA серотипов 1-6, полученным у мышей в ответ на иммунизацию улучшенной комбинированной вакциной на основе гетеродимера по данному изобретению.

Фиг. 7 иллюстрирует связывание антител из мышей, иммунизированных улучшенной комбинированной вакциной на основе гетеродимера по данному изобретению, с поверхностью клеток спирохет *Borrelia* серотипов 1-6 OspA.

Таблица 1 сравнивает выход после очистки гетеродимера Lip-S4D1-S3hybD1 и гетеродимера Lip-S4D1-S3D1.

Таблица 2 иллюстрирует защитную способность улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера по данному изобретению от заражения *in vivo* серотипами 1, 2, 5 и 6 OspA *Borrelia*.

Фигуры и таблицы, на которые могут быть сделаны ссылки в данном документе, описаны ниже более подробно.

Фиг. 1 Моделирование электростатического потенциала стабилизированных дисульфидной связью фрагментов OspA из серотипов 1-6 (S1D1-S6D1) и *B. valaisiana* (BvaD1), а также стабилизированного дисульфидной связью слитого фрагмента OspA (S3hybD1). Изоконтуры (± 1 kT/e) имеют светлую окраску

для отрицательных зарядов и темную - для положительных зарядов, в виде участков сплошной заливки. Доступная для растворителя поверхность визуализируется в виде каркасного представления. Белые стрелки указывают на положение двух увеличенных кластеров, приводящих к появлению электростатической полярности на одной плоскости фрагмента серотипа 3. Можно видеть, что поверхности гибридного С-концевого фрагмента OspA не обладают увеличенными электростатическими полярными кластерами, как мономер S3D1.

Фиг. 2 Выравнивание аминокислотных последовательностей гетеродимерных полипептидов Lip-S4D1-S3hybD1 и Lip-S4D1-S3D1 с иллюстрированием консенсусной последовательности. В общей сложности гетеродимер Lip-S4D1-S3hybD1 отличается от гетеродимера Lip-S4D1-S3D1 лишь на 31 аминокислоту.

Фиг. 3 Получение гетеродимера мутантного OspA по данному изобретению, содержащего два мутантных С-концевых фрагмента OspA, выбранных из разных серотипов OspA вида *Borrelia*, или гибридный мутантный С-концевой фрагмент OspA. (А) Схематическое изображение нуклеиновой кислоты, кодирующей липидизированный гетеродимер мутантного OspA. Компоненты, в направлении от 5' к 3', включают кодирующие последовательности для сигнальной последовательности липидизации (сигнал Lip), пептид CSS для N-концевой липидизации, мутантный С-концевой фрагмент OspA с двумя неприродными остатками цистеина, короткий линкерный пептид (LN1), за которыми следует второй мутантный С-концевой фрагмент OspA с двумя неприродными остатками цистеина. (Б) Промежуточный гетеродимерный полипептид мутантного OspA содержит вновь образованный продукт, непосредственно после трансляции конструктора нуклеиновой кислоты. От N- к С-концу, этот полипептид состоит из сигнальной последовательности липидизации (сигнал Lip), пептида CSS для липидизации, мутантного фрагмента OspA с неприродной дисульфидной связью, короткого линкерного пептида (LN1), за которыми следует второй мутантный фрагмент OspA с неприродной дисульфидной связью. (В) Конечный липидизированный гетеродимерный полипептид мутантного OspA после посттрансляционной модификации. Гетеродимер, от N- к С-концу, состоит из пептида CSS с липидизированным N-концевым цистеином, стабилизированного дисульфидной связью мутантного фрагмента OspA, линкерного пептида (LN1) и стабилизированного дисульфидной связью второго мутантного фрагмента OspA. Сигнальная последовательность липидизации отщепляется в ходе посттрансляционной модификации полипептида, как проиллюстрировано.

Фиг. 4 Пример предпочтительной фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. В композиции присутствуют три гетеродимера мутантного OspA, каждый из которых содержит два мутированных фрагмента OspA, выбранных из разных серотипов OspA *Borrelia*, или гибридный мутантный С-концевой фрагмент OspA (S3hybD1), вместе обеспечивая антигены OspA из шести различных серотипов OspA *Borrelia*. Такая фармацевтическая композиция обеспечивает одновременную иммунизацию против шести серотипов *Borrelia*.

Фиг. 5 Иллюстрация химической структуры Pam₃Cys, примера жирнокислотного замещения N-концевого цистеина полноразмерного белка OspA дикого типа, а также липидизированных гетеродимеров мутантного фрагмента OspA по данному изобретению. В ходе посттрансляционной модификации полноразмерного белка OspA или полипептидов по данному изобретению N-концевая сигнальная последовательность липидизации отщепляется и жирные кислоты, чаще всего три пальмитоильных фрагмента ("Pam₃"), под воздействием ферментов присоединяются ковалентной связью к N-концевому остатку цистеина (атом серы, "S", указан стрелкой). Остальные остатки полипептидной цепи, которые расположены в С-концевом положении от остатка Pam₃Cys, представлены с помощью "Xn". (Модифицировано из Bouchon, et al. (1997), *Analytical Biochemistry*, 246: 52-61).

Фиг. 6 Титры антител, сгенерированные для всех шести серотипов полноразмерных белков OspA. Мышей трижды иммунизировали по 3 мкг каждой из указанных комбинированных вакцин: Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3D1 и Lip-S5D1-S6D1 вместе в соотношении, составляющем 1:1:1 ("Het combo"); Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3hybD1 и Lip-S5D1-S6D1 вместе в соотношении, составляющем 1:1:1 ("улучшенная het combo"), или Lip-Chimeric OspA ST1/ST2-His, Lip-Chimeric OspA ST5/ST3-His и Lip-Chimeric OspA ST6/ST4-His вместе в соотношении, составляющем 1:1:1 ("Chimera combo"), с интервалом в две недели, и собирали сыворотки через неделю после введения последней дозы. Титры антител IgG к шести различным серотипам полноразмерных белков OspA определяли с помощью ТИФА.

Фиг. 7 Связывание антител из иммунизированных мышей с клеточной поверхностью спирохет *Borrelia*. Мышей иммунизировали, как описано выше, и собирали сыворотки через неделю после последней дозы и объединяли. Серийные разведения сывороток испытывали на связывание с клеточной поверхностью спирохет *Borrelia* посредством окрашивания клеток и проточной цитометрии. Значения интенсивности флуоресценции, наблюдаемые при окрашивании сыворотками, полученными из контрольных мышей, иммунизированных только адъювантом Al(OH)₃, вычитали для учета неспецифического связывания. (Для анализа связывания применяли следующие виды *Borrelia*: *B. burgdorferi*, серотип 1 OspA, штамм N40; *B. afzelii*, серотип 2 OspA, штамм PKO; *B. garinii*, серотип 3 OspA, штамм Fr; *B. baviensis*, серотип 4 OspA, штамм Fin; *B. garinii*, серотип 5 OspA, штамм PHei; *B. garinii*, серотип 6 OspA, штамм KL11).

Примеры

Пример 1. Молекулярное моделирование гибридного С-концевого фрагмента OspA серотипа 3.

Причины конструировать гибридные С-концевые фрагменты ST3 OspA.

Комбинированная вакцина против боррелиоза Лайма, как описано в предыдущей заявке авторов данного изобретения (WO 2014/006226), состоит из трех гетеродимеров мутантного OspA. Короткие стабилизированные фрагменты из двух различных серотипов (ST) OspA, полученных из С-концевого домена, сливаются с коротким линкером с образованием гетеродимера. Три данных гетеродимера состоят из ST1-ST2, ST4-ST3 и ST5-ST6 OspA. Для улучшения иммуногенности гетеродимеров сигнальную последовательность для липидизации добавляют по аналогии со зрелым полноразмерным OspA, который представляет собой липопротеин.

Липидизированный гетеродимер, состоящий из ST4-ST3 OspA (Lip-S4D1-S3D1; SEQ ID NO: 31), оказался менее растворимым, чем два других гетеродимера, что привело к низкому восстановлению во время очистки. Эта проблема в большинстве случаев может быть связана с коротким стабилизированным участком ST3 OspA, так как этот белок, как липидизированный мономер, не может быть экспрессирован и очищен.

Молекулярное моделирование.

Было выполнено сравнительное структурное исследование стабилизированных мономеров *in silico* для установления совместимости фолдинга между моделями мономера по сравнению с кристаллической структурой OspA (PDB:1OSP; Li H., Dunn J.J., Luft B.J., Lawson C.L. (1997), Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:3584-3589) и для сравнения их поверхностных свойств с мономером типа ST3. Кристаллическая структура представляет серотип 1 *Borrelia burgdorferi*, штамм B31, и иллюстрирует связь OspA с его N-концом, с мышинным антителом Fab 184.1. Гомологичные структурные модели шести коротких стабилизированных мономеров OspA конструировали, начиная с кристаллической структуры ST1 OspA и доступных гомологичных моделей (SwissModel; Kiefer F., Arnold K., Kunzli M., Bordoli L., Schwede T. (2009), The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nucleic Acids Res 37:D387-392), которые затем были модифицированы с целью включения стабилизирующих дисульфидных связей и изменений последовательности, в случае целесообразности (The PyMOL Molecular Graphics System, Version Open-Source, Schrödinger LLC).

Изокоординаты электростатического потенциала всех шести коротких стабилизированных мономеров OspA моделировали с помощью адаптивного решателя Пуассона-Больцмана (APBS; Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J., McCammon J.A. (2001), Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:10037-10041, pdb2pqr; Dolinsky T.J., Czodrowski P., Li H., Nielsen J.E., Jensen J.H., et al. (2007), PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. Nucleic Acids Res 35: W522-525) с целью определения того, имеет ли короткий стабилизированный белок ST3 OspA профиль в электростатике поверхности, который отличается от других ST OspA, что могло бы объяснить проблему растворимости короткого стабилизированного ST3 OspA ("S3D1", фиг. 1). Значительная полярность в распределении заряда наблюдалась на одной стороне S3D1 (см. стрелки), чего не наблюдалось ни в одном из других коротких стабилизированных ST OspA.

Моделирование электростатического потенциала было также осуществлено с коротким стабилизированным OspA из *B. valaisiana* ("BvaD1", фиг. 1). Фрагмент BvaD1 OspA продемонстрировал различную полярность изокоординат электростатического потенциала на поверхности, что сделало его потенциальным элементом-кандидатом для частичного обмена сегментами с целью модификации всей поверхности, чтобы не демонстрировать какие-либо существенно увеличенные кластеры увеличенной электростатической полярности, встречающиеся в S3D1. Выбирали предпочтительное соединение между частью серотипа 3 и полученной в результате обмена частью из *B. valaisiana* в гибридном мономере, чтобы заменить N-концевой бета-лист мономера и чтобы оставить два бета-листа и С-концевую спираль участка серотипа 3 нетронутыми, при сохранении общего фолдинга. Последнее условие в значительной степени зависит от пространственной совместимости гидрофобных остатков с высокой плотностью расположения в ядре молекулы. Совместимость фолдинга для модели гибридного стабилизированного мономера, S3hybD1, проверяли с помощью молекулярно-механического моделирования (Gromacs; Pronk S., Pall S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., et al. (2013), GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinformatics, 29: 845-854).

Применение в виде гетеродимеров, содержащих гибридный фрагмент OspA.

В результате моделирования электростатического потенциала новый гетеродимер, содержащий исследуемое слияние фрагментов белков OspA из *B. valaisiana* и *B. garinii* (S3hybD1, фиг. 1), клонировали: Lip-S4D1-S3hybD1. В дополнение к изменениям первой трети фрагмента OspA серотипа 3 в гетеродимере, S4D1-S3hybD1, по сравнению с Lip S4D1-S3D1, была введена аминокислотная замена в положении 233 (P233T, нумерация аминокислот в соответствии с незрелым полноразмерным OspA; SEQ ID NO: 8) ST3 OspA.

Как более подробно проиллюстрировано ниже, этот новый гетеродимер в очищенном состоянии и при применении для иммунизации мышей демонстрирует значительно улучшенную растворимость, а

также иммуногенность против экспрессирующего *Borrelia* OspA серотипа 3.

Пример 2. Очистка и формулирование липидизированных гетеродимеров мутантного фрагмента OspA.

Клонирование и экспрессия липидизированных гетеродимеров мутантного фрагмента OspA без гистициновой метки.

Слитый мономер OspA *B. valaisiana*/*B. garinii* штамм VS116/PBr был кодон-оптимизирован для экспрессии *E. coli* с помощью GeneArt (Германия). Сигнальная последовательность липидизации, добавленная к N-концевой области, была получена из основного липопротеина, Lpp, наружной мембраны *E. coli*, и сопровождалась непосредственно в С-концевом положении пептидом CSS, чтобы обеспечить N-концевой цистеин для липидизации. Улучшенный конструктор гетеродимера был получен посредством слияния мутантного фрагмента OspA серотипа 4 и гибридного фрагмента OspA серотипа 3 с помощью линкерной последовательности "LN1". Фрагменты генов клонировали в вектор pET28b(+) (Novagen, США), и стабилизированные гетеродимеры экспрессировались в клетки BL21(DE3) (Invitrogen, США). Клетки собирали через 4 ч центрифугированием и осадок хранили при температуре -70°C, вплоть до 12 месяцев до дальнейшей обработки.

Очистка липидизированных гетеродимеров мутантного фрагмента OspA.

Клетки разрушали механическим способом посредством гомогенизации под высоким давлением и липидизированные гетеродимеры мутантного фрагмента OspA, Lip-S4D1-S3D1 и Lip-S4D1-S3hybD1, обогащали в липидной фазе посредством фазового разделения с применением Triton X-114 в качестве детергента. Затем разбавленную детергентную фазу подвергали анионообменной хроматографии (Q-сефароза, GE Healthcare, Великобритания), функционирующей в режиме без связывания. Полученный в результате элюат наносили на колонку с гидроксипатитом (Bio-Rad, США) и липидизированные белки элюировали из колонки с помощью линейного солевого градиента. Элюат подвергали дальнейшей очистке на колонке с ДЭАЭ-сефарозой (GE Healthcare) в режиме без связывания с последующей очисткой на гель-фильтрационной колонке (Superdex 200, GE Healthcare) для замены буфера. Пики липидизированного гетеродимера мутантного OspA объединяли на базе колонки для аналитической эксклюзионной хроматографии и ДСН-ПААГ-электрофореза. После стерильной фильтрации очищенные гетеродимеры хранили при температуре, составляющей -20°C, до составления препарата.

Состав комбинированной вакцины.

Исследования, касающиеся состава комбинированной вакцины по данному изобретению, были выполнены с целью оптимизации стабильности. Различные типы буферов и стабилизаторов испытывали при различных концентрациях в комбинации с гидроксидом алюминия и антигеном, как описано в предыдущей заявке изобретателей WO 2014/006226. Определяли оптимальный состав, включающий 40 мкг/мл каждого из трех гетеродимеров (всего 120 мкг белка), 10 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 10 мМ L-метионина, 5% сахарозы, 0,05% Твин-20 (полисорбат-20) и 0,15% (мас./об.) гидроксида алюминия при pH, составляющем 6,7±0,2.

Результаты.

Улучшенный гетеродимер, Lip-S4D1-S3hybD1, продемонстрировал почти 4-кратное увеличение выхода в единицах мг/г биомассы, значительное улучшение по сравнению с Lip-S4D1-S3D1. Кроме того, сравнимая чистота улучшенного гетеродимерного препарата была достигнута при использовании на одну стадию хроматографии меньше (см. табл. 1).

Таблица 1
Улучшенный выход гетеродимера Lip S4D1-S3hybD1
по сравнению с Lip-S4D1-S3D1

Конструкт	Выход (мг/г биомассы)	Чистота (%) ОФ ВЭЖХ	Чистота (%) Эксклюзи- онная ВЭЖХ	Чистота (%) ДСН-ПААГ- электрофорез	Количество стадий хрома- тографии
Lip-S4D1-S3D1	0,35	88	95	90	5
Lip-S4D1-S3hybD1	2,5	82	96	97	4

Пример 3. Иммуногенность липидизированных гетеродимеров мутантного фрагмента OspA различных серотипов.

Иммунизация мышей.

Для всех исследований использовали самок мышей C3H/HeN. Перед иммунизацией у групп из десяти мышей выполняли забор крови через лицевую вену, а также готовили и объединяли неиммунные сыворотки. Три подкожные (п/к) иммунизации, по 100 мкл каждая, вводили с двухнедельным интервалом. Каждая доза содержала 1 мкг соответствующих гетеродимерных белков. Для улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29), Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33); для комбинированной вакцины на основе гетероди-

мера по предыдущему изобретению: Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29), Lip-S4D1-S3D1 (SEQ ID NO: 31) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33) и для химерной комбинированной вакцины: Lip-Chimeric OspA ST1/ST2-His (Seq ID NO: 40), Lip-Chimeric OspA ST5/ST3-His (Seq ID NO: 41) и Lip-Chimeric OspA ST6/ST4-His (SEQ ID NO: 42). Все комбинированные вакцины содержали в составе гидроксид алюминия ($\text{Al}(\text{OH})_3$) в конечной концентрации, составляющей 0,15%. Через неделю после третьей иммунизации выполняли забор крови из лицевой вены и готовили иммунные сыворотки. В каждый эксперимент в качестве отрицательного контроля (группы плацебо) включали одну группу, иммунизированную с применением PBS, составленного с $\text{Al}(\text{OH})_3$. Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с Австрийским правом (BGB1 № 501/1989) и одобрены "Magistratsabteilung 58".

ТИФА OspA.

Планшеты ТИФА (Maxisorp, Nunc, Дания) покрывали с применением 50 нг (1 мкг/мл) белка, разбавленного в буфере для иммобилизации (PBS), на лунку и инкубировали при температуре 4°C в течение 16-72 ч. Покрывающие антигены представляли собой меченные гистидином на С-конце полноразмерные липидизированные OspA ST1-6. Буфер для иммобилизации отбрасывали и добавляли 100 мкл блокирующего буфера (1% БСА, 0,5% Твин-20, PBS) и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. Планшеты трижды промывали с применением 300 мкл (переполнение) PBST (0,1% Твин-20, PBS). Выполняли пятикратные разведения сывороток в блокирующем буфере, добавляли 50 мкл в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды. Планшеты трижды промывали с применением 300 мкл (переполнение) PBST. Вторичное антитело (конъюгированное с пероксидазой хрена [HRP] антитело кролика к IgG мыши, DAKO, Дания) разбавляли при 1:2000 в блокирующем буфере, добавляли 50 мкл в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды. Планшеты трижды промывали с применением 300 мкл (переполнение) PBST. АБТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты), Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве субстрата для HRP, добавляли 50 мкл АБТС в каждую лунку и инкубировали в течение 15 мин в темноте при температуре окружающей среды. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1% ДСН и считывали оптическую плотность при 405 нм. Результат считался действительным, когда оптическая плотность чистого планшета была ниже 0,1. Образец считался действительным, когда оптическая плотность самого низкого разведения составляла выше 1,0, а у самого высокого разведения - ниже 0,1. Когда эти критерии были соблюдены, определяли полумаксимальный титр. Полумаксимальный титр является противоположностью разведения, что соответствует средней оптической плотности между самым высоким и самым низким разведениями.

Проточная цитометрия.

Спирохеты (1×10^6) смешивали с равным объемом 4% параформальдегида и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 96-луночном планшете (Nunclo 96U, Nunc). Планшет центрифугировали в течение 5 мин при 2000×g и супернатант отбрасывали. Клетки промывали с применением 150 мкл HBSS с 2% БСА (HBSS-B), центрифугировали, как описано выше, и супернатант отбрасывали. Сыворотки мыши инактивировали нагреванием посредством инкубирования ее при температуре, составляющей 56°C, в течение 35 мин. Термоинактивированные сыворотки разбавляли в HBSS-B и подвергали стерильной фильтрации центрифугированием при 4000×g в течение 3 мин с применением центрифужных пробирок с фильтрами Costar spin-X (0,22 мкм, Corning, США). Спирохеты растворяли в 100 мкл сыворотки и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Планшет центрифугировали в течение 15 мин при 2000×g, и супернатант отбрасывали. Клетки промывали один раз с применением 150 мкл HBSS-B с последующим ресуспендированием в 100 мкл HBSS-B. Один микролитр вторичного антитела (конъюгированного с фикоэритрином козьего антитела к IgG мыши, Beckman Coulter, США) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин в темноте. Спирохеты промывали один раз с применением 150 мкл HBSS-B с последующим ресуспендированием в 200 мкл HBSS, содержащем 2,5 мкМ красителя ДНК SYTO-17, и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Окрашенные спирохеты осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2000×g, а затем ресуспендировали в 200 мкл HBSS. Меченые спирохеты измеряли с помощью проточного цитометра FC500 (Beckman Coulter), гейтированного на SYTO-17-позитивных событий.

Результаты.

Два различных препарата на основе гетеродимера OspA ("het combo" и "улучшенную het combo"), а также химерную комбинацию OspA ("chimera combo") испытывали на иммуногенность у мышей. Гипериммунные сыворотки анализировали с помощью ТИФА на реактивность в отношении полноразмерного OspA (покрывающего антигена), а также на поверхностное связывание со штаммами *Borrelia*, экспрессирующими различные серотипы OspA (ST1-ST6).

Результаты ТИФА показали, что все комбинации вакцин стимулировали гуморальный иммунный ответ на все шесть серотипов OspA (см. фиг. 6). Особенно примечательно в отношении настоящего изобретения, что улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера OspA привела к более высоким уровням антител, специфичных к серотипу 3 OspA, по сравнению с комбинированной вакциной на основе гетеродимера OspA по предыдущему изобретению, в то время как уровни антител к другим серо-

типам OspA стимулировались обеими вакцинами на сопоставимом уровне.

Связывание антител из гипериммунных сывороток мыши непосредственно со спирохетами *Borrelia* наблюдалось в случае *Borrelia*, экспрессирующих все шесть серотипов OspA (см. фиг. 7), что свидетельствует о том, что антитела, которые генерируются в ответ на все антигены, являются функционально активными и могут связываться с нативным OspA *in situ*. Интенсивность флуоресценции была линейной для большого диапазона разведений сыворотки. Интенсивность флуоресценции, наблюдаемая в ответ на улучшенную комбинированную вакцину на основе гетеродимера, для спирохет была сопоставима с интенсивностью флуоресценции, наблюдаемой в ответ на комбинированную вакцину на основе гетеродимера и химерную комбинированную вакцину. Следует отметить, что в отношении связывания с серотипом 3 OspA *Borrelia* антитела, генерируемые в результате иммунизации улучшенной вакциной, превосходили генерацию антител в ответ на обе другие комбинированные вакцины.

Пример 4. Защитная способность улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера от заражения *Borrelia* *in vivo*.

Иммунизация мышей.

Для всех исследований (Janvier, Франция) использовали самок мышей C3H/HeN (H-2^k). Перед каждым заражением у групп из пяти мышей в возрасте 8 недель выполняли забор крови через хвостовую вену, а также готовили и объединяли неиммунные сыворотки. Три подкожные (п/к) иммунизации по 100 мкл вводили с двухнедельным интервалом в дозах, указанных в табл. 2. И улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера, и химерная комбинированная вакцина содержали три белка в соотношении 1:1:1, как описано в Примере 3. Все препараты содержали в составе гидроксид алюминия (Al(OH)₃) в конечной концентрации, составляющей 0,15%. Через неделю после третьей иммунизации выполняли забор крови и готовили гипериммунные сыворотки. В каждом эксперименте одну группу, которой вводили только Al(OH)₃ (в буфере препарата или PBS), включали в качестве отрицательного контроля, и одна группа мышей, иммунизированных полноразмерным липидизированным белком OspA дикого типа из соответствующего серотипа OspA, служила в качестве положительного контроля (*B. burgdorferi*, штамм B31 (серотип 1 OspA, SEQ ID NO: 34), *B. afzelii*, штамм K78 (серотип 2 OspA, SEQ ID NO: 35), *B. garinii*, штамм PHei (серотип 5 OspA, SEQ ID NO: 38) или *B. garinii*, штамм DK29 (серотип 6 OspA, SEQ ID NO: 39)). Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с Австрийским правом (BGBI № 501/1989) и одобрены "Magistratsabteilung 58".

Заражение иммунизированных мышей введением иглой выращенных *in vitro* *Borrelia*.

Через 2 недели после последней иммунизации мышей п/к заражали спирохетами, разведенными в 100 мкл питательной среды (BSKII). Для заражения применяли *B. burgdorferi*, штамм ZS7, экспрессирующий серотип 1 OspA (эксперименты 1 и 2), *B. garinii*, штамм PHei, экспрессирующий серотип 5 OspA (эксперименты 10-13) или *B. garinii*, штамм Ma, экспрессирующий серотип 6 OspA (эксперименты 14-17). Дозы заражения зависели от штамма и от вирулентности отдельных штаммов, которую оценивали с помощью экспериментов по заражению для определения ID₅₀. Дозы, применимые для экспериментов по заражению иглой, находились в диапазоне от 20 до 50 раз ID₅₀. Перед каждым заражением проверяли экспрессию OspA с помощью проточной цитометрии (см. Пример 3). Заражение мышей осуществляли только культурами, в которых >80% клеток были положительными на экспрессию OspA.

Заражение иммунизированных мышей клещами, инфицированными *B. burgdorferi* или *B. afzelii* ("заражение клещом").

Через 2 недели после последней иммунизации мышей заражали клещами, инфицированными *B. burgdorferi*, штамм Pra4, экспрессирующей серотип 1 OspA (эксперимент 3), *B. burgdorferi*, штамм Pra1, экспрессирующей серотип 1 OspA (эксперименты 4 и 5) или *B. afzelii*, экспрессирующей серотип 2 OspA (эксперименты 6-9). Для того чтобы облегчить заражение иммунизированных мышей клещом, волосяной покров на спине каждой мыши удаляли с помощью крема Veet® (Reckitt Benckiser, Соединенное Королевство), и суперклеем (Pattex, Германия) приклеивали к коже небольшой вентилируемый контейнер. После этого осуществляли перенос двух-трех нимф *I. ricinus*, инфицированных *B. burgdorferi*, штамм Pra1 или Pra 4, или *B. afzelii*, штамм IS1, на каждую мышь, и давали возможность прикрепиться и кормиться до тех пор, пока они достигнут полного насыщения и отпадут. Статус кормления ежедневно контролировали для каждого клеща. В конечную выборку включали только тех мышей, с которых был собран по меньшей мере один полностью или почти полностью накормленный клещ.

Умерщвление мышей и сбор материала.

Через 4 или 6 недель после заражения иглой или клещом соответственно мышей умерщвляли посредством смещения шейных позвонков. Кровь собирали через орбитальный синус, а конечные сыворотки готовили и применяли для ТИФА и/или вестерн-блоттинга VlsE для определения статуса инфицирования. Помимо этого, у каждой мыши собирали мочевой пузырь, а ДНК экстрагировали и подвергали количественной ПЦР (кПЦР) для идентификации *Borrelia*.

ТИФА с константной областью 6 (IR6) VlsE (экспрессированной основной вариабельной белково-подобной последовательности).

Для анализа (Liang F.T., Alvarez A.L., Gu Y., Nowling J.M., Ramamoorthy R., Philipp M.T. An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia*

burgdorferi. J Immunol. 1999; 163:5566-73) применяли биотинилированный 25-мерный пептид (MKKDDQIAAAMVLRGMADGQFALK, SEQ ID NO: 59), полученный из последовательности *B. garinii*, штамм IP90. Предварительно покрытые стрептавидином 96-луночные планшеты ТИФА (Nunc) покрывали с применением 100 мкл/лунку (1 мкг/мл) пептида в PBS с добавлением 0,1% Твин (PBS/0,1T). Планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. После покрытия пептидом планшеты промывали один раз с применением PBS/0,1T. Затем планшеты блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) с применением 100 мкл/лунку PBS + 2% БСА, перед последующей промывкой PBS/0,1T. Реактивность к пептиду у сывороток после заражения (конечных сывороток) испытывали при 1:200 и 1:400 разведениях в PBS + 1% БСА. Планшеты инкубировали в течение 90 мин при RT перед тем, как трижды промыть с применением PBS/0,1T. Затем в каждую лунку помещали 50 мкл 1,3 мкг/мл поликлонального антитела кролика к IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена (Dako), в PBS + 1% БСА. Затем планшеты инкубировали в течение 1 ч при RT. После трех промывок с применением PBS/0,1T добавляли АБТС (50 мкл/лунку) в качестве субстрата (Sigma-Aldrich) и позволяли цвету проявиться в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряли при 405 нм. Все сыворотки испытывали в двух повторностях. Группы отрицательного контроля содержали PBS вместо сывороток, а также пластины, не покрытые пептидом. Сыворотки из мышей, оказавшихся положительными на посев инфекции *Borrelia*, применяли в качестве групп положительного контроля.

Экстракция и очистка ДНК.

Мочевой пузырь из каждой мыши подвергали экстракции и очистке ДНК с применением набора для крови и тканей DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) в соответствии с инструкциями изготовителя с последующей модификацией. Каждый мочевой пузырь на протяжении ночи при температуре 60°C обрабатывали с применением 100 мкл рекомбинантной протеиназы К (ПЦР-чистоты; 14-22 мг/мл, Roche). ДНК элюировали в 50 мкл стерильной деионизированной воды и хранили при температуре -20°C. В качестве отрицательного контроля за каждым десятым образцом следовала одна пустая колонка очистки в каждом цикле экстракции и очистки ДНК.

кПЦР, направленная на *gscA*.

Олигонуклеотидные праймеры были сконструированы для гена *gscA* таким образом, чтобы они могли применяться в кПЦР для идентификации всех родственных видов *Borrelia*, вызывающих боррелиоз Лайма (прямой: CATGCTCTTGATCCTGTТА, SEQ ID NO: 57, обратный: CCCATTTCTCCATCTATCTC, SEQ ID NO: 58). Фрагмент *gscA* клонировали из *B. burgdorferi* s.s., штамм N40, в pET28b(+), для применения в качестве стандарта в каждой реакции. Хромосомную ДНК, экстрагированную из мышинных мочевых пузырей, разводили в воде в соотношении 1:4 с целью снижения эффектов матрикса, наблюдаемых при применении неразведенной ДНК. Мастер-микс, состоящий из 10 мкл SSoAdvanced™ SYBR® Green Supermix, по 0,3 мкл каждого праймера (10 мМ) и 7,4 мкл воды, готовили для каждого эксперимента. 18 мкл мастер-микса смешивали с 2 мкл разведенной ДНК, экстрагированной из мочевого пузыря, в планшетах для микротитрования, и ДНК амплифицировали с применением системы детектирования ПНР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad). ДНК денатурировали в течение 3 мин при 95°C с последующим осуществлением 50 циклов длительностью 15 с при 95°C и 30 с при 55°C. После амплификации ДНК готовили для анализа кривой плавления посредством денатурации в течение 30 с при 95°C и еще 2 мин при 55°C. Анализ кривой плавления осуществляли посредством инкубации в течение 5 с при 55°C, с 0,5°C увеличением за цикл, и 5 с при 95°C. Для каждого планшета включали четыре отрицательных контроля без добавления матрицы (NTC), а также стандартную кривую в двух повторностях с числом матриц, находящимся в диапазоне от 10 до 10000.

Вестерн-блоттинг.

Связывание конечных сывороток с лизатом цельных клеток из *Borrelia*, принадлежащих к соответствующему серотипу OspA, анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, 2,5 мкг лизата спирохет на сыворотку мыши, подлежащего анализу, разделяли с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в восстановительных условиях с применением 4-12% трис-глициновых гелей ZOOM (Invitrogen). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с применением системы сухого блоттинга iBlot® (Invitrogen). После блокировки в 5% молоке в течение 1 ч добавляли конечные сыворотки при 1:2000 разведении и инкубировали при температуре 4°C на протяжении ночи. Затем мембраны трижды промывали с применением PBS/0,1T, после чего следовал 1 ч инкубации в поликлональном антителе кролика к IgG мыши, конъюгированном с пероксидазой хрена (Dako), разбавленным 1:10000. Иммуноблоты визуализировали с помощью применяемых в вестерн-блоттинге реагентов для детектирования Amersham ECL Plus™ (GE Healthcare) и Kodak BioMax films (Kodak).

Считывание данных об инфекции.

Конечное считывание данных об инфекции было основано на двух отдельных методах: детектирование присутствия специфичных к *Borrelia* антител (вестерн-блоттинг и ТИФА VlsE) и присутствия ДНК *Borrelia* (кПЦР, направленная на *gscA*). В экспериментах, в которых для заражения применяли *B. burgdorferi*, штамм ZS7 (эксперименты 1 и 2), применяли вестерн-блоттинг наряду с кПЦР. Во всех остальных экспериментах применяли ТИФА VlsE и кПЦР. Была отмечена высокая согласованность данных

между этими двумя методами (>95%); в силу этих обстоятельств мышь рассматривали в качестве инфицированной, когда по меньшей мере один из этих двух методов был положительным. Статистическую значимость определяли с помощью точного критерия Фишера (двустороннего).

Результаты.

Улучшенную комбинированную вакцину на основе гетеродимера испытывали на защитную способность от заражения *Borrelia*. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2. Иммунизированных мышей заражали *B. burgdorferi* s.s. (серотип 1 OspA, штамм ZS7, заражение иглой, Эксперименты 1 и 2 или штаммы Pra1 или Pra 4, заражение клещом, эксперименты 3 или 4 и 5 соответственно), *B. afzelii* (серотип 2 OspA, штамм IS 1, заражение клещом, эксперименты 6-9), *B. garinii* (серотип 5 OspA, штамм PHei, заражение иглой, эксперименты 10-13) или *B. garinii* (серотип 6 OspA, штамм Ma, заражение иглой, эксперименты 14-17). В некоторых экспериментах включали другие антигены на основе OspA, такие как химерная комбинированная вакцина или липидизированный полноразмерный белок OspA. Группа мышей, иммунизированных PBS или буфером препарата в комбинации с $Al(OH)_3$, служила в качестве контрольной группы плацебо (только адъювант) в каждом эксперименте.

Данные по защите из 17 экспериментов сведены в табл. 2. Во всех экспериментах наблюдался высокий уровень инфицирования во всех группах плацебо. Кроме того, низкий уровень инфицирования наблюдался в группах, получающих соответствующий полноразмерный белок OspA, за исключением полноразмерного OspA серотипа 6, в котором наблюдалась лишь частичная защита (эксперименты 14-17). Эти результаты подтверждают экспериментальную модель и способы считывания.

Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера обеспечила значительную защиту (p -значения <0,05) в дозе, составляющей 3 мкг, при заражении мышей выращенными *in vitro* *B. burgdorferi* s.s. или *B. garinii* (серотип 5 или 6 OspA), или клещами, инфицированными *B. burgdorferi* или *B. afzelii*. Кроме того, когда различные дозы иммунизации оценивали на эффективность вакцины, высокозначимая защита (p -значения <0,01) могла быть продемонстрирована при введении 0,03 мкг улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера и заражении мышей *B. afzelii* или *B. garinii* (серотип 5 или 6 OspA) (эксперименты 8, 9, 12, 13 и 16). Таким образом, улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера индуцировала защитный иммунитет против трех видов *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. afzelii* и *B. garinii*), в том числе четырех клинически значимых серотипов (1, 2, 5 и 6) OspA, как показано на мышинных моделях с применением для заражения либо спирохет, выращенных *in vitro*, либо инфицированных клещей.

У мышей, иммунизированных химерной комбинированной вакциной (данные не показаны), также наблюдалась защита от серотипа 5 и 6, сравнимая с защитой, обеспеченной улучшенной комбинированной вакциной на основе гетеродимера.

Таблица 2. Защитная способность улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера мутантного OspA по данному изобретению от заражения *Borrelia* серотипа 1, серотипа 2, серотипа 5 и серотипа 6 OspA.

Группы мышей трижды иммунизировали указанными дозами иммуногена или только адъювантом $Al(OH)_3$ с двухнедельными интервалами. Применяемые иммуногены представляли собой 1:1:1 комбинацию гетеродимеров мутантных OspA Lip-S1D1-S2D1, Lip-S4D1-S3hybD1 и Lip-S5D1-S6D1 ("Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера"), 1:1:1 комбинацию Lip-Chimeric OspA ST1/ST2-His, Lip-Chimeric OspA ST5/ST3-His и Lip-Chimeric OspA ST6/ST4-His ("Химерная комбинированная вакцина") и Lip-OspA1-His (липидизированный полноразмерный белок OspA из *B. burgdorferi*, штамм B31) или Lip-OspA2-His (липидизированный полноразмерный белок OspA из *B. afzelii*, штамм K78), Lip-OspA5-His (липидизированный полноразмерный белок OspA из *B. garinii*, штамм PHei) или Lip-OspA6-His (липидизированный полноразмерный белок OspA из *B. garinii*, штамм DK29). Иммунизированных мышей заражали п/к через две недели после последней иммунизации указанными видами *Borrelia* с помощью шприца (*B. burgdorferi*, штамм ZS7, *B. garinii*, штамм PHei или *B. garinii*, штамм Ma) или с помощью клещей (*B. burgdorferi*, штамм Pra1 или Pra4 или *B. afzelii*, штамм IS1).

А. Защита от заражения иглой серотипом 1 OspA *Borrelia* с помощью химерной комбинированной вакцины и улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (разовая доза: 3 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 1: Инфицированные/Всего (p-значение)	Эксперимент 2: Инфицированные/Всего (p-значение)
Lip-OspA1-His (Seq ID NO: 34)	3 × 1,0 мкг	<i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм ZS7	0/10 (<0,0001)	1/10 (<0,0001)
Химерная комбинированная вакцина: Lip-Chimeric OspA ST1/ST2-His (Seq ID NO: 40) Lip-Chimeric OspA ST5/ST3-His (Seq ID NO: 41) Lip-Chimeric OspA ST6/ST4-His (Seq ID NO: 42)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	<i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм ZS7	0/10 (<0,0001)	0/10 (<0,0001)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	<i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм ZS7	0/10 (<0,0001)	0/10 (<0,0001)
только адъювант Al(OH) ₃	-	<i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм ZS7	9/9	10/10

Б. Защита от заражения клещом серотипом 1 OspA *Borrelia* с помощью химерной комбинированной вакцины и улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (разовая доза: 3 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 3: Инфицирован ные/Всего (p- значение)	Эксперимент 4: Инфицирован ные/Всего (p- значение)
Lip-OspA1-His (Seq ID NO: 34)	3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B.</i>	0/4 (0,0475)	1/9 (0,0216)
		<i>burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм Pra4 (Эксп. 3) или Pra1 (Эксп. 4)		
Химерная комбинированная вакцина: Lip-Chimeric OspA ST1/ST2-His (Seq ID NO: 40) Lip-Chimeric OspA ST5/ST3-His (Seq ID NO: 41) Lip-Chimeric OspA ST6/ST4-His (Seq ID NO: 42)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B.</i> <i>burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм Pra4 (Эксп. 3) или Pra1 (Эксп. 4)	0/8 (0,0060)	0/7 (0,0093)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B.</i> <i>burgdorferi</i> (OspA серотип 1) штамм Pra4 (Эксп. 3) или Pra1 (Эксп. 4)	0/5 (0,0260)	0/7 (0,0093)
только адъювант Al(OH) ₃	-	Заражение клещом <i>B.</i> <i>burgdorferi</i> (OspA серотип 1) штамм Pra4 (Эксп. 3) или Pra1 (Эксп. 4)	5/6	5/6

В. Защита от заражения клещом серотипом 1 OspA *Borrelia* с помощью улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (снижающиеся дозы: 3 и 0,3 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 5: Инфицированные/Всего (р-значение)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм Pra1	1/7 (0,0174)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,1 мкг 3 × 0,1 мкг 3 × 0,1 мкг	Заражение клещом <i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм Pra1	1/9 (0,0059)
только адъювант Al(OH) ₃	-	Заражение клещом <i>B. burgdorferi</i> (серотип 1 OspA) штамм Pra1	7/8

Г. Защита от заражения клещом серотипом 2 OspA *Borrelia* с помощью химерной комбинированной вакцины и улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (разовая доза: 3 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 6:	Эксперимент 7:
			Инфицированные/Всего (p-значение)	Инфицированные/Всего (p-значение)
Lip-OspA2-His (Seq ID NO: 35)	3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	0/8 (0,0016)	0/9 (0,0002)
Химерная комбинированная вакцина: Lip-Chimeric OspA ST1/ST2-His (Seq ID NO: 40) Lip-Chimeric OspA ST5/ST3-His (Seq ID NO: 41) Lip-Chimeric OspA ST6/ST4-His (Seq ID NO: 42)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	0/7 (0,0025)	0/9 (0,0002)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	0/9 (0,0010)	0/7 (0,0003)
только адъювант Al(OH) ₃	-	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	5/5	8/8

Д. Защита от заражения клещом серотипом 2 OspA *Borrelia* с помощью улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (снижающиеся дозы: 0,03 и 0,003 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 8: Инфицированные/Всего (p-значение)	Эксперимент 9: Инфицированные/Всего (p-значение)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,01 мкг 3 × 0,01 мкг 3 × 0,01 мкг	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	0/9 (0,0004)	2/7 (0,0096)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,001 мкг 3 × 0,001 мкг 3 × 0,001 мкг	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	7/10 (н.з.)	1/8 (0,0008)
только адъювант Al(OH) ₃	-	Заражение клещом <i>B. afzelii</i> (серотип 2 OspA) штамм IS1	6/6	9/9

Е. Защита от заражения иглой серотипом 5 OspA *Borrelia* с помощью улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (разовая доза: 3 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 10: Инфицированные/Всего (p-значение)	Эксперимент 11: Инфицированные/Всего (p-значение)
Lip-OspA5-His (SEQ ID NO: 38)	3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	0/10 (<0,0001)	0/10 (<0,0001)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	0/10 (<0,0001)	1/10 (<0,0001)
только адъювант Al(OH) ₃	-	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	10/10	10/10

Ё. Защита от заражения иглой серотипом 5 OspA *Borrelia* с помощью улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (снижающиеся дозы: 3, 0,3 и 0,03 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 12: Инфицированные/Всего (p-значение)	Эксперимент 13: Инфицированные/Всего (p-значение)
Lip-OspA5-His (SEQ ID NO: 38)	3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	0/10 (0,0007)	0/10 (<0,001)

Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	0/10 (<0,0007)	1/10 (0,0002)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,1 мкг 3 × 0,1 мкг 3 × 0,1 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	0/10 (<0,0007)	0/10 (<0,0001)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,01 мкг 3 × 0,01 мкг 3 × 0,01 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	2/10 (<0,0219)	3/10 (0,0047)
только адъювант Al(OH) ₃	-	<i>B. garinii</i> (серотип 5 OspA) штамм PHei)	8/10	9/9

Ж. Защита от заражения иглой серотипом 6 OspA *Borrelia* с помощью улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (разовая доза: 3 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 14: Инфицированные/Всего (p-значение)	Эксперимент 15: Инфицированные/Всего (p-значение)
Lip-OspA6-His (SEQ ID NO: 39)	3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	4/10 (0,0108)	6/10 (н.з.)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	0/10 (<0,0001)	0/10 (0,0007)
только адъювант Al(OH) ₃	-	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	10/10	8/10

З. Защита от заражения иглой серотипом 6 OspA *Borrelia* с помощью улучшенной комбинированной вакцины на основе гетеродимера (снижающиеся дозы: 3, 0,3 и 0,03 мкг).

Иммуноген	Доза	Заражение	Эксперимент 16: Инфицированные/Всего (p-значение)	Эксперимент 17: Инфицированные/Всего (p-значение)
Lip-OspA6-His (SEQ ID NO: 39)	3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	4/10 (0,0108)	8/10 (н.з.)

Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг 3 × 1,0 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	0/10 (<0,0001)	0/10 (0,0001)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,1 мкг 3 × 0,1 мкг 3 × 0,1 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	2/10 (0,0007)	2/10 (0,0054)
Улучшенная комбинированная вакцина на основе гетеродимера: Lip-S1D1-S2D1 (Seq ID NO: 29) Lip-S4D1-S3hybD1 (Seq ID NO: 27) Lip-S5D1-S6D1 (Seq ID NO: 33)	3 × 0,01 мкг 3 × 0,01 мкг 3 × 0,01 мкг	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	3/10 (0,0031)	4/10 (н.з.)
только адъювант Al(OH) ₃	-	<i>B. garinii</i> (серотип 6 OspA) штамм Ma)	10/10	9/10

P-значение; точный критерий Фишера, двусторонний, по сравнению с группой только адъюванта, указаны в круглых скобках, незначимый (н.з.).

Последовательности

SEQ ID NO: 1

S3hybD1: гибридный С-концевой фрагмент OspA; аминокислоты положений 125-176 из *Borrelia valaisiana*, штамм VS116, и аминокислоты 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr, с дисульфидной связью типа 1 и Т в положении 233

FNEKGEVSEKILTRSNGTTLEYSQMTDAENATKAVETLKNGIKLPGNLVGGKTKLTVTC
GTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTI
TVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 2

B. valaisiana (штамм VS116), OspA ак 125-176

FNEKGEVSEKILTRSNGTTLEYSQMTDAENATKAVETLKNGIKLPGNLVGGK

SEQ ID NO: 3

B. garinii (штамм PBr, серотип 3), OspA ак 177-274, с Т в положении 233, из полноразмерного OspA (SEQ ID NO: 8)

TKLTVTCGTVTL SKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKTKQL
VFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 4

B. valaisiana (штамм VS116), OspA

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLVATV
DKVELKGTSDKNNGSGTLEGVKDDKSKVKLTISDDLGETKLETFKEDGTLVSRKVNFK
DKSFTEEFNEKGEVSEKILTRSNGTTLEYSQMTDAENATKAVETLKNGIKLPGNLVGG
KTTLKITEGTVTL SKHIAKSGEVTVEINDTSSTPNTKKTGKWDARNSTLTIIVDSKNKTKL
VFTKQDTITVQSYNPAGNKLEGTAVEIKTLQELKNALK

SEQ ID NO: 5

B. burgdorferi s.s. (штамм B31, серотип 1 OspA)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVLDLPGEMKVLVSKEKNKDGGKYDLIATVD
KLELKGTSDKNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLGGTTLEVFKEGDKTLVSKKVTSK
DKSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKGYVLEGTLTAEKTT
LVVKEGTVTL SKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTKDLV
FTKENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEIKNALK

SEQ ID NO: 6

B. afzelii (штамм K78; серотип 2 OspA)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLKATV
DKIELKGTSDKDNNGSGVLEGTKDDKSKAKLTIADDLSKTTFEIFKEDGKTLVSRKVSSK
DKTSTDENFNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVAND
KVTLEVKEGTVTLKSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKT
QLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 7

B. garinii (штамм PBr, серотип 3 OspA) с Р в положении 233 (номер доступа EMBL X80256.1)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLMATV
EKLELKGTSDKSNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIFKEDGKTLVSRKVNSK
DKSSTEEKFNDDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGG
ETKLTVTGTVTLKSNISKSGETVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKPKQ
LVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK

SEQ ID NO: 8

B. garinii (штамм PBr, серотип 3 OspA) с Т в положении 233 (номер доступа EMBL ACL34827.1)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLMATV
EKLELKGTSDKSNNGSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIFKEDGKTLVSRKVNSK
DKSSTEEKFNDDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGG
ETKLTVTGTVTLKSNISKSGETVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKTKQ
LVFTKENTITVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK

SEQ ID NO: 9

B. bavariensis (штамм PBi, серотип 4 OspA)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLMATV
DKLELKGTSDKSNNGSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVNSKD
KSSIEEFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTL
KVTEGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFT
KEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 10

B. garinii (штамм PHei, серотип 5 OspA)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSLMATV
EKLELKGTSDKNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLKD
KSSSTEEKFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTT

LKVTEGTVTL SKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSGTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFT
KEDTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK

SEQ ID NO: 11

B. garinii (штамм DK29, серотип 6 OspA)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATV
DKLELKGTS DKNNGSGTLEGEKTDKSKVKSTIADDLSQTKFEIFKEDGKTLVSKKVTLK
DKSSTEEKFNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGK
TTLVTEGTVVL SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNL
VFTKEDTITVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK

SEQ ID NO: 12

B. garinii (штамм T25, серотип 7 OspA)

MKKYLLGIGLILALIACKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSLEATV
DKLELKGTS DKNNGSGVLEGVKAASKAKLTIADDLSQTKFEIFKEDGKTLVSKKVTLK
DKSSTEEKFNDKGKLEKVVTRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGE
TKLTVEAGTVTL SKNISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTSTLTISKNSQKTKQL
VFTKENTITVQKYNTAGTKLEGSPAIEKDLEALKAALK

SEQ ID NO: 13

Сигнал липидизации OspA *Borrelia*

MKKYLLGIGLILALIA

SEQ ID NO: 14

Сигнал липидизации OspB *Borrelia*

MRLIGFALALALIG

SEQ ID NO: 15

Сигнал липидизации lpp *E. coli*

MKATKLVLGAVILGSTLLAG

SEQ ID NO: 16

Пептидный линкер LN1, сконструированный из двух отдельных петлевых участков
N-концевой половины OspA из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (ак 65-74 и ак 42-53, обмен
аминокислот в положении 53: D53S)
GTSDKNNGSGSKEKNKDGKYS

SEQ ID NO: 17

hLFA-1-подобная последовательность из *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (серотип 1 OspA)

GYVLEGLTAE

SEQ ID NO: 18

He-hLFA-1-подобная последовательность из *B. afzelii*, штамм K78 (серотип 2 OspA)

NFTLEGKVAND

SEQ ID NO: 19

B. burgdorferi s.s. (штамм B31, серотип 1), OspA ак 126-273 с замененной hLFA-подобной последовательностью из серотипа 1 OspA

FNEKGVESEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKEGT
VTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTIT
VQQYDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALK

SEQ ID NO: 20

B. afzelii (штамм K78, серотип 2), OspA ак 126-273

FNEKGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKE
GTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQD
TITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 21

B. garinii (штамм PBr, серотип 3), OspA ак 126-274

FNDKGKLESEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTE
GTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTI
TVQNYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELKAALK

SEQ ID NO: 22

B. bavariensis (штамм PBi, серотип 4), OspA ак 126-273

FNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLKVTEGT
VVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITV
QKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALK

SEQ ID NO: 23

B. garinii (штамм PHei, серотип 5), OspA ак 126-273

FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLKVTEGT
VTLSKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKS GTWDSGTSTLTISKNR TKQLVFTKEDTITV
QNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK

SEQ ID NO: 24

B. garinii (штамм DK29, серотип 6), OspA ак 126-274

FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTEG
 TVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTI
 TVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELKNALK

SEQ ID NO: 25

B. garinii (штамм T25, серотип 7) OspA ак 126-274

FNDKGKLESEKVVTRANGTRLEYTEIQNDGSGKAKEVLKSLTLEGTLTADGETKLTVEA
 GTVTLKSNISESGEITVELKDTETTPADKKSGTWDSKTSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTI
 TVQKYNTAGTKLEGSPAEIKDLEALKAALK

SEQ ID NO: 26

Lip-S4D1-S3hybD1-nt: Кодирующая последовательность для промежуточных и конечных гетеродимерных слитых белков OspA серотипа 4 и OspA серотипа 3 с дисульфидной связью типа 1, сигнал липидизации lpp *E. coli*, линкерная последовательность LN1, фрагмент OspA серотипа 3, содержащий аминокислоты 125-176 *B. valaisiana*, штамм VS116 (SEQ ID NO: 2) и аминокислоты 177-274 *B. garinii*, штамм PBr, серотип 3 (SEQ ID NO: 3)

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCA
 GGTTGCTCAAGCTTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGC
 GAATGGCACCCGCTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAA
 AGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACACG
 CTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATTCGAACTCTGGTGA
 AATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAGACGGGCA
 AATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAA
 AATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGG
 CACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAAACCCTGGATGAACTGTGTAACG
 CCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAA
 AGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAAGGCGAAGTGAGCGAAAAAATTCTGACCC
 GTAGCAATGGCACCCACCTGGAATATAGCCAGATGACCGATGCAGAAAATGCAACC
 AAAGCAGTTGAAACCCTGAAAAACGGTATTAACTGCCTGGTAATCTGGTTGGTGG
 TAAAACCAAACCTGACCGTTACCTGTGGCACCGTTACCCTGAGCAAAAACATTAGCA
 AAAGCGGTGAAATTACCGTGGCACTGAATGATACCGAAACCACACCGGCAGACAAA
 AAAACCGGTGAATGGAAGCGATACCAGCACCTGACCATTAGTAAAAATAGCCA
 GAAAACAAAACAGCTGGTGTTTACCAAAGAAAACACCATTACCGTGCAGAATTATA

ACCGTGCAGGTAATGCACTGGAAGGTAGTCCGGCAGAAATTAAAGATCTGGCAGAA
CTGTGTGCAGCCCTGAAATAA

SEQ ID NO: 27

Lip-S4D1-S3hybD1-aa: Гетеродимерный слитый белок OspA серотипа 4 и OspA серотипа 3, содержащий аминокислоты 125-176 *B. valaisiana*, штамм VS116 (SEQ ID NO: 2) и аминокислоты 177-274 *B. garinii*, штамм PBr, серотип 3 (SEQ ID NO: 3), с дисульфидной связью типа 1, N-концевой CSS для добавления липидов, линкерная последовательность LN1, N-концевая липидизация

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLK
VTCGTVVLKSHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTK
EDITIVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELNALKGTSDKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNE
KGEVSEKILTRSNGTTLEYSQMTDAENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGKTKLTVTCGT
VTLKSNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQ
NYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 28

Lip-S1D1-S2D1-nt: Кодирующая последовательность для промежуточных и конечных гетеродимерных слитых белков OspA серотипа 1 и OspA серотипа 2 с дисульфидной связью типа 1, сигнал липидизации lpp *E. coli*, линкерная последовательность LN1, ак 164-174 OspA серотипа 1, замененные не-hLFA-1-подобной последовательностью NFTLEGKVAND

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCA
GGTTGCTCAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAGTCAGCGAAAAAATCATTACCCGCGC
AGACGGCACCCGCCTGGAATACACCGGCATCAAATCGGACGGCAGCGGCAAAAGCG
AAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAAATGATAAAACCAC
CCTGGTGGTGAAATGCGGCACCGTTACGCTGAGCAAAAACATTAGTAAATCCGGTG
AAGTCTCTGTGGAAGTGAATGATACCGACAGCTCTGCGGCCACCAAGAAAACCGCA
GCTTGGAAGTCAAGGCACCTCGACGCTGACCATACGGTTAATAGCAAGAAAACCAA
AGATCTGGTCTTCACGAAAGAAAACACCATCACGGTGACGCAATATGACAGCAATG
GTACCAAAGTGAAGGCTCCGCTGTGGAATCACGAAAGTGGATGAAATCTGTAAT
GCTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAGAGAAAAACAA
AGATGGCAAGTACTCATTCAACGAAAAGGCGAACTGTGCGGCAAAACGATGACGC
GTGAAAACGGCACCAAACTGGAATATACGGAATGAAAAGCGATGGCACCGGTAA
AGCGAAAGAAGTTCTGAAAACTTTACCCTGGAAGGCAAAGTCGCAATGACAAAG
TCACCCTGGAAGTGAATGCGGCACCGTTACGCTGTCAAAAGAAATTGCAAAATCG

GGTGAAGTGACCGTTGCTCTGAACGATACGAATACCACGCAAGCGACCAAGAAAAAC
 CGGCGCCTGGGACAGCAAAACCTCTACGCTGACCATTAGTGTTAATAGCAAGAAAA
 CCACGCAGCTGGTCTTCACCAAACAAGATACGATCACCGTGCAGAAATACGACAGT
 GCGGGTACCAACCTGGAAGGCACGGCTGTTGAAATCAAAACCTGGACGAACTGTG
 TAACGCCCTGAAA

SEQ ID NO: 29

Lip-S1D1-S2D1-aa: Гетеродимерный слитый белок OspA серотипа 1 и OspA серотипа 2 с дисульфидной связью типа 1, N-концевой CSS для добавления липидов, линкерная последовательность LN1, ак 164-174 OspA серотипа 1, замененные не-hLFA-1-подобной последовательностью NFTLEGKVAND, N-концевая липидизация

LipCSSFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLV
 VKCGTVTLNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSTLTITVNSKKTDLVFT
 KENTITVQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALKGTSKNNNGSGSKEKNKDGKYSFNE
 KGELSAKMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVKCGTV
 TLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITV
 QKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELNALK

SEQ ID NO: 30

Lip-S4D1-S3D1-nt: Кодирующая последовательность для промежуточных и конечных гетеродимерных слитых белков OspA серотипов 4 и 3, оба с дисульфидной связью типа 1, сигнал липидизации lpr *E. coli*, N-концевой CSS для добавления липидов, линкерная последовательность LN1

ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCA
 GGTTGCTCAAGCTTCAATGCTAAGGGCGAACTGAGCGAAAAACGATCCTGCGTGC
 GAATGGCACCCGTCTGGAATACACCGAAATCAAATCCGATGGTACGGGCAAAGCAA
 AGGAAGTCCTGAAAGATTTTGCTCTGGAAGGTACCCTGGCGGCCGACAAAACCACG
 CTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGAGCAAACATATTCCGAACCTCTGGTGA
 AATCACCGTTGAACTGAACGATAGCAATTCTACGCAGGCAACCAAAAAGACGGGCA
 AATGGGACAGTAATACCTCCACGCTGACCATTTCAGTCAACTCGAAAAAGACCAAA
 AATATTGTGTTACGAAGGAAGATACGATCACCGTTCAAAAATATGACTCCGCGGG
 CACCAACCTGGAAGGCAATGCCGTCGAAATCAAAACCTGGATGAACTGTGTAAACG
 CCCTGAAGGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAAGAGAAAAACAA
 AGATGGCAAGTACTCATTTAACGATAAGGGCAAACGTGCGAAAAAGTGGTCACCC
 GCGCAAATGGCACCCGCTGGAATACACGAAATCAAAAACGATGGTAGCGGCAA
 AGCGAAGGAAGTTCTGAAAGGCTTTGCCCTGGAAGGTACCCTGACGGATGGCGGTG

AAACCAAAGTACCGTGACGTGCGGCACCGTTACGCTGTCTAAAAACATTAGCAAG
 TCTGGTGAATACGGTTCGCACTGAATGATACCGAAACCACGCCGGCTGACAAAAA
 GACCGGCGAATGGAAAAGTGACACCTCCACGCTGACCATTTCAAAAGAACTCGCAGA
 AACCGAAGCAACTGGTCTTCACCAAAGAAAACACGATCACCGTGCAGAACTATAAT
 CGTGCCCGTAATGCTCTGGAAGGCTCACCGGCTGAAATCAAGGACCTGGCTGAACT
 GTGTGCGGCACTGAAA

SEQ ID NO: 31

Lip-S4D1-S3D1-aa: Гетеродимерный слитый белок OspA серотипов 4 и 3, оба с дисульфидной связью типа 1, N-концевой CSS для добавления липидов, линкерная последовательность LN1, N-концевая липидизация

LipCSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLAADKTTLK
 VTCGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTK
 EDITITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFND
 KGKLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTTCGTV
 TLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQPKQLVFTKENTITVQ
 NYNRAGNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 32

Lip-S5D1-S6D1-nt: Кодирующая последовательность для промежуточных и конечных гетеродимерных слитых белков OspA серотипов 6, оба с дисульфидной связью типа 1, сигнал липидизации lpp *E. coli*, N-концевой CSS для добавления липидов, линкерная последовательность LN1

ATGAAAGCTACTAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCA
 GGTTGCTCAAGCTTCAACGAAAAGGGCGAAATCTCAGAAAAAACCATCGTCCGCGC
 TAACGGCACCCGCCTGGAATACACCGACATCAAATCAGACAAGACCGGTAAAGCGA
 AGGAAGTTCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAAACC
 ACGCTGAAGGTGACCTGCGGTACCGTTACGCTGTCCAAAAACATTAGTAAGTCCGG
 CGAAATCACGGTCGCCCTGGATGACACCGATAGCTCTGGCAACAAAAAGAGCGGTA
 CCTGGGATTACAGGCACCTCGACGCTGACCATTCTAAAAATCGTACGAAAACCAAG
 CAGCTGGTCTTCACGAAAGAAGATACGATCACCGTGCAAACTATGACAGCGCAGG
 TACCAATCTGGAAGGCAAAGCTGTGGAATTACCACGCTGAAAGAACTGTGTAATG
 CTCTGAAAGGTACTAGTGACAAAAACAATGGCTCTGGTAGCAAGAGAAAAACAAA
 GATGGCAAGTACTATTCAACGGCAAAGGTGAAACGAGCGAAAAGACCATCGTGCG
 TGCGAACGGTACCCGCCTGGAATATACGGACATTAAATCGGACGGCAGCGGCAAAG
 CAAAGGAAGTCCTGAAAGATTTTACGCTGGAAGGTACCCTGGCAGCAGACGGTAAA

ACCACGCTGAAGGTGACGTGCGGCACCGTGGTTCTGTCAAAAAACATTCTGAAGTC
GGGTGAAATCACCGCAGCTCTGGATGACAGCGATACCACGCGTGCTACGAAAAAGA
CCGGTAAATGGGATAGCAAGACCTCTACGCTGACCATTAGTGTCAACTCCCAGAAA
ACGAAGAATCTGGTGTTCACCAAAGAAGATACGATCACCGTTCAACGCTATGACAG
TGCGGGCACCAACCTGGAAGGCAAAGCCGTTGAAATTACCACGCTGAAAGAACTGT
GTAATGCTCTGAAA

SEQ ID NO: 33

Lip-S5D1-S6D1-aa: Гетеродимерный слитый белок OspA серотипов 6, оба с дисульфидной связью типа 1, N-концевой CSS для добавления липидов, линкерная последовательность LN1, N-концевая липидизация

LipCSSFNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLK
VTCGTVTLNISKSGEITVALDDTDSSGNKSGTWDSGTSTLTISKNRTKTKQLVFTKE
DTITVQNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALKGTSDKNNGSGSKEKNKDGKYSFNGK
GETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLLEGTLAADGKTTLKVTGTVVL
SKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQR
YDSAGTNLEGKAVEITTLKELCNALK

SEQ ID NO: 34

B. burgdorferi (штамм B31, серотип 1 OspA) ак 18-273, удаленная сигнальная последовательность липидизации lpp (MKATKLVLGAVILGSTLLAG, SEQ ID NO: 15), C-концевая гистидиновая метка (LEHHHHHH), N-концевой CSSF для добавления липидов
CSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNN
GSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQTTLEVFKEGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNEKG
EVSEKIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKGYVLEGTTLAEKTTLVVKEGTVTLN
ISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSTLTITVNSKKTCDLVFTKENTITVQQYDS
NGTKLEGSVEITKLDEIKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 35

B. afzelii (штамм K78; серотип 2 OspA) ак 18-273, удаленная сигнальная последовательность липидизации lpp (MKATKLVLGAVILGSTLLAG, SEQ ID NO: 15), C-концевая гистидиновая метка (LEHHHHHH), N-концевой CSSF для добавления липидов
CSSFKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSKATVDKIELKGTSKDN
GSGVLEGTKDDKSKAKLTIADDLSKTTFELFKEDGKTLVSRKVSSKDKTSTDEMFNEKG
ELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTVLEVKEGTVTLN

KEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQDTITVQK
YDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 36

B. garinii (штамм PBr; серотип 3 OspA) ак 18-274, удаленная сигнальная последовательность липидизации lpp (MKATKLVLGAVILGSTLLAG, SEQ ID NO: 15), C-концевая гистидиновая метка (LEHHHHHH), N-концевой CSSF для добавления липидов
CSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSKSN
GSGVLEGEKADKSKAKLTISQDLNQTTFEIFKEDGKTLVSRKVNKDKSSTEEFNDKG
KLSEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTGTVTL
KNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITVQNY
NRAGNALEGSPAIEKDLAELKAALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 37

B. bavariensis (штамм PBi; серотип 4 OspA) ак 18-273, удаленная сигнальная последовательность липидизации lpp (MKATKLVLGAVILGSTLLAG, SEQ ID NO: 15), C-концевая гистидиновая метка (LEHHHHHH), N-концевой CSSF для добавления липидов
CSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKDGKYSMATVDKLELKGTSKSN
GSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVNKDKSSIEEFNAK
SEKTLRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLVTEGTVVLSKHIP
NSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAG
TNLEGNAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 38

B. garinii (штамм PHei; серотип 5 OspA) ак 18-273, удаленная сигнальная последовательность липидизации lpp (MKATKLVLGAVILGSTLLAG, SEQ ID NO: 15), C-концевая гистидиновая метка (LEHHHHHH), N-концевой CSSF для добавления липидов
CSSFKQNVSSLDEKNSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKDGKYSMATVEKLELKGTSKSN
NGSGTLEGEKTDKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLKDKSSTEEKFNEKG
EISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLVTEGTVTL
NISKSGEITVALDDTDSSGNKSGTWDSGTSTLTISKNRKTQKQLVFTKEDTITVQNYDS
AGTNLEGKAVEITTLKELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 39

B. garinii (штамм DK29; серотип 6 OspA) ак 18-274, удаленная сигнальная последовательность липидизации lpp (MKATKLVLGAVILGSTLLAG, SEQ ID NO: 15), C-концевая гистидиновая метка (LEHHHHHH), N-концевой CSSF для добавления липидов

CSSFQKNVSSLDEKNSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKDGKYSLEATVDKLELKGTSKNN
 GSGTLEGEKTDKSKVKSTIADDLSQTKFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSSTEEFNGKGE
 TSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTEGTLAADGKTTLVTEGTVVLSK
 NILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWDSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTITVQRYD
 SAGTNLEGKAVEITTLKELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 40

Химерный OspA серотипа 1/серотипа 2, N-концевая липидизация, с гистидиновой меткой, в том числе сигнальная последовательность липидизации OspB: MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 14), которая отщепляется в ходе процессинга
 MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGEMKVLVSKEKDKNGKYDLIATVDKLE
 LKGTSDKNNGSGVLEGVKTNSKVKLTISDDLQTTLEVFEDGKTLVSKKVTSDKSS
 TEEKFNEKGEVSEKIITMADGTRLEYTGKSDGTGAKYVLKNFTLEGKVANDKTTLEV
 KEGTVTLNISKSGEVSVELNDTSSAATKKTAAWNSKTSTLTISVNSKTTQLVFTK
 QDTITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 41

Химерный OspA серотипа 5/серотипа 3, N-концевая липидизация, с гистидиновой меткой, в том числе сигнальная последовательность липидизации OspB: MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 14), которая отщепляется в ходе процессинга
 MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGGMKVLVSKEKDKNGKYSMATVEKL
 ELKGTSDKNNGSGTLEGEKTNKSKVKLTIAEDLSKTTFEIFKEDGKTLVSKKVTLDKSS
 TEEKFNEKGEISEKTIVMANGTRLEYTDIKSDGTGAKYVLKDFTEGTLAADGKTTLK
 VTEGTVTLNISKSGEITVALDDTSSGNKKS GTWDSDTSTLTISKNSQKTKQLVFTKE
 NTITVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELKAALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 42

Химерный OspA серотипа 6/серотипа 4, N-концевая липидизация, с гистидиновой меткой, в том числе сигнальная последовательность липидизации OspB: MRLIGFALALALIG (SEQ ID NO: 14), которая отщепляется в ходе процессинга
 MRLIGFALALALIGCAQKGAESIGSVSVDLPGGMTVLVSKEKDKNGKYSLEATVDKLE
 LKGTSDKNNGSGTLEGEKTNKSKVKLTIAADDLSQTKFEIFKEDAKTLVSKKVTLDKSS
 TEEKFNEKGETSEKTIVMANGTRLEYTDIKSDGSGKAKYVLKDFTEGTLAADGKTTLK
 VTEGTVVLSMNLKSGEITVALDDSDTTQATKKTGKWDSNTSTLTISVNSKTKNIVFTK
 EDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELKNALKLEHHHHHH

SEQ ID NO: 43

S1D1

FNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIIKSDGSGKAKEVLKNFTLEGKVANDKTTLVVKCGT
 VTLSKNISKSGEVSVELNDTDSSAATKKTAAWNSGTSTLTITVNSKKTDLVFTKENTIT
 VQQYDSNGTKLEGSVEITKLDEICNALK

SEQ ID NO: 44

S2D1

FNEKGELSAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKNFTLEGKVANDKVTLEVVC
 GTVTLSKEIAKSGEVTVALNDTNTTQATKKTGAWDSKTSTLTISVNSKKTQLVFTKQD
 TITVQKYDSAGTNLEGTAVEIKTLDELCAALK

SEQ ID NO: 45

S3D1

FNDKGKLESEKVVTRANGTRLEYTEIKNDGSGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTC
 GTVTLSKNISKSGEITVALNDTETTPADKKTGEWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTI
 TVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 46

S4D1

FNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALGTLAADKTTLKVTCGT
 VVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWSNTSTLTISVNSKKTKNIVFTKEDTITV
 QKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCAALK

SEQ ID NO: 47

S5D1

FNEKGEISEKTIVRANGTRLEYTDIKSDKTGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLKVTCG
 TVTLSKNISKSGEITVALDDTDSSGNKKSCTWDSGTSTLTISKNRRTKTKQLVFTKEDTITV
 QNYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCAALK

SEQ ID NO: 48

S6D1

FNGKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFTLGTLAADGKTTLKVTCG
 TVVLSKNILKSGEITAALDDSDTTRATKKTGKWSKTSTLTISVNSQKTKNLVFTKEDTI
 TVQRYDSAGTNLEGKAVEITTLKELCAALK

SEQ ID NO: 49

S3HYBD1 (BVA)

FNEKGGEVSEKILTRSNGTTLEYSQMTDAENATKAVETLKNGIKLPGNLVGGKTKLTVTC
 GTVTLSKNISKSGETVALNDTETTPADKKTGWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTI
 TVQNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 50

BVAD1

FNEKGGEVSEKILTRSNGTTLEYSQMTDAENATKAVETLKNGIKLPGNLVGGKTTLKITC
 GTVTLSKHKIAKSGETVVEINDTSSTPNTKKTGKWDARNSTLTHVDSKNKTKLVFTKQDTI
 ITVQSYNPAGNKLEGTAVEIKTLQELCNALK

SEQ ID NO: 51

S3hybD1(Bsp): гибридный С-концевой фрагмент OspA; аминокислоты 126-175 из *Borrelia spielmanii* и аминокислоты 177-274 из *Borrelia garinii*, штамм PBr, с дисульфидной связью типа 1 и Т в положении 233

FNEKGELSEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFTLEGTLANEKTKLTVTCGT
 VTLSKNISKSGETVALNDTETTPADKKTGWKSSTLTISKNSQKTKQLVFTKENTITV
 QNYNRAGNALEGSPAIEKDLAELCAALK

SEQ ID NO: 52

MSPD1

FNEKGELSEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFTLEGTLANEKATLTVKCGT
 VTLSKNIDKSGETVALNDTDSTAATKKTGAWDSTSTLTITVNSKKTDLVFTKQDTI
 TVQKYDSAGTTLEGSVEIKTLDELCAALK

SEQ ID NO: 53

Прямой праймер для межгенного спейсера 16S-23S

GTATGTTTAGTGAGGGGGGTG

SEQ ID NO: 54

Обратный праймер для межгенного спейсера 16S-23S

GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG

SEQ ID NO: 55

Прямой вложенный праймер для межгенного спейсера 16S-23S

AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG

SEQ ID NO: 56

Обратный вложенный праймер для межгенного спейсера 16S-23S

GTCTGATAAACCTGAGGTCGGA

SEQ ID NO: 57

Прямой праймер для гена *RecA Borrelia*

CATGCTCTTGATCCTGTТА

SEQ ID NO: 58

Обратный праймер для гена *RecA Borrelia*

CCCATTTCTCCATCTATCTC

SEQ ID NO: 59

25-мерный пептид из константной области 6 (IR6) VlsE

MKKDDQIAAAMVLRGMAKDGGQFALK

SEQ ID NO: 60

Кателин мыши

RLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPQPE

SEQ ID NO: 61

Пептид KLK

KLKLLLLLKLK

SEQ ID NO: 62

N-концевой пептид для липидизации

CKQN

SEQ ID NO: 63

5'-(dIdC)₁₃-3'

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

SEQ ID NO: 64

C-концевая гистидиновая метка

LENNNNNN

SEQ ID NO: 65

N-концевой CSSF для добавления липидов

CSSF

Полное содержание всех ссылок (в том числе ссылок на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и патентные заявки, которые рассматриваются параллельно), приведенных по тексту этого описания, тем самым, явно включено посредством ссылки.

Список последовательностей

<110> Валнева Аустрия ГМБХ

<120> МУТАНТНЫЕ ФРАГМЕНТЫ OspA И СПОСОБЫ

<130> V69542PCREV

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 150

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> S3hybD1

<400> 1

```

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Leu Thr Arg Ser Asn
1          5          10          15
Gly Thr Thr Leu Glu Tyr Ser Gln Met Thr Asp Ala Glu Asn Ala Thr
          20          25          30
Lys Ala Val Glu Thr Leu Lys Asn Gly Ile Lys Leu Pro Gly Asn Leu
          35          40          45
Val Gly Gly Lys Thr Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu
50          55          60
Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp
65          70          75          80
Thr Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp
          85          90          95
Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu
          100          105          110
Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala
          115          120          125
Gly Asn Ala Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu
130          135          140
Leu Cys Ala Ala Leu Lys
145          150

```

<210> 2

<211> 52

<212> ПРОТЕИН

<213> Borrelia valaisiana

<400> 2

```

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Leu Thr Arg Ser Asn
1          5          10          15
Gly Thr Thr Leu Glu Tyr Ser Gln Met Thr Asp Ala Glu Asn Ala Thr
          20          25          30
Lys Ala Val Glu Thr Leu Lys Asn Gly Ile Lys Leu Pro Gly Asn Leu
          35          40          45
Val Gly Gly Lys
50

```

<210> 3

<211> 98

<212> ПРОТЕИН

<213> Borrelia garinii

<400> 3

Thr Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr
 20 25 30
 Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu
 35 40 45
 Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
 50 55 60
 Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Cys Ala Ala
 85 90 95
 Leu Lys

<210> 4
 <211> 274
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Borrelia valaisiana
 <400> 4

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Ala Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45
 Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Val Ala Thr Val Asp Lys Val Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Val Lys
 65 70 75 80
 Asp Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp Leu Gly Glu
 85 90 95
 Thr Lys Leu Glu Thr Phe Lys Glu Asp Gly Thr Leu Val Ser Arg Lys
 100 105 110
 Val Asn Phe Lys Asp Lys Ser Phe Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys
 115 120 125
 Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Leu Thr Arg Ser Asn Gly Thr Thr Leu
 130 135 140
 Glu Tyr Ser Gln Met Thr Asp Ala Glu Asn Ala Thr Lys Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Thr Leu Lys Asn Gly Ile Lys Leu Pro Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys
 165 170 175
 Thr Thr Leu Lys Ile Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys His Ile
 180 185 190
 Ala Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Glu Ile Asn Asp Thr Ser Ser Thr
 195 200 205
 Pro Asn Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ala Arg Asn Ser Thr Leu
 210 215 220
 Thr Ile Ile Val Asp Ser Lys Asn Lys Thr Lys Leu Val Phe Thr Lys
 225 230 235 240
 Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Ser Tyr Asn Pro Ala Gly Asn Lys Leu
 245 250 255
 Glu Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Gln Glu Leu Lys Asn Ala

260 265 270
 Leu Lys
 <210> 5
 <211> 273
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia burgdorferi*
 <400> 5
 Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asn Lys
 35 40 45
 Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Ile Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Val Lys
 65 70 75 80
 Ala Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp Leu Gly Gln
 85 90 95
 Thr Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
 100 105 110
 Lys Val Thr Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu
 115 120 125
 Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp Gly Thr Arg
 130 135 140
 Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Val Leu Lys Gly Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Glu Lys Thr
 165 170 175
 Thr Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser
 180 185 190
 Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala
 195 200 205
 Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr
 210 215 220
 Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe Thr Lys Glu
 225 230 235 240
 Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Lys Leu Glu
 245 250 255
 Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys Asn Ala Leu
 260 265 270
 Lys
 <210> 6
 <211> 273
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia afzelii*
 <400> 6
 Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Ala Ser Val

```

      20      25      30
Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
      35      40      45
Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Val Asp Lys Ile Glu Leu Lys
      50      55      60
Gly Thr Ser Asp Lys Asp Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Thr Lys
65      70      75      80
Asp Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Lys
      85      90      95
Thr Thr Phe Glu Leu Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Arg
      100      105      110
Lys Val Ser Ser Lys Asp Lys Thr Ser Thr Asp Glu Met Phe Asn Glu
      115      120      125
Lys Gly Glu Leu Ser Ala Lys Thr Met Thr Arg Glu Asn Gly Thr Lys
      130      135      140
Leu Glu Tyr Thr Glu Met Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Glu
145      150      155      160
Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp Lys Val
      165      170      175
Thr Leu Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Glu Ile Ala
      180      185      190
Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn Thr Thr Gln
      195      200      205
Ala Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr
      210      215      220
Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln
225      230      235      240
Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
      245      250      255
Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu
      260      265      270
Lys

```

```

<210> 7
<211> 274
<212> ПРОТЕИН
<213> Borrelia garinii
<400> 7

```

```

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
1      5      10      15
Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
      20      25      30
Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
      35      40      45
Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys
      50      55      60
Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Glu Lys
65      70      75      80
Ala Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Gln Asp Leu Asn Gln
      85      90      95
Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Arg
      100      105      110

```

Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Asp
 115 120 125
 Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn Gly Thr Arg
 130 135 140
 Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Val Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp Gly Gly Glu
 165 170 175
 Thr Lys Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190
 Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr
 195 200 205
 Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu
 210 215 220
 Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
 225 230 235 240
 Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu
 245 250 255
 Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Lys Ala Ala
 260 265 270
 Leu Lys

<210> 8
 <211> 274
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Borrelia garinii
 <400> 8

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45
 Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Glu Lys
 65 70 75 80
 Ala Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Gln Asp Leu Asn Gln
 85 90 95
 Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Arg
 100 105 110
 Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Asp
 115 120 125
 Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn Gly Thr Arg
 130 135 140
 Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Val Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp Gly Gly Glu
 165 170 175
 Thr Lys Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190
 Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr


```

      195              200              205
Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu
 210              215              220
Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
 225              230              235              240
Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu
      245              250              255
Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Lys Ala Ala
 260              265              270
Leu Lys

```

```

<210> 9
<211> 273
<212> ПРОТЕИН
<213> Borrelia bavariensis
<400> 9

```

```

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1              5              10              15
Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
      20              25              30
Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35              40              45
Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
 50              55              60
Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys
 65              70              75              80
Ser Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Glu Asp Leu Ser Lys
      85              90              95
Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
      100              105              110
Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Ile Glu Glu Lys Phe Asn Ala
      115              120              125
Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu Arg Ala Asn Gly Thr Arg
      130              135              140
Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Glu
      145              150              155              160
Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Lys Thr
      165              170              175
Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys His Ile Pro
      180              185              190
Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn Ser Thr Gln
      195              200              205
Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu Thr
      210              215              220
Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys Glu
      225              230              235              240
Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
      245              250              255
Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu
      260              265              270
Lys

```

<210> 10
 <211> 273
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia garinii*
 <400> 10
 Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45
 Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys
 65 70 75 80
 Thr Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Glu Asp Leu Ser Lys
 85 90 95
 Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
 100 105 110
 Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu
 115 120 125
 Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn Gly Thr Arg
 130 135 140
 Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys
 165 170 175
 Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190
 Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr Asp Ser Ser
 195 200 205
 Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
 245 250 255
 Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Lys Asn Ala Leu
 260 265 270
 Lys

<210> 11
 <211> 274
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia garinii*
 <400> 11
 Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Gly Met Thr Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys
 65 70 75 80
 Thr Asp Lys Ser Lys Val Lys Ser Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Gln
 85 90 95
 Thr Lys Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
 100 105 110
 Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Gly
 115 120 125
 Lys Gly Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn Gly Thr Arg
 130 135 140
 Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys
 165 170 175
 Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190
 Leu Lys Ser Gly Glu Ile Thr Ala Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr
 195 200 205
 Arg Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu
 210 215 220
 Thr Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val Phe Thr Lys
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Arg Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu
 245 250 255
 Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Lys Asn Ala
 260 265 270
 Leu Lys

<210> 12
 <211> 274
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia garinii*
 <400> 12

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys
 35 40 45
 Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Val Lys
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Gln
 85 90 95
 Thr Lys Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
 100 105 110
 Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Asp
 115 120 125
 Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn Gly Thr Arg

130 135 140
 Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Gln Asn Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Val Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Asp Gly Glu
 165 170 175
 Thr Lys Leu Thr Val Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
 180 185 190
 Ser Glu Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Lys Asp Thr Glu Thr Thr
 195 200 205
 Pro Ala Asp Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu
 210 215 220
 Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
 225 230 235 240
 Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Lys Leu
 245 250 255
 Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ala Leu Lys Ala Ala
 260 265 270
 Leu Lys

<210> 13
 <211> 16
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia burgdorferi*
 <400> 13
 Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia burgdorferi*
 <400> 14
 Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 15
 Met Lys Ala Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gly
 20
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> LN1 пептидный линкер
 <400> 16
 Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asn Lys
 1 5 10 15
 Asp Gly Lys Tyr Ser

20

<210> 17
 <211> 11
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia burgdorferi*
 <400> 17
 Gly Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Glu
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia afzelii*
 <400> 18
 Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp
 1 5 10

<210> 19
 <211> 148
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> *B. burgdorferi* OspA 126-273 с замененной hLFA-подобной последовательностью
 <400> 19
 Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn
 35 40 45
 Asp Lys Thr Thr Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
 50 55 60
 Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys
 145

<210> 20
 <211> 148
 <212> ПРОТЕИН
 <213> *Borrelia afzelii*
 <400> 20
 Phe Asn Glu Lys Gly Glu Leu Ser Ala Lys Thr Met Thr Arg Glu Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Lys Leu Glu Tyr Thr Glu Met Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
 20 25 30

Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn
 35 40 45
 Asp Lys Val Thr Leu Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
 50 55 60
 Glu Ile Ala Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn
 65 70 75 80
 Thr Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Asn Leu Glu Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys

145

<210> 21

<211> 149

<212> ПРОТЕИН

<213> *Borrelia garinii*

<400> 21

Phe Asn Asp Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp
 35 40 45
 Gly Gly Glu Thr Lys Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr
 65 70 75 80
 Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr
 85 90 95
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln Leu Val
 100 105 110
 Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly
 115 120 125
 Asn Ala Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu
 130 135 140
 Lys Ala Ala Leu Lys

145

<210> 22

<211> 148

<212> ПРОТЕИН

<213> *Borrelia bavariensis*

<400> 22

Phe Asn Ala Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 35 40 45

Asp Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys
 50 55 60
 His Ile Pro Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Asn Leu Glu Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys

145

<210> 23

<211> 148

<212> ПРОТЕИН

<213> Borrelia garinii

<400> 23

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 35 40 45
 Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr
 65 70 75 80
 Asp Ser Ser Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Lys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys

145

<210> 24

<211> 149

<212> ПРОТЕИН

<213> Borrelia garinii

<400> 24

Phe Asn Gly Lys Gly Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 35 40 45
 Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser
 50 55 60

Lys Asn Ile Leu Lys Ser Gly Glu Ile Thr Ala Ala Leu Asp Asp Ser
 65 70 75 80
 Asp Thr Thr Arg Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr
 85 90 95
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val
 100 105 110
 Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Arg Tyr Asp Ser Ala Gly
 115 120 125
 Thr Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu
 130 135 140

Lys Asn Ala Leu Lys

145

<210> 25

<211> 149

<212> ПРОТЕИН

<213> Borrelia garinii

<400> 25

Phe Asn Asp Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Gln Asn Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala
 35 40 45
 Asp Gly Glu Thr Lys Leu Thr Val Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ser Glu Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Lys Asp Thr
 65 70 75 80
 Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Lys Thr
 85 90 95
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val
 100 105 110
 Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asn Thr Ala Gly
 115 120 125
 Thr Lys Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Glu Ala Leu
 130 135 140

Lys Ala Ala Leu Lys

145

<210> 26

<211> 1029

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Lip-S4D1-S3hybD1-nt

<400> 26

atgaaagcta ctaaactggg actgggcgcg gtaatcctgg gttctactct gctggcaggt	60
tgctcaagct tcaatgctaa gggcgaactg agcgaaaaaa cgatcctgcg tgcgaatggc	120
acccgtctgg aatacaccga aatcaaatcc gatggtacgg gcaaagcaaa ggaagtcctg	180
aaagattttg ctctggaagg taccctggcg gccgacaaaa ccacgctgaa ggtgacgtgc	240
ggcaccgtgg ttctgagcaa acatattccg aactctgggtg aaatcaccgt tgaactgaac	300
gatagcaatt ctacgcaggc aacaaaaaag acgggcaaat gggacagtaa tacctccacg	360
ctgaccattt cagtcaactc gaaaaagacc aaaaatattg tggtcacgaa ggaagatacg	420
atcacggttc aaaaatatga ctccgcgggc accaacctgg aaggcaatgc cgtcgaaatc	480


```

aaaaccctgg atgaactgtg taacgccctg aagggtacta gtgacaaaaa caatggctct 540
ggtagcaaaag agaaaaacaa agatggcaag tactcattca acgaaaaagg cgaagtgagc 600
gaaaaaatc tgacccgtag caatggcacc accctggaat atagccagat gaccgatgca 660
gaaaatgcaa ccaaagcagt tgaaaccctg aaaaacggta ttaactgcc ttgtaatctg 720
gttggtggta aaacaaaact gaccgttacc tgtggcaccg ttaccctgag caaaaacatt 780
agcaaaagcg gtgaaattac cgtggcactg aatgataccg aaaccacacc ggcagacaaa 840
aaaaccggtg aatggaaaag cgataccagc accctgacca ttagtaaaaa tagccagaaa 900
acaaaacagc tgggtgttac caaagaaaac accattaccg tgcagaatta taaccgtgca 960
ggtaatgcac tggaaggtag tccggcagaa attaaagatc tggcagaact gtgtgcagcc 1020
ctgaaataa 1029
<210> 27
<211> 322
<212> ПРОТЕИН
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Lip-S4D1-S3hybD1-aa
<220>
<221> ЛИПИД
<222> (1)..(1)
<400> 27
Cys Ser Ser Phe Asn Ala Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu
1 5 10 15
Arg Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly
20 25 30
Thr Gly Lys Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr
35 40 45
Leu Ala Ala Asp Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val Val
50 55 60
Leu Ser Lys His Ile Pro Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn
65 70 75 80
Asp Ser Asn Ser Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser
85 90 95
Asn Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn
100 105 110
Ile Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser
115 120 125
Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp
130 135 140
Glu Leu Cys Asn Ala Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser
145 150 155 160
Gly Ser Lys Glu Lys Asn Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Phe Asn Glu Lys
165 170 175
Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Leu Thr Arg Ser Asn Gly Thr Thr Leu
180 185 190
Glu Tyr Ser Gln Met Thr Asp Ala Glu Asn Ala Thr Lys Ala Val Glu
195 200 205
Thr Leu Lys Asn Gly Ile Lys Leu Pro Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys
210 215 220
Thr Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile
225 230 235 240
Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr
245 250 255

```

Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu
 260 265 270
 Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys
 275 280 285
 Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu
 290 295 300
 Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Cys Ala Ala
 305 310 315 320
 Leu Lys

<210> 28
 <211> 1020
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Lip-S1D1-S2D1-nt
 <400> 28

```

atgaaagcta ctaaactggt actgggcgcg gtaatcctgg gttctactct gctggcagggt      60
tgctcaagct tcaacgaaaa gggcgaagtc agcgaaaaaa tcattaccgc cgcagacggc      120
acccgcctgg aatacaccgg catcaaatcg gacggcagcg gcaaagcgaa agaagtcttg      180
aaaaacttta ccctggaagg caaagtcgca aatgataaaa ccaccctggt ggtgaaatgc      240
ggcaccgtta cgctgagcaa aaacattagt aaatccgggt aagtctctgt ggaactgaat      300
gataccgaca gctctgcggc caccaagaaa accgcagctt ggaactcagg cacctcgacg      360
ctgaccatta cggttaatag caagaaaacc aaagatctgg tcttcacgaa agaaaaacacc      420
atcacgggtg agcaatatga cagcaatggt accaaactgg aaggctccgc tgtggaaatc      480
acgaaactgg atgaaatctg taatgctctg aaaggtacta gtgacaaaaa caatggctct      540
ggtagcaaaag agaaaaacaa agatggcaag tactcattca acgaaaaagg cgaactgtcg      600
gcgaaaacga tgacgcgtga aaacggcacc aaactggaat atacggaat gaaaagcgat      660
ggcaccggta aagcgaaaga agttctgaaa aactttaccc tggaaggcaa agtcgccaat      720
gacaaagtca ccctggaagt gaaatgcggc accgttacgc tgtcaaaaaga aattgcaaaa      780
tcgggtgaag tgaccgttgc tctgaacgat acgaatacca cgcaagcgac caagaaaacc      840
ggcgccctggg acagcaaaac ctctacgctg accattagtg ttaatagcaa gaaaaccacg      900
cagctgggtc tcaccaaaac agatacgatc accgtgcaga aatacgacag tgcgggtacc      960
aacctggaag gcacggctgt tgaaatcaaa accctggacg aactgtgtaa cgccctgaaa     1020

```

<210> 29
 <211> 320
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Lip-S1D1-S2D1-aa
 <220>
 <221> ЛИПИД
 <222> (1)..(1)
 <400> 29

Cys Ser Ser Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly
 20 25 30
 Ser Gly Lys Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys
 35 40 45
 Val Ala Asn Asp Lys Thr Thr Leu Val Val Lys Cys Gly Thr Val Thr
 50 55 60

Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn
 65 70 75 80
 Asp Thr Asp Ser Ser Ala Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser
 85 90 95
 Gly Thr Ser Thr Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp
 100 105 110
 Leu Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser
 115 120 125
 Asn Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp
 130 135 140
 Glu Ile Cys Asn Ala Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Lys Glu Lys Asn Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Phe Asn Glu Lys
 165 170 175
 Gly Glu Leu Ser Ala Lys Thr Met Thr Arg Glu Asn Gly Thr Lys Leu
 180 185 190
 Glu Tyr Thr Glu Met Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Glu Val
 195 200 205
 Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp Lys Val Thr
 210 215 220
 Leu Glu Val Lys Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Glu Ile Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn Thr Thr Gln Ala
 245 250 255
 Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile
 260 265 270
 Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln Asp
 275 280 285
 Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly
 290 295 300
 Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Cys Asn Ala Leu Lys
 305 310 315 320

<210> 30

<211> 1023

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Lip-S4D1-S3D1-nt

<400> 30

atgaaagcta ctaaactggg actgggacg gtaatcctgg gttctactct gctggcaggt	60
tgctcaagct tcaatgctaa gggcgaactg agcgaaaaaa cgatcctgcg tgcgaatggc	120
acccgtctgg aatacaccga aatcaaatcc gatggtacgg gcaaagcaaa ggaagtcctg	180
aaagattttg ctctggaagg taccctggcg gccgacaaaa ccacgctgaa ggtgacgtgc	240
ggcaccgtgg ttctgagcaa acatattccg aactctgggtg aaatcaccgt tgaactgaac	300
gatagcaatt ctacgcaggc aacaaaaaag acgggcaaat gggacagtaa tacctccacg	360
ctgaccattt cagtcaactc gaaaaagacc aaaaatattg tggtcacgaa ggaagatacg	420
atcaccgttc aaaaatatga ctccgcgggc accaacctgg aaggcaatgc cgtcgaaatc	480
aaaaccctgg atgaactgtg taacgccctg aagggtacta gtgacaaaa caatggctct	540
ggtagcaaa agaaaaacaa agatggcaag tactcattta acgataaggg caaactgtcg	600
gaaaaagtgg tcacccgcgc aaatggcacc cgcttggaa acacggaaat caaaaacgat	660
ggtagcggca aagcgaagga agttctgaaa ggctttgccc tggaaggtag cctgacggat	720
ggcgggtgaaa ccaaactgac cgtgacgtgc ggcaccgtta cgctgtctaa aaacattagc	780

```

aagtctggtg aaatcacggt cgactgaat gataccgaaa ccacgccggc tgacaaaaag      840
accggcgaat ggaagaagtg cacctccacg ctgaccattt caaagaactc gcagaaaccg      900
aagcaactgg tcttcacca agaaaacacg atcaccgtgc agaactataa tcgtgccggg      960
aatgctctgg aaggctcacc ggctgaaatc aaggacctgg ctgaactgtg tgcggcactg     1020
aaa                                                                1023

```

<210> 31

<211> 321

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Lip-S4D1-S3D1-aa

<220>

<221> ЛИПИД

<222> (1)..(1)

<400> 31

```

Cys Ser Ser Phe Asn Ala Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu
1          5          10          15
Arg Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly
20          25          30
Thr Gly Lys Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr
35          40          45
Leu Ala Ala Asp Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val Val
50          55          60
Leu Ser Lys His Ile Pro Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn
65          70          75          80
Asp Ser Asn Ser Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser
85          90          95
Asn Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn
100         105         110
Ile Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser
115         120         125
Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp
130         135         140
Glu Leu Cys Asn Ala Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser
145         150         155         160
Gly Ser Lys Glu Lys Asn Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Phe Asn Asp Lys
165         170         175
Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn Gly Thr Arg Leu
180         185         190
Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu Val
195         200         205
Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp Gly Gly Glu Thr
210         215         220
Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser
225         230         235         240
Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu Thr Thr Pro
245         250         255
Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser Thr Leu Thr
260         265         270
Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Pro Lys Gln Leu Val Phe Thr Lys Glu
275         280         285
Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn Ala Leu Glu

```

290 295 300
 Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Cys Ala Ala Leu
 305 310 315 320
 Lys

<210> 32
 <211> 1023
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Lip-S5D1-S6D1-nt
 <400> 32

atgaaagcta ctaaactggg actgggcgcg gtaatcctgg gttctactct gctggcaggt 60
 tgcctaagct tcaacgaaaa gggcgaaatc tcagaaaaaa ccacgtccg cgctaaccggc 120
 acccgcttgg aatacaccga catcaaatca gacaagaccg gtaaagcgaa ggaagtcttg 180
 aaagatttta cgctggaagg taccttggca gcagacggta aaaccacgct gaaggtgacc 240
 tgcggtaccg ttacgtctgc caaaaacatt agtaagtccg gcgaaatcac ggtcgccctg 300
 gatgacaccg atagctctgg caacaaaaag agcggtagct gggattcagg cacctcgacg 360
 ctgaccattt ctaaaaatcg tacgaaaacc aagcagctgg tcttcacgaa agaagatacg 420
 atcaccgtgc aaaaactatga cagcgtaggt accaatctgg aaggcaaacg tgtggaaatt 480
 accacgctga aagaactgtg taatgctctg aaaggtagta gtgacaaaa caatggctct 540
 ggtagcaaaag agaaaaaaca agatggcaag tactcattca acggcaaaagg tgaacgagc 600
 gaaaagacca tcgtgcgtgc gaacggtagc cgcttggaa atacggacat taaatcggac 660
 ggcagcggca aagcaaaagg agtcctgaaa gatctttacg tggaaggtag cctggcagca 720
 gacggtaaaa ccacgctgaa ggtgacgtgc ggcaccgtgg ttctgtcaaa aaacattctg 780
 aagtcgggtg aaatcaccgc agctctggat gacagcgata ccacgcgtgc tacgaaaaag 840
 accggtaaat gggatagcaa gacctctacg ctgaccatta gtgtcaactc ccagaaaaacg 900
 aagaatctgg tgttcaccaa agaagatacg atcaccgttc aacgctatga cagtgcgggc 960
 accaacctgg aaggcaaacg cgttgaaatt accacgctga aagaactgtg taatgctctg 1020
 aaa 1023

<210> 33
 <211> 321
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Lip-S5D1-S6D1-aa
 <220>
 <221> ЛИПИД
 <222> (1)..(1)
 <400> 33

Cys Ser Ser Phe Asn Glu Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys
 20 25 30
 Thr Gly Lys Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr
 35 40 45
 Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Asp Asp Thr Asp Ser Ser Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser
 85 90 95

Gly Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln
 100 105 110
 Leu Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser
 115 120 125
 Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys
 130 135 140
 Glu Leu Cys Asn Ala Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Lys Glu Lys Asn Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Phe Asn Gly Lys
 165 170 175
 Gly Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn Gly Thr Arg Leu
 180 185 190
 Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu Val
 195 200 205
 Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr
 210 215 220
 Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val Val Leu Ser Lys Asn Ile Leu
 225 230 235 240
 Lys Ser Gly Glu Ile Thr Ala Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr Arg
 245 250 255
 Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr
 260 265 270
 Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val Phe Thr Lys Glu
 275 280 285
 Asp Thr Ile Thr Val Gln Arg Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu
 290 295 300
 Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Cys Asn Ala Leu
 305 310 315 320
 Lys

<210> 34

<211> 268

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> B. burgdorferi (штамм B31, OspA серотипа 1) aa 18-273

<400> 34

Cys Ser Ser Phe Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Val Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu
 20 25 30
 Lys Asn Lys Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Ile Ala Thr Val Asp Lys Leu
 35 40 45
 Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu
 50 55 60
 Gly Val Lys Ala Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Gln Thr Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu
 85 90 95
 Val Ser Lys Lys Val Thr Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys
 100 105 110
 Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp

```

      115              120              125
Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys
 130              135              140
Ala Lys Glu Val Leu Lys Gly Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala
 145              150              155              160
Glu Lys Thr Thr Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
      165              170              175
Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp
      180              185              190
Ser Ser Ala Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser
      195              200              205
Thr Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe
 210              215              220
Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr
 225              230              235              240
Lys Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys
      245              250              255
Asn Ala Leu Lys Leu Glu His His His His His His
      260              265

```

<210> 35

<211> 268

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> B. afzelii (штамм K78; OspA серотипа 2) aa 18-273

<400> 35

```

Cys Ser Ser Phe Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser
 1              5              10              15
Ala Ser Val Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu
      20              25              30
Lys Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Val Asp Lys Ile
      35              40              45
Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asp Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu
      50              55              60
Gly Thr Lys Asp Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp
      65              70              75              80
Leu Ser Lys Thr Thr Phe Glu Leu Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu
      85              90              95
Val Ser Arg Lys Val Ser Ser Lys Asp Lys Thr Ser Thr Asp Glu Met
      100              105              110
Phe Asn Glu Lys Gly Glu Leu Ser Ala Lys Thr Met Thr Arg Glu Asn
      115              120              125
Gly Thr Lys Leu Glu Tyr Thr Glu Met Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
      130              135              140
Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn
      145              150              155              160
Asp Lys Val Thr Leu Glu Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
      165              170              175
Glu Ile Ala Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn
      180              185              190
Thr Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser
      195              200              205

```

Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe
 210 215 220
 Thr Lys Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys
 245 250 255
 Asn Ala Leu Lys Leu Glu His His His His His His
 260 265

<210> 36

<211> 269

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> B. garinii (штамм PBr; OspA серотипа 3) aa 18-274

<400> 36

Cys Ser Ser Phe Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Val Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu
 20 25 30
 Lys Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu
 35 40 45
 Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu
 50 55 60
 Gly Glu Lys Ala Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Gln Asp
 65 70 75 80
 Leu Asn Gln Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu
 85 90 95
 Val Ser Arg Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys
 100 105 110
 Phe Asn Asp Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys
 130 135 140
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Glu Thr Lys Leu Thr Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser
 165 170 175
 Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr
 180 185 190
 Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr
 195 200 205
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val
 210 215 220
 Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly
 225 230 235 240
 Asn Ala Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu
 245 250 255
 Lys Ala Ala Leu Lys Leu Glu His His His His His
 260 265

<210> 37

<211> 268

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> B. bavariensis (штамм PBi; OspA серотипа 4) aa 18-273

<400> 37

Cys Ser Ser Phe Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Val Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu
 20 25 30
 Lys Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Asp Lys Leu
 35 40 45
 Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu
 50 55 60
 Gly Glu Lys Ser Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile Ser Glu Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Lys Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu
 85 90 95
 Val Ser Lys Lys Val Asn Ser Lys Asp Lys Ser Ser Ile Glu Glu Lys
 100 105 110
 Phe Asn Ala Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu Arg Ala Asn
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
 130 135 140
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 145 150 155 160
 Asp Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Lys
 165 170 175
 His Ile Pro Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn
 180 185 190
 Ser Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe
 210 215 220
 Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys
 245 250 255
 Asn Ala Leu Lys Leu Glu His His His His His His
 260 265

<210> 38

<211> 268

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> B. garinii (штамм PHei; OspA серотипа 5) aa 18-273

<400> 38

Cys Ser Ser Phe Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Val Asp Leu Pro Gly Gly Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu
 20 25 30
 Lys Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Met Ala Thr Val Glu Lys Leu
 35 40 45
 Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu

```

      50      55      60
Gly Glu Lys Thr Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Glu Asp
65      70      75      80
Leu Ser Lys Thr Thr Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu
      85      90      95
Val Ser Lys Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys
      100      105      110
Phe Asn Glu Lys Gly Glu Ile Ser Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn
      115      120      125
Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys
      130      135      140
Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
145      150      155      160
Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser
      165      170      175
Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr
      180      185      190
Asp Ser Ser Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser
      195      200      205
Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe
      210      215      220
Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
225      230      235      240
Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Lys
      245      250      255
Asn Ala Leu Lys Leu Glu His His His His His His
      260      265

```

<210> 39

<211> 269

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> B. garinii (штамм DK29; OspA серотипа 6) aa 18-274

<400> 39

```

Cys Ser Ser Phe Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser
1      5      10      15
Val Ser Val Asp Leu Pro Gly Gly Met Thr Val Leu Val Ser Lys Glu
      20      25      30
Lys Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Leu
      35      40      45
Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu
      50      55      60
Gly Glu Lys Thr Asp Lys Ser Lys Val Lys Ser Thr Ile Ala Asp Asp
65      70      75      80
Leu Ser Gln Thr Lys Phe Glu Ile Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu
      85      90      95
Val Ser Lys Lys Val Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys
      100      105      110
Phe Asn Gly Lys Gly Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn
      115      120      125
Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys
      130      135      140

```

Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 145 150 155 160
 Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser
 165 170 175
 Lys Asn Ile Leu Lys Ser Gly Glu Ile Thr Ala Ala Leu Asp Asp Ser
 180 185 190
 Asp Thr Thr Arg Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr
 195 200 205
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val
 210 215 220
 Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Arg Tyr Asp Ser Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu
 245 250 255
 Lys Asn Ala Leu Lys Leu Glu His His His His His His
 260 265

<210> 40

<211> 278

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерный OspA Серотипа1/Серотипа2, N-терминальное липидирование

<400> 40

Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ile Gly Cys
 1 5 10 15
 Ala Gln Lys Gly Ala Glu Ser Ile Gly Ser Val Ser Val Asp Leu Pro
 20 25 30
 Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys Asn Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Asp Leu Ile Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys Gly Thr Ser
 50 55 60
 Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Val Lys Thr Asn Lys
 65 70 75 80
 Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp Leu Gly Gln Thr Thr Leu
 85 90 95
 Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val Thr
 100 105 110
 Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly Glu
 115 120 125
 Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Met Ala Asp Gly Thr Arg Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu Lys
 145 150 155 160
 Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp Lys Thr Thr Leu Glu
 165 170 175
 Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Met Asn Ile Ser Lys Ser Gly
 180 185 190
 Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala Ala Thr Lys
 195 200 205
 Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val
 210 215 220
 Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln Asp Thr Ile

225					230					235					240
Thr	Val	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser	Ala	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Gly	Thr	Ala
				245					250					255	
Val	Glu	Ile	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Lys	Asn	Ala	Leu	Lys	Leu	Glu
			260					265					270		
His	His	His	His	His	His										
			275												
<210>	41														
<211>	278														
<212>	ПРОТЕИН														
<213>	Искусственная последовательность														
<220>															
<223>	Химерный OspA Серотипа5/Серотипа3, N-концевое липидирование														
<400>	41														
Met	Arg	Leu	Leu	Ile	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ile	Gly	Cys
1				5				10					15		
Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Glu	Ser	Ile	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Asp	Leu	Pro
			20					25					30		
Gly	Gly	Met	Lys	Val	Leu	Val	Ser	Lys	Glu	Lys	Asp	Lys	Asn	Gly	Lys
		35					40					45			
Tyr	Ser	Leu	Met	Ala	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser
	50					55					60				
Asp	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Gly	Glu	Lys	Thr	Asn	Lys
65					70					75					80
Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Ile	Ala	Glu	Asp	Leu	Ser	Lys	Thr	Thr	Phe
				85					90					95	
Glu	Ile	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Lys	Lys	Val	Thr
			100					105					110		
Leu	Lys	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Glu	Glu	Lys	Phe	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu
			115				120					125			
Ile	Ser	Glu	Lys	Thr	Ile	Val	Met	Ala	Asn	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr
	130					135					140				
Thr	Asp	Ile	Lys	Ser	Asp	Lys	Thr	Gly	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	Lys
145					150					155					160
Asp	Phe	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu
				165					170					175	
Lys	Val	Thr	Glu	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Met	Asn	Ile	Ser	Lys	Ser
			180					185				190			
Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Ala	Leu	Asp	Asp	Thr	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Lys
			195				200					205			
Lys	Ser	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys
	210					215					220				
Asn	Ser	Gln	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	Phe	Thr	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile
225					230					235					240
Thr	Val	Gln	Asn	Tyr	Asn	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Gly	Ser	Pro
				245					250						

<212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Химерный OspA Серотипа6/Серотипа4, N-концевое липидирование
 <400> 42
 Met Arg Leu Leu Ile Gly Phe Ala Leu Ala Leu Ile Gly Cys
 1 5 10 15
 Ala Gln Lys Gly Ala Glu Ser Ile Gly Ser Val Ser Val Asp Leu Pro
 20 25 30
 Gly Gly Met Thr Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asp Lys Asn Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Ser Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys Gly Thr Ser
 50 55 60
 Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Thr Leu Glu Gly Glu Lys Thr Asn Lys
 65 70 75 80
 Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ala Asp Asp Leu Ser Gln Thr Lys Phe
 85 90 95
 Glu Ile Phe Lys Glu Asp Ala Lys Thr Leu Val Ser Lys Lys Val Thr
 100 105 110
 Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Lys Phe Asn Glu Lys Gly Glu
 115 120 125
 Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Met Ala Asn Gly Thr Arg Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Tyr Val Leu Lys
 145 150 155 160
 Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Thr Thr Leu
 165 170 175
 Lys Val Thr Glu Gly Thr Val Val Leu Ser Met Asn Ile Leu Lys Ser
 180 185 190
 Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Ser Asp Thr Thr Gln Ala Thr
 195 200 205
 Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser
 210 215 220
 Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Lys Glu Asp Thr
 225 230 235 240
 Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu Glu Gly Asn
 245 250 255
 Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn Ala Leu Lys Leu
 260 265 270
 Glu His His His His His His
 275
 <210> 43
 <211> 148
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> S1D1
 <400> 43
 Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30

Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn
 35 40 45
 Asp Lys Thr Thr Leu Val Val Lys Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
 50 55 60
 Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Cys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys

145

<210> 44

<211> 148

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> S2D1

<400> 44

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Leu Ser Ala Lys Thr Met Thr Arg Glu Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Lys Leu Glu Tyr Thr Glu Met Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn
 35 40 45
 Asp Lys Val Thr Leu Glu Val Lys Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
 50 55 60
 Glu Ile Ala Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn
 65 70 75 80
 Thr Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Asn Leu Glu Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Cys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys

145

<210> 45

<211> 149

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> S3D1

<400> 45

Phe Asn Asp Lys Gly Lys Leu Ser Glu Lys Val Val Thr Arg Ala Asn
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Asn Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Gly Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Thr Asp
 35 40 45
 Gly Gly Glu Thr Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr
 65 70 75 80
 Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr
 85 90 95
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val
 100 105 110
 Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly
 115 120 125
 Asn Ala Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu
 130 135 140
 Cys Ala Ala Leu Lys
 145
 <210> 46
 <211> 148
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> S4D1
 <400> 46
 Phe Asn Ala Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Ile Leu Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 35 40 45
 Asp Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val Val Leu Ser Lys
 50 55 60
 His Ile Pro Asn Ser Gly Glu Ile Thr Val Glu Leu Asn Asp Ser Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Asn Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asn Ile Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Asn Leu Glu Gly Asn Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Cys
 130 135 140
 Asn Ala Leu Lys
 145
 <210> 47
 <211> 148
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> S5D1
 <400> 47

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Lys Thr Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 35 40 45
 Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asp Asp Thr
 65 70 75 80
 Asp Ser Ser Gly Asn Lys Lys Ser Gly Thr Trp Asp Ser Gly Thr Ser
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Arg Thr Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe
 100 105 110
 Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
 115 120 125
 Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu Cys
 130 135 140

Asn Ala Leu Lys

145

<210> 48

<211> 149

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> S6D1

<400> 48

Phe Asn Gly Lys Gly Glu Thr Ser Glu Lys Thr Ile Val Arg Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Leu Glu Tyr Thr Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys
 20 25 30
 Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 35 40 45
 Asp Gly Lys Thr Thr Leu Lys Val Thr Cys Gly Thr Val Val Leu Ser
 50 55 60
 Lys Asn Ile Leu Lys Ser Gly Glu Ile Thr Ala Ala Leu Asp Asp Ser
 65 70 75 80
 Asp Thr Thr Arg Ala Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ser Lys Thr
 85 90 95
 Ser Thr Leu Thr Ile Ser Val Asn Ser Gln Lys Thr Lys Asn Leu Val
 100 105 110
 Phe Thr Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Gln Arg Tyr Asp Ser Ala Gly
 115 120 125
 Thr Asn Leu Glu Gly Lys Ala Val Glu Ile Thr Thr Leu Lys Glu Leu
 130 135 140

Cys Asn Ala Leu Lys

145

<210> 49

<211> 150

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> S3HYBD1 (BVA)

<400> 49

```

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Leu Thr Arg Ser Asn
1          5          10          15
Gly Thr Thr Leu Glu Tyr Ser Gln Met Thr Asp Ala Glu Asn Ala Thr
          20          25          30
Lys Ala Val Glu Thr Leu Lys Asn Gly Ile Lys Leu Pro Gly Asn Leu
          35          40          45
Val Gly Gly Lys Thr Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu
          50          55          60
Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp
65          70          75          80
Thr Glu Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp
          85          90          95
Thr Ser Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu
          100          105          110
Val Phe Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala
          115          120          125
Gly Asn Ala Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu
          130          135          140
Leu Cys Ala Ala Leu Lys
145          150

```

<210> 50

<211> 150

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> BVAD1

<400> 50

```

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Leu Thr Arg Ser Asn
1          5          10          15
Gly Thr Thr Leu Glu Tyr Ser Gln Met Thr Asp Ala Glu Asn Ala Thr
          20          25          30
Lys Ala Val Glu Thr Leu Lys Asn Gly Ile Lys Leu Pro Gly Asn Leu
          35          40          45
Val Gly Gly Lys Thr Thr Leu Lys Ile Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu
          50          55          60
Ser Lys His Ile Ala Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Glu Ile Asn Asp
65          70          75          80
Thr Ser Ser Thr Pro Asn Thr Lys Lys Thr Gly Lys Trp Asp Ala Arg
          85          90          95
Asn Ser Thr Leu Thr Ile Ile Val Asp Ser Lys Asn Lys Thr Lys Leu
          100          105          110
Val Phe Thr Lys Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Ser Tyr Asn Pro Ala
          115          120          125
Gly Asn Lys Leu Glu Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Gln Glu
          130          135          140
Leu Cys Asn Ala Leu Lys
145          150

```

<210> 51

<211> 148

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> S3HYBD1 (BSP)

<400> 51

```

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Leu Val Arg Ala Asn
1      5      10      15
Gly Thr Lys Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
20      25      30
Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Asn
35      40      45
Glu Lys Thr Lys Leu Thr Val Thr Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
50      55      60
Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Ile Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Glu
65      70      75      80
Thr Thr Pro Ala Asp Lys Lys Thr Gly Glu Trp Lys Ser Asp Thr Ser
85      90      95
Thr Leu Thr Ile Ser Lys Asn Ser Gln Lys Thr Lys Gln Leu Val Phe
100     105     110
Thr Lys Glu Asn Thr Ile Thr Val Gln Asn Tyr Asn Arg Ala Gly Asn
115     120     125
Ala Leu Glu Gly Ser Pro Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ala Glu Leu Cys
130     135     140
Ala Ala Leu Lys
145

```

<210> 52

<211> 148

<212> ПРОТЕИН

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MSPD1

<400> 52

```

Phe Asn Glu Lys Gly Glu Leu Ser Glu Lys Thr Leu Val Arg Ala Asn
1      5      10      15
Gly Thr Lys Leu Glu Tyr Thr Glu Ile Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys
20      25      30
Ala Lys Glu Val Leu Lys Asp Phe Thr Leu Glu Gly Thr Leu Ala Asn
35      40      45
Glu Lys Ala Thr Leu Thr Val Lys Cys Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys
50      55      60
Asn Ile Asp Lys Ser Gly Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asp
65      70      75      80
Ser Thr Ala Ala Thr Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser
85      90      95
Thr Leu Thr Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe
100     105     110
Thr Lys Gln Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr
115     120     125
Thr Leu Glu Gly Ser Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Cys
130     135     140
Asn Ala Leu Lys
145

```

<210> 53

```

<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Прямой праймер для 16S-23S межгенной распорки
<400> 53
gtatgttttag tgaggggggt g 21
<210> 54
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Обратный праймер для 16S-23S межгенной распорки
<400> 54
ggatcatagc tcaggtgggt ag 22
<210> 55
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Прямой праймер для 16S-23S межгенной распорки
<400> 55
aggggggtga agtcgtaaca ag 22
<210> 56
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Обратный праймер для 16S-23S межгенной распорки
<400> 56
gtctgataaa cctgaggtcg ga 22
<210> 57
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Прямой праймер для гена RecA Borrelia
<400> 57
catgctcttg atcctgttta 20
<210> 58
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Обратный праймер для гена RecA Borrelia
<400> 58
cccatttctc catctatctc 20
<210> 59
<211> 25
<212> ПРОТЕИН
<213> Искусственная последовательность
<220>

```

<223> Пептид 25-mer из константной области 6 (IR6) VlsE
 <400> 59
 Met Lys Lys Asp Asp Gln Ile Ala Ala Ala Met Val Leu Arg Gly Met
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Gln Phe Ala Leu Lys
 20 25
 <210> 60
 <211> 36
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Кателин мыши
 <400> 60
 Arg Leu Ala Gly Leu Leu Arg Lys Gly Gly Glu Lys Ile Gly Glu Lys
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Ile Gly Gln Lys Ile Lys Asn Phe Phe Gln Lys Leu Val
 20 25 30
 Pro Gln Pro Glu
 35
 <210> 61
 <211> 11
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Пептид KLK
 <400> 61
 Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 4
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> N-концевой пептид для липидирования
 <400> 62
 Cys Lys Gln Asn
 1
 <210> 63
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 5'-(dIdC)13-3'
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> n=inosine
 <400> 63
 ncncncncnc ncncncncnc ncncncncnc
 <210> 64
 <211> 8
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> С-концевая метка His
 <400> 64
 Leu Glu His His His His His His
 1 5
 <210> 65
 <211> 4
 <212> ПРОТЕИН
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> N-концевой CSSF для введения липидов
 <400> 65
 Cys Ser Ser Phe
 1

26

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенный полипептид, содержащий гибридный С-концевой фрагмент внешнего поверхностного белка А (OspA), при этом указанный гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит из слияния С-концевого домена первой и второй частей OspA от двух различных штаммов *Borrelia*, и причем указанная вторая часть OspA отличается от соответствующего фрагмента дикого типа, по меньшей мере, введением по меньшей мере одной дисульфидной связи.

2. Иммуногенный полипептид по п.1, в котором указанный гибридный С-концевой фрагмент OspA состоит в N-С-концевом направлении из:

i) первого участка OspA, состоящего из аминокислот 125-176 или аминокислот 126-175 OspA от штамма *Borrelia*, отличного от фрагмента *B. garinii*, штамм PBr, с SEQ ID NO: 8; и

ii) второго участка OspA, состоящего из аминокислот 176-274 или наиболее предпочтительно аминокислот 177-274 OspA из *B. garinii*, штамм PBr (SEQ ID NO: 8), при этом второй фрагмент OspA является мутантным и цистин-стабилизированным в том аспекте, что он отличается от соответствующей последовательности дикого типа, по меньшей мере, заменой аминокислоты дикого типа в положении 182 SEQ ID NO: 8 цистеином и заменой аминокислоты дикого типа в положении 269 SEQ ID NO: 8 цистеином, при этом присутствует дисульфидная связь между цистеином в положении 182 и цистеином в положении 269 указанного второго фрагмента OspA; и

при этом нумерация аминокислот и замен цистеина соответствует нумерации соответствующих аминокислот полноразмерного OspA *B. burgdorferi* s.s., штамм B31 (SEQ ID NO: 5).

3. Иммуногенный полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

4. Иммуногенный полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

5. Иммуногенный полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 (гетеродимер Lip-S4D1-S3hybD1).

6. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуногенный полипептид по п.1, в частности нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 26.

7. Способ получения иммуногенного полипептида по п.1, включающий экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по п.6.

8. Способ получения иммуногенного полипептида по п.1, который характеризуется следующими стадиями:

а) введение вектора, кодирующего иммуногенный полипептид, в клетку-хозяина;

б) выращивание клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии указанного иммуногенного полипептида;

в) гомогенизация указанной клетки-хозяина и

г) проведение стадий очистки гомогената клетки-хозяина.

9. Антитело или по меньшей мере его эффективная часть, которые селективно связываются с гибридным С-концевым фрагментом OspA по п.1, но не с первым участком OspA и вторым участком OspA по отдельности.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) иммуногенный полипептид по п.1 и/или нуклеиновую кислоту по п.6 и

(ii) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции *Borrelia*.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, дополнительно содержащая Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33).

12. Применение фармацевтической композиции, содержащей Lip-S1D1-S2D1 (SEQ ID NO: 29), Lip-S4D1-S3hybD1 (SEQ ID NO: 27) и Lip-S5D1-S6D1 (SEQ ID NO: 33), в качестве лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции *Borrelia*.

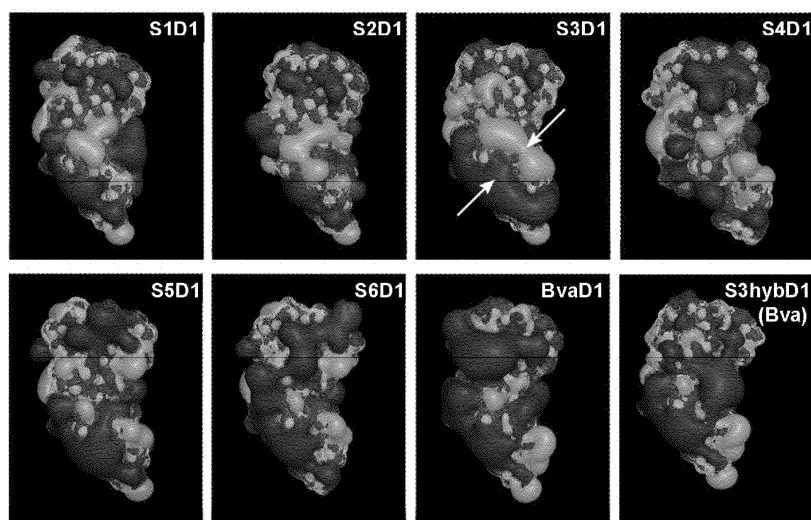
13. Фармацевтическая композиция по п.10, отличающаяся тем, что указанное фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество включает L-метионин.

14. Фармацевтическая композиция по п.10, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция представляет собой вакцину.

15. Применение иммуногенного полипептида по п.1 в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*.

16. Применение антитела по п.9 в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*.

17. Применение фармацевтической композиции по п.10 в способе лечения или профилактики инфекции *Borrelia*.

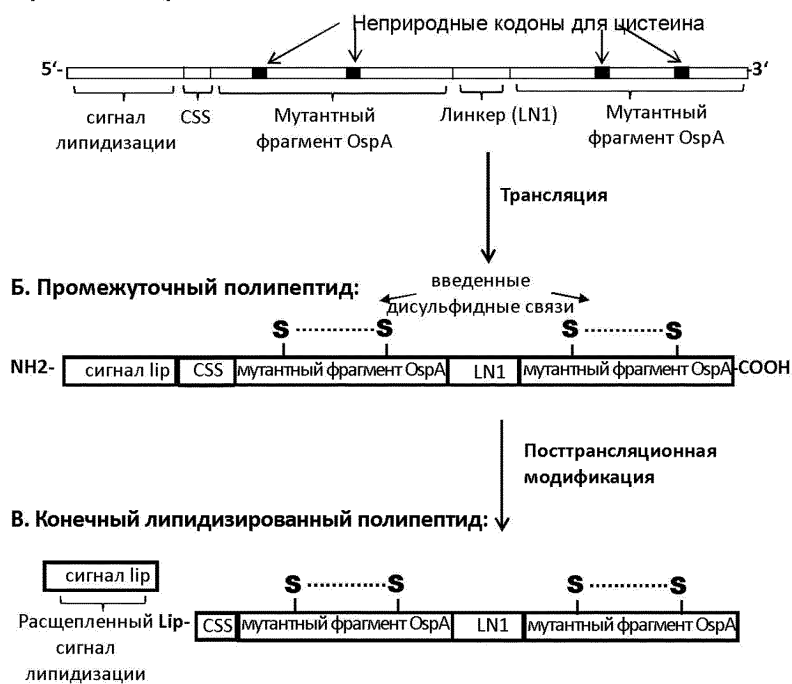


Фиг. 1

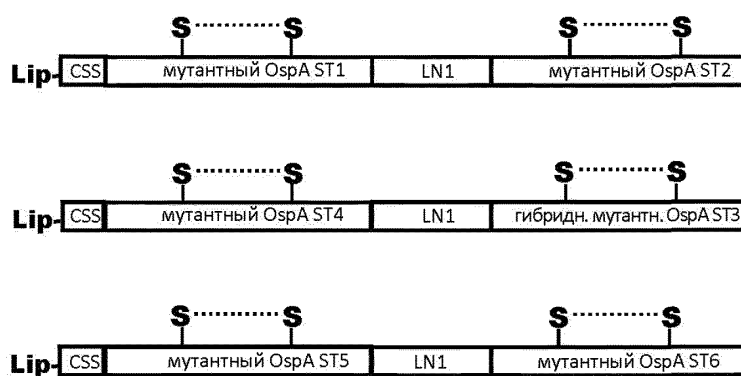
	1	50
Lip-S4D1-S3hybD1	(1)	CSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLA
Lip-S4D1-S3D1	(1)	CSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLA
Консенсусный	(1)	CSSFNAKGELSEKTILRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGTLA
	51	100
Lip-S4D1-S3hybD1	(51)	ADKTTLLKVTCTGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTST
Lip-S4D1-S3D1	(51)	ADKTTLLKVTCTGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTST
Консенсусный	(51)	ADKTTLLKVTCTGTVVLSKHIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGKWDSTST
	101	150
Lip-S4D1-S3hybD1	(101)	LTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLAL
Lip-S4D1-S3D1	(101)	LTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLAL
Консенсусный	(101)	LTISVNSKKTKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNAVEIKTLDELCLAL
	151	200
Lip-S4D1-S3hybD1	(151)	KGTSCKNNGSGSKEKNKDGKYSFNEKGEVSEKILTRSNGTLEYEQMTDA
Lip-S4D1-S3D1	(151)	KGTSCKNNGSGSKEKNKDGKYSFNDKGLSEKVVTRANGTRLEYTEIKND
Консенсусный	(151)	KGTSCKNNGSGSKEKNKDGKYSFN KG SEK TR NGT LEY
	201	250
Lip-S4D1-S3hybD1	(201)	ENATKAVETLKNIGIKLPGNLVGGKTKLTVTCTGTVTLNISKSGEITVAL
Lip-S4D1-S3D1	(201)	G-SGKAKEVLKGFALGTLTDGGETKLTVTCTGTVTLNISKSGEITVAL
Консенсусный	(201)	KA E LK GG TKLTVTCTGTVTLNISKSGEITVAL
	251	300
Lip-S4D1-S3hybD1	(251)	NDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKQQLVFTKENTITVQNYNRA
Lip-S4D1-S3D1	(250)	NDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQKPKQLVFTKENTITVQNYNRA
Консенсусный	(251)	NDTETTPADKKTGEWKSDTSTLTISKNSQK QQLVFTKENTITVQNYNRA
	301	322
Lip-S4D1-S3hybD1	(301)	GNALEGSPAIEIKDLAELCAALK
Lip-S4D1-S3D1	(300)	GNALEGSPAIEIKDLAELCAALK
Консенсусный	(301)	GNALEGSPAIEIKDLAELCAALK

Фиг. 2

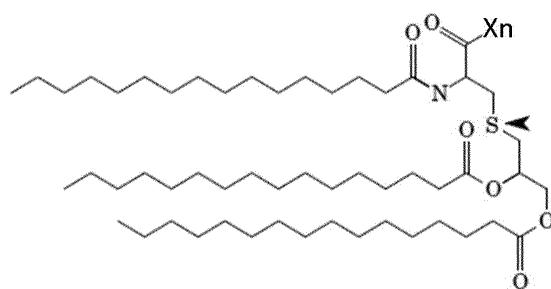
А. Нуклеиновая кислота, кодирующая гетеродимерный полипептид мутантного OspA:



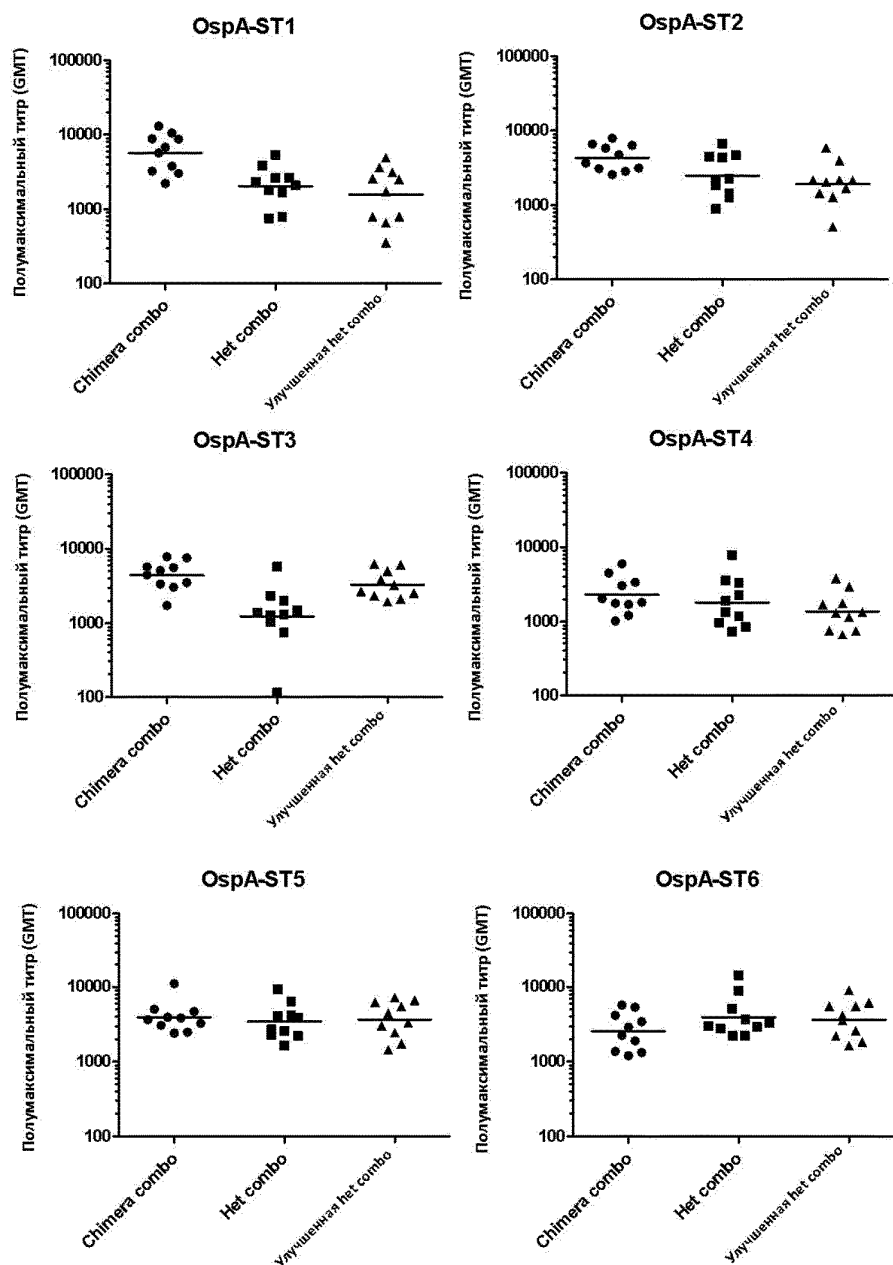
Фиг. 3



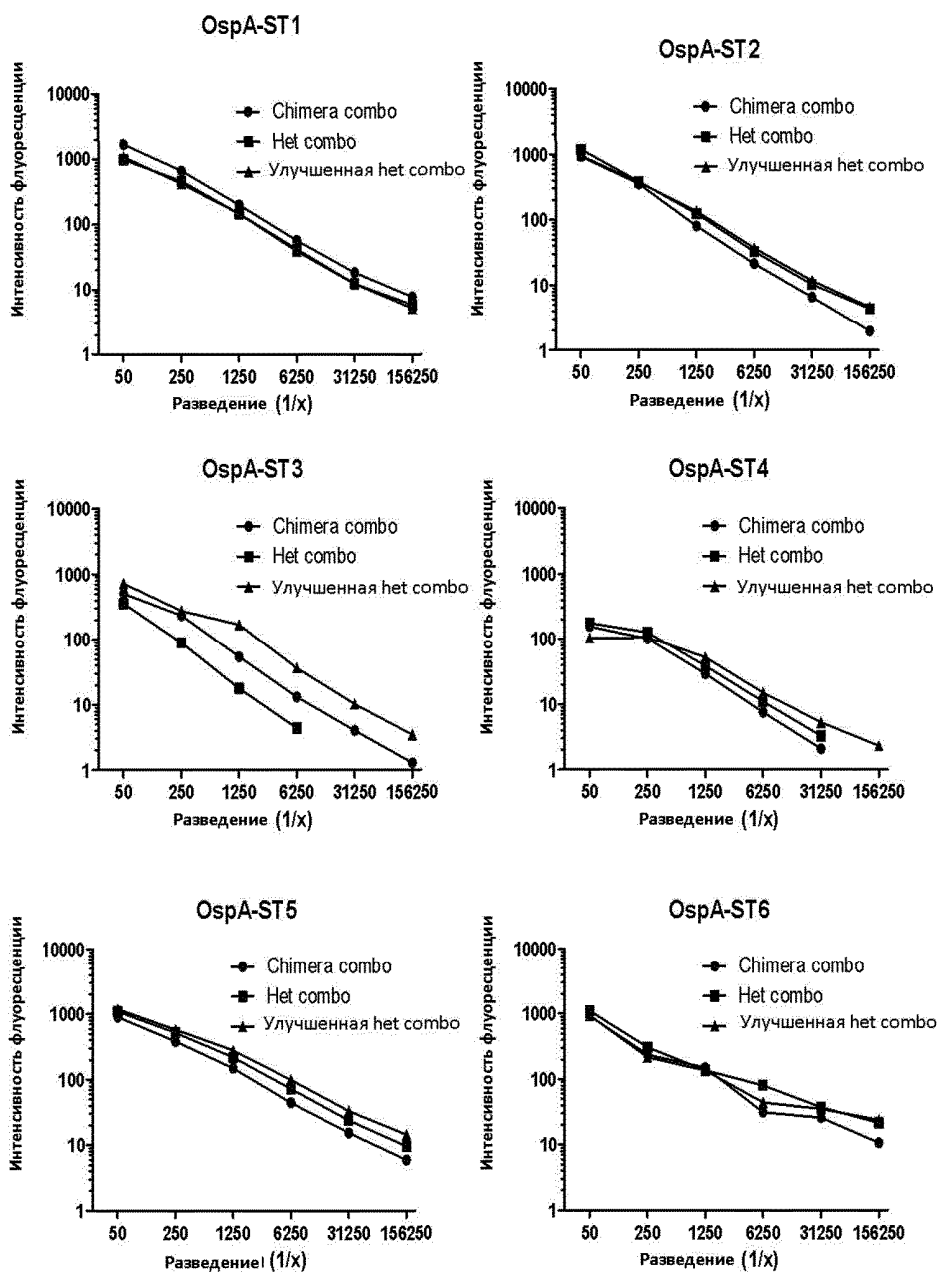
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2