

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-516083

(P2006-516083A)

(43) 公表日 平成18年6月22日(2006.6.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H O 4 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-505688 (P2004-505688)	(71) 出願人	504423996 フンダサオ オズワルド クルズー フロ クルズ
(86) (22) 出願日	平成14年5月20日 (2002.5.20)		ブラジル国、リオデジャネイロ、リオデジ ャネイロ、 マングインホス、アベニダ ブラジル、4365
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/BR2002/000072	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開番号	W02003/098214	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(87) 国際公開日	平成15年11月27日 (2003.11.27)	(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
(31) 優先権主張番号	10/147,299	(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
(32) 優先日	平成14年5月17日 (2002.5.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レプトスピラ種 (Leptospira species) に存在する細菌免疫グロブリン様 (Big) 反復ドメインを有するタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、レプトスピラ (Leptospira) sp 細菌における Big L 1、Big L 2 及び Big L 3 タンパク質をコードする3種の単離されたDNA分子、並びに診断、治療及びワクチン応用へのそれらのDNA分子の使用に関し、それらのタンパク質は、細菌免疫グロブリン様 (Big) 反復ドメインを有する。本発明によれば、Big L 1、Big L 2 及び Big L 3 タンパク質をコードする単離された分子は、獣医学上重要なレプトスピラ種を含めて、ヒト及び他の哺乳動物において疾病を引き起こすことができるレプトスピラ種の感染の診断及び予防に使用される。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
配列番号 2 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列を有する実質的に精製されたポリペプチド。
- 【請求項 2】
配列番号 2 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列をコードする単離されたポリヌクレオチドセグメント。
- 【請求項 3】
配列番号 1 又はその機能的同等配列から選択される単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 4】 10
配列番号 4 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列を有する実質的に精製されたポリペプチド。
- 【請求項 5】
配列番号 4 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列をコードする単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 6】
配列番号 3 又はその機能的同等配列から選択される単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 7】
配列番号 6 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列を有する実質的に精製されたポリペプチド。 20
- 【請求項 8】
配列番号 6 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列をコードする単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 9】
配列番号 5 又はその機能的同等配列から選択される単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 10】
前記ポリヌクレオチド配列がレプトスピラ種 (*Leptospira species*) 由来である、請求項 2、5 又は 8 に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 11】 30
配列番号 8 又はその機能的同等配列から選択される実質的に精製されたポリペプチド配列。
- 【請求項 12】
配列番号 8 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列をコードする単離されたポリヌクレオチドセグメント。
- 【請求項 13】
配列番号 7 又はその機能的同等配列から選択される単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 14】
配列番号 10 又はその機能的同等配列から選択される実質的に精製されたポリペプチド配列。
- 【請求項 15】 40
配列番号 10 に記載のアミノ酸配列又はその機能的同等配列をコードする単離されたポリヌクレオチドセグメント。
- 【請求項 16】
配列番号 9 又はその機能的同等配列から選択される単離されたポリヌクレオチド。
- 【請求項 17】
請求項 1、4、7、11 及び 14 に記載の実質的に精製されたポリペプチド又は機能的同等配列と結合する抗体。
- 【請求項 18】 50
哺乳類対象において病原性スピロヘータに対する免疫応答を誘導するために使用される医薬組成物であって、薬剤として許容できる担体中に、免疫原として有効量の、請求項 1

、 4、 7、 11 及び 14 に記載の実質的に精製されたポリペプチド又はその機能的同等配列を含む、医薬組成物。

【請求項 19】

前記薬剤として許容できる担体がアジュバントを含む、請求項 18 記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記病原性スピロヘータがトレポネマ (*Treponema*)、ボレリア (*Borrelia*) 及びレプトスピラから選択される請求項 18 記載の医薬組成物。

【請求項 21】

哺乳類対象に病原性スピロヘータに対する免疫応答をもたらすために有用な医薬組成物であって、薬剤として許容できる担体中に、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列と結合する免疫有効量の抗体を含む、医薬組成物。

10

【請求項 22】

請求項 18 に記載の医薬組成物を投与することを含む、哺乳類対象に病原性レプトスピラの感染に対する免疫応答を誘導する方法。

【請求項 23】

請求項 19 記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、哺乳類対象に病原性スピロヘータに対する免疫応答を誘導する方法。

【請求項 24】

病原体特異的細胞成分と結合する試薬を、病原性スピロヘータを含有する疑いのある試料に接触させること、及び前記成分に対する前記試薬の結合を検出することを含む、試料中の病原体を検出する方法。

20

【請求項 25】

前記病原体特異的細胞成分と結合する前記試薬が、 big L 1、 big L 2 及び big L 3 ポリヌクレオチドを同定するためのオリゴヌクレオチドである、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

前記病原体特異的細胞成分と結合する前記試薬が、 Big L 1、 Big L 2 若しくは Big L 3 ポリペプチドに対する、又は機能的同等配列を有するポリペプチドに対する抗体である、請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

前記スピロヘータ特異的成分が、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列をコードするポリヌクレオチドである、請求項 22 記載の方法。

30

【請求項 28】

前記スピロヘータ特異的成分が、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列である、請求項 22 記載の方法。

【請求項 29】

試料中の、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列に対する抗体の検出法であって、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列を前記抗体と結合させる条件で、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列を前記試料に接触させること、並びに請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列に対する前記抗体の結合を検出することを含む、検出法。

40

【請求項 30】

試料中の、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列の検出法であって、請求項 1、 4、 7、 11 及び 14 に記載のポリペプチド又はその機能的同等配列に対する抗体を前記試料に接触させることにより、前記試料中の前記ポリペプチドを前記抗体と結合させること、並びに前記抗体に対する前記ポリペプチドの結合を測定することを含む、検出法。

【請求項 31】

50

試料中の *BigL1*、*BigL2*、*BigL3* 又はその機能的同等配列をコードする核酸の検出法であって、請求項 1、4、7、11 及び 14 に記載のポリペプチドをコードするか、又はその機能的同等配列をコードするポリヌクレオチドを使用する、検出法。

【請求項 32】

BigL1、*BigL2* 及び *BigL3* ポリペプチド若しくは機能的同等配列を有するポリペプチド；*bigL1*、*bigL2* 及び *bigL3* ポリヌクレオチド；又は *BigL1*、*BigL2*、*BigL3* ポリペプチド若しくは機能的同等配列を有するポリペプチドと結合する抗体、を検出するために有用なキット。

【請求項 33】

BigL1、*BigL2*、*BigL3* 又はその機能的同等配列をコードする核酸を検出するために有用なキットであって、*BigL1*、*BigL2*、*BigL3* 核酸、又はその機能的同等配列とハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを含有する第 1 容器を備えた 1 つ又は複数の容器を含む担体手段を備えたキット。 10

【請求項 34】

BigL1、*BigL2*、*BigL3* 核酸又はその機能的同等配列に対する抗体の検出に有用なキットであって、*BigL1*、*BigL2* 若しくは *BigL3* ポリペプチド、又はその機能的同等配列を含有する第 1 容器を備えた 1 つ又は複数の容器を含む担体手段を備えたキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、レプトスピラ *s p* 細菌において細菌免疫グロブリン様 (*Big*) 反復ドメインを有するタンパク質 *BigL1*、*BigL2* 及び *BigL3* をコードする 3 種の単離された DNA 分子、並びに診断、治療及びワクチン応用へのそれらの使用に関する。本発明によると、その *BigL1*、*BigL2* 及び *BigL3* をコードする単離された分子は、獣医学上重要な種を含めたヒト及び他の哺乳動物に発病可能なレプトスピラ種の感染の診断及び予防に使用される。

【背景技術】

【0002】

スピロヘータは運動性で、ラセン型の細菌であり、ヒト及び他の動物の病原体であるレプトスピラ、ボレリア (*Borrelia*) 及びトレポネマ (*Treponema*) の 3 属がある。ボレリア及びトレポネマはライム病、回帰熱、梅毒及びフランベジアを含めた疾病の原因因子である。レプトスピラは 8 つの病原性種及び 4 つの非病原性腐生種という遺伝的に多様な群から成る (1、2)。レプトスピラは血液型亜型状態によっても分類され、200 を超える病原性血液型亜型が同定されている。リポ多糖部分の構造の不均一性は、血液型亜型間で観察される抗原多様性の度合いが大きいことの根拠のようである (1、2)。 30

【0003】

レプトスピラ症は人獣共通伝染病であり、ヒトへの伝染は飼い慣らし動物若しくは野生動物である保菌宿主、又はそれらの動物の尿によって汚染された環境との接触を介して起こる。感染によって広範囲の臨床症状が発現する。疾患の初期は発熱、悪寒、頭痛及び激しい筋肉痛を特徴とする。臨床感染の 5 ~ 15 % で疾病は進行して、黄疸、腎不全及び出血の発現のような多器官の重篤な合併症が生ずる (1 ~ 4)。重症のレプトスピラ症は死亡率 5 ~ 40 % である。 40

【0004】

レプトスピラ症は全世界に分布している。保菌宿主をつとめる動物種の範囲が大きいいため、最も広まった人獣共通伝染病であるとみなされている (1)。レプトスピラ症は軍人、農民、鉱夫、下水及び廃棄物処理業者、獣医師並びに屠殺場労働者のようなリスクグループで伝統的に重要な職業病である (1 ~ 3)。しかし、新しいパターンの疾病の伝染が近年出現し、そのことはレプトスピラ症が公衆衛生上の問題として重要性を増しつつある 50

ことを強調している。先進国ではレプトスピラ症は娯楽活動（１）及びスポーツイベント（１、４、５）に伴う大発生の原因となった。ブラジル及び他の発展途上国では根元的な貧困状態によって高い死亡率を伴うレプトスピラ症の都市部での大流行を招いた（４、５）。

【０００５】

公衆衛生への影響力に加えて、レプトスピラ症は、家畜やペットにおける疾病の原因として主要な経済的負担となっている（２）。レプトスピラ症はウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ及びイヌのような動物に流産、死産、不妊、発育不全、乳の産生の減少及び死亡を引き起こし、家畜において病原性レプトスピラ症の慢性感染及び放出を誘導する（２）。したがって、現行の国際及び国内検疫規制が原因で、レプトスピラ症は畜産業にとって経済的な損失のさらなる源となっている。

10

【０００６】

ヒト及び動物のレプトスピラ症の防除は、適切な診断手段が現在欠如していることに阻まれている。標準的な血清学的試験である顕微鏡下凝集試験（MAT）は症例を迅速に同定するには不満足である。それは、MATが少数の基準研究室でしか実施できず、十分な感度を得るためには対になった血清の分析を必要とするからである（１、２）。MATへの依存はいくつかの研究でみられるように大発生の原因を立証する上で遅れを生じた（１、２）。全細胞レプトスピラ抗原調製物に基づく酵素免疫検定法（ELISA）及びその他の迅速血清学的試験がレプトスピラ感染をスクリーニングするための代替法として開発されているが、MATが依然として症例の確定に必要である（１、２）。組換え抗原に基づく血清学的試験は、ライム病及び梅毒のようなスピロヘータ感染のスクリーニングに広く使用されているが、レプトスピラ症の血清診断のための組換えタンパク質の使用はあまり研究されてこなかった。近年、ウシレプトスピラ症の血清診断のための組換え鞭毛抗原の免疫捕獲アッセイが記載された（６）。組換え熱ショックタンパク質Hsp58はヒトの症例の少数から得た血清試料で高度のELISA反応性を示した（７）。しかし、レプトスピラ症の血清診断のための組換え抗原の利用性は、大規模な確認研究では調査されていない。

20

【０００７】

さらに、レプトスピラ症を防除又は予防する有効な介入法は、現在のところ得られていない。土壌中及び水中で病原性レプトスピラが長期間生存し、多数の野生動物及びペットが保菌宿主となるため、環境による防除措置は実行が困難である（１、３）。レプトスピラ症に対する介入として、防御免疫の発生に努力が集中した。現在利用できるワクチンは、病原性レプトスピラの不活性化全細胞又は膜調製物に基づき、そのワクチンはレプトスピラのリポ多糖に対する抗体を誘導することによって防御応答を誘導するようである（１、３）。しかし、これらのワクチンは感染に対して長期の防御を誘導しない。さらに、これらのワクチンはワクチン調製物に含まれていないレプトスピラの血液型亜型に対して交差防御免疫ももたらさない。病原性の血液型亜型が多数であること（>200）及び多血液型亜型ワクチンの製造コストが、全細胞又は膜調製物に基づく戦略によって有効なワクチンを開発する上での主な制限となっている。

30

【０００８】

レプトスピラ症の病原性のメカニズムは、ライム病及び梅毒のようなスピロヘータ病のように病原体が感染の初期段階で宿主内で広く播種できることに依存している（２）。膜結合レプトスピラタンパク質は、宿主の組織を介した進入と播種を可能にするような相互作用を媒介していると想像されている。推定表面結合毒性因子はワクチン戦略の候補として働き、宿主における播種を遮断する応答をこれらの因子に対して誘導する。さらに、膜結合タンパク質は宿主の感染時の免疫応答に利用できるであろうことから、抗体依存性食作用及び補体介在性細胞傷害のようなメカニズムを介した免疫防御の標的を構成するであろう。抗原であるこれらの標的を組換えタンパク質として生産することは、サブユニットワクチンとしてレプトスピラ症の防御免疫を得るための費用効果の高い手法となる。さらに、病原性レプトスピラに保存されている膜結合標的の選択によって、現在利用できる

40

50

全細胞ワクチン製剤で遭遇している制限を避けることができる。

【0009】

レプトスピラ症の分野における主な制限は、表面結合タンパク質及び宿主で発現されるタンパク質を従来の生化学的方法で同定することであった。スピロヘータであるボレリアブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) のゲノム配列から、100種を超える表面結合リポタンパク質が同定された。ゲノムサイズとその生活環の生物学に基づいて、レプトスピラは顕著に多数の表面結合標的を有すると考えられる。現在のところ膜抽出物の単離、これらの抽出物中のタンパク質の精製及び特性決定、及びこれらのタンパク質標的の分子クローニングを介して10種未満の表面結合タンパク質が特性決定された(8~14)(12)。いくつかの同定された標的であるLipL32、OmpL1及びLipL41の組換えタンパク質を用いた免疫は、完全ではなく部分的な防御応答を誘導する(11、12)。

10

【0010】

レプトスピラのタンパク質発現についてのさらなる包括的な理解を得るために、我々は感染時に発現されるタンパク質抗原のレポーターとしてヒトレプトスピラ症の際の体液性免疫応答を使用した。感染時に発現されるレプトスピラ抗原の同定は、新しい血清診断戦略及び免疫防御戦略の開発に潜在的に重要な意味を有する。レプトスピラゲノムDNAファージライブラリーから、免疫反応性ポリペプチドを発現するクローンを同定するために、レプトスピラ症の患者の血清を使用した。これらのクローンの一部は、レプトスピラの膜結合タンパク質の新規なファミリーをコードすることが発見された。これらのポリヌクレオチド及びポリペプチドの同定、並びにレプトスピラ症の診断及び病原性スピロヘータに対する免疫応答を誘導することへのそれらの応用は本発明の基礎である。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、レプトスピラにおけるDNA分子、及びそれらがコードする、細菌免疫グロブリン様反復ドメインを有するポリペプチドに関する。本発明は、本来L.キルシュネリ (*L. kirschneri*) 及びL.インテロガンズ (*L. interrogans*) から得られる3種のDNA分子の単離について記述している。それらのDNA分子は、ポリペプチドの推定アミノ酸配列に基づき、それぞれおよそ110、205及び205kDaの分子量を有している、本明細書において「BigL1」、「BigL2」及び「BigL3」と称するタンパク質をコードする。この3種のタンパク質はおよそアミノ酸90個の縦列反復 (*tandem repeat*) 配列12~13個を有する。BigL1、BigL2及びBigL3の反復配列は互いに高度に関連し (>90%のアミノ酸配列同一性)、細菌病原体の毒性因子にみられる部分である細菌免疫グロブリン様 (Big) ドメインファミリーに属する。

30

【0012】

本明細書においてレプトスピラのBigドメインを有するレプトスピラタンパク質をコードする、「bigL1」、「bigL2」及び「bigL3」と呼ばれるDNA分子は、ペプチド及びポリペプチドを製造するための発現ベクターに異種DNAとして挿入できる。そのような発現ベクターで形質転換した代替宿主から組換えポリペプチドを精製できる。BigL1、BigL2及びBigL3由来のポリペプチドは進行中及び過去の感染の血清学的マーカーである。それは、病原性レプトスピラに感染しているか、又はそれを免疫されたレプトスピラ症の患者及び動物の血清が、単離されたポリペプチドを認識するからである。

40

【0013】

さらに、組換え又は天然抗原調製物由来のBigL1、BigL2及びBigL3ポリペプチドは免疫原性である。精製組換えBigL1、BigL2及びBigL3ポリペプチドを免疫された実験動物から得た抗体は、レプトスピラ由来の天然抗原を認識し、感染が疑われる対象から得た試料中の病原性スピロヘータを検出するために有用である。

50

【0014】

さらに、BigL1、BigL2及びBigL3ポリペプチドは、病原性スピロヘータに対する免疫応答を誘導する。BigL1、BigL2及びBigL3由来ポリペプチド、これらのポリペプチドに対する抗体、並びにBigL1、BigL2及びBigL3をコードするポリヌクレオチドを単独又は薬剤として許容できる担体と組み合わせてレプトスピラの感染を治療又は予防するために使用できる。Bigドメインは、他の細菌病原体での毒性に関連するタンパク質に存在することから、これらの部分はレプトスピラによって引き起こされる感染に無関係の感染を治療又は予防するために使用できる。

【0015】

第1の実施形態では、本発明はbigL1、bigL2及びbigL3の単離されたDNA分子、並びにこれらのDNA分子によってコードされるか、又は機能的同等配列を有するポリペプチドを提供する。さらに、bigL1、bigL2及びbigL3ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを製造するための、及びこれらの配列から得られる実質的に精製されたポリペプチドを得るための方法を提供する。

10

【0016】

本発明の第2の実施形態は、対象において病原性スピロヘータに対する免疫応答を誘導するための医薬組成物を提供することである。その医薬組成物は、BigL1、BigL2、BigL3、及び機能的同等配列を有するポリペプチドから成る群から選択された、免疫原として有効量の1つ又は複数の抗原を薬剤として許容できる溶剤中に含む。

【0017】

第3の実施形態では、本発明はBigL1、BigL2、BigL3ポリペプチド又は機能的同等配列を有するポリペプチドと結合する化合物を同定するための方法を提供し、その方法は、その化合物及びBigL1、BigL2若しくはBigL3ポリペプチド、又は機能的同等配列を有するポリペプチドから成る成分をそれらの成分を相互作用させるのに十分な条件でインキュベートすること、並びにBigL1、BigL2若しくはBigL3ポリペプチド、又は機能的同等配列を有するポリペプチドに対するその化合物の結合を測定することを含む。好ましくは本発明の方法は、レプトスピラ又は関係する他の細菌病原体を活動性感染又は既往感染した疑いのある対象の血清を利用する血清診断法である。

20

【0018】

第4の実施形態では、本発明は試料中の病原体を検出するための方法を提供し、その方法は、病原体特異的細胞成分と結合する試薬を病原性スピロヘータを含有する疑いのある試料に接触させること、及びその成分に対する試薬の結合を検出することを含む。一側面では、その病原体特異的細胞成分と結合する試薬は、bigL1、bigL2及びbigL3ポリヌクレオチドを同定するためのオリゴヌクレオチドである。別の側面では、その病原体特異的細胞成分と結合する試薬は、BigL1、BigL2若しくはBigL3ポリペプチド、又は機能的同等配列を有するポリペプチドに対する抗体である。

30

【0019】

第5の実施形態では、本発明はBigL1、BigL2及びBigL3ポリペプチド若しくは機能的同等配列を有するポリペプチド、bigL1、bigL2及びbigL3ポリヌクレオチド、又はBigL1、BigL2、BigL3ポリペプチド若しくは機能的同等配列を有するポリペプチドの検出に有用なキットを提供する。

40

【0020】

本発明の他の目的、特徴及び利点は以下の詳細な説明によって明らかとなる。しかし、本発明の精神内及び範囲内である種々の変更及び改造は詳細な説明から当業者には明らかとなることから、本詳細な説明及び特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているものの、例示としてのみ述べられていることを理解すべきである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

便宜上、明細書、実施例及び添付の請求項に採用される特定の用語及び熟語の意味を以

50

下に供する。他に規定しない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する業界の通常の技術者の1人が一般に理解するものと同じ意味を有する。

【0022】

「BigL」は、配列相同性によれば細菌免疫グロブリン様(Big)ドメインにそれぞれ類似した縦列反復配列を有するレプトスピラsp.のポリペプチドである。Bigドメインは、大腸菌(E.coli)、エルシニア(Yersinia)及びボルデテラ(Bordetella)のような細菌病原体に発現している細菌タンパク質に存在し、宿主細胞との接着のような毒性機能を有する。

【0023】

「参照配列」は、自然界の生物からの単離によって、又は遺伝子工学を介して得られた新しい配列であり、本発明に特徴的な正確な生体機能を示す。

【0024】

「機能的同等配列」は、参照配列の特徴的な機能に修正を生じない多様性の結果である、すなわちヌクレオチド又はアミノ酸の置換及び/若しくは欠失及び/若しくは挿入、並びに/又はそれらの末端の一方における配列の伸長及び/若しくは短縮である、配列における自然発生又は誘導されたすべての修正の結果である、その参照配列に係る配列である。機能的同等配列はその断片及びアナログを包含する。言い換えると、機能的に同等な配列は、参照アミノ酸配列又は参照核酸配列に対して少なくとも80%の相同性を有するポリペプチド又は核酸のような、参照配列と「実質的に同じ」又は「実質的に同一」である配列である。相同性は通常は配列解析を実行するソフトウェアシステム(遺伝学コンピュータグループ配列解析ソフトウェアパッケージ、ウイスコンシン大学バイオテクノロジーセンター、1710、University Avenue、マジソン、ウイスコンシン州、53705)によって測定される。

【0025】

前に指摘したように、宿主の感染時に発現されるレプトスピラ抗原は診断テスト及びワクチンの標的を同定するために重要である。LipL32タンパク質はこれらの標的の1つであり、自然感染時の体液性免疫応答によって主要抗原として同定された。しかし、レプトスピラ症が検出された急性期疾患時の患者血清では、LipL32に対する抗体の検出に基づいた血清学試験の感度は限定的である(Flannery、B:「レプトスピラ症の血清診断のための組換えレプトスピラ抗原に基づく酵素免疫検定法の評価(Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based Enzyme-linked Immunosorbent Assays for the serodiagnosis of Leptospirosis)」J.Clin.Microbiology 2001;39(9):3303~3310;WO9942478)。

【0026】

本発明は、レプトスピラに属する細菌を含めたスピロヘータ細菌種に関連するBigLタンパク質ファミリーの同定に基づく。

【0027】

本発明によると、BigLタンパク質ファミリーは、病原性レプトスピラの感染時、又は病原性レプトスピラ若しくは組換えBigLポリペプチドの免疫時に生成する宿主の体液性免疫応答の標的として同定された。BigLポリペプチド及びこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト及び動物の保菌宿主を含めた様々な種における自然感染を同定するための診断テストに有用である。それらのタンパク質に基づくこの診断テストは、標準的な診断テスト又は公表された文献に用いられた診断テストと比較して感度及び特異性の改善を示す。初期におけるレプトスピラ症の同定。さらに、BigLポリペプチドを免疫用の医薬組成物に使用すると、免疫応答を誘導できる。

【0028】

本発明では、3種のBigLポリペプチドは分子量128.4kD、201.3kD及

10

20

30

40

50

び200.4kDを有すると特性決定する。これらの分子量はこれらのポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであるbigL1、bigL2及びbigL3の推定アミノ酸配列に基づく。BigLポリペプチドのアミノ酸配列はシグナル配列及びスピロヘータのリポボックスに大きく一致するシグナルペプチダーゼ推定切断部位を有する。したがって、BigLポリペプチドは膜結合リポタンパク質である。128.4kD、201.3kD及び200.4kDのポリペプチドをそれぞれ「BigL1」、「BigL2」及び「BigL3」と称する。

【0029】

本発明のBigLポリペプチドは、本来レプトスピラspから単離されたが、それらは病原性生物であるレプトスピラsp.に対するだけでなく、Bigドメインを有する因子をもつ他のスピロヘータ細菌及び病原体に対しても免疫応答を誘導するために有用である。そのうえ、BigLポリペプチドはレプトスピラsp.、他の病原性スピロヘータ及び細菌性病原体による感染の診断にも使用できる。

10

【0030】

最先端技術の方法論を取り込んだいくつかの方法をBigLポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を得るために使用できる。これら方法には、ヌクレオチドの相同配列を検出するためのプローブを使ったゲノムライブラリーのハイブリダイゼーションを用いたDNAの単離、構造面が共通であるクローニングされたDNAの断片を検出するための発現ライブラリーの抗体のスクリーニング、目的DNA配列を組換えできるイニシエーターを用いたゲノムDNAにおけるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、及びコンピュータに基づく配列データベースからのbigLポリヌクレオチドと類似した配列の検索があるが、それらに限定されない。

20

【0031】

本発明では、抗原の同定は培養(in vitro)時及び宿主への感染(in vivo)時にレプトスピラ抗原の発現が異なるという知識に基づいた。レプトスピラ抗原の発現が異なることが、感染時の宿主への適応に重要であると推定される。我々は免疫反応性抗原、すなわち宿主感染時に発現される抗原を同定する戦略を採った。病原性レプトスピラに感染した患者の血清を、ファージを用いたレプトスピラゲノムDNAライブラリーから免疫反応性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を選択するために使用した。

30

【0032】

本発明は配列番号1、配列番号3及び配列番号5に対応するヌクレオチド配列を有する3種のポリヌクレオチド、並びにそのようなヌクレオチドがコードするポリペプチドであるBigL1、BigL2及びBigL3のアミノ酸配列を同定し、単離した。

【0033】

ステップ1 - 基本的に以下のステップから成る陽性クローンのスクリーニング:

(a) 病原性レプトスピラのDNAを適当な酵素で切断し、ファージゲノムの特異的部位に連結した。宿主細菌にファージを感染させ、結果として生じたIPTGを用いた誘導後に組換えポリペプチドを発現するクローンに免疫プロットプロトコルを施した。そのプロトコルでは、検査室で確認されたレプトスピラ症患者の血清と共に、次にホースラディッシュペルオキシダーゼと結合した二次抗体と共に、コロニー溶解物の膜をインキュベートした。その二次抗体はヒト免疫グロブリンを認識する。陽性クローンを発色に基づく抗原抗体複合体についての指示反応によって検出した。

40

(b) クローニングされ単離されたポリヌクレオチドの配列を配列決定反応のイニシエーターとしてファージベクター特異的配列を用いて決定した。クローンの配列の分析とプライマー歩行戦略の使用によって、BigL1、BigL2及びBigL3をコードする遺伝子の完全なヌクレオチド配列を同定した。

(c) 得られた陽性クローンの大部分は熱ショックタンパク質Hsp58及びDnaK、並びに外膜タンパク質LipL41をコードする遺伝子を含んでいる。しかし、タンパク質ファミリー(Pfam)データベースで比較すると、複数のクローンが細菌型免疫グ

50

ロブリン (B i g) タンパク質としてアミノ酸 90 個を縦列に反復コードする遺伝子を含有することが分かった。クローンの配列の分析で 3 種の遺伝子が同定され、 b i g L 1 では 12 個の縦列反復配列を、 b i g L 2 及び b i g L 3 では 13 個の縦列反復配列を含んでいた。

【 0 0 3 4 】

ステップ 2 - タンパク質のサブクローニング発現と精製

- 2 つの B i g L タンパク質の配列に基づく 2 つのオリゴヌクレオチドの図
- それらのオリゴヌクレオチドから反復領域の一部をコードする初発 B i g L 部分の P C R 増幅
- 増幅産物の配列決定
- 配列決定された産物がコードする領域のサブクローニング
- 組換えタンパク質の発現
- 組換えタンパク質の精製

10

【 0 0 3 5 】

免疫プロット分析は、病原性レプトスピラに感染したレプトスピラ症患者及びげっ歯類保菌宿主から得た血清が、 B i g L ポリペプチドの B i g L ドメイン反復配列に主として反応する抗体を産生することを実証した。このことは、 B i g L ドメイン反復配列が感染時に認識される主要な抗原領域であることを示している。

【 0 0 3 6 】

本発明のポリペプチドに関して述べると、それらは D N A、 c D N A 又は R N A 配列 (及び相補的な核酸配列)、或いはそれらの機能的同等配列、すなわち B i g L 1、 B i g L 2 及び B i g L 3 と称するポリペプチドの全体又は一部をコードする配列から成るが、それらは多様性が原因で同一ではない。

20

【 0 0 3 7 】

本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドは、 B i g L 1、 B i g L 2 及び B i g L 3、並びにこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから成るが、さらにはそれらには機能的同等配列を有するポリペプチド及びポリヌクレオチドが含まれる。

【 0 0 3 8 】

本発明では、ポリヌクレオチドとポリペプチドの両者がそれらの生物活性を付与するのに必要な純度を有する天然、合成又は組換え起源のものであってよい。

30

【 0 0 3 9 】

本発明は、 B i g L 1、 B i g L 2 及び B i g L 3 をコードするポリヌクレオチドにもあてはまり、それらのポリヌクレオチドは b i g L ポリヌクレオチドの完全断片又は部分増幅 D N A 断片を得るための P C R 反応に使用される。その P C R 反応の目的は、試料中のレプトスピラの検出又は組換え B i g L ポリペプチドの発現である。本発明のポリヌクレオチドの増幅に使用されるイニシエーターの場合は、それらのイニシエーターは天然又は合成の 2 つ以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドでできたオリゴヌクレオチドである。

【 0 0 4 0 】

各イニシエーターは増幅の標的である配列鎖の隣接領域に実質的に類似するように好ましくは構築される。この意味で、考慮される利用又は応用に際して、同じ方法で対応するポリマーを同一にならずに製造できるならば、イニシエーターを機能的に同等と呼ぶことができる。

40

【 0 0 4 1 】

本発明のポリヌクレオチド配列は、組換えクローニングに使用されるプラスミド、ウイルス又は他の媒体のような発現ベクターにも挿入できる。この発現ベクターは、 B i g L 1、 B i g L 2 及び B i g L 3 又はそれらの機能的同等配列をコードする全体又は部分ヌクレオチド配列の挿入又は組み込みによって使用される。そのような発現ベクターは、そのベクターが挿入された宿主における遺伝子配列からの効率的な転写を可能にするプロモーター配列を含有する。そのような宿主は、酵母のような微生物又は昆虫及び哺乳動物を

50

含めた真核細胞又は原核細胞を含み得る。そのような発現ベクター構築物の使用方及び組換え配列の発現法は、適切にいうならば、専門技術者に十分公知である。

【0042】

本発明は、BigL1、BigL2及びBigL3又はそれらの機能的同等配列の完全ポリペプチド又は部分ポリペプチドと結合する抗体の製造法を提供する。そのような抗体はスピロヘータ感染一般の検討及び診断における、さらに具体的レプトスピラ症の診断法、及び治療であれ予防であれ治療法の開発における研究及手段及び診断手段として有用である。抗スピロヘータ治療の一部として、そのような抗体を単独、又はこれらの抗体及び薬剤として許容できる担体を使用する医薬組成物の一部として投与できる。

【0043】

本発明は、BigLポリペプチド又はこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの医薬組成物をワクチンとして使用することに関し、そのワクチンは、病原性スピロヘータの感染若しくは常在化に対する免疫防御応答を誘導する疾病予防用のワクチンとして、或いは病原性スピロヘータにまさしく感染した対象における疾患の臨床経過の持続若しくは重篤度の減少に、又は長期間病原性スピロヘータを保有し排泄するブタ、ウシ、ラット若しくはイヌのような病原性スピロヘータの保菌動物の保菌宿主状態の減少に、有益な影響をもたらす治療用ワクチンとしてのどちらかである。そのような組成物を、それぞれBigL1、BigL2及びBigL3に対する免疫原として有効量の抗体を用いて、又はレプトスピラ病原体から単離された1つ若しくは複数のBigL1、BigL2及びBigL3若しくは組換えBigLポリペプチド、又はその機能的同等配列を用いて、賦形剤及び添加剤又は佐剤中に調製できる。

【0044】

本発明の別の実施形態は、個体に病原性スピロヘータ、詳細にはレプトスピラ sp. に対する免疫応答を誘導するために使用される医薬組成物に関し、その医薬組成物は、薬剤として許容できる溶剤中に免疫有効量のBigL1、BigL2及びBigL3又はそれらの機能的同等配列を含む。我々は、「個体」としてヒト、げっ歯動物、ペット、実験動物並びに家畜を含めたあらゆる哺乳動物を呼称する。「免疫有効量」として個体にレプトスピラ若しくは他のいかなる病原性スピロヘータ又は細菌病原体に対する免疫応答を誘導するために必要なBigLポリペプチド抗原の量を呼称する。本発明はさらに以下の目的のキットを提供する。

1 - BigL1、BigL2及びBigL3ポリペプチドの、又はそれらの機能的同等配列の、1つを検出すること、

2 - BigL1、BigL2及びBigL3又はそれらの機能的同等配列をコードする核酸を検出すること、

3 - BigL1、BigL2及びBigL3のようなポリペプチド又はそれらの機能的同等配列に対する抗体を検出すること。

【0045】

BigLポリペプチドの検出に使用されるキットには、1つ又は複数の容器を含有する媒体を使用するキットが含まれ、その第1容器はBigL1、BigL2及びBigL3に対するか、又はそれらの機能的同等配列に対する連結試薬を含有する。

【0046】

BigLポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの検出に使用されるキットには、1つ又は複数の容器を含有する媒体を使用するキットが含まれ、その第1容器はBigL1、BigL2及びBigL3か、又はそれらの機能的同等配列とハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを含有する

【0047】

BigLポリペプチドに対する抗体の検出に有用なキットには、1つ又は複数の容器を含有する媒体を使用するキットが含まれ、その第1容器はBigL1、BigL2及びBigL3ポリペプチドか、又はそれらの機能的同等配列を含有する。

【0048】

10

20

30

40

50

さて、本発明を実施例を参照して記述するが、その実施例が本発明を制限するものとしてみなすべきではない。

【実施例1】

【0049】

例1A：細菌株、プラスミド及び培地

レプトスピラキルシュネリセロバールグリッポチフォーザRM52株(Leptospira kirschneri serovar grippotyphosa strain RM52)をブタの流産の誘発中に分離した(1983)。L.インテロガンセロバールコペンハーゲンFiocruz L1-130株(L.interrogans serovar copenhageni strain Fiocruz L1-130)をヒトレプトスピラ症患者の血流から分離した。L.キルシュネリセロバールグリッポチフォーザRM52株及び他のレプトスピラ株を国立レプトスピラ症参照センター(National Leptospirosis Reference Center)(米国農務省農業試験場国立動物疾病センター、[米国アイオワ州アムズ(Ames)所在])から入手した。レプトスピラ株をジョンソン-ハリスウシ血清アルブミン-Tween 80培地(Bovuminar PLM-5微生物培地、インタージェン(Intergen))で30で培養した(2)。RM52分離菌の少数回継代試料を液体窒素中で保存、又は多数回継代型を生み出すために液体培地で少なくとも200回継代した。多数回継代株ではいかなる用量でもハムスターを致死させることは無理で、 10^7 用量の腹腔内接種によってハムスターに感染させ得たのみであった。

【0050】

大腸菌(Escherichia coli)XL1-Blue MRF'(mcrA)183 mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proAB lacI^qZ M15 Tn10(Tetr)])(ストラタジーン(Stratagene)及び大腸菌PLK-F'(endA1 gyrA96 hsdR17 lac⁻ recA1 relA1 supE44 thi-1[F'lacI^qZ M15])をそれぞれ、ZapII(ストラタジーン(Stratagene))ベクター及びTriplex(クローンテック(Clontech))ベクターを感染させる際の宿主株として使用した。大腸菌SOLR(e14⁻[mcrA], [mcrCB-hsdSMR-mrr]171 sbcC recB recJ umuC::Tn5[Kan^r]uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1⁻, [F'proAB lacI^qZ M15]), Su⁻[non-suppressing])及び大腸菌BM25.8(supE44 thi lac-proAB[F'trad36 proAB⁺ lacI^qZ M15] imm434(kan^r)P1(cam^r)hsdR(r^{K12}-m^{K12}-))をそれぞれ、pBluescriptファージミド及びpTriplexファージミドのin vivoでの除去に使用した。BLR(DE3)pLysS[F'ompT hsdS_B(r_B-m_B-)gal dcm₋(sr1-recA)306::Tn10(TcR)(DE3)pLysS(CmR)](ノバジェン(Novagen))をpSET発現用ベクター(インビトロジェン(Invitrogen))の宿主株として使用した。大腸菌株を、適宜100µg/mlアンピシリン、100µg/mlカルベニシリン又は25µg/mlクロラムフェニコールを足したLBで培養した。抗生物質はシグマ(Sigma)から購入した。

【0051】

例1B：bigL遺伝子の単離及び特徴：

本実施例は、bigL遺伝子の同定及び単離について示す。イェルトン及びチャロン(Yelton and Charon)の方法に従って、毒性の少数回継代L.キルシュネリセロバールグリッポチフォーザRM52株からゲノムDNAを調製した(15)。ゲノムDNA用のキット(キアゲン(Qiagen))を使用して、L.インテロガンセロバールコペンハーゲンFiocruz L1-130株の臨床用分離株からゲノムDN

10

20

30

40

50

Aを調製した。精製DNAを得るためにQIAquick PCR精製キット(キアゲン(Qiagen))を使用した。ゲノムDNAをTsp509Iで部分分解し、付属の取扱説明書(クローンテック(Clontech))に従ってTriplexのアームに連結した。Gigapack II Gold Packaging Extract(ストラタジーン(Stratagene))を使用して、連結した分解ゲノムDNAを頭部に詰め込んだ。大腸菌XL1-Blueに感染させてライブラリーのファージ力価を決定した。

【0052】

ゲノムライブラリーのスクリーニングのために、約 10^3 pfuを大腸菌XL1-Blue上にまき、ニトロセルロース膜(シュレイシャー及びシュエル(Schleicher & Schuell))に写しとって、IPTGで感作させ、推奨通りに(シュレイシャー及びシュエル(Schleicher & Schuell))処理した。ニトロセルロースフィルターを5%スキムミルク(0.05% Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水(pH 7.8)(TBST)、又は0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)(PBST)に溶解)でブロックして、検査で確認されたレプトスピラ症の患者からプールした血清の希釈液(1:50)と共に1時間インキュベートした。1996年から1999年の間にブラジルの都市伝染病で同定された疾病の回復期の患者から血清を集めた。血清の使用に先立ち、大腸菌に対する抗体を取り除くために血清を大腸菌溶解物で予備吸着させた。膜をTBST又はPBSTで3回洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ウサギ抗ヒトイムノグロビン抗体又はアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトイムノグロビン抗体(1:1000希釈)(シグマ(Sigma))と1時間超インキュベートした。NBT(0.3mg/ml)及びBCIP(0.15mg/ml)を用いた検出、又はECL Western Blot Detection Reagent(アマシャム(Amersham))の後にHyperfilm(アマシャム(Amersham))に曝露させる現像を使用して抗原抗体複合体をもつプラークを同定した。

【0053】

各陽性プラークを1mlのSM(0.1M NaCl、8mM MgSO₄、50mM Tris-HCl pH 7.5; 0.01%ゼラチン、クロロホルム1、2滴)中で4で保存した。プールした血清に反応したプラーククローンをさらに2段階にわけて精製した。大腸菌SOLR株(ストラタジーン(Stratagene)又は大腸菌BM25.8株(クローンテック(Clontech))を供給元の説明通りにクローンに感染させることによって、バクテリオファージに挿入されたゲノムDNA断片を除去した。

【0054】

挿入配列の近傍に結合するベクター特異的プライマーを使用して、挿入配列の最初の500~700ヌクレオチドの配列を得た。131クローンのヌクレオチド配列を解析して、約90アミノ酸の長さの縦列反復配列をコードするとみられるDNA断片が挿入された13個のクローンを同定した。その後、それぞれの反復配列は、Pfam6.6(<http://pfam.wustl.edu/>)において細菌免疫グロブリン様(bacterial immunoglobulin-like)(Big)ドメインのBig2ファミリーに属すると同定された。

【0055】

推定アミノ酸配列に応じた完全長のタンパク質をコードする配列を同定するために、プライマー歩行法(primer walking)及び内側欠失配列(nested deletion)の配列決定を組み合わせて得た個々の配列からクローンのヌクレオチド配列を組み立てた。挿入配列の内部から挿入配列に隣接するマルチクローニング部位中に伸びる制限酵素切断断片を除去することによって、プラスミドクローンから欠失配列を複製した。ジブコビーアールエル(GIBCO BRL)又はオペロン(Operon)からオリゴヌクレオチドを合成、入手した。遺伝子の残存部及び隣接DNAを含む配列を得

るために逆PCR (iPCR)を行った。UCLA配列決定中核施設、エール/ケックDNA配列決定中核施設及びカリフォルニア大学バークレー校配列決定施設が配列決定反応を行った。

【0056】

2種類のL.キルシュネリのクローン及び4種類のL.インテロガンスのクローンが、細菌免疫グロブリン様レプトスピラタンパク質1、bigL1 (*bacterial immunoglobulin-like Leptospiral protein one*)と称する遺伝子をコードしていることが判明した。L.キルシュネリのbigL1の完全なヌクレオチド配列及びその遺伝子産物の推定アミノ酸配列を配列番号1及び配列番号2に示す。6種類のL.キルシュネリのクローンがbigL2と称する第2の遺伝子をコードしていることが判明した。L.キルシュネリのbigL2の完全なヌクレオチド配列を配列番号3に示す。L.キルシュネリのbigL2は偽遺伝子のようである。1011番目のヌクレオチドに余分なアデニンが挿入された結果、フレームシフト変異を起こし下流にTAG停止コドンがくる。しかしながらプールした患者の血清を用いた抗体スクリーニングによって、bigL2遺伝子産物をコードするDNA断片をもつクローンを同定することができた。恐らくは、クローン化された断片にフレームシフト変異がなく、患者の血清によって認識される遺伝子産物を発現可能にするような向きに断片が挿入されたためである。フレームシフト変異のないL.キルシュネリのbigL2遺伝子産物の推定アミノ酸配列を配列番号4に示す。L.インテロガンスの5番目のクローンは、bigL1に属すると当初考えられた数個のBig反復配列をコードすることが判明した。しかしながらL.インテロガンスのこの5番目のクローンがコードする上流側のDNAは、bigL1の上流側の配列と異なっていることが判明した。bigL1遺伝子に隣接する領域の配列決定によって、L.インテロガンスのこの5番目のクローンは、bigL1の下流側に位置しbigL3と称する3番目の遺伝子に対応することが明らかになった(図2)。bigL3の完全なヌクレオチド配列はL.キルシュネリDNAから得られた。それを配列番号5に示し、L.キルシュネリのbigL3遺伝子産物の推定アミノ酸配列を配列番号6に示す。

10

20

【0057】

3種類のbigL遺伝子はいずれも、以前に定義されているようなスピロヘータ性リポボックスに大きく一致するシグナルペプチド及び推定シグナルペプチダーゼ切断部位をコードしている(ハーケディーエー(Haake, D. A., 2000年, *Spirochetal lipoproteins and pathogenesis*, *Microbiology*, 146: 1491-1504)。既知のスピロヘータ性リポタンパク質の配列間の比較は、スピロヘータ性リポボックスが大腸菌のリポボックスよりもはるかに緩やかに規定されていることを示す。例えば、大腸菌のリポタンパク質の多くはCysからみて-3位置にLeuをもつものに対し、スピロヘータ性リポタンパク質はこの位置にVal、Phe及びIleを含むいくつかのその他の疎水性アミノ酸をもつこともできる。システインの後に続くアミノ酸の部位特異的変異誘発を含む大腸菌の実験は、酸性残基が細胞膜へのリポタンパク質の局在化を引き起こすことを示す。レプトスピラのリポタンパク質の配列解析は、類似の局在化シグナルがこれらの細菌にも存在することを示す。例えば、LipL31は、システインの後に続く始めの2つのアミノ酸中に反対電荷なしに負電荷をもつ唯一のリポタンパク質であり、細胞膜にだけ局在化される唯一のリポタンパク質でもある。外膜リポタンパク質LipL32及びLipL41と同様に、BigLタンパク質も、+2及び+3位置に非荷電性アミノ酸をもつ。このことは、BigLタンパク質が外膜に局在化される可能性があることを示す。

30

40

【0058】

シグナルペプチドに引き続いて、この3種類のタンパク質はいずれも長さ約90アミノ酸の一連の縦列反復配列を含むものと思われる。成熟したBigL1タンパク質はほぼ全体として13個の反復配列から構成されるかもしれないが、対照的にBigL2及びBigL3は大きなカルボキシ末端ドメインを後ろにもつ12個の反復配列を含むかもしれな

50

い。これらの3種類のタンパク質にみられる31個の独自の反復配列の間には非常に多くの配列上のばらつきがあるが、これらの反復配列はいずれもPfamデータベースによって細菌免疫グロブリン様Bigタンパク質ファミリー(E-valueは $4 \times e^{-30}$ 程度)と同定された。

【0059】

L. インテロガンスのbigL1、bigL2及びbigL3並びにL. キルシュネリのbigL1、bigL2及びbigL3は関連性が高く、DNA配列及びアミノ酸配列において90%より高い相同性をもつ。どちらの種にも、bigL1及びbigL3の5'末端を含んでDNA配列の同一な領域がある(図2)。配列の同一な領域は、両遺伝子内の最初のATG開始コドンから1890bpの位置まで伸びる。bigL1とbigL3の間で同一のDNA配列をもつ広い領域は、BigL1の最初の630アミノ酸(1~630番目)(配列番号2)及びBigL3の最初の630アミノ酸(1~630番目)(配列番号6)の同一アミノ酸配列という結果になる。この同一な領域は最初の6個のBigLドメイン反復配列に対応する。

10

【実施例2】

【0060】

例2A: bigL遺伝子の特性決定及びbigLのDNA及びRNAの検出

本実施例は、レプトスピラ種間のbigL遺伝子の多重コピー分布並びに試料中のbigLのDNA及びRNAの検出方法について示す。

【0061】

サザンプロット解析

L. インテロガンスFiocruzL1-130株、L. キルシュネリRM52株及びL. ビフレキシ(L. biflexi)PatocI株のゲノムDNA中のbigL遺伝子の多重コピーを同定するためにサザンプロット解析を行った。DNA制限酵素及び修飾酵素をニューイングランドバイオラボ(New England Biolabs)から購入した。Blood and Cell Cultureキット(キアゲン(Qiagen)、[米国カリフォルニア州バレンシア(Valencia)所在])を使用したレプトスピラ細胞の7日間培養物500mlからゲノムDNAを抽出した。約3µgのDNAを5~20ユニットのNsiIで一晩、最終液量50µlで分解した。その後、DNAをフェノール:クロロホルム:イソアミルで精製し、冷100%エタノール及び3M酢酸ナトリウムpHで沈殿させ、70%エタノールで洗浄した。次に、精製したDNAを5~20ユニットのPacIで一晩、最終液量25µlで再分解した。二重分解したDNAを0.8%アガロースゲルで一晩、20Vで分離した。その後、ゲルを変性バッファー(1.5M NaCl、0.5N NaOH)に30分ずつ2回、中和バッファー(1M Tris(pH7.4)、1.5M NaCl)に30分ずつ2回浸した。サザンの記述した方法に従って、ゲノムDNAを正荷電したナイロン膜(ロッシュモルキュラーバイオケミカルズ(Roche Molecular Biochemicals)、[米国インディアナ州インディアナポリス(Indianapolis)所在])に転移した。

20

30

【0062】

PCR Digプローブ合成キット(ロッシュ(Roche)、[独国マンハイム(Mannheim)所在])を使用してプローブを合成した。製造会社の指示に従って、50µlの最終液量で反応を行った。増幅の温度サイクルは、94で5分、94で30秒、57で30秒、72で1分を計35回、最後に延長時間7分であった。プローブの配列は以下の通りである。bigL反復ドメインをコードするbigL DNA断片を増幅するために、bigL3の反復ドメイン4~6をコードする領域に対応したbigL3のDNA配列を選択した。

40

【化1】

BigL3_395 gat-ttt-aaa-gtt-aca-caa-gc 及び BigL3_573 aaa-ccg-gac-tac-tta-cct-ttc-c;

50

各々の *bigL* 遺伝子に特異的な *bigL* DNA 断片を増幅するために、*BigL* 遺伝子産物の C 末端領域をコードする配列を選択した。

【化 2】

BigL1.2078p, *tta-cgg-cta-cag-gta-ttt-tta-cg* 及び
BigL1.2691p *att-gga-aga-ttt-cca-agt-aac-c*, *BigL2.5121p*
tat-cta-cgc-tgc-aaa-tgg 及び *BigL2.5865p* *ttg-ttg-gcg-ata-cgt-*
ccg, *BigL3.5071p* *cat-aac-tct-cct-cat-aac-a* 及び *BigL3.5548p*
tat-gta-gag-ata-aga-tcc.

10

【0063】

UV 架橋膜を 42 で 1 時間、*Dig Easy* ハイブリダイゼーション溶液 (ロッシュ (Roche)) 中で予備ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションに先立ち、*Dig* 標識したプローブを 10 分間煮沸し、即座に氷に移して 5 分間置いた。変性したプローブをハイブリダイゼーション溶液と混合し、膜を 42 で一晩それに浸した。ハイブリダイゼーションに引き続き、膜を 2 × SSC (NaCl、クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した (室温)。次いで膜を 0.1 SSC、0.1% SDS で 30 分間ずつ 2 回洗浄した (42)。化学発光産物を検出するために、膜を *Biomax ML* フィルム (イーストマンコダック (Eastman Kodak)、[米国ニューヨーク州ロチェスター (Rochester) 所在]) に 1 ~ 3 分間曝露した。

20

【0064】

図 1 A 及び B はサザンプロットの結果を示す。*BigL* 反復配列をコードする DNA 配列に対応したプローブは、*L. キルシュネリ* 及び *インテロガンス* の複数の DNA 断片にハイブリダイズした (図 1 A)。対照的に、非病原性の *L. ビフレキシ* の分解ゲノム DNA へのハイブリダイゼーションはみられなかった。*L. インテロガンス* の *bigL* 遺伝子産物の各々に特異的な C 末端領域をコードする配列に基づいたプローブは、分解した *L. インテロガンス* のゲノム DNA の独自の断片の 1 つにハイブリダイズした。それ故に、このことは実施例 1 で同定した 3 種類の *bigL* 遺伝子の各々のコピーが 1 つずつ存在することを確認する (図 1 B)。これらの結果は、非病原性の *レプトスピラ* には見られない DNA 断片の検出に基づいて、病原性の *レプトスピラ* を特異的に同定する方法を示している。

30

【0065】

例 2 B : *レプトスピラ* ゲノム DNA の *bigL* 遺伝子配列の PCR 検出

本実施例は、病原性の *レプトスピラ* の *bigL* 遺伝子の分布について示す。他の *レプトスピラ* 種において *bigL* 遺伝子を検出するために、実施例 1 で同定された *L. キルシュネリ* RM 52 株及び *L. インテロガンス* *Fiocruz L1-130* 株の *bigL* 遺伝子の配列に基づいて縮重 (degenerate) プライマーを設計した。*BigL-1 up* と称する「上流」プライマーの配列は、5' - (GC) AAAGTTG (TC) (AG) (TC) G (TG) CTTGGCC - 3' で、*bigL1* の 46 ~ 65 番目 (開始コドンの A からみて) (配列番号 1) 及び *bigL3* の 46 ~ 65 番目 (開始コドンの A からみて) (配列番号 5) に対応する。*BigL-2 dn* と称する「下流」プライマーの配列は、5' - (GC) (AT) ACC (AG) TC (CT) GAAAA (AG) AT (AT) CC - 3' で、*bigL1* の 506 ~ 487 番目 (開始コドンの A からみて) (配列番号 1) 及び *bigL3* の 506 ~ 487 番目 (開始コドンの A からみて) (配列番号 5) に対応する。各々のプライマーの長さは 20 ヌクレオチドである。これらのプライマーが *bigL2* の 97 ~ 116 番目及び 590 ~ 571 番目 (*bigL2* の開始コドンの A からみて) にアニーリングするように設計した (配列番号 3)。

40

【0066】

レプトスピラ の多数回継代株及び少数回継代株から精製したゲノム DNA を使用して PCR 反応を行った。図 3 では、評価済みの 4 種類の病原性種すべての菌株のゲノム DNA

50

を使用したPCR反応で、増幅したDNA断片を同定した。断片はbigL1/bigL3配列(461bp)及びbigL2配列(494bp)に基づいて推定される電気泳動の移動度を示した。評価済みの2種類の非病原性レプトスピラ種においては、増幅したDNA断片は同定されなかった。それ故に、本実施例は試料中の病原性レプトスピラDNAを特異的に同定するこのPCR法の適用について示す。

【0067】

例2C:レプトスピラbigL RNAの逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)による検出

本実施例は、試料中のbigL RNAの検出について示す。L.キルシュネリ(L. kirschneri) RM52株を指数増殖後期まで培養し、熱フェノール法を使用して 1×10^{10} 個のレプトスピラ細胞から全RNAを抽出し、エタノール沈殿させた後に水に再懸濁した(参照)。~2gのレプトスピラRNAを、70 μ lのDNase Iバッファー(アンピオン社(Ambion)の1xRNA secure中に10mM Tris-HCl pH7.5、25mM MgCl₂、1mM CaCl₂)中で6単位のDNase I(アンピオン(Ambion))を使用して37 $^{\circ}$ Cで3分間分解した。DNase Iを失活させるために、1.75 μ lの25mM EDTAを添加して反応を止め、70 $^{\circ}$ Cで5分間加熱処理して酵素を失活させた。記載の通りに(キアゲン(Qiagen))、~200ngのレプトスピラRNA及びOmniscrypt RTを使用してRT-PCRを行った。逆転写酵素反応を行うために以下のプライマーを使用した。

【化3】

bigL1, 5'-CGCAGAAATTTTAGAGGAACCTACAG-3'
bigL2, 5'-TTTGACTCCAAGACGCAGAGGATGAT-3'
bigL3, 5'-ATTTTCAAGATTTGTTCTCCAGATTT-3';
lipL45, 5'-ATTACTTCTTGAACATCTGCTTGAT-3'.

【0068】

Taqポリメラーゼ(キアゲン(Qiagen))を使用したDNA PCRをRT反応液で行った。PCRに先立ち、以下のプライマーをRT反応液に添加した。

【化4】

bigL1, 5'-CTGCTACGCTTGTTGACATAGAAGTA-3'
bigL2, 5'-TAGAACCAACACGAAATGGCACACA-3'
bigL3, 5'-ATCCGAAGTGGCATAACTCTCCTCAT-3'
lipL45, 5'-TGAAAAGAACATTACCAGCGTTGTA-3'.

【0069】

逆転写のために添加したプライマーにより、500bp、479bp、440bp及び438bpのPCR産物が予想される。PCRを行うために反応混合物をTechno Progeneサーモサイクラー中に入れた。最初の95 $^{\circ}$ C 1分の変性ステップに引き続いて、95 $^{\circ}$ C 30秒の変性、53 $^{\circ}$ C 30秒のアニーリング及び72 $^{\circ}$ C 30秒の伸長を30回行った。そして最後に、72 $^{\circ}$ Cで30秒間インキュベーションした。

【0070】

図4の結果は、RT-PCR法がBigL3転写物及び対照のlipL46転写物を検出できることを示す。BigL1転写物及びBigL2転写物は同定されなかった。このことは、BigL3はレプトスピラで発現しているが、BigL1及びBigL2は発現していないかもしれないことを示す。さらにまたこれらの結果は、試料中の特異的なBigL遺伝子転写物を同定するためのRT-PCR法の適用を示す。

【実施例3】

【0071】

組換えBigLタンパク質の発現及び精製

10

20

30

40

50

本実施例は、組換えBigLポリペプチドを発現させ、精製するための、bigL遺伝子のDNA配列の使用について示す。L・インテロガンズBigL3の2領域の発現に使用するために2対のオリゴヌクレオチドを設計した。第1の領域は、L・キルシュネリのBigL3内部の2～6番目までの反復ドメインに対応する領域で、BigL3 DNA配列の131～649番目（配列番号6）に対応した。実施例1で同定したL・インテロガンズBigL3クローンの配列に基づいてオリゴヌクレオチドを設計した。その配列は以下の通りである。

【化5】

45B-1 5'-ATGGGACTCGAGATTACCGTTACACCAGCCATT-3'
45B-2 5'-ATTCCATGGTTATCCTGGAGTGAGTGTATTTGT-3'

10

【0072】

オリゴヌクレオチド45B-1及び45B-2並びに精製したL・インテロガンズのゲノムDNAを使用してPCR増幅を行い、DNA断片を得た。これらの断片をXhoI及びNcoI酵素（ニューバイオラボ（New Biolabs））で分解し、pRSETA発現ベクター（インビトロジェン（Invitrogen））に連結した（16）。ベクターに特異的なプライマー及びプライマー歩行法を使用してクローン化産物の配列を決定した。1557bp産物の配列を配列番号7に示す。BigL3領域1と称する519アミノ酸からなるポリペプチドの推定配列を配列番号8に示す。

【0073】

L・インテロガンズBigL3のC末端領域の最後の200アミノ酸を含む第2の領域を、発現させるために選択した。この領域は、L・キルシュネリBigL3の1687～1886番目（配列番号6）までのアミノ酸に対応した。この領域をクローン化するために使用したオリゴヌクレオチドは、

20

【化6】

BIGLCTERM1 5' aac-ctc-gag-cat-aac-tct-cct-cat-aac 3'
BIGLCTERM2 5' ttc-gaa-ttc-tta-ttg-att-ctg-ttg-tct-g 3'

【0074】

オリゴヌクレオチドBIGLCTERM1及びBIGLCTERM2、並びに精製したL・インテロガンズのゲノムDNAを使用してPCR増幅を行い、DNA断片を得た。これらの断片をXhoI及びEcoRI酵素（ニューバイオラボ（New Biolabs））で分解し、pRSETA発現ベクター（インビトロジェン（Invitrogen））に連結した（16）。ベクターに特異的なプライマー及びプライマー歩行法を使用してクローン化産物の配列を決定した。600bp産物のヌクレオチド配列を配列番号9に示す。BigL3領域2と称する200アミノ酸からなるポリペプチドの推定配列を配列番号10に示す。

30

【0075】

組換えタンパク質rBigL領域1及び2をBL21（DE3）pLysogen（インビトロジェン（Invitrogen））中に発現させた。His6融合タンパク質を発現させるために、レプトスピラDNA断片をコードするpRSETプラスミドで形質転換した大腸菌BLR（DE3）pLysS（ノバジェン（Novagen））の対数増殖期培養物に、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド（IPTG：最終濃度2mM、ライフテクノロジーズ（Life Technologies））を添加した。培養菌のペレットを可溶化するために6Mのグアニジン塩酸を使用し、His6融合タンパク質をNi²⁺-ニトリロ三酢酸-アガロース（キアゲン（Qiagen））及びファルマシア（Pharmacia））を使用したアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。溶出したHis6融合タンパク質の純度を、ゲル電気泳動及びクーマシーブリアントブルーの染色によって評価した。タンパク質を透析（PBS、10%（v/v）グリセロール、0.025%（w/v）アジ化ナトリウム）した。透析後、タンパク質濃度をピ

40

50

シンコニン酸で決定した(42)。精製したBigL3領域1を写しとった後のPonceau-S(シグマケム社(Sigma Chem Co))染色ニトロセルロース膜を図7に示す。精製したBigL3の相対移動度は、組換えタンパク質の推定アミノ酸配列に基づいて計算される推定分子量約58kDにほぼ等しかった。

【実施例4】

【0076】

例4A：組換えBigLタンパク質に対する抗体の検出

本実施例は、対象試料中の抗体を検出するためにBigLポリペプチドを使用する方法のうち2つの方法を示す。さらにまた、本実施例は、感染の疑いのある被験者の感染を同定するための血清診断キット法を提供する。

10

【0077】

感染被験者の試料中のBigLポリペプチドに対する抗体の免疫ブロット検出

非連続性のバッファー系を使用して、精製した組換えBigL3領域2のポリペプチド(1µg/レーン)(実施例3)をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE、12%)にかけて、前述通りにニトロセルロース膜(オスモミックス(Osmomics))に写しとった(17)。ニトロセルロースフィルターを5%のスィムミルクを含むTBSTでブロッキングし、検査で確認されたレプトスピラ症の患者、捕獲ラット(*Rattus norvegicus*)(尿及び腎臓の培養物が病原性のレプトスピラ陽性を示すレプトスピラの保菌宿主)並びに実験用ラット及びウサギ(L.インテロガンセロパルコペンハーゲニFiocruz L1-130株の全溶解物で免疫)からプールした血清と共に1時間余りインキュベートした。対照実験として、ブラジル国内の健常者、捕獲ラット(培養物用又は血清にレプトスピラ感染の証拠がないもの)並びに実験用ラット及びウサギ(免疫前のもの)からの血清と共にインキュベーションを行った。使用に先立ち、血清を1:100に希釈した。洗浄後、1:1000に希釈したアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト鎖抗体(シグマ(Sigma))と共に膜を1時間余りインキュベートした。抗原抗体複合体をNBT(0.3mg/ml)及びBCIP(0.15mg/ml)を用いた発色反応で検出した。レプトスピラ症患者及び病原性レプトスピラに感染した捕獲ラットからプールした血清は、精製した組換えBigL3領域1タンパク質を強く認識した。しかしながら、レプトスピラ全溶解物で免疫したラットは目で確認できるほどにはBigL3ポリペプチドに結合しなかった。このことは、BigL3は培養したレプトスピラには発現しているが(実施例2、図4)、bigL3遺伝子の発現量が異なっているかもしれないことを示す。in vitroでは十分な量の天然BigL3タンパク質が存在していないかもしれないのに対し、自然感染の間に、in vivoのレプトスピラは、強い免疫反応を引き起こすのに十分な量のBigL3を生成する。さらにまた、本実施例は、ある範囲の動物が感染時及び免疫反応の検出時においてBigL3に対する免疫反応を示すこと、並びに被験者の感染を同定する方法として組換えBigL3ポリペプチドに対する抗体の検出が使用可能であることを示す。

20

30

【0078】

組換えBigL3ポリペプチドに対する抗体の検出方法の使用についてより詳しく例示するために、検査で確認されたレプトスピラ症の患者、ブラジル国内及び米国内の健常者、レプトスピラ症以外と診断された入院患者又は外来診療所の患者からの血清を用いて免疫ブロット評価を行った。臨床的に疾病の疑われる患者においてレプトスピラ症の診断を確認するために、微量凝集反応試験及び培養菌分離を使用した(5)。レプトスピラ症患者から集めた血清は、ブラジルのサルバドル市でのレプトスピラ症に関する5年間の調査で集められたものである。対照の個人から集めた血清は、入院患者及び外来診療所患者に対する既存の血清銀行並びにブラジルのサルバドル市の健常者から、また米国の疾病対策予防センター(Center for Disease Control and Prevention)を通じて入手した。表1に使用した血清の一覧を示す。1:100に希釈した血清を上述の方法に従って分析した。免疫ブロットでは、目で確認できる程度の組換えBigL3領域1ポリペプチド1µgのバンドの発色を陽性反応とみなした。

40

50

【0079】

図8は、個々のレプトスピラ症患者からの血清が組換えBigL3に反応することを示す。レプトスピラ症の入院患者の90%以上及びレプトスピラ症の外来患者の約70%が、活発な感染時にrBigL3に反応することを示した結果を表1に要約する。レプトスピラ症患者のすべて(100%)が、疾病の回復期においてrBigL3に反応する。表2は、rBigL3に対する血清反応性を標準的な診断学的検査と比較している。rBigL3の血清反応性は、疾病の初期段階においては標準的な診断試験で観察されたものより大きかった。米国内の健常者及びブラジル国内の健常者の88%はrBigL3に反応しなかった。このことは、rBigL3に対するこの反応が特異的であることを示す。ブラジルの健常者間のIgM血清反応性の頻度に基づいて計算した場合、反応の特異性は100%まで増加する。以上をまとめると、これらの結果は、この方法が活発な感染の血清学的マーカーとして使用できること及びレプトスピラ症の診断に使用できるキットの基礎となることを示す。

10

【0080】

レプトスピラ症の危険性が高い伝染病地域におけるrBigL3の血清反応性についての調査結果を表1に要約する。これらの地域に住む人口の25%はrBigL3 IgG血清反応性を示す。このことは、この反応が過去の感染を同定する有用なマーカーとなり得ることを示す。レプトスピラ症と確認された患者のうち56%が、レプトスピラ症感染後の2年の間にrBigL3に対する血清反応を示した(表2)。レプトスピラ症感染後2~4年の間に、18%がrBigL3に対する血清反応性を示した。以上をまとめると、これらの結果は、免疫プロット法を基礎としたキットが過去のレプトスピラ症感染を検出できることを示す。

20

【0081】

例4B：感染被験者の試料中のBigLポリペプチドに対する抗体のELISA基準検出

本実施例は、BigLポリペプチドに対する抗体を検出する際、及び感染の疑いをもたれる人々の中でレプトスピラ症の患者を同定する際にELISA法が有用であることを示す。0.05M炭酸ナトリウム(pH9.6)中に懸濁したHis₆融合rBigL3(0.5~100ng/well)で平底のポリスチレンマイクロタイタープレート(コーニング(Corning))を4で一晚コートする(16)。プレートを蒸留水で2回洗浄し、PBS、0.05%(v/v)Tween20(PBST)で3回洗浄した。プレートをブロッキング溶液(PBST/1%[w/v]ウシ血清アルブミン)で2時間、室温でインキュベートし、PBSTで4回洗浄後、-20で使用時まで保存した。ブロッキング溶液で5~200倍に希釈した50µlの血清をウェルに加えて、室温で1時間振盪した。PBSTで4回洗浄後、5000~20000倍に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ヒトµ又は鎖ヤギ抗体(シグマ(Sigma))をウェルに加えて、室温で1時間振盪した。その後、プレートをPBSTで2回、PBSで3回洗浄し、1ウェルにつき50µlずつの0.01%(w/v)3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(基質バッファー中(0.03%[v/v]過酸化水素、25mMクエン酸、50mM Na₂HPO₄、pH5.0)に)でインキュベートした(20分間、暗状態、室温)。25µlの2N H₂SO₄を添加して発色反応を止め、Emaxマイクロプレートリーダー(モルキュラーデバイス(Molecular Devices))、[米国カリフォルニア州サニーバール(Sunnyvale)所在]で450nmの吸収を測定した。

30

40

【0082】

検査で確認されたレプトスピラ症ケース(n=4)からの血清試料のELISA反応とブラジル国内のレプトスピラ症感染地域の健常者(n=4)からの血清試料のELISA反応を区別するのに最適の抗原濃度(µg/well)を決定するために、最初のアッセイを行った。50、100、200倍といった血清希釈及び1ウェルにつき25、50、100、200ngの抗原濃度でチェッカーボード滴定を行った。図6は、対照の個人よりもレプトスピラ症患者の場合において、血清希釈及びrBigL3ポリペプチドの濃度

50

のすべてで吸収値の大幅な増大を観察したことを示す。

【0083】

感受性及び特異性を決定するその後のアッセイでは、プレートに50 ngのrBigL3でコートした。50倍希釈の一次血清及び10,000倍希釈の2次抗体結合体でプレートをインキュベートした。分析のために個々の血清試料を2組ずつ調べて、それらの平均をとった。測定値が10%以上異なる組はもう一度調べ直した。すべての組換え抗原に陽性反応を示す対照血清試料の1つ及び陰性反応を示す対照血清試料の1つを品質管理手段としてそれぞれ2組ずつ各プレートに含めた。図7は、疾病の急性期にあるレプトスピラ症患者が対照の個人よりもIgM及びIgG血清反応性に対してはるかに大きい吸収を示すことを示す(図7)。疾病の回復期にある患者の吸収値を比較した場合、その違いは

10

【実施例5】

【0084】

被験者におけるレプトスピラ症免疫反応の誘発

本実施例は、組換えBigLタンパク質の免疫を介してBigLタンパク質に対する免疫反応を誘発できることを示す。実施例3に記述した方法で精製した組換えBigL3ポリペプチド(L.インテロガンズ由来)を得た。実験室のラット(ウイスター系)をフロイントアジュバント(シグマ(Sigma))に懸濁した40 µgのrBigL3で免疫し、皮下に接種した。3週目及び6週目に20 µgのrBigL3で追加免疫を行った。最初の免疫から7週間後に血液を集めて、血清用に処理した。実施例4に従って、rBigL3(1 µg/レーン)を用いた免疫プロットを準備した。図9は、rBigL3で免疫したラットの血清反応性を示す。rBigL3は、計3回の免疫で1:2500超の力価をもつrBigL3血清反応性免疫プロットを誘導するほど効果的な抗原であった。さらにまた、rBigL3ポリペプチドに対する抗体は、レプトスピラ全溶解物(1レーンにつき10⁸のレプトスピラ)中において天然の抗原を認識した(図9)。免疫プロットでは、200 kDの相対移動度をもつバンドがわずかに染色されたが、それより小さな相対移動度をもつバンドがより強く染色される。このことは、200 kD以上の分子量のBigLタンパク質が分解を受けていることを表しているかもしれない。免疫前の血清では

20

30

【0085】

精製した組換えBigLポリペプチド(L.キルシュネリ由来)を用いて免疫原性実験を行った。精製した組換えタンパク質を12%調製用SDS-PAGEゲルにのせ、電気泳動によって分離ゲルへ移動させた。100~200 µgの組換えタンパク質を含むバンドをゲルから除去して乾燥させ粉末にして1 mlの水に懸濁し、1 mlのフロイント完全アジュバント(シグマ(Sigma))と混ぜて、レプトスピラ抗体をもたないニュージランド白ウサギ(ハーランスピラードーリー)の皮下及び筋肉内に接種した。最初の免疫の4週間後及び8週間後に、フロイント不完全アジュバント(シグマ(Sigma))と混合させた粉末アクリルアミドゲル中の等量の融合タンパク質で追加免疫を行った。最初の免疫から10週間後にウサギから血液を集めて、血清用に処理した(ハーロー(Harlow, 1988))。1レーンにつき108個のレプトスピラ濃度で、以前に記述されている方法で(Guerreiro et al) Infect Immun 2001)免疫プロットを行った。

40

【0086】

図10は、L.キルシュネリ由来のrBigL3を用いた免疫が、L.キルシュネリの天然rBigL3ポリペプチド及びL.インテロガンズといった他の病原性レプトスピラ種の天然rBigL3ポリペプチドに対して高い抗体力価を誘発することを示す。以上をまとめると、これらの結果は、rBigLポリペプチドを用いた免疫が、組換えrBigLポリペプチドの設計に使用した種以外の病原性スピロヘータ種に対する免疫反応を誘発

50

することを示す。さらにまた、この免疫方法で産生した抗体は試料中の病原性スピロヘータの検出に使用できる。

【0087】

最後に本実施例は、天然 Big L ポリペプチドの存在が毒性の少数回培養継代株には観察されるが、無毒性の弱毒化多数回培養継代株には観察されないことを示す(図10)。r Big L 3で免疫したウサギの血清は、毒性株のレプトスピラ全溶解物において Big L 3に対応する予想通りの200kDaを認識したが、無毒性の弱毒化株のものにおいては認識しなかった。本実施例は、Big L タンパク質が毒性に対するマーカーとなること、及び Big L タンパク質に対する抗体を毒性株の同定方法として使用できることを示す。Big L はそれ自体、毒性因子であり得るので、本実施例に示されるような Big L タンパク質に対する免疫応答の誘発はワクチンとしての適用に有用であろう。

10

【0088】

表1. ウェスタンブロット法で測定されたレプトスピラ症患者群及び対照群の血清におけるrBigL及びrLipL32に対するIgG抗体及びIgM抗体の検出

試験群	rBigL3に対する血清反応性		rLipL32に対する血清反応性		陽性反応数 (%)		
	IgM	IgG	IgM or IgG	IgG			
レプトスピラ症が確定した入院症例							
急性期	52	37 (71)	46 (88)	48 (92)	22 (42)	21 (50)	38 (73)
回復期	52	19 (37)	52 (100)	52 (100)	21 (40)	45 (86)	46 (88)
レプトスピラ症が確定した外来症例							
急性期	14	6 (42)	8 (57)	9 (64)	2 (14)	2 (14)	3 (21)
回復期	14	7 (50)	14 (100)	14 (100)	6 (42)	5 (36)	8 (57)
健康個体対照群							
非流行地域 (米国)	30	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
流行地域 (ブラジル)	40	0 (0)	5 (12)	5 (12)	2 (6)	0 (0)	2 (6)
高リスク流行地域 (ブラジル)	40	0 (0)	10 (25)	10 (25)	4 (10)	5 (12)	8 (20)
患者対照群							
デング熱	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ライム病	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VDR陽性	20	0 (0)	1 (5)	1 (5)	0 (0)	1 (5)	1 (5)

【 表 2 】

表2. レプトスピラ症に対するrBigL3及びrLipL32に基づくウエスタンブロットと標準診断テストとの比較。

発病後の 期間	試料数	標準診断テストによる評価	ウエスタンブロットでの rBigLに対する血清反応性		ウエスタンブロットでの rLipL32に対する血清反応性						
			IgM	IgM又は IgG	IgM	IgM又は IgG					
急性期 (N = 52) ^a											
2～6日	21	MAT力価の逆数 における最大値の 中央値 (範囲) □ 100	200 (0-1600)	12 (57)	11 (52)	12 (57)	16 (76)	17 (81)	8 (38)	8 (38)	12 (57)
7～15日	31		400 (0-3200)	17 (55)	20 (91)	25 (81)	30 (97)	31 (100)	14 (45)	23 (74)	26 (84)
回復初期 (N = 52)											
16～21日	21		800 (200-12800)	21 (100)	15 (100)	7 (33)	21 (100)	21 (100)	8 (38)	18 (86)	19 (90)
21～30日	31		1600 (0-6400)	31 (100)	21 (100)	12 (39)	31 (100)	31 (100)	13 (42)	27 (87)	27 (87)
回復後期 (N = 59)											
0～23ヶ月	25		400 (0-800)	21 (84)	24 (96)	0 (0)	14 (56)	14 (56)	2 (8)	2 (8)	3 (12)
24～47ヶ月	17		400 (100-1600)	17 (100)	7 (41)	0 (0)	3 (18)	3 (18)	2 (12)	2 (12)	3 (18)
48～78ヶ月	17		200 (0-800)	15 (88)	5 (29)	0 (0)	3 (18)	3 (18)	2 (12)	1 (6)	3 (18)

^a 急性期の血清試料は入院時に採取した。

【 0 0 9 0 】

種々の修正及び変更を本発明の化合物及び方法に加え得ることは当業者には明らかであ

ろう。したがって、付帯する請求項及びそれらの同等物の範囲内に入る限り、本発明はそのような修正及び変更を包含することを意図する。よって、本発明は添付の請求の範囲によってのみ制限される。

【 0 0 9 1 】

参考文献

1. **Levett PN.** Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):296-326.
2. **Faine SB, Adler B, Bolin C, Perolat P.** *Leptospira and leptospirosis.* 2nd ed Melbourne, Australia: MediSci; 1999. 10
3. **Farr RW.** Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 1995;21(1):1-6; quiz 7-8.
4. **Lomar AV, Diamant D, Torres JR.** Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14(1):23-39, vii-viii.
5. **Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr., Riley LW.** Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet.* 1999;354(9181):820-5.
6. **Bughio NI, Lin M, Surujballi OP.** Use of recombinant flagellin protein as a tracer antigen in a fluorescence polarization assay for diagnosis of leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(4):599-605. 20
7. **Park SH, Ann BY, Kim MJ.** Expression and immunologic characterization of recombinant heat shock protein 58 of *Leptospira* species: a major target antigen of the humoral immune response. *DNA Cell Biol.* 1999;18(12):903-10.
8. **Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN, Lovett MA.** Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun.* 1991;59(3):1131-40.
9. **Haake DA, Champion CI, Martinich C, et al.** Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol.* 1993;175(13):4225-34. 30
10. **Haake DA, Martinich C, Summers TA, et al.** Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun.* 1998;66(4):1579-87.
11. **Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, et al.** Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun.* 1999;67(12):6572-82. 40
12. **Haake DA, Chao G, Zuerner RL, et al.** The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000;68(4):2276-85.
13. **Shang ES, Exner MM, Summers TA, et al.** The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun.* 1995;63(8):3174-81.

【 0 0 9 2 】

14. **Shang ES, Summers TA, Haake DA.** Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun.* 1996;64(6):2322-30.
15. **Yelton DB, Charon NW.** Cloning of a gene required for tryptophan biosynthesis from *Leptospira biflexa* serovar patoc into *Escherichia coli*. *Gene.* 1984;28(2):147-52.
16. **Flannery B, Costa D, Carvalho FP, et al.** Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001;39(9):3303-3310.
17. **Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al.** Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001;69(8):4958-68.

10

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】レプトスピラにおける big L 遺伝子配列のサザンプロット分析を示す図である。L. インテロガンズ *Fiocruz* L1-130 株 (レーン1)、L. キルシュネリ *Rm52* 株 (レーン2) 及び L. ビフレキシ (*L. biflexi*) *Patoc I* 株 (レーン3) から得たゲノム DNA (3 mcg /レーン) を *Nsi I* で分解しアガロースゲル電気泳動にかけた。ニトロセルロース膜に写しとった後、これらの遺伝子にそれぞれ特有である Big L 反復ドメイン (Big L3 の第4ないし第6反復ドメイン、図1A)、及び big L1、big L2 及び big L3 の C 末端領域 (図1B) をコードする DNA 断片をプローブとしてプロットを分析した。

20

【図2】L. キルシュネリにおいて Big L1 及び Big L3 タンパク質をコードする領域のゲノム編成を示す概略図である。Big L1 タンパク質はシグナルペプチド (斜線長方形) とアミノ酸 90 個の細菌免疫グロブリン様ドメイン 13 個 (黒長方形) を含む。Big L3 タンパク質はシグナルペプチド、アミノ酸 90 個の細菌免疫グロブリン様ドメイン 12 個、及びアミノ酸 793 個のカルボキシ末端 (C 末端) ドメインを含む。DNA 配列が 100% 一致する 2156 bp 領域の位置を示す。描いた領域の編成は L. インテロガンズ及び L. キルシュネリで保存されていた。

30

【図3】レプトスピラの病原性 5 種の株から得た DNA 断片のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅を示す図である。位置 46 ~ 65 aa に対応する Big L3 領域をコードする L. キルシュネリ及び L. インテロガンズの配列に基づき縮重プライマーを設計した。病原性の 5 種 (L. キルシュネリ、L. ボルグペテルセニー (*L. borgpetersenii*)、L. インテロガンズ、L. サンタロサイ (*L. santarosai*) 及び L. ノグチ (*L. noguchi*)) 並びに非病原性の 2 種 (L. ビフレキシ及び L. ウォルバキー (*L. wolbachii*)) から精製した DNA で PCR 反応を行った。

40

【図4】big L1、big L2 及び big L3 の特異的プライマーで L. キルシュネリの RNA 抽出物の RT-PCR による増幅産物を示す図である。培養レプトスピラの RNA 抽出物に逆転写反応 (レーン「+」) を行い、big L1、big L2 及び big L3 内の特有配列と結合するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅ステップにかけた。lip L45 内の配列に基づくプライマーを用いた増幅、並びに逆転写ステップを行わなかった試料に対する PCR 反応を対照反応として実施した。

【図5】病原性レプトスピラに感染した患者及び動物保菌宿主、並びに全 L. インテロガンズ抗原の調製物を免疫した実験動物から得たプール血清の、組換え Big L3 タンパク質 (r Big L3) に対する免疫プロットでの反応性を示す図である。精製 r Big L3

50

(1レーンあたり1mcg、レーン3)を用いてウエスタンブロット分析を実施した。レプトスピラ症患者の血清(レーンA)、健康な個体(レーンB)、L.インテロガンスが常在化している捕獲ラット(レーンC)、L.インテロガンスが常在化していない捕獲ラット(レーンD)、in vitro培養したL.インテロガンスの全抗原調製物を免疫された実験用ラット(レーンE)及び免疫前に採取された実験用ラットの免疫前血清(レーンF)をプローブとして膜を分析した。全L.インテロガンス抗原調製物(レーン1)及び組換えLipL32タンパク質(rLipL32、レーン2)に対する反応性を比較のために示す。左の数字は分子量標準(Invitrogen)の位置と相対移動度(kDa)を示す。

【図6】レプトスピラ症の疾患急性期(レーンA)及び疾患回復期(レーンB)におけるrBigL3に対する個々の患者の血清反応性を評価したELISAを示す図である。レプトスピラ症患者4名(実線)及び健康な個体4名(点線)の血清を1:50、1:100及び1:200の希釈でrBigL3(1穴あたり25~200ng)と共にインキュベートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合させた、 μ 鎖及び ν 鎖に特異的な抗体をそれぞれIgM及びIgG血清反応性を測定するために使用した。平均吸光度(OD450nm)及び標準偏差をグラフに示す。 10

【図7】疾患急性期(レーン2)及び疾患回復期(レーン3)におけるレプトスピラ症患者29名、並びに健康な個体28名(レーン1)の血清におけるrBigL3のIgM(A)及びIgG(B)の反応性を示す図である。血清(1:50希釈)、及びホースラディッシュペルオキシダーゼと結合させた、 μ 鎖及び ν 鎖に特異的な抗体を反応性を測定するために使用した。実線は平均吸光度(OD450nm)を示す。 20

【図8】疾患急性期(レーン6~9)及び疾患回復期(レーン10~13)における、rBigL3に対する個々のレプトスピラ症患者の免疫ブロットでの反応性を示す図である。精製rBigL3(1レーンあたり1mcg、レーン3)を用いてウエスタンブロット分析を実施した。1:100に希釈した血清をプローブとして膜を分析した。BigL3領域1の58kDの組換えタンパク質(第2ないし第6Big回復ドメイン)に対する反応性を測定するために、アルカリホスファターゼと結合させた ν 鎖特異的な抗体を使用した。rLipL32(1レーンあたり1mcg)に対する反応性を比較として実施した。それぞれPonceau-S及びクマシーブルーを用いて染色後の精製rBigL32、精製rLipL32(レーン14)及び分子量標準(レーン15)の移動度を示す。 30

【図9】rBigL3及びL.インテロガンス溶解物から得た天然抗原に対するラット抗rBigL3抗血清の免疫ブロットでの反応性を示す図である。精製rBigL3(1mg/レーン;レーン3、5、7、9)及び培養レプトスピラからの全抗原調製物(レプトスピラ 10^8 個/レーン;レーン2、4、6及び8)を用いて免疫ブロットを調製した。L.インテロガンス由来bigL3のクローニング済みDNA断片を発現する大腸菌から得たrBigL3を免疫されたラットからのプール血清(1:500希釈[レーン4及び5]、1:100希釈[レーン6及び7]、1:2500希釈[レーン8及び9])をプローブとして膜を分析した。初回免疫に先立って免疫前の血清を入手し、対照として免疫ブロット分析に使用した(レーン2及び3)。分子量標準の移動度(kDa)を図の左側に示す。 40

【図10】レプトスピラ株の溶解物から得た天然抗原に対する、ウサギ抗rBigL3抗血清の免疫ブロットでの反応性を示す図である。以下の培養株の全抗原調製物を用いて免疫ブロットを調製した(レプトスピラ 10^8 個/レーン)。レーン1、L.インテロガンスsvポモナ(L. interrogans sv pomona)(ケネウィッキ(kennewicki)型)RM211株、少数回継代。レーン2、L.インテロガンスsvカニコラ(L. interrogans sv canicola)CDC Nic 1808株、少数回継代。レーン3、L.インテロガンスsvポモナPO-01株、多数回継代。レーン4、L.インテロガンスsvブラティスラバ(L. interrogans sv bratislava)AS-05株、多数回継代。レーン5、L.キルシュネリsvグリッポチフォーザRM52株、少数回継代。レーン6、L.キルシュネリsvグ 50

リップチフォーザ P 8 8 2 7 - 2 株、少数回継代。レーン 7、L . キルシュネリ s v グリッポチフォーザ 8 6 - 8 9 株、少数回継代。レーン 8、L . キルシュネリ s v グリッポチフォーザ Moskva V 株、多数回継代。レーン 9、L . キルシュネリ s v モズドク (L . k i r s c h n e r i s v m o z d o k) 5 6 2 1 株、多数回継代。レーン 1 0、L . キルシュネリ s v グリッポチフォーザ R M 5 2 株、多数回継代。L . キルシュネリ由来 b i g L 3 のクローニング済み DNA 断片を発現する大腸菌からの r B i g L 3 を免疫したウサギから得た血清をプローブとして膜を分析した。組換え L . キルシュネリ G r o E L タンパク質を免疫したウサギの血清を対照測定とした。B i g L 3 及び G r o E L に対応する天然抗原の位置及び分子量標準の移動度 (k D a) をそれぞれ図の左側及び右側に示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTINGS

1) GENERAL INFORMATION

I.a) APPLICANTS: FIOCRUZ and KO, Albert I.; HAAKE, David A.; REIS, Mitermayer Galvão; MATSUNAGA, James; CRODA, Julio Henrique Rosa; SIQUEIRA, Isadora Cristina; RILEY, Lee W.; BAROCCHI, Michele; YOUNG, Tracy Ann.

I.b) ADDRESS:

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Fundação Oswaldo Cruz/MS
Rua Waldemar Falcão, 121
Salvador, Bahia 40295-001
Brazil

10

II) TITLE OF INVENTION: "Protein family with repetitive Bacterial-Ig-like (Big) domains present in *Leptospira* species"

III) NUMBER OF SEQUENCES: 10 (ten).

IV) COMPUTER READABLE FORM:

IV.a) MEDIUM TYPE: Floppy disk
IV.b) COMPUTER: IBM PC compatible
IV.c) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS.

2) GENERAL INFORMATION FOR SEQUENCES:

I.a) Identifier Number for Sequence: SEQ ID NO: 1

II) Sequence Characteristics:

II.a) LENGTH: 3672 base pairs
II.b) TYPE: DNA
II.c) STRANDEDNESS: single strand
II.d) TOPOLOGY: linear

20

III) Position in the genome:

III.a) organism: *Leptospira kirschneri*
III.b) Name/key: CDS
III.c) position in the map: (0) - (3672)

ATGAAGAGAACATTTTGTATTTTCGATTCTTCTTTTCGATGTTTTTTCAAAGTTGTATGTCCTTG
GCCACTTTTAAACAGTCTCGCGGGTTTAGCAGCTGGTAAAAAAGTAATGGGCTGCCCTTTT
TCCACCTTCTATTAAGTAACTCTGATCCAGTTATTACAAGGATCGAGCTCAGTTATCAAAT
TCTTCCATCGCAAAGGTACAAGTACAACCTCTCGAAGTCACCGCAATCTTTGATAACGGAAC
AAATCAGAATATTACGGATTTCGACATCTATCGTTTTCCGATGCCCAATCAATCGTTGACATTC
AAGGTAACAGAGTCAGAGGAATCGCTTCTGGTTCTTCCATTATAAAAAGCTGAATACAACGGG
ATGTATTcTGAACAAAAATTACGGTTACACCAGCCACGATAAACTCAATTCAAGTTACGAG
TTTAGATGACGGTATATTACCTAAAGGTACAAATCGTCAATTTGCTGCCATCGGTATCTTTT
CGGATGGTTCTCATCAAGATATTTCCAACGATCCATTGATCGTTTGGTCTTCCAGTAATATA
GATTTAGTTTCGAGTAGATGATTCGGTTTGGCCCTCAGGTATCAATTTAGGAACGGCTCATAT
TCGTTGCATCCTTTCAATCAAACAAGCCTCCGAAGAGATAACTGTTGGTGACGCTGTTCTTT
CTTCTATCCAAGTAACTTCCAACAGTCCAAATATTCCTCTCGGAAAAAACAAAACTCACA
GCTACTGGAATTTATTTCGATAACTCTAACAGGGATATTTCCCTCTTCTGTTATCTGGAATTC
TTCTAATTCCACTATCGCTAATATTCAGAATAACGGAATATTAGAAACAGCTGATACTGGAA
TTGTTACTGTTTCTGCTTCTAGAGGTAATATAAATGGTTCCATAAACTAATCGTCACTCCT
GCTGCCTTAGTTTCTATTTCTGTTTCTCCTACAAATTCGTCAGTAGCAAAGGPTTACAAGA
AAACTTTAAAGCTACAGGGATCTTACAGATAATTCGAACTCAGATATTACAGATCAAGTTA

30

40

CTTGGGATTCTTCTAATCCGGATATTCTTTCCATTTCCAATGCAAGTGATAGCCACGGGTTA
GCTTCCACACTCAACCAAGGAAATGTTAAGGTCACCGCTTCCATCGGTGGAATACAAGGATC
CACTGATTTTAAAGTTACACAAGAGGTATTAACCTCCATCGAAGTTTCTCCAGTTTTACCTT
CAATTGCAAAAGGACTAACTCAGAAATTTACGGCGATCGGGATTTTTACGGATAACTCCAAA
AAAGATATTACAAATCAAGTCACTTGGAAATCTTCTTCAGCAATCGCAAGCGTGTCTAACTT
AGATGATAATAAAGGCTCTGGGAAAAGCTCACGCTGTTGGAGACACGACTATTACCGCTACTT
TAGGAAAAGTTTCAGGTA AAACTTGGTTTACTGtAGTTCCTGCGGTTCTCACTTCTATTCAA
ATCAATCCTGTAAATCCTTCTCTTGCAAAAGGGTTAACTCAAAAATTTACGGCTACTGGGAT
CTACTCTGACAACCTTAACAAGGACATTACTTCCCTCCGTTACTTGGTTCTCATCCGATTCTT
CAATCGCAACAATTTCAAACGCCAAAAAAAATCAAGGAACTCTTACGGAGCAGCTACAGGA
GCAACGGATATTAAAGCCACATTCGGAAAGGTAAGTAGTCCAGTTTCTACGTTATCCGTTAC
TGCTGCAAACTTGTGAAATACAAATCACACCGGCCGCTGCTTCCAAAGCAAAGGGAATTT
CCGAAAGATTTAAAGCAACCGGTATTTTTACAGACAACCTCTAATCCGATATTACAAATCAG
GTCACTTTGGAGTTCATTAATACAGATATTCTTACCGTTTCCAATACAAACGCCAAACCGGG
GTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACTGTTAAAGTTATCGCTTCCATGGGTGGAATCGAAA
GTTCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCTAATTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGC
TCTTCGATTGCAAAAGGACTAACTCAAAAATTTACCGCTATAGGTATTTTTACGGATCATT
TAAGAAGGATATTACAGAGCAAGTTACTTGGAAAGTCTTCTTCGAAAGTATTAATATGTTGA
ATGCATCCGGTGAAGAAGGAAAGAGGTAAGGCAATTTAGTTCGGGAAAGCGACCATTACTGCA
ACCTTAGAAAACTTTCGGGAAAGCTGATATTACAGTTACTCCCGCGGTTCTTACTTCAAT
TCAAATCAGTCTGTGAAACCTTCTCTGTAAAAGGGTTAACAGAAAATTTTTCTGCTACAG
GTATCTACTCTGATAATTCAGCAAGGACATAACTTCCCTCCGTTACATGGCATTTCGTTCAAC
AACTCTGTTGCAACGATCTCGAACACGAAAAATTACCATGGACAAGCTCACGCAACCGGTAC
AGGGATAGTGGGTATTAAAGCGACATTCGGGAAATGTAAGCAGCCAGTTTCCAAATTATCCG
TTACCGCAGCAGAAGTGGTTGAGATTGTGTTAAATCCTACTTTATCTCACAAGGCCAAGGGA
CTTACTGAAAAATTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTCGACAAAAGATATTACCGA
CCAGGTTACTTGGAAATCTTCCAATACGCTACGCAGAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTA
AAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGGAACGAGTCACATTTCCGCTACCTTAGGTTCAAT
TCAAGTGCAATGCGACATTCGAAGTTACTCCAGCAAAAATAGCTTCGATCGAAATACACC
AAATAATTTCTTCTGATCAAAAACTTAGTTATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTATACGG
ATAATACAAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCCCTGGTCTTCTCTGATCCGAATGTTGCA
TCGATCGATAACACATTTTCATTTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGAAAAACGAA
CATCACTGCAACGTTATCCGACTCTATGTCCGCTTCCACTACTTTGTATGTCACTTCTGCTA
CGCTTGTGACATAGAAGTAAAACCTAGTATCTTCGTTCTGAGTGAAGGTCTTACACTACAA
CTGACCGCTACCGGCATCTATTCGGATTACTCTACCTATGATTTGACTCAGGTTGTAACGTG
GACTTCCAGCGAACCATCCAACATTTGATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAA
CGGCTCTTGCAATTTGGAGCTTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTGAAAGTAATCGA
GCTTGGATATTTGTCAATGACGAGAAATTTGTAAACATAACCATTAGTTCTTCTCAAGTTTT
GACAGACAAGGGCTTGACTCAACAATTCAAAGCAATCGGAACTTTCGAAAAAGGTAGCGAAC
TTGACCTTACGGATCTGTAAACCTGGAAGTCTCTGATTCTAAGGTAGCTTCTATCGGTAAC
TCTAATGATGACAGAGGTTTAATAACACCGCTTTCTGTAGGTTCTCTAAAATTTCTGCGAC
TTACAATTTCTATCCATAGTAACTCTATTGATTTTGAAGTAACTCCAGAAATATTAGCCTCTA
TTAAAACGAAGCCG

10

20

30

- I.b) Identifier Number of Sequence: SEQ ID NO2
II) Sequence Characteristics:
II.a) LENGHT: 1224
II.b) TYPE: amino acid
II.c) TOPOLOGY: linear
III) TYPE: peptide
IV) SOURCE: N-terminal to C-terminal portion

40

MKRTFCISILLSMFFQSCMSWPLLTSLAGLAAGKKSNGLPFFHLLLSNSDFVITRIELSYQNSSIAGKTSTTLEVTAI
 NGTNQNTIDSTSIIVSDAQSIQVQNRVIRGASGSSIIKAEYNGMYSEQKITVTPATINSIQVTSLEDGILPKGTNRQFA
 AIGTFSGDGHQDINSNPLIYVWSSNIDLVRVDDSLASGILNGTAHIRASFQSKQASEEITVGDVAVLSSIQVTSNSPNIP
 LGKKQKLTATGIYSDNSNRDISSSVIWNSSNSTIANIQNNGILETADTGIVTVSASRGNINGSIKLIVTPAALVSI
 TNSAVAKGLQENFKATGIFTDNSNSDIIDQVTWSSNPDIILSNASDSHGLASTLNQGNVKTASIGGIQGSTDFKVTQ
 EVLTSIEVSPVLPFSAKGLTQKFTAIGIFTDNSKDDITNQVTWSSSAIASVSNLDDNKGLGKAHVGDTTITATLGKVS
 GKTWFTVVPVAVLTSIQINPVNPSLAKGLTQKFTATGIYSDNSNKDITSSVTFWSSDSSIATISNAKKNQNGSYGAATGAT
 DIKATFGKVSSPVVTLSTVAAKLVETIQTAAASKAKGISERFKATGIFTDNSNSDIIDQVTWSSNTDILTVSNTNAKR
 GLGSTLKQGTVKVIASMGIESSVDFVTQANLTSIEVSPTRSSIAKGLTQKFTAIGIFTDHSKDDITEQVTWSSSKVL
 NMLNASGEEGRKAI SVGKATITATLEKLSGKADITVPAVLTISIQISPVKPSLVKGLTENEFATGIYSDNSKDDITSSV
 TWHFSNNSVATISNTKNYHGQAHATGTGIVGIKATLGNVSSPVSKLSVTAELVEIVLNPILLSHKAKGLTENFKATGVFT
 DNSTKIDTDQVTWSSNTAYAEISNATGSKGVNALSNGTSHISATLGSISSANATFQVTPAKIASIEITPNNFFLIKLL
 SYPFKAIGIYDNTKTITKQVSWSSDPNVASIDNFTSLAGSATAIDDGKNTITATLSDSMSASTTLYVTSATLVLDIEV
 KPSIFVLSEGLTQLTATGIYSDYSTYDLTQVVTWTSSEPSNISIENTAGKKGKVTALAFGASEFTATYDSIESNRWIF
 VNDEKFNITISSQVLTDKGLTQGFKAIGTFEKGSELDTLVTWSSSDSKVASI GNSNDDRGLIITPLSVGSSKISATY
 NSIHSNSIDFEVTEPEILASIKTFP

10

- I.c) Identifier Number of Sequence: SEQ ID NO: 3
- II) Sequence Characteristics:
 - II.a) LENGTH: 5863 base pairs
 - II.b) TYPE: nucleic acid
 - II.c) STRANDEDNESS: single strand
 - II.d) TOPOLOGY: linear
- III) Position in the genome:
 - III.a) organism: *Leptospira kirschneri*
 - III.b) Name/key: CDS
 - III.c) position in the map: (0) - (5863)

ATGCCATAACATATCAACAACTCAGAGATAAAAAAAGCTGGCCTTTCTCTCAGTTTATTTTATTCTTTTTCTAACATT
 CAGCCTATTTTTTGGAAAGTTGGCGCGCTTGGCCAAATTTTTTTCAGGCACACCTGGTTTATTAGCAGGTAAAAAAGCG
 GAGCAACCAATCTACTTTGGATGCTTTTTTAGGAATAGATAATCCGCTCGAATCGGAGCCATCCGAAGCAGAGTTAGAT
 CCGATCGAAATTCCTGACCGAAGTCAAAATTTAGCTCGAGGTACTACTTTACATCTAAACGCCACAGCCATCTATAAGA
 CAATCTACCGAGATATTTCTCGGAAGGATCCTGGTCTCAGGATTCGAGCATTCTCAAGCTATTAACACAATCTC
 AATTCAAAGGAATGAATCTAGGTTCTGGAACGTTAATGTATCTTTCAAGGAAAAACGCAACTACAACGTTAACCGTT
 ACATCCCGTGTGTTCGGATCTGACCGTAACCTGTGTGAACCAAGGTAGTCCATTTACCTGTGGAAATCGATCGTCAATG
 TAAATTAGAAGGAATTTTTTCCGACGGTAGTACTCAGGTTTAACTTCCGATCCAAAGCCGCTCTGGAACGTAACCCAAT
 CTCTTATTCAGGTGTAACACCCACAGGTTTAGTTTCCGGACTTCTCCAGGTAACACTTTTATACCACCTCTTATGGA
 AGTAAACCTCCAGTTTGAATGTGACCGTAAGTGGGCAACCCCTTAGCTCGATCTCAGTGAATCTCCGCAACTCAAGTTA
 TCCTCTGGCAAGGTCCAACAGTACACAGCAATCGGAACCTACAGCAATCAGTCCACTCAGATTTAACAATCAGGTTT
 CCTGGGCTTCTTTAAATCTCCGTTGCTACGATCGATAATCTACATCCGCCAAAGGTATGCTTACTACTCAATCAACC
 GGTTACGCAACATCAGCGCAACCTTAGCGGAAATACCGGACAGACTACTAGTAAACGTCACCTCCGCAAGTTCTTACTA
 GTATTACGATCACTCCGCAAAATCCAGCGTAGCAATGGAAGGACATATATCTTACCGCCACCGGAGTTTTTCCGGAT
 GGTACAGTTTCCGACATTACCAACCAAGTAACCTGGTCCAGTTCCTTAACAAGTGTAGTACCAGCAGATAACTCAGGCGG
 TTTATCCGGAAGAAATTTCCGGAGTCCGAGTTGGTAGTACGAATATCACCGCCGCTTCCGTTGGAGTAGATATTACGGTTT
 CTTTAAATGTACCAACGCCACTTTAGAATCGATTCAAGTGGTTCCGATTCCTATTCGATAGCTCGAGGTACGTTACG
 TTTGTACAAGCGATAGGAGTCTACTCGGACGGTTCTCTCAAAACATAAGTGTATCAAGTTGCCTGGAACAGCTCTAATTC
 TTCAATATTACAATATCTAATTTAAATGCAGTTCCCAAAAGAGAAATACAATCTCTCTCTCCGGAGGCCCTAGGTACAG
 CAAGGATCACCGCAACTTTAGAAGCAaTCTCCTCATATACCGACATCTCCGTTCAATGCAGCAACTTTAGTTTCTATCGAA
 GTGTACCCCAAAATCCTTCGGTATCTTCAGGACTTACCCTTCTTTACGGCGACCGGgTTTTATACGGATGGAAGTAA
 TCAAAATCTGACTTCTCAAGTAACCTTGAATTCCTCAACACGAACAGAGCTACAATCAGCAACGCAACCGGAACTCAAG
 GAATTCCTTGGGCTCTCTGTGCGAAGTACGAACATATCaGCAACGTTAGGTGGGTTACTTCTTCCGCTACCACCTTT
 ACGGTCACAAACCGCGTTTTAAATTCGATCACGATTACTCCGCTCTCTCTTCCGTTAGCAGTAGGAAGGAGTCTGAACCT
 TACTGCAACCGGAACTTATTCTGACGGAAGTAACCAAGATTTAACTACCTCCGTCGCTTGGACGAGTACGGATCTTCCA
 TCGTTTTCCGTAGACAACCGCTCAGGTAGACAGGGGACAGCAGGTTTGCACAAGGTAACTCAGATCAGTGCCACA
 TTAGCGGAACTTCTCTGCTATCAATTTTACGGTAAGTGCAGCGGTTTTAGATTCAATTCAGTAACCTCGGAAGATTC
 TCCGATTCGAAAAGGAACCTTCTACAAGCAATCCGACGGGTGTTTTTTCAGACGGAAGCAATTTGAATATTAGTGATC
 AAGTTATTTGGGATAGTTCACAACAAACGTTGATCCAGCTAGGAGTTTTAGAAACCGGCTCTAAAAAGAACTGATGAAT
 TACAGTAATCGCTCAAGTTTAAACCAGCATCAAAATCGATCTACACATCCGAGCGTTGCCAACGGTCTGACTCAAAAT
 TACTGCAACCGGAGTTTACTCAGATGGTAGCAATCAGAACTTAACCGATTCGTTACTTGGGCGCTTCCAATCCTGCT
 GTTGCCACGATCAGCAACGCTTCCGGAACCAACGTTAAAGCTACTACTCTTCAAACGTTCCACCAATATCAGCGGAG
 TCTGGGCGCCACTACTCTGATCCAAGTGTATTAACGTTTACAACCGCAACCTTAAACAAGTATCAGGATCGCTCCACCT
 CTCTCTCAACATCGAAAAGGATTAATCAAGACTTTGTAGCAGCGGTTATTATACAGATGGTTCTCTAGAGACCTG

20

30

40

ACCACCTAAGTCACTTGGAAATCTTCCAATACTTCTACCGCTACGATCAGCAATGCAAACGGAACTCAAGGAAGAAATGGC
 CGCGGTCGATACTGGTCTACAAATATCTCCCGCTCTTAGGAGGAACGTATAGTCAGACCACAACCGTAACCGTTACAT
 CTGCGGTTCTGAATTCGATCCAGGTTTCTCCAGCGGACATTAGTGTAGCCAAAGGAAACCAAGGCCACACCGCGATC
 GGAGTATATTCAGATTTAGCACGTTAGACGTTACTTCTCAGGTTACCTGGACTTCTCCAGCGTTTCGATCCCTACGAT
 CAGCAATGCAAGCGGACAGGAAGGTTTAGCTACGGCTGTAGGCACGGGAACCTCCACAATACCGCAACTCTTGGAGGAA
 TTTCTAATCTACAGGTTTACGCGTTACGGCCGCGTATTGGTTCTCTTCCGTTAGGTCCTACCAATAGTTTTGTTTAT
 ATGCACAAAACCAAAATTTATGGCTACTGGAACGTAATCTGACGGAAACGATGCAGGATCTTACAACCTCAAGTCACTG
 GACTTCTCCGATACAACCTTGGGAACAATCAGCAACCGCTTCCGAATAGAAGGTAGGGCTACAGGAATTGCTGCCGGTG
 CCATAACGATCACTGCGACTTTGGGAAGTATCAGCGGAACACTTCTTTGACTATAATCTTTTATAGTACGATAGCACCT
 GCGATCACAACCGTAGTGCCTFAACTCTACTACTTTAAGAATTACATATTCGAAAACGTAAACGAAACCCAGGCAAA
 AACCCGCCCAATACAAACTGGCTCTTACTTCTCCGTAACCGGAAGTTGTTAGATAACAGCAACTTTACTTCTACCT
 CTTCTGTGATTAAGTTTCTCAGTGAAGCGGATCTGTGTTGTTCTAATCTAGGTTCTTCCAAAACGCTCTAAC
 GCACCTTATACGATTTTAGTGAATAAATCGGGAATACAAGATCTTCTACAACCCCAACAATTTGGGTTGTGCAAACTA
 CGGAGACTTCTTAGGACAGGAACAAATCAAATCGTATCCGCTCCTGTGCAAAATCCAATTCGTTGATTTTGAATTTCT
 CTAAGGCTCCTAAATCTGGAACAATGTCCGCGGTTCCGAGAAATGTACCGGTTCTGCAATGTTCTAATCGTTACAAA
 ATTTCCGGACCAAGCGATCTTGGAAACAATTAACAGCGTAAAGGTGTAGATGGAAATATTTGTAACCGGAGCAACTGCGA
 TCCCGCAAAAGTATGCGTAATCATAATTTAGTACAACCCGGAGCACAATAACAATCACTACCGGATTCGATCCGAGC
 GAGACGGATTTGACAACCTCAAGCTGGGGATCAATCCGAAATTTTGGATACAGAGAATCTTCAATCTTCCCAGAGAC
 AGGGCTTCTTTTAGGATGTGGAACGTTCCCGTCAACTTTGCAGACGGACCGATTTCCATCGATCCAAACTCATCCAC
 GTTCGGTTACTAATCGATTTAACTCTAAGATCTATTCCAGGACCAACAATCCGGGAACCGGAGCGCTTCGATTTGCCT
 ATGATGGAAGTGTCCAGAATCAGTTCAATCTCCTTTGAAAAGACACAACCGTTCAAGACGGTACCGGACTAACGTA
 AGTTCAAACTCAGGTTCTTCCAGAGAAATTCGATCTCGGTTCCGCTTACGTTACATTAGGACTACTCCGGATGTACTAC
 AAACAACGGAACTCTTCTCTAGGATGTGGTCCGGATAACGAAAACGGAGAGGAGTATTCGCTACTGGAATCTTTCCA
 GCGTCTCCTATCTTTTGTGAGCTGCAAAAACCGTAGCGGACGGCTGGGCAATACTTATTGATTAATCTGTATTAC
 TCCGACAGACTTCTACTAATAACAAGTTTCAAATATATAGATCTAGGATCGATCACCGGAACTTTAACCGCCGAACTTC
 TTCGCTTACTGTACTCAATAATAGAGTGTTCGAGGTTTTCGAAAGTCAAGCAACGACCGGAATCGGATTTGTCGGAGG
 TTAATGCACCCGATTTTGGATTTGTAACGTTAACTCAGCGGACTCAGGAACCTGGATTTGTACTCCAGGCTCCAACCTGC
 GACCGTTTTCAGCGAACCAAGGAAAAAGAAATCCGGATCGATTTCTTCTTACTTCCGAGGACCGTCCACCGGTTTATT
 AGGAATTAATAATGCACATCCAACCTGGGCTATTAATATCGGATCGATTCATGTTCGATTTAAAAATCGTATCT
 ATCCCGCAACCGGAGGATTACCGCGGTAGGACATAACGGTCCATAATACGTTTACAACCTGCAGATCCAACCGCGGCT
 TGTACCGGACCGGACTCTTGTCTAATCTGGTGGAAATTTGACCTAGAACCACAACGAAATGGCACAACAGTCCCACAAA
 CAACCTGTTCTTTAGAGTTAAATCAATTTTACAATCTGATTCGGGAGATAAGCGGTTGCAACAATTTGCCAGATTCA
 ACAATAACCTTTATGTAACAGAACCAATTTGATTTCAAAGTTCTCAAGCGACTGGAAATCAGAACAATCCAGGAACCGTA
 ACAGGATGTACAGACGGAACAACCTACAATCGAAGGGCACAACTTTGAAATGTGATCTTACAATTTTCAGGAACACGAG
 CGAATGTGATGCAGCGGATTTGGTCCGTCGTAGGCGACGACGGAACCGGAATCACAACATGGGAGATTCTACAACCGAA
 CGATCACCATGGTGTGAAAAACGGATCCTATCTTACATAGGATATGATAATCCAACCGGAATCAGAATTTATAGAAC
 AACGTAGCCAACCGGATCATCTCTCGTCTTGGAGTCAAATCCCGGGAACCGGCTCTACAGATCGGACTAACGTTCA
 ACAAAATTTACTGGCCGATCCGTAACCTCCGGAAGTACAATATATCTACGTAAGCGGTGAAAAAGTAAACGTTTCTG
 TTCGGACGTATCGTCAACAAAAT

10

20

- I.d) Identifier Number of the Sequence: SEQ ID NO 4
- II) Sequence Characteristic:
 - II.a) LENGHT: 1954
 - II.b) TYPE: amino acid
 - II.c) TOPOLOGY: linear
- III) MOLECULE TYPE: peptide
- IV) SOURCE: N-terminal to C-terminal portion

30

MPKHINKLRDKKTNFFLQFIFILFLFSLFLESAAWPIFSGTPLLKAGKSGANNSLWMLFLGIDNPLESEFSEAEELD
 RIEISVPNSNLARGTTLHLNATAIYKDNTHRDISSEGSWSSTDSSILKLLTQSQFKGMNLGSGNVNVSFQGNATTTTLTV
 TSAVLSDLTVTCVNQGSPLPVGIDRQCKLEGI FSDGSTQVLTSDPSASWNVQSS IAGVNTTGLVSGLSPGNFTFITTSYG
 SKTSSLNVTVSAAATLSSISVTPANSSYPLGKVVQYTAIGTYSNQSTQDLTNQVSWASLNTSVATIDNSTSAKMLTTQST
 GSANITATLGGITGQTTVNVTSAVLTSITITPANPSVANGRTLYLTATGVFSDGTVSDITNQVTWSSSLTSVATADNSGG
 LSGRISGVGVGSTNITAAIGVDITVSLNVTNATLESIQVVS DSHSIARGTSTFVQAI GYVSDGSSQNI SDQVAWNSNS
 SILQISNLNAVPKREIQSPSSGGLGTARITATLEAIISSYTDISVNAATLVSEVSPNPSVSSGLTVPFTATGVYTDGSN
 QNLTSQVTWNSNTRATISNANGTQGIALGSSVGTNNISATLGAVTSSATTLTVTNAVLNSITITPSLPSVAVGRSLNL
 TATGTYSDGSNQDLTTSVAWSTSDSSIVSDNASGRGQTTGVAQGNTOISATLGGTSSAINTVSAAVLDSIQVTLEDS
 PIAKGTSTRAIATGVFSDGSNLNISDQVIWDSQTNVIQLGVLETGPKKLMNSPANGNSTTGTSTRITATLGGVSGYADL
 TVIAPSLTSIQIDPHTFVSANGLTQNFATGVVSDGSNQLTDSVTVASSNPAVATISNAGSNGKATTLQTGSTNISAS
 LGATTSVPSVLTVTNATLTSITIAPTSSFNIAKGLNQDFVATGYTDGSSRDLTQVTWNSNNTSTATISNANGTQGRMA
 AVDTGSTNISASLGGTYSQTTNVTVTSAVLNSIQVSPADI SVAKGNTKAYTAIGVYDFSTLDDVTSQVTWTSVSSVIAI
 SNASGHEGLATAVGTSTITATLGGISNSTSLVTAAVLVLSVSGPTNSFVYMTQTKNFMATGTYSDGTMQDLTTQVTW
 TSSDTTLGTTISNAPGIEGRATGIAAGAITITATLGSISGNTSLTIIFLDTIAPAITNVVALTPTTLRIITYSENVNETQAK
 TAANYKLALTSVVTGSCSDNSNFTSTSSVITVSSVSGSGSVFVLTLLGSSQTSNAPYITLVNKSQIDQLSTPPNNLGCANY
 GDFLQGEQIKIVSASCNSNSVILNFSKPKSGNNAVSAECTGSAEC SNRYKISGASDLGTINSVLDGICNGATAD
 SAKVCVHLNLVQTAQYTIITADSVGDGDFDNSSWGSIRNSLDTENLQSSPRDRASFLGCGTSPVNFADGPISIDPNSST

40

FGYLIDFNSKIYSGPNNSGNALRFAYDGSVPESVQFSFEKDTTVQDGDATNVSSNSASSRENSISVPPYVTLGHSGCTT
NNGTLLSGCGPDNENGRGVFATGILLSVSYLVFAAAKTVDGLGQYLFYLYSADTSTNTSFKYIDLGSITGTLTAGTS
SLTVLNNRVFAGFAKSNDSNDIGLFGGLNAPDFGFVTFNSADSGTGFCPTGPNCDADFDTGKGRIRIDFLPYFGFPSTGLL
GYNNAHPNWAYIYIGVDSMFVFNRIYAANGGLHVAHNGSIIIRSTADPTAACTGPDSCSNWVEIGPRTNWKHNSPTN
NWFSELELNQFYNIIPGDKAFAQFAEFNNLYVTRTICIQSSQATGIRTNPCTVTGCTDGTTRRRAQLWKCDPTISGNTS
ECCDAADWSVVGDDGTGITNMGDSNRTITMVMKNGSYLYIGYDNPNGIRIYRTNVANPGSSASWSQIAGNGLDATNVQ
QLYSVSVSPGSGINXYVSACKSNVSVRYRQQN

I.e) Identifier Number of the Sequence: SEQ ID NO: 5

II) Sequence Characteristics:

II.a) LENGTH: 5658 base pairs

II.b) TYPE: nucleic acid

II.c) STRANDEDNESS: single strand

II.d) TOPOLOGY: linear

III) Position in the genome:

III.a) organism: *Leptospira kirschneri*

III.b) Name/key: CDS

III.c) Position in the map: (0) - (5658)

10

ATGAAGAGAACATTTTGTATTTGATTCCTTCTTCCGATGTTTTTCAAAGTTGTATGTCTTGGCCACTTTTAAACAGTCT
CGCGGGTTAGCAGCTGGTAAAAAAGTAATGGGCTGCCCTTTTTCCACCTTCTATTAGTAACTCTGATCCAGTTATTA
CAAGGATCGAGCTCAGTTATCAAAATCTTCCATCGCAAAGGTACAAGTACAACCTCGAAGTCACCGCAATCTTTGAT
AACCGAAACAAATCAGAATATTAACGGATTCGACATCTATCGTTCCGATGCCCAATCAATCGTTGACATCAAGGLAACAG
AGTCAGAGGAATCGCTTCTGCTTCTCCATTATAAAAGCTGAATACAACGGGATGTATTCTGAACAAAAATTACGGTTA
CCACAGCCAGATAAACTCAATCAAGTTACAGGTTAGATGACGGTATATTACCTAAAGGTACAATCGTCAATTTGCT
GCCATCGGTATCTTTCCGATGGTCTCATCAAGATATTTCCAACGATCCATTGATCGTTTGGTCTTCCAGTAATATAGA
TTTAGTTCCGAGTAGATGATTCGGGTTTGGCCTCAGGTATCAATTTAGGAACGGCTCATATTCGTCGCATCTTTCAATCAA
AACAGCCTCCGAAGAGATAACTGTTGGTGACGCTGTTCTTCTTCTATCCAAGTAACTTCCAACAGTCCAAATATCTCT
CTCGAAAAAACAAAACTCACAGCTACTGGAAATTTATTCGGATAACTCTAACAGGATATTTCTCTTCTGTTATCTG
GAATCTTCTAATCCACTATCGTAAATTCAGATAACGGAAATTTAGAAACAGCTGATACCTGGAAATTTACTGTTT
CTGCTTCTAGAGGTAATATAAATGGTCCATAAACTAATCGTCACTCTGCTGCCCTAGTTTCTATTTCTGTTTCTCTCT
ACAAATCTGCAAGTAGCAAAAGGTTTACAAGAAAACTTTAAAGCTACAGGGATCTTTACAGATAATTCGAACCTCAGATAT
TACAGATCAAGTTACTTGGGATTTCTTAATCCGGATATTTCTTCCATTTCCAATGCAAGTGATGCCACGGGTAGCTT
CCACACTCAACCAAGGAAATGTTAAGGTCACCGCTTCCATCGTGGAAATACAAGGATCCACTGATTTTAAAGTTACACAA
GAGGTATTAACCTCCATCGAAGTTTCTCCAGTTTACTCTCAATGCAAAAGGACTAACTCAGAAATTTACGGGcGATCGG
GATTTTTACGGATAACTCCAAAAAGATATTAACAATCAAGTCACTTGGAAATCTTCTTCCAGCAATCGCAAGCGTGTCTA
ACTTAGATGATAATAAAGGCTCGGAAAAAGCTCACGCTGTTGGAGACAGACTATTACCGCTACTTTAGGAAAAGTTTCA
GGTAAACTTGGTTTACTGTAGTTCTCGGGTCTCACTTCTATTCAAATCAATCCTGTAAATCCTTCTCTTGCAAAAGG
GTTAACTCAAAAATTTACGGCTACTGGGATCTACTCTGCAACTCTAACAGGACATTAATTTCTCTCGTTACTTGGTTCT
CATCCGATCTTCAATCGCAACAATTTCAAACGCCAAAAAATCAAGGAAACTCTTACGGAGCAGCTACAGGCAACCG
GATATTAAGCCACATTCGGAAGGTAAGTAGTCCAGTTTCTACGTTATCCGTTACTGCTGCAAACTTGTGAAATACA
AATCACACCCGGCCGCTGCTTCCALAGCAAGGGAAATTTCCGAAAGATTTAAAGCAACCGGATTTTTTACAGACAACCTTA
ATTCGGATATTACAATCAGGTCAGTTGGAGTTCACTAATACAGATATGCTGAAATTAACAATACCAGAGGAAGCAAA
GGTATTACAATACACTCACTCCCGGATCGAGTGAATATCCGcCGCTCTCGGTTCAATCAAAAGTTCTAAAGTAAATAT
GAAGGTAACCTCCGGCACAATTGATTTCCATTGCAGTAACACCTACAATCCATCAGTTGCAAAAGGTTAATACGACAAT
TTAAAGCCACCGGAACATATACGGATCAATCCGTACAAGAGCTGACTGCCCTAGTACCTGGTCTTCTTCCAATCCAGA
AAAGCAATGGTTAACAACTTACAGGTTCCGTTACAACAGTGGCTACCGGAAATACAATATTAAGCAACCGATAGACTC
CATATCCGGATCTTCCGTTTGAATGTCACCTCTGCATCTTACTTCTATCGAGATAACACCGACGATTAATCTATCA
CTCACGGTCTTACAAAACAATTTAAAGGCACTGGTATCTTTTTCAGATAAATCTACTCAAAATTTGACTCAGCTTGAAC
TGGATTTCTCCGATCCCTCCAAGATCAAGATCGAAATAACTCCGGTATAGCAACAGCTTCTGCAATAGGAAGTTGAA
TATTACGGCCATCTACAATTTGTCCAAAGTTCCCAATTCGGATCACAGTCACTGACTTAAACTGAAAAGTATAACTA
TCAGTCTCTTCAAGTTCAATAGCCAAAGGATTAACCAACAATTTAAAGCGATCGGAACTTTTATAGATGGTTCTGAA
CAAGAAATTACGAATCTTGTGACCTGGTATTCCTCCAATCCGATATTTGTTTCCCTATCAATAATCTCGGGTAAAAAAG
TTTAGCGaCCGCaCTCTCAATAGGTTCTTCCAACATCTCCGCAATTTACAATCTATAAGCAGTAATAAAATAAATTTTA
ATGTAAGCGCCCGCAGTTAGATTCATTAATAATCAATCCAGTCAACAATAACATCGCCAAGGCACTTACCCAACAATAT
ACTGCGCTTGGCGTTTATTCAGACTCCACCATTCAGGACATCAGCGATTTAGTTACATGGTCCAGTCCAAATTCGACTC
GATCAGCATCTCCAATTCGACCCGGAACCAAGGAAAGCGACCGCTTTACAGATTTGAAAGCAAAAATACCGGACTT
ACAAATTCATTTGCAAAACATAAATCTAATCTCAGCGCAGCACTCTCTCTTGGATTTTTATATCTCTACCAATACA
AATATAACACCACCGTATCAAAACAATTTCTTGAATGGGAACGTATTCGGACGGAACCAAAACGGATTTAACTTCTTC
GGTTACATGGTCCAGTTCGAATCAAGCTCAAGCAAGGTGAGTAACGCACTGAAACGAAAGGATTTGGTTACAGGGATTA
CTTCTGAAATCTATAATCACAGCGACCTACGGCTCAGTGTCCGGAATACAATTTCTCACAGTAAACAAACCGACACG
ATAGCTCCGACGGTCAATCCGTTAGTTCTTTATCACTACTACCATCCAAGTTGTATATTCAGAAATCCATAAAACAATCA
GGAAGCCCTTGATTTATCCAATTAACAATAAATAATAGTTCCAATTTTTACGGACATGTTCCGGATAATACGGACTTCA
ATTCCAATTTCTCAACCCGAGATTTTTCTCTTAGTAGTATCAAAGGAAGTAAAATACTTTTACGATTACACTTTTCACT

20

30

40

TCACAAATCTTAAACAAATCATACACACTTGTAGTCAACAAACAAGGAATTCACGATCTTCTCCATTCCAAATTCCTT
AAGTTGTCACAAATAACTCTGATTTTATAGGAAAAGAACAACTCAAATTCACAGTGCAGTTTGTAAATTCCTTAAACCAAG
TGATCGTTCTTTTCCAAACCTTTATATTTCTGGAAAGGAAGTAAACAAATCCGTGGAAATGTTCAAAATCCGTCCCAATGT
GAATCCAGATATAAATTTGACAGGTGTCTTCAATGGGAAGTATTACGAGCGTTAGAAATTTAGATGGAAAAGTATGCGG
TGGAGCACCGGCAGACTCCTCGAAAATATGTTTAAACACACTCCCTTCTCAATCAGGTGGTCAATATACGATCATCGCCG
CAAATGATTTGACCGGAGACGGCTTTGACAACAAATCCTGGGGAGCAATTCGAGATTCATTCGATCAAGAAAACCTACAA
CCTTCTCCGAAAGATAGAATCAACTTTATAGGTTGTGGAAATTCCTCTCAACTTTATGGATGGCCCGATCGTGTGAGA
TCCTTTTGGAGACGGTTCGATTTCCGGCTCTCTGTAGATTACAACAATCAAATCTATCTAGGACCGAATGTAAAAGGAA
ACCAAGCAGCTCGATTCAATACGACGGAACTTTCCGGAACTATTTCTTTCTTTTACCAGATAAAAATGCCACT
AACCGTCTTCTCAAGAGATGGAGGAATTCGGTTCCGAATACGTTACGATCGGTTCATACCGGTTGTACTCTCAATAG
TGCAGACATCACTACTGGATGTGGTCCAGATAACGAAGATGGACGTGGGGTTTTTGCCACCGGATCATTAGACAAAAAAT
CTCATATTTTTATAGCAGGTTCAAACCAAGGAGATCAACTATCTTATTATCTCAGATACCGATACAAACCTTAAT
TTTTAATATATAGTATGGAAAAAATTTAGGATGGCGACTGCAGGAACCTCATCTATCCGAGTTCTAGACGATCGGAT
CCATGTAGGTTTTGCAAAAAAATAAATCAAATCTAAACGCACTGATTCGTTAAATACCTTAAATACATCCGACACA
ATCGATGTGCAATGTAAACAACCTGTGAAGCCTCTGACGGATACCGCGGTAATCGTTTAGAATCGAATAGCCTTAC
TTTGGCGCGGCTCCGTGGATGACGTCATATAAACTCATAAATCTGATAATTCCTCGATCAACTGGGGTTATATATGT
GGGAATAGATTCCTATTCGTTTTTAAAGAAAACTTTACGCCGCAACCGGAGATTTCCAAATTCATACATAATGGAA
GTATAATACACTCTACCAAGTCAAAATCTAGTCTTGTGAAGGAATCAATCGTTTCCAGTTGGAAGACACAGCACT
AGATCAAATCCGAAGTGGCATACTCTCTCATACCAATTTGGTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGAGATTTAATCC
GGCGGATAAAGCATTCTCTCAATTCGAGAATTTAACGGGAAGATTGTATGTAACAAGAAGCTCTGTGTAACGAAAGAAG
ATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAACTTTGAAAGGTTGTACAGACGGAAGTATACAAATCGAAGACCTCAACTT
TGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGCGGATACAACAACCTGCGAAGCAAAAGATGGTCTTTAGTAGGAGATAATGGAAC
GGGTTTTACGAATTTCCGAGACGATTTCAATACAGATGACGATGGTAGTTGCAAGTGGATCTTATCTTACGATGGTT
TTGACAACGAAGCAGGATTTCAAATCTGGAGAACAATCTGAAATCTCTGAAAGTTCATCACAGACTGGGAGCCTATA
GGAATAGCGGATTAAGAGACGTTACCAATCGTCAAAATTTATTCGGCTATATCCGGAATGAATTTTGGTGTAAATTCGT
ATAATAAGCGTAGGAATAAAGATCAACCGGTTAAAATTTACAGACAACAGAACCA

10

- I.f) Identifier Number of the Sequence: SEQ ID NO: 6
- II) Sequence Characteristic:
 - II.a) LENGHT: 1886
 - II.b) TYPE: amino acid
 - II.c) TOPOLOGY: linear
- III) MOLECULE TYPE: peptide
- IV) SOURCE: N-terminal to C-terminal portion

20

MKRTFCISILLSMFFQSCMSWPLLTSLAGLAAGKKSNGLPFFHLLSNSDPVITRIELSYQNSSIAKGTSTTLEVTAFD
NGTNQNIIDSTSIIVSDAQSIVDIQGNRVRGSIAGSSIIKAEYNGMYSEQKITVTPATINSIQVTSLDDGILPKGTNRQFA
AIGLFSGSHQDISNDPLIIVSSSNI DLVRVDDSLASGINLGTAHIRASFQSKQASEEITVGDVLLSSIQVTSNSPNIP
LGKQKLTATGIYSDNSNRDISSVIWNSNSNTIANIQNNGILETADTGI VTVSASRGNINGSIKLVTPAALVSI SVSP
TNSAVAKGLQENFKATGIFDONSNDITDQVTDSSNPDI LSI SNASDSHGLASTLNQGNVKTASIGGIQGSTDFKVTQ
EVLTSIEVSPVLP SIAKGLTQKFTAI GIFTDNSKDKITNQVTWNSSSAIASVSNLDDNKLGHKAHVGDDTTITATLGKVS
GKTWFTVVPVAVLTSIQINPVNPSLAKGLTQKFTATGIYSDNSNKDITSSVTFWSSDSSIATI SNAKKNQGN SYGAATGAT
DIKATFGVSSPVSTLSVTAAKLVEIQI TPAASKAKGI SERFKATGIFTDONSNDITNQVTWSSSNTDIAEITNTRGSK
GITNTLTPGSSEISAALGSIKSSKVLKVT PAQLISIAVTPTNPSVAKGLIRQFKATGTYTDHSVQDVTALATWSSSNPR
KAMVNNVTVGVTVTAGNTNIKATIDSI SGSSVLNVPPALLTSIEITPTINSITHGLTKQFKATGIFSDKSTQNLTLQVLT
WISSDPSKIKIENNSGIATASALGSSNI TAIYKFVQSSPIPI TVTDLKLSITIS PSSSSIAKGLTQQFKAI GTFIDGSE
QEITNLVWYSSKSDI VPIINNSAGKGLATALSI GSSNISAIYNSISSNKINFNVAATLDSIKINPVNNNIAGLTLQY
TALGVYSDSTIQDI SLDVTVSSSSNSDSISI SNSTGTGKATALQICKSKITATYNS ISKNINLTVSAATLSSIFI SPTNT
NINTVSKQFFAMGTYSDGKTDLTSSVTVSSSNQAQAKVSNASETKGLVTGITSGNP IITATYGSVSGNTILTVNKDIT
IAPTQSVVLSLPTTIQVYSESI NNQEALDLSNYKII NSNFYGHCSNDTDFNSNSQTADFSLSSIKGSKNTFTITLSH
SQILNKSYTLVNNKQGIHDLSSIPNSLSCFNNSDFIGKEQLKLSAVCNLNQVIVSFSKPLYSGKEVTKSVECSNPSQC
ESRYKFAGVSSLSGITSVRLDGVKCGGAPADSSKICLTHSLLQSGGQYTI IAAANDLNGDGF DNKSWGAI RDSFDQENLQ
PSPKDRINFIGGNSPLNFMGPIVSDPPFGDGSDFGLVDYNNQI YLGNVVKGNQAARENYDGT FPESIFFSFTQDKNAT
NRASSRGGIPVFNVTI GHTGCTLNSADITTCGCPDNEGRGVFATGSLDKKSHI FIAGSKPRRFNYLYSSDITNLN
PKYISMGKITGLATACTSSIAVLDRIHVGFAKKNQNLNAPDFGKITFNTSEHNRCATVNNCEASDGYRGNRFRIDRMPY
FGGSDAVNYKTHKSDNSINWGYVGI DSLFVFEKELYAANGGFENSLHNGSIIHSTANPSPCGINRCSSWKDTP
RSNPKWHNSPHTNWFSELETKYRDLI PADKAFSQFAEENGRLVYVTRTICVTKEDHSGLRQSLQTLKGTDBGSYTNRRPQL
WKCDPTLTGDTTTCBAKDWSLVGDNGTGFNTFGDSDSNHSMVMVASGSYLYVGF DNENGIQIWRTNLENPGSSSHDWEPI
GIGGLRDVTNRQIYSAISGMNFGVNFVYISVGNKDQPVKIYRQQNQ

30

I.g) Identifier Number of the Sequence: SEQ ID NO: 7
 II) Sequence Characteristic:
 II.a) LENGTH: 1557 base pairs
 II.b) TYPE: nucleic acid
 II.c) STRANDEDNESS: single strand
 II.d) TOPOLOGY: linear
 III) Position in the genome:
 III.a) organism: *Leptospira interrogans*
 III.b) Name/key: CDS
 III.c) Position in the map: (0) - (1557)

ATTACCGTTACACCAGCCATTCTTAACTCAATTCAAGTTACGAGTTTAGAGTCAGGTATACTACCTAAAGGT
 ACTAATCGTCAATTCTCAGCCATCGGTATCTTTTCGGATGGTTCTCATCAGGATATTTCCAACGAACCACTG
 ATCGTTTGGTCTTCCAGTAATCCTGATTTGGTTCGAGTAGATGATTCAGGGTTGGCATCAGGGATCAATTTA
 GGAACAGCTCATATTCGTGCATCCTTTCAATCAAACAAGGGGCTGAAGAAATGACCGTTGGAGATGCTGTT
 CTCTCTCAAATCCAAGTAACTTCAAACGATCTGAATATTCCTCTCGGAAAAAACAACAACTAACAGCTACG
 GGAATCTATTCGGATAACTTAACAGGGATATTTCTCTCTGTTATTTGGAATTTCTTAATCCACTATC
 GCTAATATTCAAAACAACCGAATATTAGAAACAGCTGATACTGGTATTGTCACTGTTTCTGCTTCTAGCGAG
 AATATAATCGGATCCGTAACCTAATCGTTACTCCAGCAGCCTTAGTTCTATTTCTGTTTCTCCGACAAAT
 TCTACAGTTGCAAAAGGTTTACAAGAAACTTTAAAGCTACAGGGATCTTTACAGATAATTCAAACTCGGAT
 ATTACCGACCAAGTTACTTTGGGATTTCTTAATACCGATATTTCTCTCAATTTCCAATGCAAGTGATAGCCAC
 GGATTAGCTTCCACTCAACCAAGGGAATGTTAAAGTCACTGCTTCCATCGGTGGAATACAAGGATCCACT
 GATTTTAAAGTTACACAAGCTGCATTGCCATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCACTTCCATTGCAAAAGGA
 CTAACCTCAAAGTTTACTGCGATCGGGATTTTACGGATAACTCTAAGAAGGATATTACGGATCAAGTCACT
 TGAATTTCTTTCAGCAATCGTAAGCGTGTCTAACTTAGACAACAATAAAGTCTGGGAAAAACCAACTCA
 GTTGGAAACACGACTATTACCGCAACCTTAGGAAAAGTTTCAGGTAACACTTGGTTTACTGTAGTTCTCTGCG
 GTTCTCACTTCTATTCAAATCAATCCTGTAAATCCTTCTCTGCAAAAGGGTTAACTCAAATAATTTACGGCT
 ACTGGGATCTACTCTGACAACCTAACAAGGACATTACTCCGCTGTTACGTGGTTCTCATCCGATTTCTTCA
 ATCGCGACGATTTCAAACGCCCAAAAAATCAAGGAAACGCTTACGGAGCAGCTACAGGAGCAACGGATATT
 AAAGCCACATTCCGAAAGGTAAAGTAGTCCGGTTTCTACGTATCTGTTACAGCTGCAAAGCTTGTGAAATC
 CAAATCACACCCGGCTGCTGCTTCCAAGCAAAGGACTCACAGAAAGATTCAAGGCTACTGGTATCTTTACG
 GATAACTCAAATTCGATATTACAAATCAAGTTACCTGGAATTCCTCTAATACGGATATTGCTGAAATTAA
 AATACCAGTGAAGTAAAGGTATTACAAATCACTCACTCCAGGA

10

20

I.h) Identifier Number of the Sequence: ID SEQ NO: 8
 II) Sequence Characteristic:
 II.a) LENGTH: 519
 II.b) TYPE: amino acid
 II.c) TOPOLOGY: linear
 III) MOLECULE TYPE: peptide
 IV) SOURCE: N-terminal to C-terminal portion (0) - (519)

ITVTPAILNSIQVTSLESGILPKGTNRQFSAIGIFSDGSHQDISNEPLIVWSSSNPDLVRVDDSGLASGINL
 GTAHIRASFQSKQGAEMTVGDAVLSQIQVTSNDLNIPLGKQKLTATGIYSDNSNRDISSSVIWNSSNSTI
 ANIQNNGILETADTGIVTVSASSENIIGSVKLIIVTPAALVSVSPTNSTVAKGLQENFKATGIFTDNSNSD
 ITDQVTTWSSNTDILSISNASDSHGLASTLNQGNVKTASIGGIQGSTDFKVTQAALTSIEVSPTRTSIAKG
 LTQKFTAIGIFTDNSKIDITDQVTWNSSSAIVSVNLNKNKGLKNTSVGNTTITATLGKVSNGTWFVTPA
 VLTSIQINPVNPSLAKGLTQKFTATGIYSDNSNKDITSAVTWFSSDSSIATISNAQKNQGNAYGAATGATDI
 KATFGKVSSPVSTLSVTAAKLVEIQITPAAASKAKGLTERFRATGIFTDNSNSDITNQVTWNSNTDIAEIK
 NTSGSKGITNLTTPG

30

I.i) Identifier Number of the Sequence: SEQ ID NO: 9
 II) Sequence Characteristic:
 II.a) LENGTH: 600 base pairs
 II.b) TYPE: nucleic acid
 II.c) STRANDEDNESS: single strand

40

II.d) TOPOLOGY: linear
 III) Position in the genome:
 III.a) organism: *Leptospira interrogans*
 III.b) Name/key: CDS
 III.c) Position in the map: (0) - (600)

```
CATAACTCTCCTCATAACAATTGGITTTTCACTGGAGCTTACAAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA
GCATTCTCTCAATTTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTAACGAAAGAAGAT
CACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTGGAAGTTGTACGGACGGAAGTTATACAAATCGAAGACCC
CAACTTTGGAAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGATACAACAACCTGCGAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTA
GGAGATAACGGAACCGGATTTACAAACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGT
GGATCTTATCTCTACATAGTTTTTGATAACGAAAACGGAATTCAAATCTGGAGAACAATCTTGAAAATCCT
GGAAGTTCATCACACAACCTGGGAACCTATAGGAATAGGCGGATTAAGAGACGTTACCAATCGTCAAATTTAT
TCGGCTATATCCGGAATGAATTTTGGTGTAAATTCGTATATATAAGCGTAGGAAACAAAAATAAACCGGCT
AAAAATTTACAGACAACAGAATCAA
```

10

I.j) Identifier Number of the Sequence: SEQ ID NO: 10
 II) Sequence Characteristic:
 II.a) LENGTH: 200
 II.b) TYPE: amino acid
 II.c) TOPOLOGY: linear
 III) MOLECULE TYPE: peptide
 IV) SOURCE: N-terminal to C-terminal portion (0) - (200)

```
HNSPHNNWFSLELTKYRNLI PADKAFSQFAEFNGLRYVTRTICVTKEDHSLRQSLQTVEGCTDGSYTNRRP
QLWKCDPTLTGDTTCEAEDWSLVGDNGTGFTNFGDNSNHSMTMMVASGSYLYIGFDNENGIQIWRTNLENP
GSSSHNWEPIGIGGLRDVTNRQIYSAISGMNFGVNFVYISVGKNKPKVKIYRQONO
```

20

【 図 1 】

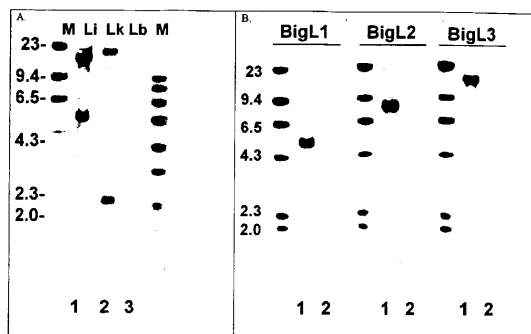
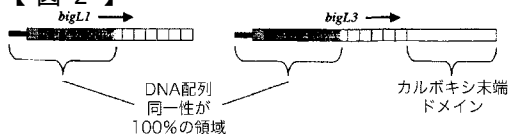


Figure 1

【 図 2 】



【 図 3 】

1 kb ラダー (NE Biolabs)

HaeIII で分解した ØX174RF

- L. キルシュネリsvグリッポチフォーザ(RM52), 少数回継代
- L. インテロガンスsvライ(L391)
- L. サンタロサイsvバケリ(LT79)
- L. インテロガンスsvブラチスラバ(AS-05)
- L. ウォルバキーsvピフレクサ(コティス)
- L. キルシュネリsvグリッポチフォーザ(RM52), 多数回継代
- L. ボルグベテルセニーsvハーゾ(HB-15B/93U)
- L. キルシュネリsvモズドク(5621)
- L. ピフレクサsvパトック(Patoc I)
- L. インテロガンスsvボモナ(RZ11)
- L. ノグチsvプロエキミス(LT796)

L. ボルグベテルセニーsvタラソービ(No. 11)
 テンプレートなし

【 図 4 】



Figure 4

【 5 】

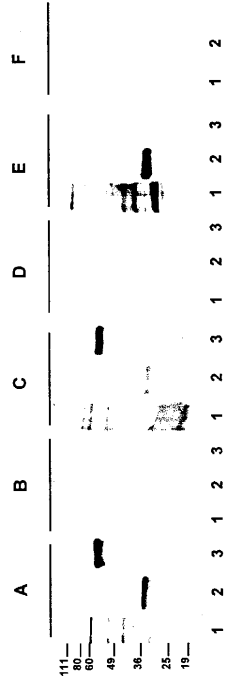
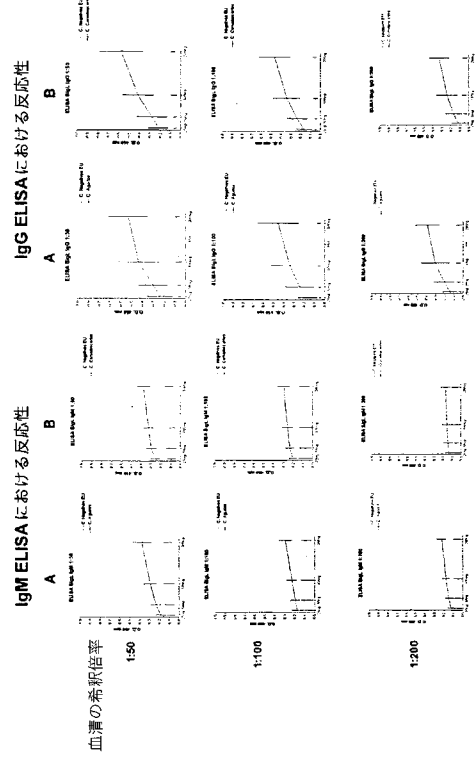


Figure 5

【 6 】



【 7 】

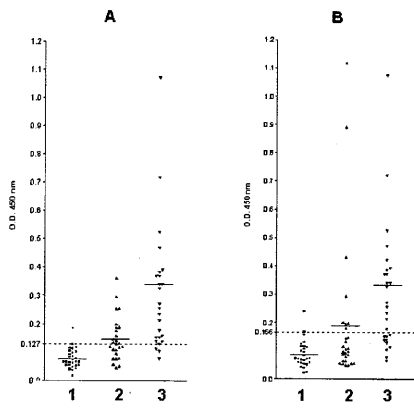
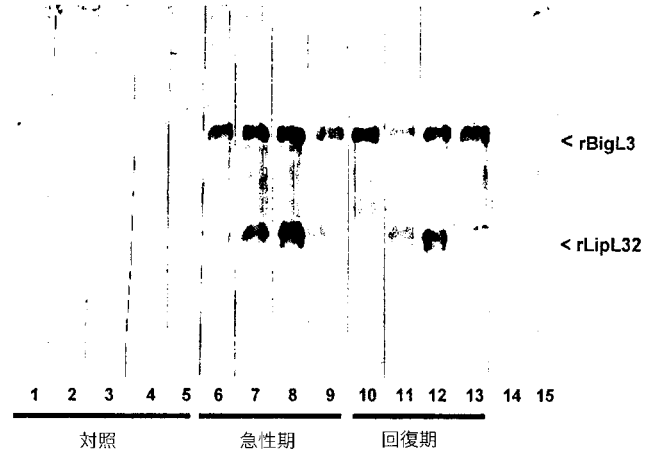


Figure 7

【 8 】



【 図 9 】

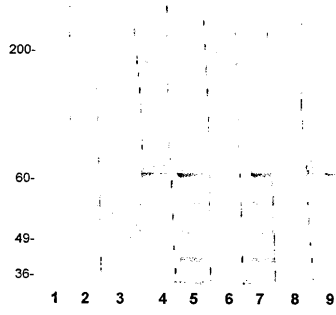


Figure 9

【 図 10 】

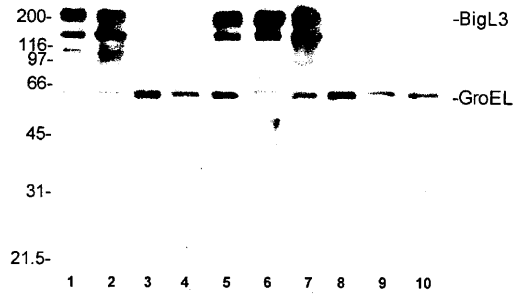


Figure 10

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/BR02/00072		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : G01N 33/53; C07K 17/00 US CL : 435/7.1, 7.2; 530/350, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.2; 530/350,				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	US 5,989,547 A (HAAKE) 23 November 1999 (23.11.1999), see entire document.	24-26 and 32-34		
X	US 5,091,301 A (ZUERNER) 25 February 1992 (25.02.1992), see entire document.	24-26 and 32-34		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 09 September 2003 (09.09.2003)		Date of mailing of the international search report 01 OCT 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for</i> Robert A. Zeman Telephone No. (703) 308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR02/00072

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.: 1-23 and 27-31
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Said claims recite or are dependent on claims reciting SEQ ID NO:s. No CRF has been filed with the instant application.
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/BR02/00072

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN, Medline, Biosis, Caplus, EAST
search terms: assay, detection, spirochete, BigL1, BigL2 and BigL3

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 14/20	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	N
	G 0 1 N 33/569	F

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 コー、アルバート、アイ。
ブラジル国、バイア、サルバドル、 セントロ デ レスキサス ゴンサロ モニス/フィオクル
ス、 ルア ワルデマール ファルカロ、 1 2 1
- (72) 発明者 ガルヴァオ レイス、ミテルマイヤー
ブラジル国、バイア、サルバドル、 セントロ デ レスキサス ゴンサロ モニス/フィオクル
ス、 ルア ワルデマール ファルカロ、 1 2 1
- (72) 発明者 ロサ クロダ、ジュリオ、ヘンリクス
ブラジル国、バイア、サルバドル、 セントロ デ レスキサス ゴンサロ モニス/フィオクル
ス、 ルア ワルデマール ファルカロ、 1 2 1
- (72) 発明者 シケイラ、イザドラ、クリスティーナ
ブラジル国、バイア、サルバドル、 セントロ デ レスキサス ゴンサロ モニス/フィオクル
ス、 ルア ワルデマール ファルカロ、 1 2 1
- (72) 発明者 ハーケ、デーヴィッド、エー。
アメリカ合衆国、カリフォルニア、ロサンゼルス、 スクール オブ メディシン オブ ユニバ
ーシティー オブ カリフォルニア
- (72) 発明者 マツナガ、ジェームズ
アメリカ合衆国、カリフォルニア、ロサンゼルス、 スクール オブ メディシン オブ ユニバ
ーシティー オブ カリフォルニア
- (72) 発明者 ライリー、リー、ダブリュー。
アメリカ合衆国、カリフォルニア、パークリー、 ユニバーシティー オブ カリフォルニア、デ
ィヴィジョン オブ パブリック ヘルス バイオロジー アンド エピデミオロジー
- (72) 発明者 バロッチ、ミシェル
アメリカ合衆国、カリフォルニア、ロサンゼルス、 ユニバーシティー オブ カリフォルニア、
ィヴィジョン オブ インфекションズ ディジーズ
- (72) 発明者 ヤング、トレーシー、アン
アメリカ合衆国、カリフォルニア、パークリー、 ユニバーシティー オブ カリフォルニア、ス
クンレイ ホール 4 2 9、 ディパートメント オブ モレキラー アンド セル

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 CA02 HA12
4B063 QA01 QQ08 QQ58 QR55 QS32
4C084 AA13 NA14 ZB351 ZB352
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 CC21 EE01 EE06
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA75 DA86 EA29 EA52

专利名称(译)	具有细菌免疫球蛋白样 (大) 重复结构域的蛋白质存在于钩端螺旋体物种中		
公开(公告)号	JP2006516083A	公开(公告)日	2006-06-22
申请号	JP2004505688	申请日	2002-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	丰达嫂奥斯瓦尔德克鲁兹流克鲁兹		
申请(专利权)人(译)	Fundasao奥斯瓦尔德克鲁兹 - Furokuruzu		
[标]发明人	コーアルバートアイ ガルヴァオレイスミテルマイヤー ロサクロダジュリオヘンリクス シケイライザドラクリスティーナ ハーケデーヴィッドエー マツナガジェームズ ライリーリーダブリュー バロッチミシエル ヤングトレーシーアン		
发明人	コー、アルバート、アイ、 ガルヴァオレイス、ミテルマイヤー ロサ クロダ、ジュリオ、ヘンリクス シケイラ、イザドラ、クリスティーナ ハーケ、デーヴィッド、エー、 マツナガ、ジェームズ ライリー、リー、ダブリュー、 バロッチ、ミシエル ヤング、トレーシー、アン		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/20 C07K16/12 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/569 C07H21/04 C12N1/21		
CPC分类号	A61P31/04 A61P37/04 C07H21/04 C07K14/20 C12Q1/689 Y02A50/56 A61K2039/505 C07K16/1207 C12Q1/68 G01N33/56911 G01N2469/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P31/04 C07K14/20 C07K16/12 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/CA02 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ58 4B063/QR55 4B063/QS32 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52		
代理人(译)	池田幸		
优先权	10/147299 2002-05-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及三种分离的DNA分子，其编码钩端螺旋体细菌中的蛋白质BigL1，BigL2和BigL3，其具有重复的细菌Ig样 (大) 结构域及其在诊断，治疗和疫苗应用中的用途。根据本发明，编码BigL1，BigL2和BigL3蛋白的分离的分子用于诊断和预防能够在人和其他哺乳动物中产生疾病的钩端螺旋体属的感染，包括具有兽医重要性的那些。

○ 表1. カエダアプラウ法で測定されたノボリス学識者及び知識人の血漿における抗IgM IgG IgM/IgG

○ 及びIgM抗体の検出

○ 1

対象者	血液検査			IgM/IgG			IgM/IgG			IgM/IgG
	陽性	陰性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性			
ノボリス学識者及び知識人の血漿										
全対象	52	37(71)	46(88)	48(92)	21(42)	21(42)	21(42)	38(73)		
対象者	52	19(37)	52(100)	52(100)	21(40)	21(40)	45(86)	46(88)		
ノボリス学識者及び知識人の家族										
全対象	14	6(42)	8(57)	9(64)	2(14)	2(14)	3(21)	8(57)		
対象者	14	7(50)	14(100)	14(100)	6(42)	5(36)	8(57)	8(57)		
健康者対照										
対象者(全)	30	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		
対象者(77歳以下)	40	0(0)	5(12)	5(12)	2(6)	0(0)	2(6)	2(6)		
対象者(77歳以上)	40	0(0)	10(25)	10(25)	4(10)	5(12)	8(20)	8(20)		
健康者対照										
子対象	15	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		
子対象	15	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		
VDRL陽性	20	0(0)	1(5)	1(5)	1(5)	0(0)	1(5)	1(5)		