



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103998459 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201280062344. 4

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 05

G01N 33/543 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/556, 061 2011. 11. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/063594 2012. 11. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/067524 EN 2013. 05. 10

(71) 申请人 爱贝斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 R·K·梅拉 K·P·阿伦

D·M·布莱利 J·沃克 C·奎斯科

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书25页

序列表32页 附图5页

(54) 发明名称

检测莱姆病抗体的肽和方法

(57) 摘要

本发明公开了可用于检测结合疏螺旋体属抗原的抗体的组合物(例如肽组合物)。所述肽组合物包含多肽序列,其包含疏螺旋体属 VlsE 蛋白质的 IR6 结构域中的变体。本发明还提供了包含这种肽组合物及可用于检测结合疏螺旋体属抗原的抗体和诊断莱姆病的装置、方法和试剂盒。

1. 分离的肽,其包含序列 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅(SEQ ID NO :1),其中 X₁₁ 是选自 V 和 L 的氨基酸,X₁₆ 是选自 L 和 I 的氨基酸,X₁₇ 是选自 A 和 V 的氨基酸,X₂₁ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸,X₂₄ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸,以及 X₂₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸。

2. 权利要求 1 的分离的肽,其包含另外的 N 末端肽序列,其中所述另外的 N 末端肽序列是天然 V1sE 序列或者非 -V1sE 疏螺旋体属抗原。

3. 权利要求 2 的分离的肽,其中所述另外的 N 末端肽序列是序列 n₁-n₂-S-P-n₅-n₆-P(SEQ ID NO :149) 或者其片段,其中 n₁ 是选自 A 和 V 的氨基酸,n₂ 是选自 E 和 D 的氨基酸,n₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸,以及 n₆ 是选自 K 和 R 的氨基酸。

4. 权利要求 1 的分离的肽,其包含另外的 C 末端肽序列,其中所述另外的 C 末端肽序列是天然 V1sE 序列或者非 -V1sE 疏螺旋体属抗原。

5. 权利要求 4 的分离的肽,其中另外的 C 末端肽序列是序列 V-c₂-E-G-c₅-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C(SEQ ID NO :150) 或者其片段,其中 c₂ 是选自 Q 和 R 的氨基酸,以及 c₅ 是选自 V 和 A 的氨基酸。

6. 权利要求 4 的分离的肽,其中另外的 C 末端肽序列是序列 A-V-c₃-E-G-c₆-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S(SEQ ID NO :151) 或者其片段,其中 c₃ 是选自 Q 和 R 的氨基酸,以及 c₆ 是选自 V 和 A 的氨基酸。

7. 权利要求 1 的分离的肽,其包含至少 30、35、40 或 45 个氨基酸。

8. 权利要求 1 的分离的肽,其中所述分离的肽与配体缀合。

9. 权利要求 1 的分离的肽,其中所述分离的肽是生物素化的。

10. 权利要求 1 的分离的肽,其中所述分离的肽与链霉抗生物素蛋白缀合。

11. 权利要求 1 的分离的肽,其附着于或者固定于固体支持物。

12. 权利要求 1 的分离的肽,其附着于或者固定于珠、侧向流免疫测定装置中的流动通道、微量滴定板中的孔或者转子中的流动通道。

13. 权利要求 1 的分离的肽,其中所述肽包含选自 SEQ ID NO :3-146 的序列。

14. 权利要求 1 的分离的肽,其中所述分离的肽包含来自序列 n₁-n₂-S-P-n₅-n₆-P-L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₈-V-L-R-G-X₂₃-X₂₄-K-D-G-X₂₈-F-A-X₃₁-X₃₂-A-V-c₃₅-E-G-c₃₈-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C(SEQ ID NO :2) 的至少 30、35、40 或 45 个连续氨基酸,其中 n₁ 是选自 A 和 V 的氨基酸,n₂ 是选自 E 和 D 的氨基酸,n₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸,n₆ 是选自 K 和 R 的氨基酸,X₁₈ 是选自 V 和 L 的氨基酸,X₂₃ 是选自 L 和 I 的氨基酸,X₂₄ 是选自 A 和 V 的氨基酸,X₂₈ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸,X₃₁ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸,X₃₂ 是选自 K 和 R 的氨基酸,c₃₅ 是选自 Q 和 R 的氨基酸,以及 c₃₈ 是选自 V 和 A 的氨基酸。

15. 包含第一种分离的肽和第二种分离的肽的分离的肽的混合物,其中第一种分离的肽与第二种分离的肽不同,并且其中第一种和第二种分离的肽均包含序列 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅(SEQ ID NO :1),其中 X₁₁ 是选自 V 和 L 的氨基酸,X₁₆ 是选自 L 和 I 的氨基酸,X₁₇ 是选自 A 和 V 的氨基酸,X₂₁ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸,X₂₄ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸,以及 X₂₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸。

16. 包含三种或更多种不同的分离的肽的分离的肽的混合物,其中每种分离的肽均包含序列 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅(SEQ ID NO :1),其

中 X_{11} 是选自 V 和 L 的氨基酸, X_{16} 是选自 L 和 I 的氨基酸, X_{17} 是选自 A 和 V 的氨基酸, X_{21} 是选自 R、D 和 N 的氨基酸, X_{24} 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸, 以及 X_{25} 是选自 K 和 R 的氨基酸。

17. 权利要求 15 或 16 的混合物, 其中每种分离的肽均与配体缀合。
18. 权利要求 15 或 16 的混合物, 其中一或多种所述分离的肽是生物素化的。
19. 权利要求 15 或 16 的混合物, 其中一或多种所述分离的肽与链霉抗生物素蛋白缀合。
20. 权利要求 15 或 16 的混合物, 其中每种分离的肽均固定于固体支持物。
21. 检测样品中疏螺旋体属抗原表位的抗体的方法, 所述方法包括:
将样品与权利要求 1 的分离的肽接触; 及
检测包含所述分离的肽的抗体-肽复合物的形成,
其中所述复合物的形成是所述样品中存在疏螺旋体属抗原表位的抗体的指征。
22. 权利要求 21 的方法, 其中所述疏螺旋体属抗原来自伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、阿氏疏螺旋体 (*Borrelia afzelli*) 或者伽氏疏螺旋体 (*Borrelia garinii*) 物种。
23. 权利要求 21 的方法, 其中所述分离的肽固定于固体支持物。
24. 权利要求 23 的方法, 其中所述固体支持物是珠、侧向流测定装置中的流动通道、微量滴定板中的孔或者转子中的流动通道。
25. 权利要求 21 的方法, 其中所述检测步骤包括 (i) 进行 ELISA 测定, (ii) 进行侧向流测定, (iii) 进行凝集反应测定, (iv) 进行 Western 印迹、狭线印迹或者斑点印迹, 或者 (v) 通过分析转子分析样品。
26. 权利要求 21 的方法, 其中所述样品来自人、犬或者马对象。
27. 权利要求 21 的方法, 其中所述样品是血液、血清、脑脊液、尿液或者唾液样品。
28. 权利要求 21 的方法, 包括将所述样品与权利要求 1 的两种或更多种分离的肽接触。
29. 诊断对象中莱姆病的方法, 所述方法包括:
将来自所述对象的样品与权利要求 1 的分离的肽接触; 及
检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成, 其中所述复合物的形成是所述对象患有莱姆病的指征。
30. 试剂盒, 其包含权利要求 1 的一或多种分离的肽及标记试剂, 所述标记试剂能结合识别所述一或多种分离的肽的表位的抗体。
31. 权利要求 30 的试剂盒, 其中所述一或多种分离的肽附着于固体支持物。
32. 权利要求 30 的试剂盒, 其中所述一或多种分离的肽附着于珠、管或孔、侧向流测定装置或者分析转子。
33. 权利要求 30 的试剂盒, 其中所述标记试剂是与可检测标记缀合的抗人或抗犬 IgG 抗体。
34. 权利要求 33 的试剂盒, 其中所述可检测标记是胶体金颗粒。

检测莱姆病抗体的肽和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2011 年 11 月 4 日申请的美国临时申请 No. 61/556, 061 的优先权, 该申请全文并入本文作参考。

[0003] 电子递交文本文件的描述

[0004] 电子递交的文本文件内容全文并入本文作参考: 序列表的计算机可读形式 (文件名: ABAX_039_01WO_SeqList_ST25.txt, 记录日期: 2012 年 11 月 2 日, 文件大小 45 千字节)。

[0005] 发明背景

[0006] 莱姆病是一种导致人体虚弱的病症, 已经成为重要的公共卫生健康问题。该疾病是由于感染病原性疏螺旋体属 (*Borrelia*) 细菌 (螺旋菌) 所致, 并且通过疏螺旋体属各物种感染的硬蜱虫 (*Ixodes ticks*) 叮咬传播。莱姆病的精确及早期检测对于有效治疗是关键因素。足以诊断莱姆病的唯一临床症状是存在游走性红斑, 具有牛眼状 (bull's-eye) 特殊外观的皮疹。然而, 游走性红斑仅存在于感染早期, 甚至不是在所有感染的个体中均出现。在不存在游走性红斑的情况中, 与莱姆病相关的其它临床症状如 Bell's 麻痹单独或者组合均不能足够特异性地确定临床诊断。

[0007] 在不存在游走性红斑的情况中, 诊断莱姆病的基础是应答病原性疏螺旋体物种如伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、阿氏疏螺旋体 (*Borrelia afzelli*) 或者伽氏疏螺旋体 (*Borrelia garinii*) 的抗体。在北美洲, 疾病控制中心 (CDC) 推荐一种两级 (two-tier) 方法对莱姆病进行血清学诊断, 包括灵敏的第一级测定如 ELISA, 随后如果第一级测定是阳性或者意义不明的则进行 western 印迹。第一级测定传统上使用全细胞伯氏疏螺旋体属抗原或者重组疏螺旋体属蛋白质。但是这种测定可能难以解释, 并且由于产生自接种而非感染的疏螺旋体属抗体而复杂化。此外, 在一些疏螺旋体属测定中使用的全细胞超声降解物与密螺旋体属 (*Treponema*) 抗体反应。

[0008] 最近, 基于疏螺旋体属的可变表面抗原 (VlsE) 的保守 IR6 结构域的 C6 肽测定已经被广泛接受作为第一级测定, 其对于传播性和末期莱姆病具有高度灵敏性。所述 C6 肽测定使用伯氏疏螺旋体 VlsE 蛋白的单独 25 个氨基酸的序列作为检测抗原。尽管已经建议 C6 肽测定可适用于单一级别方法诊断莱姆病, 但是显然 C6 测定对于这种目的不够灵敏, 因为其不能检测某些感染性疏螺旋体属菌株。

[0009] 因此, 本领域仍需要另外的检测疏螺旋体属抗原的测定及莱姆病的血清学诊断方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明部分基于发现疏螺旋体属 VlsE 蛋白质的 IR6 结构域中某些序列变体可以提供针对广泛疏螺旋体属物种的抗体应答的强力 (robust) 检测。因此, 本发明提供了可用于检测结合疏螺旋体属抗原的抗体及诊断莱姆病的组合物、装置、方法和试剂盒。

[0012] 一方面, 本发明提供了能结合识别疏螺旋体属抗原的抗体的肽。在某些实施方案中, 所述肽包含 VlsE IR6 结构域及来自至少一种 (如两种、三种等) 其它疏螺旋体属抗原的

序列。在某些实施方案中,所述至少一种其它疏螺旋体属抗原是表面抗原(例如 OspC、p41 或者其组合)。

[0013] 在某些实施方案中,本发明的肽包含序列 SEQ ID NO:1, L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅(SEQ ID NO:1),其中 X₁₁ 是选自 V 和 L 的氨基酸, X₁₆ 是选自 L 和 I 的氨基酸, X₁₇ 是选自 A 和 V 的氨基酸, X₂₁ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸, X₂₄ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸, X₂₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸。

[0014] 在某些实施方案中,本发明的肽包含序列 SEQ ID NO:1,及进一步包含另外的 N-末端肽序列。所述另外的 N-末端肽序列可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或者更多个氨基酸,可以是天然或非天然序列。在某些实施方案中,本发明的肽包含由 SEQ ID NO:1 定义的序列,及进一步包含另外的 C-末端序列。所述另外的 C-末端肽序列可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或者更多个氨基酸,可以是天然或非天然序列。在某些实施方案中,所述非天然序列包含非-VLsE 疏螺旋体属抗原(例如疏螺旋体属 OspC 或 p41 抗原)。

[0015] 在其它实施方案中,本发明的肽包含序列 SEQ ID NO:2, n₁-n₂-S-P-n₅-n₆-P-L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₈-V-L-R-G-X₂₃-X₂₄-K-D-G-X₂₈-F-A-X₃₁-X₃₂-A-V-c₃₅-E-G-c₃₈-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C(SEQ ID NO:2),其中 n₁ 是选自 A 和 V 的氨基酸, n₂ 是选自 E 和 D 的氨基酸, n₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸, n₆ 是选自 K 和 R 的氨基酸, X₁₈ 是选自 V 和 L 的氨基酸, X₂₃ 是选自 L 和 I 的氨基酸, X₂₄ 是选自 A 和 V 的氨基酸, X₂₈ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸, X₃₁ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸, X₃₂ 是选自 K 和 R 的氨基酸, c₃₅ 是选自 Q 和 R 的氨基酸, c₃₈ 是选自 V 和 A 的氨基酸。

[0016] 在某些实施方案中,本发明的肽包含至少 25、30、35、40、45 或者更多个氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽是分离的(例如合成的和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,本发明的肽与配体缀合。例如,在某些实施方案中,所述肽是生物素化的。在其它实施方案中,所述肽与抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或者亲和素(neutralavidin)缀合。在其它实施方案中,所述肽与载体蛋白(例如血清白蛋白,匙孔血蓝蛋白(KLH)或者免疫球蛋白 Fc 结构域)缀合。在其它的实施方案中,所述肽与树状聚合物和/或多抗原性肽系统(MAPS)的一部分缀合。

[0017] 在某些实施方案中,本发明的肽附着于或固定于固体支持物。在某些实施方案中,所述固体支持物是珠(例如胶体颗粒,纳米颗粒,胶乳珠等)、侧向流免疫测定装置中的流动通道(flow path)(例如多孔膜)、分析转子中的流动通道,或者管或孔(例如适于 ELISA 测定的平板)。

[0018] 另一方面,本发明提供了包含本发明的一或多种肽的组合物。例如,在某些实施方案中,本发明提供了包含含有 SEQ ID NO:1 所示序列的肽、含有 SEQ ID NO:2 所示序列的肽或者其混合物的组合物。在某些实施方案中,所述组合物包含 2、3、4 或更多种本发明的不同的肽的混合物,其中每种肽均包含序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

[0019] 在某些实施方案中,所述肽与配体或信号部分缀合。例如,在某些实施方案中,所述肽是生物素化的。在其它实施方案中,所述肽与抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或者亲和素缀合。在其它实施方案中,所述肽与载体蛋白(例如血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)或者免疫球蛋白 Fc 结构域)缀合。在其它的实施方案中,所述肽与树状聚合物和/或多抗原性肽系统(MAPS)的一部分缀合。

[0020] 另一方面,本发明提供了包含编码本发明的肽的序列的核酸。此外,本发明提供了包含这种核酸的载体,及包含这种载体的宿主细胞。在某些实施方案中,所述载体是穿梭载体。在其它实施方案中,所述载体是表达载体(例如细菌或真核表达载体)。在某些实施方案中,所述宿主细胞是细菌细胞。在其它实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞。

[0021] 另一方面,本发明提供了装置。在某些实施方案中,所述装置可用于进行免疫测定。例如,在某些实施方案中,所述装置是侧向流免疫测定装置。在其它实施方案中,所述装置是分析转子。在其它实施方案中,所述装置是管或孔,如在适于 ELISA 测定的平板中。在其它的实施方案中,所述装置是电化学、光学或者光电传感器。

[0022] 在某些实施方案中,所述装置包含本发明的肽。在其它实施方案中,所述装置包含本发明的不同肽的混合物。例如,在某些实施方案中,所述装置包含 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。在某些实施方案中,所述肽或者所述混合物中的每种肽均包含序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。在某些实施方案中,所述肽附着于或固定于所述装置上。

[0023] 另一方面,本发明提供了检测样品中疏螺旋体属抗原表位的抗体的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与本发明的肽接触,并检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成是所述样品中存在疏螺旋体属抗原表位的抗体的指征。在某些实施方案中,所述疏螺旋体属抗原来自感染性疏螺旋体属物种如伯氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体或者伽氏疏螺旋体。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽的混合物接触。

[0024] 在某些实施方案中,所述肽或者所述混合物中的每种肽均是分离的(例如合成的和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,所述肽或肽混合物附着于或固定于固体支持物上。在某些实施方案中,所述固体支持物是珠(例如胶体颗粒,纳米颗粒,胶乳珠等),侧向流免疫测定装置中的流动通道(例如多孔膜),分析转子中的流动通道,或者管或孔(如在适于 ELISA 测定的平板中)。在某些实施方案中,所述固体支持物包括金属、玻璃、基于纤维素的材料(例如硝化纤维素)或者聚合物(例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、尼龙、聚矾等)。在某些实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于树状聚合物和/或掺入 MAPS 系统中。在某些其它实施方案中,所述肽或不同肽的混合物附着于 BSA。

[0025] 在某些实施方案中,检测步骤包括进行 ELISA 测定。在其它实施方案中,检测步骤包括进行侧向流免疫测定。在其它实施方案中,所述检测步骤包括进行凝集反应测定。在其它实施方案中,所述检测步骤包括将样品在分析转子中旋转。在其它实施方案中,所述检测步骤包括使用 Western 印迹、狭线印迹或者斑点印迹分析样品。在其它的实施方案中,所述检测步骤包括用电化学传感器、光学传感器或者光电传感器分析样品。

[0026] 在某些实施方案中,所述样品是体液,如血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、粘液或者唾液。在其它实施方案中,所述样品是组织(例如组织匀浆)或者细胞裂解物。在某些实施方案中,所述样品来自野生动物(例如鹿,或者啮齿类动物如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,所述样品来自实验室动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长目动物等)。在其它实施方案中,所述样品来自驯养动物或者野化动物(feral animal)(例如狗、猫、马)。在其它的实施方案中,所述样品来自人。

[0027] 另一方面,本发明提供了诊断对象中莱姆病的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将来自对象的样品与本发明的肽接触,并检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,

其中所述复合物的形成是对象患有莱姆病的指征。在某些实施方案中,所述方法包括将所述样品与 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽的混合物接触。

[0028] 在某些实施方案中,所述肽或所述混合物中的每种肽均是分离的(例如合成的和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于或固定于固体支持物上。例如,在某些实施方案中,所述固体支持物是珠(例如胶体颗粒,纳米颗粒,胶乳珠等)、侧向流免疫测定装置中的流动通道(例如多孔膜)、分析转子中的流动通道、或者管或孔(例如在适于 ELISA 测定的平板中)。在某些实施方案中,所述固体支持物包含金属、玻璃、基于纤维素的材料(例如硝化纤维素)或者聚合物(例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚矾等)。在某些实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于树状聚合物和/或掺入 MAPS 系统中。在某些其它实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于 BSA。

[0029] 在某些实施方案中,所述检测步骤包括进行 ELISA 测定。在其它实施方案中,所述检测步骤包括进行侧向流免疫测定。在其它实施方案中,所述检测步骤包括进行凝集反应测定。在其它实施方案中,所述检测步骤包括将样品在分析转子中旋转。在其它实施方案中,所述检测步骤包括使用 Western 印迹、狭线印迹或者斑点印迹分析样品。在其它的实施方案中,所述检测步骤包括用电化学传感器、光学传感器或者光电传感器分析样品。

[0030] 在某些实施方案中,所述样品是体液,如血液、血清、血浆、脑脊液、尿液或者唾液。在其它实施方案中,所述样品是组织(例如组织匀浆)或细胞裂解物。在某些实施方案中,所述对象是野生动物(例如鹿,或者啮齿类动物如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,所述对象是实验室动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长目动物等)。在其它实施方案中,所述对象是驯养动物或野化动物(feral animal)(例如狗、猫、马)。在其它的实施方案中,所述对象是人。

[0031] 再一方面,本发明提供了试剂盒。在某些实施方案中,所述试剂盒包含本发明的肽。在某些实施方案中,所述试剂盒包含 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。所述肽可包含序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。在某些实施方案中,所述肽附着于或者固定于固体支持物上。例如,在某些实施方案中,所述固体支持物是珠(例如胶体颗粒、纳米颗粒、胶乳珠等)、侧向流免疫测定装置中的流动通道、分析转子中的流动通道,或者管或孔(例如在平板中)。在某些实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于树状聚合物和/或掺入 MAPS 系统中。在某些其它实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于 BSA。

[0032] 在某些实施方案中,所述试剂盒进一步包含一群珠或包含平板(例如适于 ELISA 测定的平板)。在其它实施方案中,所述试剂盒进一步包含一种装置,如侧向流免疫测定装置、分析转子、Western 印迹、斑点印迹、狭线印迹、电化学传感器、光学传感器,或者光电传感器。在某些实施方案中,所述一群珠、平板或者装置可用于进行免疫测定。例如,在某些实施方案中,所述一群珠、平板或者装置可用于检测抗体-肽复合物的形成,所述复合物包含来自样品的抗体和本发明的肽。在某些实施方案中,本发明的肽或者不同肽的混合物附着于或者固定于珠、平板或装置上。

[0033] 在某些实施方案中,所述试剂盒进一步包含说明书。例如,在某些实施方案中,所述试剂盒包含表明怎样使用本发明的肽检测疏螺旋体属抗原的抗体或者诊断莱姆病的说明书。在某些实施方案中,所述试剂盒包含表明怎样使用一群珠、平板或装置(例如包含本发明的肽或不同肽的混合物)检测疏螺旋体属抗原的抗体或者诊断莱姆病的说明书。

[0034] 本发明的其它方面和实施方案通过如下详细描述将显而易见。

[0035] 附图简述

[0036] 图 1 是间接夹心测定的示意图,其可用于检测疏螺旋体属抗原的抗体。在这个实施方案中,抗-人 IgG/IgM 或抗-狗 IgG/IgM 抗体固定于合适基质(例如硝化纤维素膜)的测试位点。检测样品中的抗体由固定的抗体结合。然后针对合适的疏螺旋体属抗原的检测样品抗体将结合本发明的肽。当本发明的肽与生物素缀合时,可使用胶体金标记的链霉抗生物素蛋白检测在测试位点上所述肽的存在。可意识到所述间接夹心测定可以反向操作,即本发明的肽可固定在基质上以捕获检测样品中的抗-疏螺旋体属抗体,及与标记(如胶体金)缀合的抗-人 IgG/IgM 或抗-狗 IgG/IgM 抗体可用于检测在测试位点上与固定的肽结合的抗体的存在。

[0037] 图 2 是基于图 1 的间接夹心测定的侧向流免疫测定装置的示意图。在侧向流免疫测定装置的这个实施方案中,将样品应用于样品加样垫,然后流经缀合物垫至测试膜。肽-生物素-链霉抗生物素蛋白-金复合物随着样品经过缀合物垫而溶解,然后在本发明的肽与合适的抗疏螺旋体属抗原抗体之间形成复合物。所述测试位点包含样品合适的抗-IgG 或抗-IgM 抗体,其结合样品中所有抗体。例如,蛋白质 L 可用于代替抗-IgG 或抗-IgM 抗体。如果样品中足够的抗体结合本发明的肽,则在测试位点将出现阳性信号。在侧向流免疫测定装置的另一实施方案中,本发明的肽固定在测试位点(T),与可检测标记(例如胶体金颗粒)缀合的样品合适的抗-IgG 或抗-IgM 抗体(例如抗-人或抗-狗)存在于缀合物垫中。样品经过缀合物垫使得标记的抗体溶解,检测样品中存在的任何抗-疏螺旋体属抗原抗体结合标记的抗体,这种抗体复合物被在测试位点上的固定的本发明疏螺旋体属肽捕获,从而产生阳性信号。在任一实施方案中,所述装置可进一步包含对照位点(C),在此固定识别缀合物垫中标记的肽或标记的抗体的结合配偶体。

[0038] 图 3 是双抗原夹心测定的示意图,其可用于检测疏螺旋体属抗原的抗体。在这个实施方案中,本发明的肽在测试位点固定在合适的基质上(例如硝化纤维素膜,ELISA 平板的孔)。检测样品中的抗体由固定的本发明的肽结合。然后合适的疏螺旋体属抗原的检测样品抗体将结合与检测分子(例如胶体金,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶(ALP))缀合的第二组本发明的肽,其检测与在测试位点固定的第一组肽结合的抗体的存在。

[0039] 图 4 是侧向流免疫测定装置的示意图,其可用于检测疏螺旋体属抗原的抗体。在侧向流免疫测定的这个实施方案中,本发明的肽在测试位点固定在合适基质上(例如硝化纤维素膜)。检测样品中抗-疏螺旋体属抗体由固定的本发明的肽结合。在该系统中加入金-缀合的蛋白质 A 和 / 或金缀合的蛋白质 G,其结合捕获的抗-疏螺旋体属抗体的 Fc 部分,从而产生阳性信号。在这个实施方案中,所述装置可进一步包含对照位点,在此固定了识别金-缀合的蛋白质 A 和 / 或金-缀合的蛋白质 G 的结合配偶体。这种结合配偶体可包括但不限于抗-蛋白质 A、抗-蛋白质 G、小鼠 IgG、和 / 或其它相似的 IgG 分子。

[0040] 图 5 是侧向流免疫测定装置的示意图,其可用于检测疏螺旋体属抗原的抗体。在侧向流免疫测定装置的这个实施方案中,本发明的肽在测试位点固定在合适基质上(例如硝化纤维素膜)。检测样品中抗-疏螺旋体属抗体由固定的本发明的肽结合。抗-疏螺旋体属抗体可以由本发明的金-缀合的肽检测,从而产生阳性信号。在这个系统中加入金-缀合的蛋白质 A 和 / 或金缀合的蛋白质 G,以通过结合捕获的抗-疏螺旋体属抗体的 Fc 部分

而增强信号。在这个实施方案中,所述装置可进一步包含对照位点,在此固定了识别金-缀合的蛋白质 A 和 / 或金-缀合的蛋白质 G 的结合配偶体。这种结合配偶体可包括但不限于抗-蛋白质 A、抗-蛋白质 G、小鼠 IgG、和 / 或其它相似的 IgG 分子。

[0041] 发明详述

[0042] 如本文所用,如下术语应具有如下含义:

[0043] 如本文所用,术语“抗原”是指能由抗体识别的分子。抗原可以是例如肽或者其修饰形式。抗原可包含一或多个表位。

[0044] 如本文所用,术语“表位”是抗原的一部分,其由抗体特异性识别。例如,表位可包含或者由肽(如本发明的肽)的一部分组成。表位可以是线性表位、顺序表位或者构象表位。在某些实施方案中,表位可包含非连续区域。

[0045] 术语“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”在本文可互换使用,涵盖了 DNA、RNA、cDNA,无论单链还是双链的,以及其化学修饰形式。

[0046] 本文使用的单个字母氨基酸缩写具有其在本领域中的标准含义,本文中描述的所有肽序列均根据惯例书写,N-末端在左侧,C末端在右侧。

[0047] 根据需要,其它术语在如下详细描述中定义。

[0048] 组合物和装置

[0049] 本发明部分基于发现疏螺旋体属 VlsE 蛋白的 IR6 结构域中某些序列变体提供针对广泛疏螺旋体属物种的抗体应答的强力检测。因此,一方面,本发明提供了能结合识别疏螺旋体属抗原的抗体的肽。

[0050] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 VlsE IR6 结构域或者其片段及来自至少一种(例如 2、3 种等)其它疏螺旋体属抗原的序列(例如包含表位的序列)。在某些实施方案中,所述至少一种其它疏螺旋体属抗原是表面抗原或者是选自 OspA、OspB、OspC、p41 及其组合的抗原。因此,例如在某些实施方案中,本发明的肽包含:(i) VlsE IR6 结构域,或者其片段,及(ii)包含 OspA 蛋白的表位的序列,包含 OspB 蛋白的表位的序列,包含 OspC 蛋白的表位的序列,包含 p41 蛋白的表位的序列,或者这些序列的组合。在其它实施方案中,本发明的肽包含:(i) VlsE IR6 结构域,或者其片段,(ii) 包含 OspC 蛋白的表位的序列,及(iii) 包含 p41 蛋白的表位的序列。

[0051] 在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 SEQ ID NO:1 所示序列 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₁-V-L-R-G-X₁₆-X₁₇-K-D-G-X₂₁-F-A-X₂₄-X₂₅(SEQ ID NO:1) 组成,其中 X₁₁ 是选自 V 和 L 的氨基酸,X₁₆ 是选自 L 和 I 的氨基酸,X₁₇ 是选自 A 和 V 的氨基酸,X₂₁ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸,X₂₄ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸,X₂₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸。

[0052] 在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由如下序列组成:L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:3);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:4);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:5);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:6);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:7);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:8);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:9);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-K(SEQ ID NO:10);L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-K(SEQ ID

NO:11) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:12) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:13) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:14) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:15) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:16) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:17) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-K (SEQ ID NO:18) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:19) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:20) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:21) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:22) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:23) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:24) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:25) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-K (SEQ ID NO:26) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:27) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:28) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:29) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:30) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:31) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:32) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:33) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-K (SEQ ID NO:34) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:35) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:36) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:37) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:38) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:39) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:40) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:41) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-K (SEQ ID NO:42) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:43) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:44) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:45) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:46) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:47) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:48) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:49) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-K (SEQ ID NO:50) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:51) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:52) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:53) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:54) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:55) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:56) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-K (SEQ ID NO:57) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-K

K (SEQ ID NO:58) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:59) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:60) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:61) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:62) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:63) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:64) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:65) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-K (SEQ ID NO:66) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:67) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:68) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:69) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:70) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:71) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:72) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:73) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-K (SEQ ID NO:74) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:75) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:76) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:77) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:78) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:79) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:80) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:81) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-I-R (SEQ ID NO:82) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:83) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:84) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:85) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:86) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:87) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:88) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:89) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-I-R (SEQ ID NO:90) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:91) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:92) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:93) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:94) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:95) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:96) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:97) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-I-R (SEQ ID NO:98) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO:99) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO:100) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO:101) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO:102) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO:103) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-W-R (SEQ ID NO:104) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-

I-V-K-D-G-R-F-A-W-R(SEQ ID NO:105) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-W-R(SEQ ID NO:106) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:107) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:108) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:109) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:110) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:111) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:112) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:113) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-W-R(SEQ ID NO:114) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:115) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:116) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:117) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:118) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:119) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:120) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:121) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-W-R(SEQ ID NO:122) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:123) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:124) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:125) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:126) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:127) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:128) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:129) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-R-F-A-Y-R(SEQ ID NO:130) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:131) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:132) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:133) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:134) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:135) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:136) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:137) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-D-F-A-Y-R(SEQ ID NO:138) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:139) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-A-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:140) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:141) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-A-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:142) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:143) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-L-V-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:144) ;L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-V-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:145) ;或者 L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-L-V-L-R-G-I-V-K-D-G-N-F-A-Y-R(SEQ ID NO:146)。

[0053] 在某些实施方案中,本发明的肽包含序列SEQ ID NO:1及另外的N-末端肽序列(例如N-末端延伸)。所述另外的N-末端肽序列可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或更多个氨基酸。在某些实施方案中,所述N-末端肽序列的长度为大约5-大约10、大约10-大约15、大约15-大约20、大约20-大约25、大约25-大约30、大约30-大约

40 或者大约 40- 大约 50 个氨基酸。所述另外的 N- 末端肽序列可以是天然序列。如本文所用,“天然”序列是来自天然存在的疏螺旋体属 V1sE 序列的肽序列或者其变体。在某些实施方案中,所述肽序列是天然存在的疏螺旋体属 V1sE 序列的片段。所述肽序列可以是例如来自 V1sE 的保守或非保守区域。所述肽序列可包含例如一个表位,如免疫决定簇表位或者可由宿主(如人、狗等)免疫系统识别的任何其它表位。V1sE 蛋白及其肽已经在例如美国专利 No. 6, 475, 492、6, 660, 274、6, 719, 983、6, 740, 744 和 7, 887, 815 及欧洲专利 No. 0894143、1012181、1171605 和 1589109 中描述,所述专利内容在此并入本文作参考。

[0054] 变体多肽与 SEQ ID NO: 1-146 所示肽至少大约 80、85、90、95、98 或 99% 相同,及也是本发明的多肽。序列相同性百分比具有本领域认可的含意,有许多方法测量两个多肽或多核苷酸序列之间的相同性。见例如 Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); 和 Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991) 所述。对比多核苷酸或多肽的方法编码为计算机程序,包括 GCG 程序包 (Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12:387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul et al., J Molec. Biol. 215:403(1990)) 及 Bestfit 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711), 其使用 Smith 和 Waterman 的局部同源算法 (Adv. App. Math., 2:482-489(1981))。例如可以使用应用 FASTA 算法的计算机程序 ALIGN, 进行仿射缺口搜索 (affine gap search), 缺口开放罚分为 -12, 缺口扩展罚分为 -2。

[0055] 当使用任何序列排列对比程序确定特定序列与参考序列是否例如大约 95% 相同时, 设定参数, 由此相同性百分比根据参考多核苷酸全长序列计算并且允许在参考多核苷酸中核苷酸总数至多 5% 的相同性缺口。

[0056] 所述肽序列的变体可以由本领域技术人员部分基于已知的序列性质而容易地选择。例如, 变体肽可包括氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)和/或缺失(例如小的、单个氨基酸缺失, 或者涵盖 2、3、4、5、10、15、20 或更多个连续氨基酸的缺失)。因此, 在某些实施方案中, 天然肽序列的变体是与天然存在的序列区别如下的序列: (i) 一或多个(例如 2、3、4、5、6 或更多个)保守氨基酸取代, (ii) 缺失 1 或多个(例如 2、3、4、5、6 或更多个)氨基酸, 或者 (iii) 其组合。缺失的氨基酸可以是连续或者非连续的。保守氨基酸取代是在其侧链和化学性质相关的氨基酸家族内发生的那些取代。这些包括例如 (1) 酸性氨基酸: 天冬氨酸, 谷氨酸; (2) 碱性氨基酸: 赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸; (3) 非极性氨基酸: 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 甲硫氨酸, 色氨酸; (4) 非荷电极性氨基酸: 甘氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸; (5) 脂肪族氨基酸: 甘氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 丝氨酸和苏氨酸任选被单独分组为脂肪族-羟基氨基酸; (6) 芳香氨基酸: 苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸; (7) 酰胺氨基酸: 天冬酰胺, 谷氨酰胺; 及 (9) 含硫氨基酸: 半胱氨酸和甲硫氨酸。见例如 Biochemistry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, W H Freeman and Co.: 1981。证实变体肽是合适的方法为本领域常规及常用方

法。

[0057] 肽序列的变体涵盖先前定义的肽序列的变化。例如,包含已知表位的先前描述的肽序列可以在一端或两端被延长或者缩短(例如大约1-3个氨基酸),和/或1、2、3、4或更多个氨基酸可以由保守氨基酸取代等。此外,如果蛋白质的区域已经被鉴别为含有感兴趣的表位,则研究人员可以将该感兴趣的区域从原始区域的终点“移动”(例如以任一方向移动大约5个氨基酸)以优化活性。

[0058] 在某些实施方案中,所述另外的N-末端肽序列可包含或者由另一IR6结构域肽组成。在其它实施方案中,所述天然序列是V1sE序列,其与V1sEIR6结构域的N-末端天然相邻。

[0059] 在某些实施方案中,所述另外的N-末端肽序列是非天然序列。如本文所用,“非天然”序列是除了天然V1sE肽序列之外的任何蛋白质序列,来自疏螺旋体属蛋白质或其他蛋白质。在某些实施方案中,所述另外的N-末端肽序列包含疏螺旋体属抗原如OspA、OspB、DbpA、鞭毛相关蛋白FlaA(p37)和FlaB(p41)、OspC(25kd)、BBK32、BmpA(p39)、p21、p39、p66或者p83的表位。也可以使用来源于其它微生物的多肽或肽。

[0060] 包含另外的N-末端肽序列的本发明的肽可以设计为用于在感染后早期诊断疏螺旋体属感染(例如在感染发生后1-2周内)。在病原性疏螺旋体属蛋白质中,其表达在感染早期被识别(例如在感染后早期出现其IgM抗体)的是OspC、BBK32、鞭毛相关蛋白FlaB(p41),及较低程度的BmpA(p39),及鞭毛相关蛋白FlaA(p37)。多肽或者衍生自这些多肽的肽适合用于早期感染测定。例如,可用于诊断早期感染的一些合适的线性表位包括OspC中的肽:PVVAESP KKP(SEQ ID NO:147)、ILMTLFLFISCNNS(SEQ ID NO:148),及在氨基酸161-210之间含有的一或多个表位,如Jobe et al. (2003) Clin Diagn Lab Immunol 10, 573-8) 所报导,所述文献内容在此并入本文作参考。也可以使用美国专利No. 6, 716, 574中描述的OspC肽,所述专利内容在此并入本文作参考。其它合适区域,其经证实不含有主要交叉反应表位,已经在FlaB(p41)中鉴别,如残基120-235。见例如Crother et al. ((2003) Infect. Immun. 71, 3419-3428; Wang et al. (1999)) Clin Microbial Rev 12, 633-653; 及美国专利No. 5, 618, 533、5, 643, 733、5, 643, 751、5, 932, 220和6, 617, 441所述,所述文献内容在此均并入本文作参考。携带线性或构象表位的其它肽为本领域已知。鉴别另外的非天然表位序列、特别是来自如OspC、BBK32或DbpA的可变区的方法在例如美国专利No. 7, 887, 815中揭示。

[0061] 在某些实施方案中,所述另外的N-末端肽序列来自OspC。例如,在某些实施方案中,所述另外的N-末端肽序列是SEQ ID NO:149所示序列 $n_1-n_2-S-P-n_5-n_6-P$ (SEQ ID NO:149)或者其片段(例如C-末端片段),其中 n_1 是选自A和V的氨基酸, n_2 是选自E和D的氨基酸, n_5 是选自K和R的氨基酸, n_6 是选自K和R的氨基酸。

[0062] 在某些实施方案中,所述另外的N-末端肽序列是序列组合。例如,所述另外的N-末端肽序列可包含天然序列、非天然序列,或者这些序列的任意组合(例如两个或更多个天然序列,两个或更多个非天然序列,天然序列和非天然序列等)。

[0063] 在某些实施方案中,本发明的肽包含SEQ ID NO:1定义的序列及进一步包含一个另外的C-末端序列。所述另外的C-末端肽序列可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或更多个氨基酸。所述另外的C-末端肽序列可以是天然序列。例如,在某些

实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列可包含或者由另一 IR6 结构域肽组成。在其它实施方案中,所述天然序列是 V1sE 序列,其与 V1sE IR6 结构域的 C-末端天然相邻。

[0064] 在某些实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列是非天然序列。在某些实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列包含疏螺旋体属抗原的表位,如 OspA、OspB、DbpA、鞭毛相关蛋白 F1aA (p37) 和 F1aB (p41)、OspC (25kd)、BBK32、BmpA (p39)、p21、p39、p66 或 p83,如上文所述。也可以使用来源于其它微生物的多肽或肽。

[0065] 在某些实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列来自 F1aB (p41)。例如,在某些实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列是 SEQ ID NO:150 所示序列 V-c₂-E-G-c₅-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO:150) 或者其片段(例如 N-末端片段),其中 c₂ 是选自 Q 和 R 的氨基酸, c₅ 是选自 V 和 A 的氨基酸。在其它实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列是 SEQ ID NO:151 所示序列 A-V-c₃-E-G-c₆-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO:151) 或者其片段(例如 N-末端片段),其中 c₃ 是选自 Q 和 R 的氨基酸, c₆ 是选自 V 和 A 的氨基酸。

[0066] 在某些实施方案中,所述另外的 C-末端肽序列是序列组合。例如,所述另外的 C-末端肽序列可包含天然序列、非天然序列或者这些序列的任意组合(例如两个或更多个天然序列,两个或更多个非天然序列,天然和非天然序列等)。

[0067] 在某些实施方案中,本发明的肽包含 SEQ ID NO:1 定义的序列及进一步包含另外的 N-末端肽序列和另外的 C-末端肽序列。所述另外的 N-末端和 C-末端肽序列可如上文所述。本发明的肽不是由全长 V1sE 蛋白质组成。然而,在某些实施方案中,本发明的肽可包含全长 V1sE 蛋白质。在其它实施方案中,本发明的肽不包含全长 V1sE 蛋白质。

[0068] 除了上述序列之外,所述另外的 N-末端和 C-末端序列可包含或者由柔性序列组成,设计为更好地呈现本发明的肽以在免疫测定(例如 ELISA 测定,侧向流免疫测定,凝集反应测定等)中检测。这种柔性序列可以由本领域技术人员容易地鉴别。

[0069] 在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 SEQ ID NO:2 所示序列 n₁-n₂-S-P-n₅-n₆-P-L-K-K-D-D-N-I-A-A-A-X₁₈-V-L-R-G-X₂₃-X₂₄-K-D-G-X₂₈-F-A-X₃₁-X₃₂-A-V-c₃₅-E-G-c₃₈-Q-Q-E-G-A-Q-Q-P-S-C (SEQ ID NO:2) 组成,其中 n₁ 是选自 A 和 V 的氨基酸, n₂ 是选自 E 和 D 的氨基酸, n₅ 是选自 K 和 R 的氨基酸, n₆ 是选自 K 和 R 的氨基酸, X₁₈ 是选自 V 和 L 的氨基酸, X₂₃ 是选自 L 和 I 的氨基酸, X₂₄ 是选自 A 和 V 的氨基酸, X₂₈ 是选自 R、D 和 N 的氨基酸, X₃₁ 是选自 I、W 和 Y 的氨基酸, X₃₂ 是选自 K 和 R 的氨基酸, c₃₅ 是选自 Q 和 R 的氨基酸, c₃₈ 是选自 V 和 A 的氨基酸。

[0070] 在某些实施方案中,本发明的肽包含由 SEQ ID NO:2 定义的序列及进一步包含另外的 N-末端肽序列、另外的 C-末端肽序列或者其组合。所述另外的 N-末端和 C-末端肽序列可以如上文所述。

[0071] 在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 25 或更多个(如 26、27、28、29 或更多个)氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 30 或更多个(例如 31、32、33、34 或更多个)氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 35 或更多个(例如 36、37、38、39 或更多个)氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 40 或更多个(例如 41、42、43、44 或更多个)氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 45 或更多个(例如 46、47、48、49 或更多个)氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 50 或更多个(例如 51、52、53、54 或更多个)氨

氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明的肽包含或者由 55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个氨基酸残基组成。

[0072] 在某些实施方案中,本发明的肽包含如本文所述肽序列的表位。例如,在某些实施方案中,本发明的肽包含选自 SEQ ID NO:1-146 的序列的表位。

[0073] 在某些实施方案中,本发明的肽包含如本文所述肽序列的片段。例如,在某些实施方案中,本发明的肽包含选自 SEQ ID NO:1-146 的序列的片段。所述片段的长度可以是例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 或 44 个氨基酸。所述片段可以是连续的或者可包括一或多个缺失(例如缺失 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个氨基酸残基)。在某些实施方案中,所述片段包含如美国专利 No. 6, 475, 492、6, 660, 274、6, 719, 983、6, 740, 744 或 7, 887, 815 或者欧洲专利 No. 0894143、1012181、1171605 或 1589109 所述序列。在某些实施方案中,所述片段不是由一或多个美国专利 No. 6, 475, 492、6, 660, 274、6, 719, 983、6, 740, 744 和 7, 887, 815 及欧洲专利 No. 0894143、1012181、1171605 和 1589109 所示序列组成。包含本文所述肽序列的片段的本发明的肽可进一步包含另外的 N-末端肽序列、另外的 C-末端肽序列或者其组合。所述另外的 N-末端和 C-末端肽序列可以如上文所述。

[0074] 包含另外的 N-末端或 C-末端肽序列的本发明的肽可进一步包含接头,其连接所述肽(例如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示肽或者其片段)与所述另外的 N-末端或 C-末端肽序列。所述接头可例如是肽间隔物。这种间隔物可由例如大约 1-5 个(例如大约 3 个)氨基酸残基组成,优选非荷电氨基酸,例如脂肪族残基如甘氨酸或丙氨酸。在一个实施方案中,所述间隔物是三个一组的甘氨酸间隔物。在另一实施方案中,所述间隔物是三个一组的丙氨酸间隔物。在再一个实施方案中,所述间隔物包含甘氨酸与丙氨酸残基二者。或者,所述接头可以是化学(即非肽)接头。

[0075] 在某些实施方案中,本发明的肽通过合成化学方法产生(即“合成的肽”)。在其它实施方案中,本发明的肽通过生物学方法产生(即通过细胞机构如核糖体产生)。在某些实施方案中,本发明的肽是分离的。如本文所用,“分离的”肽是指通过合成或生物学方法产生及随后从用于产生所述肽的化学物和/或细胞机构中至少部分纯化的肽。在某些实施方案中,本发明的分离的肽是基本上纯化的。如本文所用,术语“基本上纯化的”是指分子如肽基本上没有细胞材料(蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸等)、培养基、化学前体、用于合成所述肽的化学物或者其组合。基本上纯化的肽具有低于大约 40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1% 或更低的所述细胞材料、培养基、其它多肽、化学前体和/或用于合成所述肽的化学物。因此,基本上纯的分子如肽可以是感兴趣分子干重的是至少大约 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99%。本发明的分离的肽可以在水、缓冲液中或者等待复溶的干燥形式,例如是试剂盒的一部分。本发明的分离的肽可以是药物可接受的盐形式。能与本发明的肽形成盐的合适的酸和碱为本领域技术人员熟知,包括无机和有机酸和碱。

[0076] 在某些实施方案中,本发明的肽是经亲和性纯化的。例如,在某些实施方案中,本发明的肽是通过其结合抗-疏螺旋体属抗体(例如 V1sE 蛋白及任选其它疏螺旋体属抗原的抗体)的能力而纯化的,通过将这种抗体与本发明的肽接触,由此能形成肽-抗体复合物,洗涤该肽-抗体复合物以除去杂质,然后从抗体中洗脱肽。所述抗体可例如附着于固体

支持物。亲和性纯化的方法为本领域技术人员熟知和常规使用。

[0077] 在某些实施方案中,本发明的肽是修饰的。本发明的肽可以通过多种技术修饰,例如通过用加热和/或去垢剂(如 SDS) 变性。或者,本发明的肽可以通过与一或多种进一步的部分结合而修饰。所述结合可以是共价结合或非共价结合,可以是例如通过末端氨基酸接头如赖氨酸或半胱氨酸、化学偶联剂或者肽键结合。另外的部分可以是例如配体、配体受体、融合配偶体、可检测标记、酶,或者固定所述肽的基质。

[0078] 本发明的肽可以缀合至配体,如生物素(例如通过半胱氨酸或赖氨酸残基)、脂质分子(例如通过半胱氨酸残基)或者载体蛋白(例如血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、免疫球蛋白 Fc 结构域,通过例如半胱氨酸或赖氨酸残基)。附着于配体如生物素可用于使所述肽与配体受体结合,所述配体受体如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、聚合的链霉抗生物素蛋白(见例如 US2010/0081125 和 US2010/0267166,所述文献在此均并入本文作参考)或者亲和素(neutravidin)。抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、聚合的链霉抗生物素蛋白、亲和素进而可以与信号部分(如可以观测到的部分,如胶体金、荧光部分)或者酶(辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)或者固体基质(例如 Immobilon 或者硝化纤维素膜)连接。或者,本发明的肽可以与配体受体融合或连接,所述配体受体如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、聚合的链霉抗生物素蛋白或者亲和素,从而促进所述肽与相应配体如生物素及任何部分(如信号部分)或者其附着的固体基质的结合。其它配体-受体对的实例为本领域熟知,可相似使用。在一些实施方案中,本发明的肽可以与信号部分直接连接或缀合。

[0079] 本发明的肽可以与融合配偶体(fusion partner)(例如肽或其它部分)融合或缀合。在一些实施方案中,融合配偶体可促进所述肽的纯化、在宿主细胞中的表达、检测、稳定所述肽、将所述肽连接至表面或其它实体等。融合配偶体的合适的化合物实例包括载体蛋白(例如血清白蛋白,免疫球蛋白 Fc 结构域,树状聚合物等)、 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签等。所述融合可以通过例如肽键实现。例如,本发明的肽和融合配偶体可以是融合蛋白,并且可以符合读框地直接融合或者可包含肽接头,如在上文关于另外的 N-末端和 C-末端肽序列的论述中所述。在某些实施方案中,本发明的肽的混合物可以通过树状聚合物连接,例如在 MAPS 结构中。

[0080] 此外,本发明的肽可以修饰为包括任何各种已知化学基团或分子。这种修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价附着于聚乙二醇(例如 PEGylation)、共价附着黄素、共价附着血红素部分(heme moiety)、共价附着核苷酸或核苷酸衍生物、共价附着脂质或脂质衍生物、共价附着磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联形成、胱氨酸形成、焦谷氨酸形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化(selenoylation)、硫酸化、泛素化、脂肪酸修饰、转移-RNA 介导的为蛋白质加入氨基酸如精氨酸等。也包括具有取代的键连的氨基酸(包括非天然氨基酸)和肽的类似物。由本文所述任何序列组成的本发明的肽可以通过任何所述修饰方法修饰。这种肽仍由氨基酸“组成”。

[0081] 上述修饰为本领域技术人员熟知,在学术文献中已经大量详细描述。一些特别常用的修饰如糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化和 ADP-核糖基化在许多基础教材中描述,如 Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd

ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993)。关于这个主题的许多详细综述可见 Wold, F., *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983); Seifter et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 182:626-646 和 Rattan et al. (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663:48-62 所述。

[0082] 在某些实施方案中,本发明的肽附着于或者固定于基质上,如固体或半固体支持物。所述附着可以是共价或非共价附着,与所述肽结合的使得可以共价或非共价结合的部分能促进该附着,如与附着于载体、支持物或表面的成分具有高亲和性的部分。例如,所述肽可以与配体如生物素结合,与表面结合的成分可以是相应的配体受体如抗生物素蛋白。在一些实施方案中,所述肽可与融合配偶体如牛血清白蛋白 (BSA) 结合,其促进所述肽与基质的附着。所述肽可以附着于或固定于基质上,在免疫测定期间加入含有抗体的样品之前或之后进行。

[0083] 在某些实施方案中,所示基质是珠,如胶体颗粒(例如由金、银、铂、铜、金属复合材料、其它软金属制成的胶体纳米颗粒、核-壳结构颗粒,或者中空金纳米球)或者其它类型颗粒(例如磁珠或者包含二氧化硅、胶乳、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯或 PVDF 的颗粒或纳米颗粒)。这种颗粒可包含标记(例如比色标记、化学发光标记或者荧光标记),可用于在免疫测定期间观测所述肽的位置。在某些实施方案中,本发明的肽的末端半胱氨酸用于使所述肽直接结合由金、银、铂、铜、金属复合材料、其它软金属等制成的纳米颗粒。

[0084] 在某些实施方案中,所述基质是斑点印迹或者侧向流免疫测定装置中的流动通道。例如,所述肽可以附着或固定于多孔膜上,如 PVDF 膜(例如 Immobilon™ 膜)、硝化纤维素膜、聚乙烯膜、尼龙膜,或者相似类型的膜。

[0085] 在某些实施方案中,所述基质是分析转子中的流动通道。在其它实施方案中,所述基质是管或孔,如适用于 ELISA 测定中的平板(例如微量滴定板)中的孔。这种基质可包含玻璃,基于纤维素的材料,热塑聚合物如聚乙烯、聚丙烯或者聚酯,由微粒材料组成的烧结结构(例如玻璃或各种热塑聚合物),或者由硝化纤维素、尼龙、聚砜等组成的浇铸膜 (cast membrane film)。基质可以是聚乙烯的烧结的、精细的颗粒,通常称作多孔聚乙烯,例如来自 Chromex Corporation (Albuquerque, NM) 的 0.2-15 微米多孔聚乙烯。所有这些基质材料均可以合适形状使用,如薄膜、片状或平板,或者其可以涂覆或结合或层合于合适的惰性载体,如纸、玻璃、塑料膜或织物。将肽固定在固相上的合适方法包括离子性、疏水性、共价相互作用等。

[0086] 因此,另一方面,本发明提供了装置。在某些实施方案中,所述装置可用于进行免疫测定。例如,在某些实施方案中,所述装置是侧向流免疫测定装置。在其它实施方案中,所述装置是分析转子。在其它实施方案中,所述装置是斑点印迹、狭线印迹或者 Western 印迹。在其它实施方案中,所述装置是管或孔,例如在适于 ELISA 测定的平板中。在其它的实施方案中,所述装置是电化学传感器、光学传感器或者光电传感器。

[0087] 在某些实施方案中,所述装置包含本发明的肽。在其它实施方案中,所述装置包含不同的本发明的肽的混合物。例如,在某些实施方案中,所述装置包含 2、3、4 或更多种不同的本发明的肽。在某些实施方案中,所述肽或者混合物中的每种肽均包含序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。在某些实施方案中,所述肽附着或固定于所述装置上。

[0088] 另一方面,本发明提供了包含一或多种本发明的肽的组合物。例如,在某些实施

方案中,本发明提供了组合物,其包含含有 SEQ ID NO:1 所示序列的肽、含有 SEQ ID NO:2 所示序列的肽或者其混合物。在某些实施方案中,所述组合物包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500 或更多种肽(例如由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 定义的所有可能的肽)的混合物。在某些实施方案中,所述肽被修饰(例如通过与一或多种进一步的部分结合),如本文所述。

[0089] 在某些实施方案中,所述组合物包含本发明的一或多种肽及一或多种另外的肽,如疏螺旋体属肽或抗原,来自一或多种感染性疏螺旋体属物种的肽或抗原,或者来自一或多种莱姆病致病物质的肽或抗原。所述疏螺旋体属肽或抗原可以是本文所述任何疏螺旋体属肽或抗原(例如 OspA、OspB、DbpA、鞭毛相关蛋白 FlaA(p37) 和 FlaB(p41)、OspC(25kd)、BBK32、BmpA(p39)、p21、p39、p66、p83 或 VlsE 蛋白),或者其任何片段或表位。一些合适的疏螺旋体属肽已经例如在美国专利 No. 7, 887, 815 中描述。所述组合可包含各个肽或多肽的混合物(简单混合物),其可以是融合肽或多肽形式(例如多聚体肽),或者所述肽可以任选通过连接残基(如赖氨酸残基)通过树状聚合物连接(如在 MAPS 结构中)。本发明的肽可以在其 N-末端或 C-末端与另一合适的肽融合。本发明的肽的两个或更多个拷贝可以彼此连接,单独或者与一或多个另外的肽组合连接。可以使用融合的和非融合的肽或多肽的组合。在一个实施方案中,所述另外的肽含有来自疏螺旋体属肽或抗原、来自感染性疏螺旋体属物种的肽或抗原或者来自莱姆病致病物质的肽或抗原的 B 细胞和 / 或 T 细胞表位。

[0090] 另一方面,本发明提供了包含编码本发明的肽的序列的核酸。本发明的核酸含有少于全部的微生物基因组,可以是单链或双链的。核酸可以 RNA、DNA、cDNA、基因组 DNA、化学合成的 RNA 或 DNA,或者其组合。所述核酸可以纯化为没有其它成分,如蛋白质、脂质及其它多核苷酸。例如,所述核酸可以是 50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 纯化的。本发明的核酸编码本文描述的肽。在某些实施方案中,所述核酸编码具有 SEQ ID NO:1-146 所示序列或者其组合的肽。本发明的核酸可包含其它核苷酸序列,如编码接头、信号序列、TMR 终止转移序列、跨膜结构域或者用于蛋白质纯化的配体如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签和葡萄球菌蛋白质 A 的序列。

[0091] 本发明的核酸可以是分离的。“分离的”核酸是与其天然结合的 5' 和 3' 侧翼基因组序列之一或两者不直接相邻的核酸。分离的核酸可以是例如任何长度的重组 DNA 分子,条件是在天然存在的基因组中在该重组 DNA 分子的紧接的两侧天然发现的核酸序列被除去或不存在。分离的核酸也可以包括非天然存在的核酸分子。本发明的核酸也可以包含编码免疫原性肽的片段。本发明的核酸可编码全长多肽、肽片段及变体或融合肽。

[0092] 本发明的核酸可以至少部分分离自例如生物学样品中存在的核酸序列,所述生物学样品例如是来自感染个体的血液、血清、唾液或者组织。核酸也可以是在实验室中合成的,例如使用自动合成仪进行。扩增方法如 PCR 可用于至少部分从编码所述多肽的基因组 DNA 或 cDNA 扩增核酸。

[0093] 本发明的核酸可包含天然存在的多肽的编码序列或者可编码非天然存在的改变的序列。如果需要,可以将核酸克隆进表达载体中,所述载体包含表达控制元件包括如复制起点、启动子、增强子、或者驱动本发明多核苷酸在宿主细胞中表达的其它调节元件。表达载体可例如是质粒,如 pBR322、pUC 或 ColE1,或者腺病毒载体,如腺病毒 2 型或 5 型载体。任选地,可以使用其它载体,包括但不限于 Sindbis 病毒、猿猴病毒 40、 α 病毒载体、痘病毒

载体,及巨细胞病毒和逆转录病毒载体,如鼠肉瘤病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、Moloney 鼠白血病病毒及 Rous 肉瘤病毒。也可以使用微型染色体如 MC 和 MC1,噬菌体,噬菌粒,酵母人工染色体,细菌人工染色体,病毒颗粒,病毒样颗粒,粘粒(其中插入噬菌体 λ cos 位点的质粒)和复制子(能在细胞中在其自身控制下复制的遗传元件)。

[0094] 制备与表达控制序列可操纵地连接的多核苷酸及在宿主细胞中表达该多核苷酸的方法为本领域熟知。见例如美国专利 No. 4,366,246 所述。当位于与指导多核苷酸转录和/或翻译的一或多个表达控制元件相邻或紧邻时,则本发明的核酸是可操纵地连接的。

[0095] 因此,例如本发明的肽可以根据常规基因工程技术重组产生。为了产生重组的本发明的肽,将编码所述肽的核酸插入合适的表达系统中。通常,构建重组分子或载体,其中编码选择的肽的多核苷酸序列与允许所述肽表达的表达式控制序列可操纵地连接。本领域已知许多类型的合适的表达载体,包括例如含有细菌、病毒、酵母、真菌、昆虫或哺乳动物表达系统的载体。获得和使用这种表达载体的方法为本领域熟知。关于用于本发明组合物或方法的这种及其它分子生物学技术的指导见例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, current edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Miller et al., *Genetic Engineering*, 8:277-298 (Plenum Press, current edition), Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, N. Y., current edition), *Recombinant Gene Expression Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, N. J., current edition) 及 *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausabel et al, Eds.,) John Wiley & Sons, NY (current edition) 及其中引用的参考文献。

[0096] 因此,本发明还提供了包含本发明核酸的载体,及包含这种载体的宿主细胞。在某些实施方案中,所述载体是穿梭载体。在其它实施方案中,所述载体是表达载体(例如细菌或真核表达载体)。在某些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞。在其它实施方案中,宿主细胞是真核细胞。

[0097] 对于通过这种方法转染的本发明的重组核酸或载体的合适宿主细胞或细胞系包括细菌细胞。例如,熟知各种大肠杆菌菌株(例如 HB101、MC1061)在生物技术领域中作为宿主细胞。各种枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、链霉菌(*Streptomyces*)及其它杆菌菌株等也可以用于这种方法中。或者,本发明的肽可以使用常规方法在酵母、昆虫、哺乳动物或者其它类型细胞中表达。也可以使用无细胞体外合成和/或酶介导的合成机构。

[0098] 本发明还提供了产生重组肽或多肽的方法,包括用含有本发明多核苷酸的至少一种表达载体,例如通过常规方法如电穿孔在表达式控制序列(如转录调节序列)的控制下转染或转化宿主细胞。然后将转染或转化的宿主细胞在使得所述肽或多肽表达的条件下培养。通过本领域技术人员已知的适当方式从细胞中(或者如果在细胞外表达则从培养基中)回收、分离及任选地纯化表达的肽或多肽,所述方式包括液相层析如正常或反相液相层析,使用 HPLC、FPLC 等,亲和性层析如使用无机配体或单克隆抗体,体积排阻层析,固定的金属螯合物层析,凝胶电泳等。本领域技术人员在不偏离本发明范围的前提下可选择最合适的分离和纯化技术。本领域技术人员通过使用标准方法可以确定所述肽或多肽的纯度,所述方法包括例如聚丙烯酰胺凝胶电泳(例如 SDS-PAGE)、毛细管电泳、柱层析(例如高

效液相层析 (HPLC)、氨基末端氨基酸分析, 及定量氨基酸分析。

[0099] 方法

[0100] 另一方面, 本发明提供了检测样品中疏螺旋体属抗原的表位的抗体的方法。在某些实施方案中, 所述方法包括将样品与本发明的肽接触, 并检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成, 其中所述复合物的形成是所述样品中存在疏螺旋体属抗原的表位的抗体的指征。在某些实施方案中, 所述疏螺旋体属抗原来自感染性疏螺旋体属物种。在某些实施方案中, 所述疏螺旋体属抗原来自病原性疏螺旋体属物种, 如伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*)、阿氏疏螺旋体或者伽氏疏螺旋体。涉及莱姆病的其它疏螺旋体属物种如 *B. lusitaniae* 和 *B. valaisiana* 也可以使用本发明的方法检测, 条件是其诱导与本发明的肽可特异性反应的抗体。因此, 应理解如本文所用术语“病原性疏螺旋体属”是指导致莱姆病的任何这种疏螺旋体属物种。

[0101] 在某些实施方案中, 所述方法包括将样品与 2、3、4 或更多种 (例如 5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500 或更多种) 不同的本发明的肽的混合物接触。在某些实施方案中, 所述方法包括将所述样品与一或多种本发明的肽和一或多种其它肽 (例如疏螺旋体属肽, 或者其抗原性片段或表位如 OspA、OspB、DbpA、鞭毛相关蛋白 FlaA (p37) 和 FlaB (p41)、OspC (25kd)、BBK32、BmpA (p39)、p21、p39、p66、p83 或 VlsE 蛋白) 的混合物接触。

[0102] 在某些实施方案中, 所述肽或者混合物中的每种肽是分离的 (例如合成和 / 或纯化的) 肽。在某些实施方案中, 所述肽或肽的混合物附着于或固定于固体支持物上。在某些实施方案中, 所述固体支持物是珠 (例如胶体颗粒、纳米颗粒、胶乳珠等)、侧向流免疫测定装置中的流动通道 (例如多孔膜)、分析转子中的流动通道、印迹 (Western 印迹、斑点印迹或狭线印迹)、管或孔 (例如在适于 ELISA 测定的平板中的), 或者传感器 (例如电化学、光学或者光电传感器)。

[0103] 在某些实施方案中, 所述检测步骤包括进行 ELISA 测定。在其它实施方案中, 所述检测步骤包括进行侧向流免疫测定。在其它实施方案中, 所述检测步骤包括进行凝集反应测定。在其它实施方案中, 所述检测步骤包括将样品在分析转子中旋转。在其它的实施方案中, 所述检测步骤包括用电化学、光学或光电传感器分析样品。

[0104] 有许多不同的常规测定法检测包含本发明的肽的抗体-肽复合物的形成。例如, 所述检测步骤可包含进行 ELISA 测定, 进行侧向流免疫测定, 进行凝集反应测定, 进行 Western 印迹、狭线印迹或斑点印迹, 在分析转子中分析样品, 或者用电化学、光学或光电传感器分析样品。这些不同的测定在上文描述和 / 或为本领域技术人员熟知。

[0105] 在一个实施方案中, 所述方法包括检测针对疏螺旋体属抗原 (例如病原性疏螺旋体属如伯氏疏螺旋体的抗原) 的天然存在的抗体的存在, 其是通过感染的对象的免疫系统在其生物体液或组织中产生的并且其能特异性结合本发明的肽或者本发明的肽的组合及任选一或多种合适的另外的抗原性多肽或肽。

[0106] 合适的免疫测定方法通常包括: 接受或获得 (例如从患者中) 可能含有抗体的体液或组织样品; 将待测定的样品与本发明的肽接触 (例如孵育或反应), 在有效形成特异性肽-抗体复合物 (例如所述肽与抗体的特异性结合) 的条件下进行; 以及测定接触的 (反应的) 样品中抗体-肽反应的存在 (例如确定抗体-肽复合物的量)。所述抗体-肽复合

物的量增高表示该对象暴露于并感染了感染性疏螺旋体属物种。“特异性结合”（例如“特异性”或“优先”结合）抗疏螺旋体属抗原的抗体的肽，包括其修饰的形式，与所述抗体以足以可以检测所述抗体的量和时间相互作用，或者与其形成或经历物理结合。“特异性”或“优先”是指所述肽对于这种抗体比对于样品中的其它抗体具有更高的亲和性（例如更高的选择性程度）。例如，所述肽对于所述抗体的亲和性比对于样品中的其它抗体的亲和性高至少大约 1.5- 倍、2- 倍、2.5- 倍、3- 倍或更高。这种亲和性或特异性程度可以通过各种常规方法确定，包括例如竞争性结合研究。在 ELISA 测定中，阳性应答定义为高于健康对照组平均值的 2 或 3 个标准误差。在一些实施方案中，需要二级测定以提供对莱姆病的明确血清学诊断。

[0107] 短语如“含有抗体的样品”或者“检测样品中的抗体”不意味着排除其中不含有或未检测到抗体的样品或测定（例如检测尝试）。在一般意义上，本发明包括确定应答感染性疏螺旋体属感染产生的抗体是否存在于样品中的测定，无论其是否被检测到。

[0108] 使肽与抗体反应以使其特异性反应的条件为本领域技术人员熟知。见例如 *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc)。

[0109] 所述方法包括从对象中接受或获得可能含有抗体的体液或组织样品。所述抗体可以是例如 IgG、IgE、IgD、IgM 或者 IgA 类型。通常，检测 IgM 和 / 或 IgA 抗体，例如在感染早期检测。但是，在疏螺旋体属感染的情况中，IgM 抗体可持续长时间。当上述一些另外的肽（例如用于检测鞭毛蛋白的肽）用于所述方法中时，可以检测 IgG 抗体。所述样品优选易于获得，并且可以是得自静脉血样或者甚至得自指尖取血样的血清或血浆。来自其它机体部分的组织或者其它体液如脑脊液 (CSF)、唾液、胃分泌液、粘液、尿液等已知含有抗体，可以用作样品来源。

[0110] 一旦所述肽抗原和样品抗体允许在合适培养基中反应，进行测定以确定抗体 - 肽反应的存在与否。在许多类型的合适的测定中，为技术人员显而易见的是免疫沉淀和凝集反应测定。

[0111] 在本发明的某些实施方案中，所述测定包括：将样品中的抗体例如直接或者通过与本发明的肽结合而间接固定；加入本发明的肽；检测抗体与肽结合的程度，例如通过标记的肽或通过加入标记物质如特异性识别所述肽的标记的结合配偶体（例如链霉抗生物素蛋白 - 胶体金复合物）或者标记的抗体。见例如图 1 所示。在其它实施方案中，所述测定包括：固定本发明的肽；加入含有抗体的样品；检测抗体与肽结合的量，例如通过加入与标记（例如胶体金复合物，荧光标记，酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶））直接或间接缀合的另一种本发明的肽或者通过加入标记的物质如特异性识别样品抗体的结合配偶体或者标记的抗体（例如抗 - 人 IgG 抗体，抗 - 人 IgM 抗体，抗 - 狗 IgG 抗体，抗 - 狗 IgM 抗体，蛋白质 A，蛋白质 G，蛋白质 L 等）或者这些物质的组合进行。见例如图 3 所示。在其它实施方案中，所述测定包括：固定本发明的肽；加入含有抗体的样品；检测与肽结合的抗体的量，例如通过加入特异性识别样品抗体的第一结合配偶体（例如抗 - 人 IgG 抗体，抗 - 人 IgM 抗体，抗 - 狗 IgG 抗体，抗 - 狗 IgM 抗体，蛋白质 A，蛋白质 G，蛋白质 L 等），及进一步加入第二结合配偶体（例如蛋白质 A、蛋白质 G、蛋白质 L 等），其中所述第二结合配偶体是标记的及识别所述第一结合配偶体。在其它的实施方案中，所述测定包括：使所述肽与含有抗体的样品反应，不用固定任何反应物，然后检测抗体与肽的复合物的量，例如通过标记的肽

或者通过加入标记的物质如特异性识别所述肽的标记的结合配偶体（例如链霉抗生物素蛋白-胶体金复合物）或者标记的抗体。

[0112] 本发明的肽的固定可以是共价或者非共价固定，非共价固定可以是非特异性的（例如非特异性结合如在微滴定孔中的聚苯乙烯表面）。与固体或半固体载体、支持物或表面的特异性或半特异性结合可以通过所述肽实现，所述肽具有与其结合的部分，该部分使所述肽与固体或半固体载体、支持物或表面共价或非共价结合。例如，所述部分对附着于载体、支持物或表面的组分可具有亲和性。在这种情况下，所述部分可以是例如与肽的氨基酸基团结合的生物素或生物素基或者其类似物，如 6-氨基己酸；所述组分是抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、亲和素或其类似物。另一种情况是其中所述部分具有氨基酸序列 His-His-His-His-His-His (SEQ ID NO:152)，所述载体包含带 Ni^{++} 或 Co^{++} 离子电荷的次氨基三乙酸 (NTA) 衍生物。在某些实施方案中，所述部分是融合配偶体，例如 BSA。在举例的实施方案中，本发明的肽可以通过肽的 N-末端和 / 或 C-末端残基与 BSA 缀合。在一个实施方案中，1、2、3、4、5、10、15、20、25、30 或更多种本发明的肽可以被取代为例如与 BSA 缀合。如本领域技术人员所理解，取代水平可影响测定的灵敏性。需要较低浓度的高度取代的 BSA 以实现含有较少肽分子的高浓度 BSA-肽赋予的灵敏性。在某些其它实施方案中，融合配偶体可以是 MAPS。在某些举例的实施方案中，MAPS 可以由 4、8 或更多个不对称分支组成。

[0113] 合适的载体、支持物和表面包括但不限于珠（例如磁性珠，胶体颗粒或纳米颗粒，如胶体金，或者包含二氧化硅、胶乳、聚苯乙烯、聚碳酸酯或 PDVF 的纳米颗粒），共聚物胶乳如苯乙烯-二乙烯苯，羟基化的苯乙烯-二乙烯苯，聚苯乙烯，羧酸化聚苯乙烯，炭黑珠，非活性的或聚苯乙烯或聚氯乙烯活性的玻璃，环氧树脂活性的多孔磁性玻璃，明胶或多糖颗粒或者其它蛋白质颗粒，红细胞，单克隆或多克隆抗体或者这种抗体的 Fab 片段。

[0114] 使用抗原检测特异性抗体的免疫测定方案为本领域熟知。例如，可以使用常规的夹心测定或者常规的竞争性测定。关于一些合适类型测定的论述见 Current Protocols in Immunology (如前述)。在某些实施方案中，本发明的肽在加入含有抗体的样品之前或之后通过共价或非共价结合固定在固体或半固体表面或载体上。

[0115] 进行特异性结合测定、特别是免疫测定的装置为本领域已知，且可容易地调整用于本发明方法中。通常，固相测定因为反应物的分离较快速和简便而与异相测定方法相比较容易进行，后者需要分离步骤，如沉淀、离心、过滤、层析或磁性分离。固相测定装置包括微量滴定板、流式测定装置（例如侧向流免疫测定装置）、浸渍片 (dipsticks)，及免疫毛细管或免疫层析免疫测定装置。

[0116] 在本发明的实施方案中，固体或半固体表面或载体是微量滴定孔中的底板或壁，滤膜表面或膜（例如硝化纤维素膜或 PVDF (聚偏二氟乙烯) 膜，如 Immobilon™ 膜），中空纤维，珠状层析介质（例如琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶），磁珠，纤维状纤维素基质，HPLC 基质，FPLC 基质，具有这种大小的分子的物质，该分子与其结合的肽当溶解或分散于液相中时可以由滤膜保留，或者能形成微团或者参与形成微团使得液相被改变或交换而不夹带 (entraining) 微团的物质，水溶性聚合物，或者任何其它合适的载体、支持物或表面。

[0117] 在本发明的一些实施方案中，所述肽具有可以检测的合适标记。可以使用常规标记，其可以单独或者与其它组合物或化合物协作提供可检测信号。合适的检测方法包括例如通过免疫荧光显微术检测直接或间接用荧光标记标示的物质，包括共聚焦显微术，或者

通过流式细胞计量术 (FACS), 通过放射自显影术、电子显微术、免疫染色、亚细胞分级分离等检测放射性标记的物质。在一个实施方案中, 将放射性元件 (例如放射性氨基酸) 直接掺入肽链中; 在另一实施方案中, 荧光标记通过生物素 / 抗生物素蛋白相互作用、与荧光素缀合的抗体结合等而与肽结合。在一个实施方案中, 将抗体的可检测的特异性结合配偶体加入混合物中。例如, 所述结合配偶体可以是与一抗结合的可检测的二抗或其它结合剂 (例如蛋白质 A、蛋白质 G、蛋白质 L)。这种二抗或其它结合剂可以用例如放射性的、酶的、荧光的、发光的或其它可检测标记进行标记, 如抗生物素蛋白 / 生物素系统。在另一实施方案中, 所述结合配偶体是本发明的肽, 其可以与酶或者其它信号部分直接或间接缀合 (例如通过生物素 / 抗生物素蛋白相互作用), 所述酶如辣根过氧化物酶或者碱性磷酸酶。在酶的情况下, 通过加入产生可检测信号的所述酶的底物产生可检测信号, 所述底物如生色、荧光或者化学发光底物。

[0118] 如本文所用, 检测结合的肽的“检测系统”可包含可检测的结合配偶体, 如特异于所述肽的抗体。在一个实施方案中, 所述结合配偶体是直接标记的。在另一实施方案中, 所述结合配偶体附着于信号产生试剂, 如酶, 其在存在合适底物的条件下可产生可检测信号。固定所述肽的表面可任选伴随所述检测系统。

[0119] 在本发明的实施方案中, 所述检测程序包括目测抗体 - 肽复合物的颜色改变, 或者检测所述抗体 - 肽复合物的物理 - 化学变化。物理 - 化学变化可以随着氧化反应或其它化学反应而发生。其可以通过眼睛, 使用分光光度计等检测。

[0120] 一种特别有用的测定形式是侧向流免疫测定。可以将人或动物 (如狗、小鼠、鹿等) 免疫球蛋白的抗体或者葡萄球菌 A 或 G 蛋白抗体用信号产生物或报道分子 (例如胶体金) 标记, 将其干燥并置于玻璃纤维垫 (样品应用垫或缀合物垫) 上。将诊断性肽固定在膜如硝化纤维素或 PVDF (聚偏二氟乙烯) 膜 (例如 Immobilon™ 膜) 上。当将样品 (血液、血清等) 溶液施加于所述样品应用垫 (或者流经所述缀合物垫) 时, 其溶解标记的报道分子, 报道分子然后结合样品中的所有抗体。然后所得复合物通过毛细管作用转运至下一个膜 (含有所述诊断性肽的 PVDF 或硝化纤维素膜)。如果存在针对所述诊断性肽的抗体, 则其结合划线 (striped) 在膜上的诊断性肽, 从而产生信号 (例如可见或可视化的条带)。特异于标记的抗体的另外的抗体或第二标记的抗体可用于产生对照信号。

[0121] 侧向流免疫测定的另一形式包括与配体 (例如生物素) 缀合的及与标记的配体受体 (例如链霉抗生物素蛋白 - 胶体金) 复合的本发明的肽或组合物。所述标记的肽复合物可置于样品应用垫或缀合物垫上。将抗人 IgG/IgM 或抗动物 (例如狗、小鼠、鹿) IgG/IgM 抗体或本发明的其它肽固定在膜如硝化纤维素膜或 PVDF 膜的测试位点 (如检测线) 上。当将样品加入样品应用垫时, 样品中的抗体与标记的肽复合物反应, 由此结合本发明的肽的抗体变成间接被标记。然后样品中的抗体通过毛细管作用被转运至下一个膜 (含有诊断性肽的 PVDF 或硝化纤维素膜) 并结合固定的抗人 IgG/IgM 或抗动物 IgG/IgM 抗体 (或蛋白质 A、D 蛋白质 G、蛋白质 L 或其组合) 或者固定的本发明的肽。如果任何样品抗体结合标记的本发明的肽, 则在测试位点可见或观测与所述肽结合的标记。这种类型侧向流装置的一个实施方案在图 2 中示出。这种类型侧向流装置的另一实施方案在图 3 中示出, 其中本发明的肽用作在测试位点的固定的捕获剂及可溶的标记的复合物以与样品中的抗体反应。这个测定的合适对照可包括例如位于样品应用垫或缀合物垫的鸡 IgY- 胶体金缀合物, 及

固定在位于测试位点近端的对照位点的抗鸡 IgY 抗体。

[0122] 在利用上述侧向流免疫测定的实施方案中,侧向流装置可包含两个孔道(port):样品孔道(sample port),其位于缀合物垫(含有标记的分析物结合配偶体)与测试位点或检测线(含有固定的分析物结合配偶体)之间,及追加孔道(chase port),其位于所述缀合物垫的上游(例如朝向远离测试位点的装置的末端)。在这种包含两个孔道的装置中,样品通过样品孔道沉积在测试位点上游,液体流经缀合物垫由沉积液(例如稀释液、缓冲液等)经追加孔道引发。所述“追加”液溶解缀合物垫中标记的试剂并流经以与测试位点的相同和固定的试剂相互作用。

[0123] 筛选血液制品或其它生理学或生物学流体的另一测定是酶联免疫吸附测定,即 ELISA。典型地,在 ELISA 中,分离的本发明的肽或组合物直接或通过捕获基质(例如抗体)吸附于微滴定孔的表面。然后,表面上的剩余的非特异性蛋白质结合位点用合适物质封闭,如牛血清白蛋白(BSA)、热灭活的正常山羊血清(NGS)或者 BLOTTO(脱脂奶粉的缓冲溶液,其也含有防腐剂、盐和消泡剂)。然后将所述孔与怀疑含有特异性抗疏螺旋体属(例如伯氏疏螺旋体)抗体的生物学样品孵育。所述样品可不掺水应用,或者更通常可以稀释使用,通常在含有少量(0.1-5.0%重量)蛋白质如 BSA、NGS 或 BLOTTO 的缓冲液中稀释。在孵育足够长时间以使得发生特异性结合之后,洗涤所述孔以除去未结合的蛋白质,然后与最佳浓度的合适的抗免疫球蛋白抗体(例如针对人对象,来自另一动物如狗、小鼠、牛等的抗人免疫球蛋白(α HuIg))或者与酶或其他标记通过标准程序缀合并溶解于封闭缓冲液中的另一本发明的肽孵育。所述标记可选自各种酶,包括辣根过氧化物酶(HRP)、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。等待足够时间使得再次发生特异性结合,然后再次洗涤该孔以除去未结合的缀合物,加入合适的酶底物。使颜色产生,目测或通过仪器(在适当波长测量)确定所述孔内容物的光密度。OD 截断值可以定义为从莱姆病非地区性的地区的个体中收集的至少 50 个血清样品的平均 OD+3 标准误差(SD),或者通过其它这种常规定义定义。在非常特异性测定的情况中,OD+2SD 可用作截断值。

[0124] 在 ELISA 的一个实施方案中,本发明的肽或肽混合物固定在表面上,如 96 孔 ELISA 平板或等同的固相,其用在碱性包被缓冲液中最佳浓度的链霉抗生物素蛋白或等同的生物素结合化合物如抗生物素蛋白或亲和素包被,在 4°C 孵育过夜。在用标准洗涤缓冲液洗涤合适次数之后,在每个孔应用溶解于常规封闭缓冲液中的最佳浓度的生物素化形式的本发明的肽或组合物。然后加入样品,如上述进行测定。进行 ELISA 测定的条件为本领域熟知。

[0125] 在 ELISA 的另一实施方案中,本发明的肽或肽混合物通过融合配偶体如 BSA 或 MAPS 固定在表面上,如 96 孔 ELISA 平板或等同固相。然后加入样品并如上述进行测定。

[0126] 在另一实施方案中,所述方法包括凝集反应测定。例如,在某些实施方案中,将胶体颗粒(例如胶体金等)或胶乳珠与本发明的肽或组合物缀合。随后,将生物学流体与前述珠/肽缀合物孵育,从而形成反应混合物。然后分析该反应混合物以确定抗体的存在情况。在某些实施方案中,凝集反应测定包括使用第二群颗粒,如胶体颗粒(例如胶体金等)或胶乳珠,其缀合于(1)在竞争性测定中特异于本发明的肽或组合物的抗体,或者(2)在夹心测定中能检测样品抗体(例如抗人 IgG 或 IgM 抗体,抗狗 IgG 或 IgM 抗体等)的抗体。合适的凝集法可包含离心,作为评定凝集程度的方式。

[0127] 在其它的实施方案中,本发明的肽或组合物经电转或斑点印迹于硝化纤维素纸

上。随后,将样品如生物学流体(如血清或血浆)与印迹的抗原孵育,使所述生物学流体中的抗体结合所述抗原。然后检测结合的抗体,例如通过标准免疫酶学方法或者通过使用与二抗偶联的胶体纳米颗粒或其它抗体结合剂如蛋白质 A、蛋白质 G、蛋白质 L 或者其组合进行观测。

[0128] 本领域技术人员应理解可设计任何数目的常规蛋白质测定形式、特别是免疫测定形式,以利用本发明分离的肽在对象中检测疏螺旋体属抗体及病原性疏螺旋体属(例如伯氏疏螺旋体)感染。本发明因此不受特定测定形式选择的限制,确信涵盖本领域技术人员已知的测定形式。

[0129] 在某些实施方案中,本发明方法中使用的样品是体液,如血液、血清、脑脊液、尿液或唾液。在其它实施方案中,所述样品是组织(例如组织匀浆)或者细胞裂解物。在某些实施方案中,所述样品来自野生动物(例如鹿或啮齿类动物,如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,所述样品来自实验室动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长目动物等)。在其它实施方案中,所述样品来自驯养动物或野化动物(例如狗、猫、马)。在其它的实施方案中,所述样品来自人。

[0130] 前文论述大都涉及检测针对病原性疏螺旋体属的抗体。然而,应理解所述论述也适用于在体外或体内检测致敏的 T 细胞。

[0131] 预期由于 IgG 的产生而产生细胞介导的免疫应答(例如 T- 细胞辅助应答)。因此预期可以确定致敏的 T 细胞与本发明的肽之间的免疫学反应性。在体外这可以通过将分离自对象的 T 细胞与本发明的肽孵育并测量免疫反应性而进行,例如通过测量随后的 T 细胞增殖或者通过测量自 T 细胞中细胞因子如 IFN- γ 的释放。这些方法为本领域熟知。

[0132] 当本发明的方法在体内进行时,可以使用任何各种常规测定方法。例如,可以在对象中进行皮肤测试,例如通过皮内注射本发明的肽。在注射位点的阳性皮肤反应表示该对象已经暴露于且感染了能导致莱姆病的病原性疏螺旋体属,在注射位点的阴性皮肤反应表示该对象尚未如此暴露/感染。这种或其它体内测试依赖于对象中 T 细胞应答的检测。

[0133] 另一方面,本发明提供了诊断对象中莱姆病的方法。所述对象可以是怀疑具有针对莱姆病致病因素的抗体的对象。所述诊断方法可用于诊断呈现出莱姆病临床症状的对象。

[0134] 在某些实施方案中,所述方法包括将来自对象的样品与本发明的肽接触,并检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成表示所述对象患有莱姆病。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与 2、3、4 或更多种(例如 5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500 或更多种)不同的本发明的肽接触。在某些实施方案中,所述方法包括将样品与一或多种本发明的肽和一或多种其它肽(例如疏螺旋体属肽或者其抗原性片段或表位,如 OspA、OspB、DbpA、鞭毛相关蛋白 FlaA(p37) 和 FlaB(p41)、OspC(25kd)、BBK32、BmpA(p39)、p21、p39、p66、p83 或 VlsE 蛋白)的混合物接触。

[0135] 在某些实施方案中,所述肽或者混合物中的每种肽均是分离的(例如合成的和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,所述肽或者不同肽的混合物附着于或固定于基质上(例如固体或半固体支持物)。例如,在某些实施方案中,所述基质是珠(例如胶体或其它类型颗粒或纳米颗粒),侧向流免疫测定装置中的流动通道(例如多孔膜),印迹(例如 Western

印迹、斑点印迹或狭线印迹),分析转子中的流动通道,或者管或孔(例如在适于ELISA测定的平板中)。

[0136] 有许多不同的常规测定法检测包含本发明的肽的抗体-肽复合物的形成。例如,检测步骤可包含进行ELISA测定,进行侧向流免疫测定,进行凝集反应测定,使用Western印迹、狭线印迹或斑点印迹分析样品,在分析转子中分析样品,或者用电化学、光学或光电传感器分析样品。这些不同的测定法在上文描述和/或为本领域技术人员熟知。

[0137] 在某些实施方案中,所述样品是体液,如血液、血清、脑脊液、尿液或唾液。在其它实施方案中,所述样品是组织(例如组织匀浆)或者细胞裂解物。在某些实施方案中,所述对象是野生动物(例如鹿或啮齿类动物,如小鼠、金花鼠、松鼠等)。在其它实施方案中,所述对象是实验室动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猴、灵长目动物等)。在其它实施方案中,所述对象是驯养动物或野化动物(例如狗、猫、马)。在其它的实施方案中,所述对象是人。

[0138] 试剂盒

[0139] 再一方面,本发明提供了试剂盒。在某些实施方案中,所述试剂盒包含本发明的肽。在某些实施方案中,所述试剂盒包含2、3、4或更多种不同的本发明的肽。所述肽可包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示序列。在某些实施方案中,所述肽附着于或固定于固体支持物上。例如,在某些实施方案中,所述固体支持物是珠(例如胶体颗粒或纳米颗粒),侧向流免疫测定装置中的流动通道,分析转子中的流动通道,或者管或孔(例如在平板中的)。

[0140] 在本发明的试剂盒中也可以提供用于特定类型测定的试剂。因此,所述试剂盒可包含一群珠(例如适于凝集反应测定或侧向流测定),或者平板(例如适于ELISA测定的平板)。在其它实施方案中,所述试剂盒包含装置,如侧向流免疫测定装置,分析转子,Western印迹,斑点印迹,狭线印迹,或者电化学、光学或光电传感器。所述一群珠、平板和装置可用于进行免疫测定。例如,其可用于检测包含来自样品的抗体与本发明的肽的抗体-肽复合物的形成。在某些实施方案中,本发明的肽、不同肽的混合物或者本发明的肽组合物附着于或固定于所述珠、平板或装置上。

[0141] 此外,所述试剂盒可包括各种稀释剂和缓冲液、用于检测特异性结合的抗原或抗体的标记的缀合物或其他物质,以及其它信号产生试剂,如酶底物,辅因子和生色团。试剂盒的其它成分可易于由本领域技术人员确定。这种成分可包括包被试剂,特异于本发明的肽的多克隆或单克隆捕获抗体,或者两种或更多种抗体的混合物,作为标准的这些抗原的纯化或半纯化的提取物,单克隆抗体检测抗体,具有与其缀合的指示物分子的抗小鼠、抗狗、抗鸡或抗人抗体,比色对比的指示图表,一次性手套,去污说明书,涂抹条或容器,样品准备杯等。在一个实施方案中,试剂盒包含适于组建反应介质使得肽-抗体复合物形成的缓冲液或其它试剂。

[0142] 这种试剂盒提供了便利有效的临床实验室诊断病原性疏螺旋体属如伯氏疏螺旋体感染的方式。因此,在某些实施方案中,所述试剂盒进一步包含说明书。例如,在某些实施方案中,所述试剂盒包含表明怎样使用本发明的肽检测疏螺旋体属抗原的抗体或者诊断莱姆病的说明书。在某些实施方案中,所述试剂盒包含表明怎样使用一群珠、平板或装置(例如包含本发明的肽或本发明不同肽的混合物)检测疏螺旋体属抗原的抗体或者诊断莱姆病的说明书。

[0143] 本发明的肽、包含所述肽的组合物和装置、试剂盒和方法提供了许多优势。例如,

其使得可以简便、便宜、快速、灵敏及精确地检测莱姆病,及避免与具有“莱姆病样”症状的其它病症的血清学交叉反应性,所述病症如肌痛、关节痛、不适或发热,包括如梅毒、慢性关节炎及多发性硬化等病症。这使得可以进行精确诊断。此外,本发明的诊断检测(例如ELISA测定、侧向流免疫测定或者凝集反应测定)可用于含有抗-OspA抗体或应答基于疏螺旋体属外表面蛋白的疫苗产生的其它抗体的血清样品中。本发明的V1sE IR6肽与这种抗体不交叉反应,从而使得接种的个体与天然感染伯氏疏螺旋体的个体区分开来。

[0144] 在并入参考的文献中任何定义与本文提供的定义不一致的情况中,以本文提供的定义为准。尽管本发明参考目前优选的实施方案加以描述,但是应理解在不偏离本发明精神的范围内,本领域技术人员可以对本发明进行各种改变和修改。因此,本发明仅由如下权利要求书限制。

[0145] 本文引用的每个专利、专利申请的公开内容包括权利要求书、附图和/或绘图以及出版物均以其全部内容并入本文作参考。

[0001]

序列表

<110> 爱贝斯股份有限公司
 <120> 检测莱姆病抗体的肽和方法
 <130> ABAX-039/01W0 010265-2227
 <150> US 61/556,061
 <151> 2011-11-04
 <160> 152
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa may be Val or Leu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa may be Leu or Ile

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa may be Ala or Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa may be Arg, Asp or Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa may be Ile, Trp or Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa may be Lys or Arg

 <400> 1
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Xaa Val Leu Arg Gly Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Lys Asp Gly Xaa Phe Ala Xaa Xaa
 20 25

 <210> 2
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa may be Ala or Val
 <220>

[0002]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa may be Glu or Asp

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa may be Lys or Arg

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa may be Lys or Arg

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa may be Val or Leu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa may be Leu or Ile

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa may be Ala or Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa may be Arg, Asp or Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa may be Ile, Trp or Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa may be Lys or Arg

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa may be Gln or Arg

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa may be Val or Ala

 <400> 2

 Xaa Xaa Ser Pro Xaa Xaa Pro Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala
 1 5 10 15

 Ala Xaa Val Leu Arg Gly Xaa Xaa Lys Asp Gly Xaa Phe Ala Xaa Xaa
 20 25 30

 Ala Val Xaa Glu Gly Xaa Gln Gln Glu Gly Ala Gln Gln Pro Ser Cys
 35 40 45

 <210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

 <400> 3

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

[0003]

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

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

<400> 4

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 5

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 6

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 7

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 8

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

[0004]

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 9

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 10

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 11

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
20 25

<210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 12

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
20 25

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

<400> 13

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
20 25

[0005]

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

<400> 14

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
 20 25

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

<400> 15

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
 20 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 16

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
 20 25

<210> 17
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 17

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
 20 25

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

<400> 18

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Lys
 20 25

[0006]

<210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 19
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 20
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 20
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 21
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 21
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 22
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 22
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 23
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 23
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 24
 <211> 25

[0007]

<212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 24
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 25
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 26
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 26
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Lys
 20 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 27
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
 20 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 28
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
 20 25
 <210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

[0008]

<400> 29

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 30

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 31

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 31

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 32

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 33

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 34

[0009]

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Lys
 20 25

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

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
 20 25

<210> 36
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 36

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
 20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 37

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
 20 25

<210> 38
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 38

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
 20 25

<210> 39
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 39

Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Leu

[0010]

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
20 25

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

<400> 40

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
20 25

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

<400> 41

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
20 25

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

<400> 42

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 43
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 43

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 44
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 44

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

[0011]

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 45
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 45

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
20 25

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

<400> 46

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 47
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 47

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 48
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 48

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
20 25

<210> 49
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 49

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys

[0012]

20

25

<210> 50
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 50

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Lys
 20 25

<210> 51
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 51

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

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

<400> 52

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 53
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 53

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 54
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 54

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

[0013]

<210> 55
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 55

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 56
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 56

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 57

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 58
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 58

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 59
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 59

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 60

[0014]

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 60

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 61
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 61

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 62
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 62

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 63
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 63

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 64
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 64

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
 20 25

<210> 65
 <211> 25
 <212> PRT

[0015]

<213> Borrelia sp.

<400> 65

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 66

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 66

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 67

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 67

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 68

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 68

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 69

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 70

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

[0016]

<400> 70

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 71

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 72

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 72

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 73

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 74

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Lys
20 25

<210> 75

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 75

[0017]

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 76
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 76

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 77
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 77

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 78
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 78

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 79

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 80
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 80

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

[0018]

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 81
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 81

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 82
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 82

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Ile Arg
20 25

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

<400> 83

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 84

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 85
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 85

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

[0019]

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 86
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 86

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 87
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 87

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 88
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 88

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 89
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 89

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

<210> 90
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 90

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Ile Arg
20 25

[0020]

<210> 91
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 91

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 92
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 92

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 93
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 93

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 94
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 94

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 95
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 95

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

[0021]

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

<400> 96

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 97
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 97

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 98
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 98

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Ile Arg
 20 25

<210> 99
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 99

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25

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

<400> 100

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25

<210> 101
 <211> 25

[0022]

<212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 101
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25
 <210> 102
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 102
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25
 <210> 103
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 103
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25
 <210> 104
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 104
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25
 <210> 105
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 105
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
 20 25
 <210> 106
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

[0023]

<400> 106

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 107

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 107

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 108

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 108

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 109

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 109

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 110

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 110

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 111

<211> 25

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 111

[0024]

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 112
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 112

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 113
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 113

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 114
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 114

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 115
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 115

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 116
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 116

Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Leu

[0025]

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 117
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 117

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 118
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 118

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 119
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 119

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 120
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 120

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 121
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 121

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

[0026]

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 122
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 122

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

Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Trp Arg
20 25

<210> 123
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 123

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
20 25

<210> 124
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 124

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
20 25

<210> 125
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 125

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
20 25

<210> 126
<211> 25
<212> PRT
<213> Borrelia sp.

<400> 126

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

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg

[0027]

20

25

<210> 127
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 127

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 128
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 128

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 129
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 129

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 130
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 130

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

Val Lys Asp Gly Arg Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 131
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Borrelia* sp.

<400> 131

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

[0028]

<210> 132
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 132

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 133
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 133

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 134
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 134

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

Ala Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 135
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 135

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 136
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 136

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 137

[0029]

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 137

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 138
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 138

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

Val Lys Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 139
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 139

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 140
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 140

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 141
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

<400> 141

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

Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25

<210> 142
 <211> 25
 <212> PRT

[0030]

<213> Borrelia sp.
 <400> 142
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25
 <210> 143
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 143
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25
 <210> 144
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 144
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25
 <210> 145
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 145
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Val Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25
 <210> 146
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.
 <400> 146
 Leu Lys Lys Asp Asp Asn Ile Ala Ala Ala Leu Val Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Gly Asn Phe Ala Tyr Arg
 20 25
 <210> 147
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Borrelia sp.

[0031]

<400> 147

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

<210> 148

<211> 14

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<400> 148

Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser
1 5 10

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa may be Ala or Val

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa may be Glu or Asp

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa may be Lys or Arg

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa may be Lys or Arg

<400> 149

Xaa Xaa Ser Pro Xaa Xaa Pro
1 5

<210> 150

<211> 15

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa may be Gln or Arg

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa may be Val or Ala

<400> 150

Val Xaa Glu Gly Xaa Gln Gln Glu Gly Ala Gln Gln Pro Ser Cys
1 5 10 15

<210> 151

<211> 16

<212> PRT

<213> Borrelia sp.

[0032]

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa may be Gln or Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa may be Val or Ala

<400> 151

Ala Val Xaa Glu Gly Xaa Gln Gln Glu Gly Ala Gln Gln Pro Ser Cys
 1 5 10 15

<210> 152
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 6X His tag

<400> 152

His His His His His His
 1 5

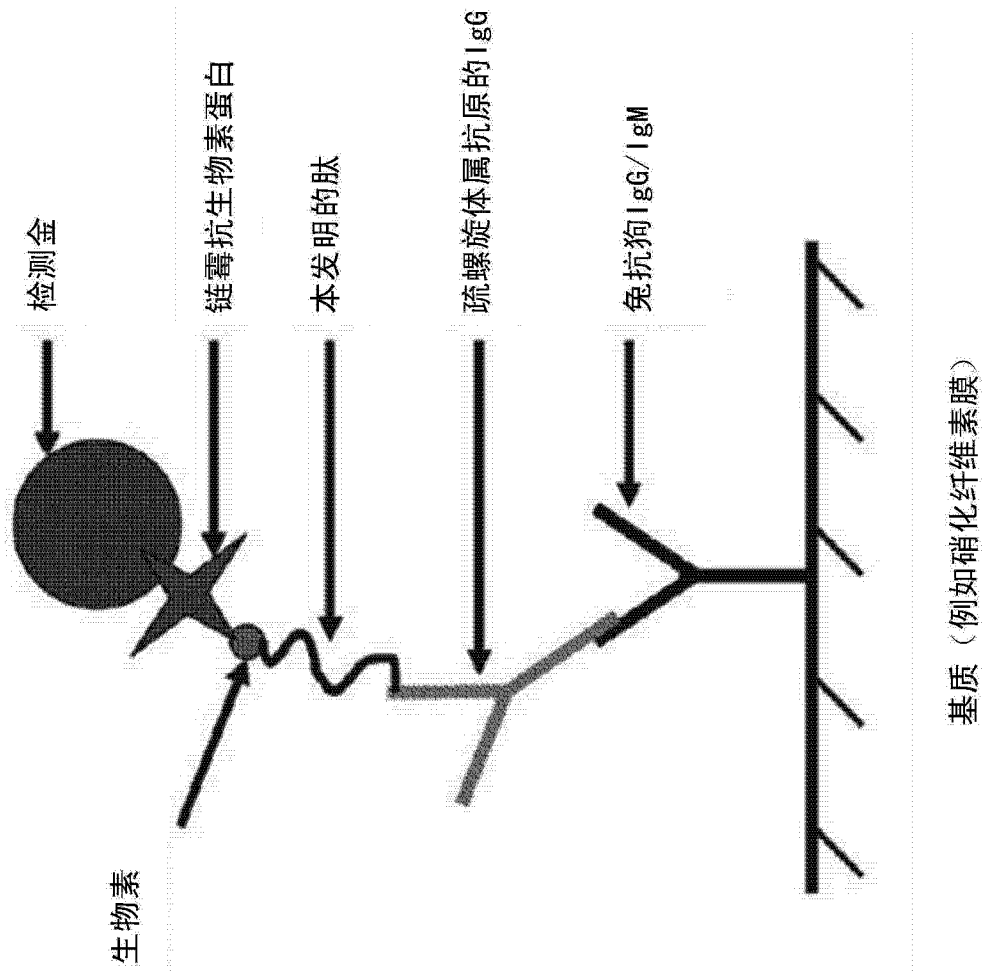


图 1

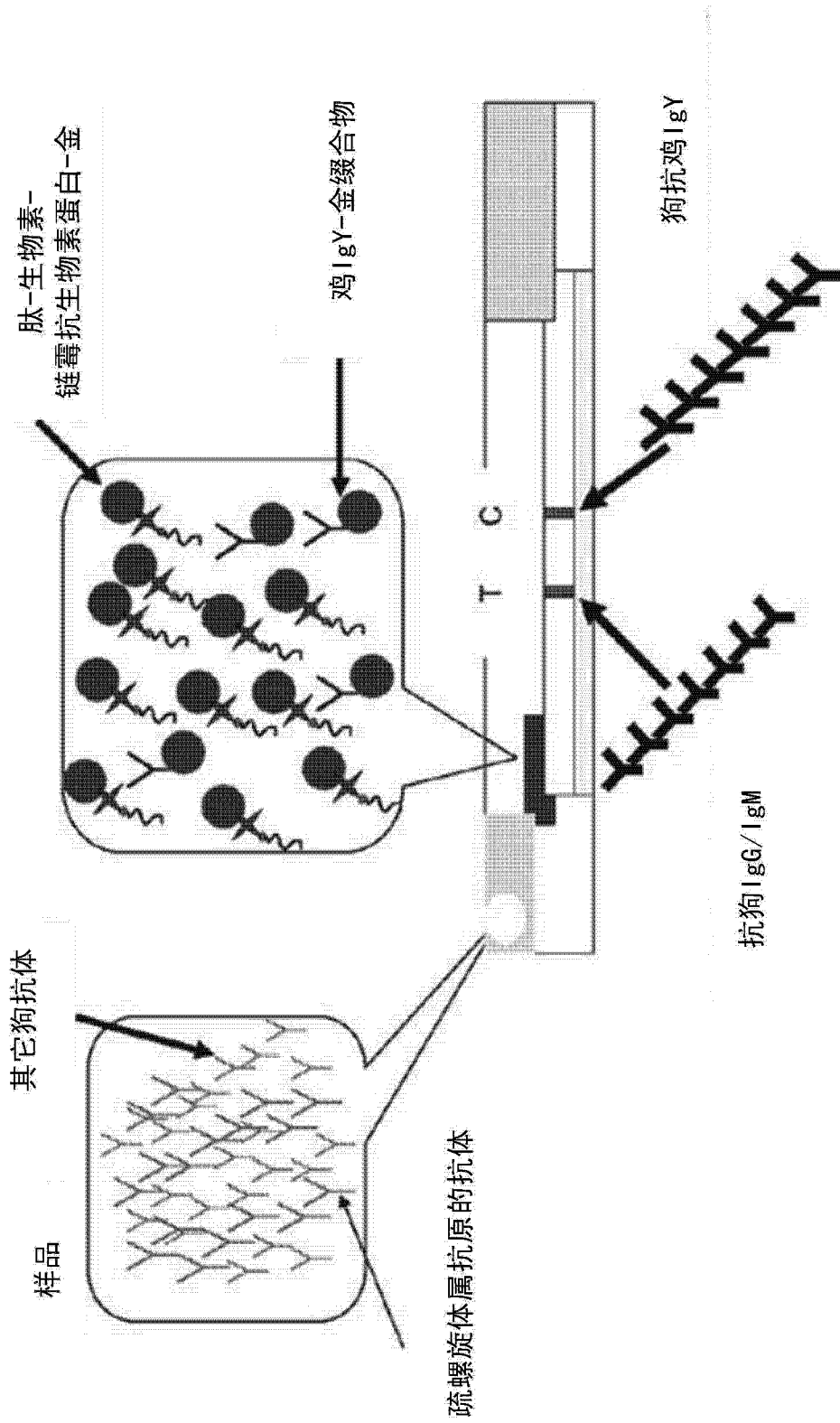


图 2

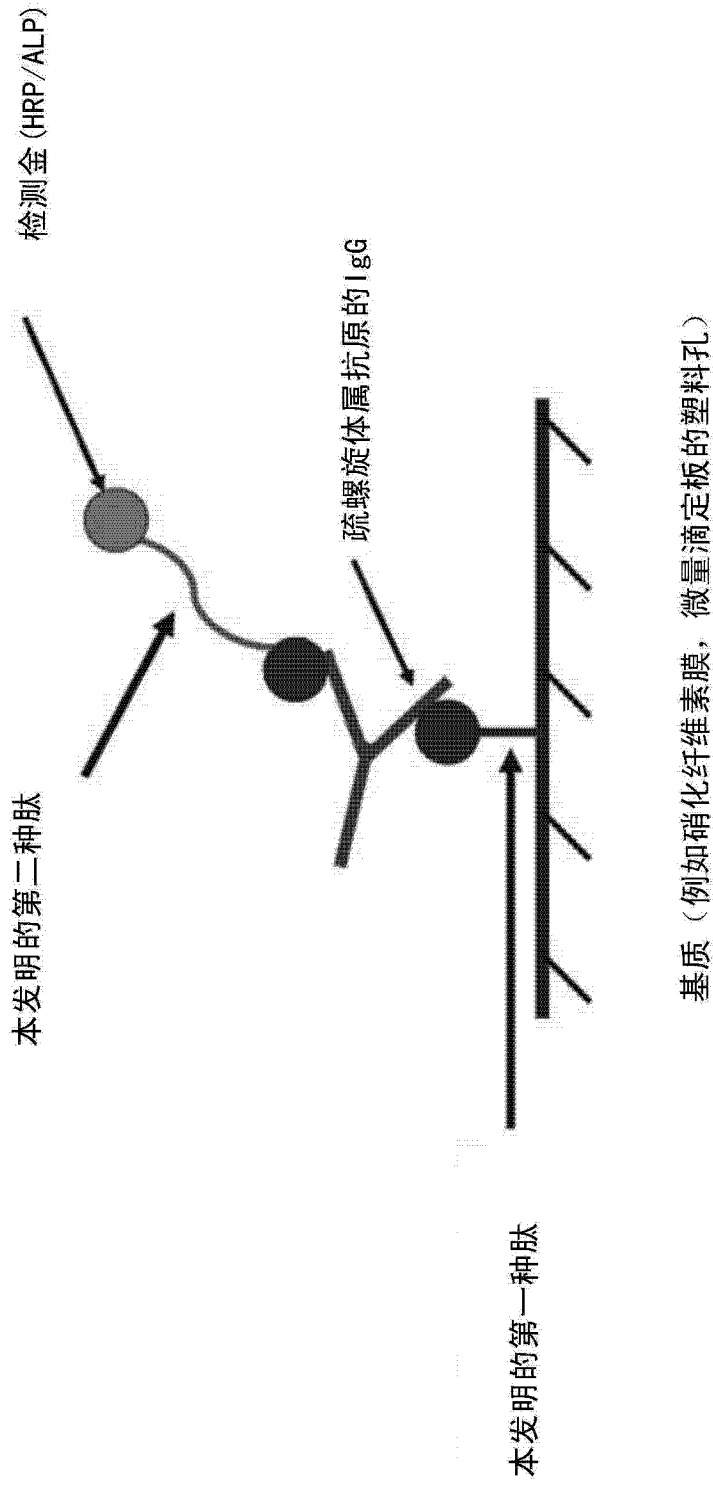


图 3

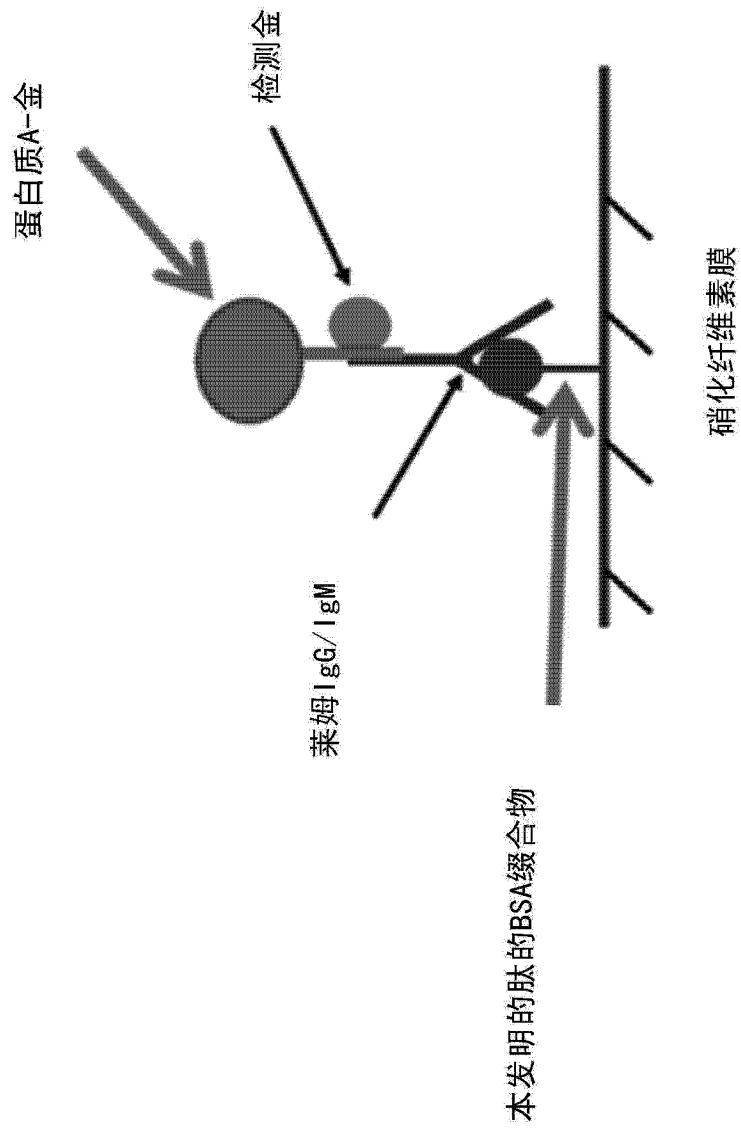


图 4

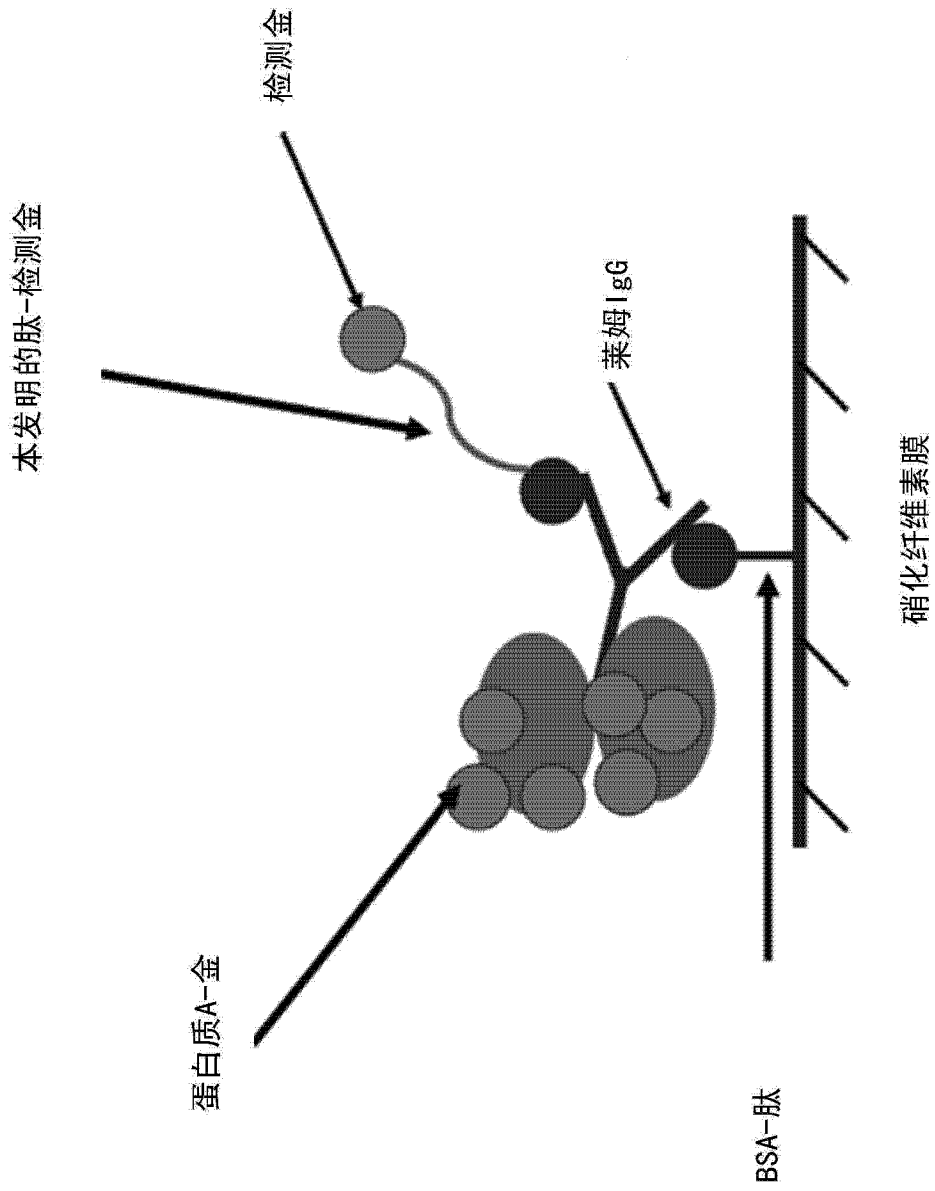


图 5

专利名称(译)	检测莱姆病抗体的肽和方法		
公开(公告)号	CN103998459A	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201280062344.4	申请日	2012-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
[标]发明人	RK梅拉 KP阿伦 DM布莱利 J沃克 C奎斯科		
发明人	R·K·梅拉 K·P·阿伦 D·M·布莱利 J·沃克 C·奎斯科		
IPC分类号	C07K14/00 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N2333/20 C07K14/20 G01N2469/20 Y02A50/57		
代理人(译)	王健		
优先权	61/556061 2011-11-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了可用于检测结合疏螺旋体属抗原的抗体的组合物(例如肽组合物)。所述肽组合物包含多肽序列，其包含疏螺旋体属VlsE蛋白质的IR6结构域中的变体。本发明还提供了包含这种肽组合物及可用于检测结合疏螺旋体属抗原的抗体和诊断莱姆病的装置、方法和试剂盒。

