

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 548**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2008 E 08834647 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **14.07.2010 EP 2205625**

54 Título: **Proteínas inmunogénicas de la membrana externa derivada de genoma de leptospira y composiciones y métodos basados en las mismas**

30 Prioridad:

**24.09.2007 US 974818 P**  
**28.09.2007 US 976088 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2013**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)**  
**395 PINE TREE ROAD SUITE 310**  
**ITHACA, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**CHANG, YUNG-FU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 395 548 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas inmunogénicas de la membrana externa derivada de genoma de leptospira y composiciones y métodos basados en las mismas.

## 1. CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a proteínas de membrana externa de *Leptospira* (OMPs = Outer Membrane Proteins) y a los anticuerpos dirigidos contra ellas. La invención también se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades, trastornos o desordenes provocados por un patógeno de *Leptospira* inmunogénico transportado por la sangre, que comprende administrar anticuerpos que se unen a OMPs. La invención además se refiere a métodos para utilizar OMPs de *Leptospira* como vacunas o antígenos de diagnóstico.

## 10 2. ANTECEDENTES

Las especies de *Leptospira* son una espiroqueta gram negativa, el agente causante de leptospirosis, una enfermedad zoonótica de mamíferos, caracterizada por fallo renal y hepático, aborto, uveitis, fallo reproductor, miocarditis, mastitis y hemorragia pulmonar (Kishimoto, et al. 2004. Leptospirosis misdiagnosed as pulmonary-renal syndrome. Am. J. Med. Sci. 328:1 16-120; Marotto, et al. 1999. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. Clin. Infect. Dis. 29:1561-1563; Seijo, et al. 2002. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerg. Infect. Dis. 8: 1004-1005; Trevejo, et al. 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. J. Infect. Dis. 178:1457-1463; Vinetz, J. M. 2001. Leptospirosis. Curr. Opin. Infect. Dis. 14:527-538).

Aunque hay 21 genomoespecies de *Leptospira*, la causa más común de leptospirosis entre el ganado, especialmente en ganado lechero en los E.U.A., es *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, y *L. interrogans* serovar Pomona (Talpada, M. D., N. Garvey, R. Sprowls, A. K. Eugster, and J. M. Vinetz. 2003. Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. Vector Borne Zoonotic Dis. 3: 141-147). M. Vinetz. 2003. Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. Vector Borne Zoonotic Dis. 3: 141-147). El ganado actúa como el hospedero de mantenimiento para esta infección y en ganado crónicamente infectado, las leptospiras persisten en los riñones y tracto genital, conduciendo a aborto (Ellis, W. A., and S. W. Michna. 1976. Bovine leptospirosis: demonstration of leptospire of the Hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf. Vet. Rec. 99:430-432; Ellis, W. A., J. J. O'Brien, D. G. Bryson, and D. P. Mackie. 1985. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar Hardjo infection. Vet. Rec. 117:101-104) y falla renal (Masri, S. A., P. T. Nguyen, S. P. Gale, C. J. Howard, and S. C. Jung. 1997. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. Can. J. Vet. Res. 61:15-20). Las especies de *Leptospira* también infectan a cerdos, caballos, perros y humanos (Palaniappan, R.U.M.; Ramanujam, S.; Chang, Y-F. (2007) Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. Curr. Opin. Infect. Dis. 20(3): 284-292). Los animales infectados también pueden sobrevivir en forma asintomático al excretar las espiroquetas en forma intermitente en la orina, afectando eventualmente a los otros animales sanos.

35 El diagnóstico de leptospirosis depende de una prueba serológica estándar, la prueba de aglutinación microscópica (MAT = Microscopic Agglutination Test). Sin embargo, MAT es consumidora de tiempo, laboriosa y carece de sensibilidad para detectar la infección en una etapa temprana. Pruebas serológicas para diagnóstico tales como ensayo de tiras reactivas, ensayo de hemaglutinación indirecta y ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay), son métodos alternos para rápido diagnóstico, pero solo pocos ensayos se han evaluados sistemáticamente con base en los títulos de MAT (Palaniappan, et al. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J. Med. Microbiol. 53:975-984). Esta información es crucial para muchos laboratorios de diagnóstico para elegir el ensayo conveniente para diagnóstico de leptospirosis.

45 Vacunas monovalentes o pentavalentes comercialmente disponibles proporcionan solo inmunidad a corto plazo y son ineficaces contra serovares de *Leptospira*. Recientemente, una nueva vacuna que contiene proteínas de células enteras del serovar Hardjo de *L. borgpetersenii* se ha encontrado que protege incluso la transmisión de infección de madre a feto en ganado (Ribeiro, M. A., C. C. Souza, and S. H. Almeida. 1995. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. J. Trop. Med. Hyg. 98:452-456; Smith, C. R., P. J. Ketterer, M. R. McGowan, and B. G. Corney. 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in cattle. Aust. Vet. J. 71:290-294). En forma notable, estas vacunas incrementan el título de anticuerpo contra antígenos leptospirales en animales, y este aumento no puede ser diferenciado por la prueba de aglutinación microscópica (MAT) estándar. Además, si estos animales vacunados también se someten a infección de otros serovares de *Leptospira*, es imposible distinguir vacunación de infección utilizando MAT.

55 Por lo tanto hay necesidad en la técnica para una vacuna para leptospirosis. Hay también necesidad por distinguir vacunación de leptospirosis de infección.

La cita o identificación de cualquier referencia en la Sección 2, o en cualquier otra sección de esta solicitud, no habrá de considerarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica previa para la presente invención.

**3. COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

- 5 La proteína de membrana externa de *Leptospira* (OMP) rLP1454 (SEQ ID NOS: 1-2), se proporciona, que puede servir como herramienta para desarrollar vacunas efectivas o métodos de diagnóstico para leptospirosis. En una modalidad, se proporcionan fragmentos de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores.
- Las propiedades antigénicas de OMP de *Leptospira* LP1454 pueden emplearse para crear, fabricar o mejorar vacunas. Vacunas, incluyendo pero no limitadas a vacunas de ADN, vacunas recombinantes y vacunas de epítipo de célula T con base en las OMPs anteriores, además se proporcionan. Métodos para producir estas vacunas, también se proporcionan.
- 10 En una modalidad, la vacuna se basa en la proteína de membrana externa de *Leptospira* (OMP) rLP1454 (SEQ ID NOS: 1-2)
- Se proporcionan métodos para utilizar los genes OMP de *Leptospira*, proteínas y anticuerpos, para técnicas de diagnóstico serológico.
- 15 Un plásmido también se proporciona que comprende un ADN recombinante que codifica una OMP LP1454 o un epítipo de su variante conservada, o un fragmento péptido inmunológicamente reactivo de la misma.
- También se proporciona un vector de expresión.
- También se proporcionan epítopos inmunogénicos de OMP de *Leptospira*, o un epítipo de una variante conservada de la misma, o un fragmento péptido inmunológicamente reactivo de la misma.
- 20 Se proporcionan métodos para utilizar el epítipo inmunogénico (por ejemplo, un epítipo de célula T) como una vacuna (o para mejorar una vacuna) para mamíferos, incluyendo pero no limitados a vacas, cerdos, perros, ovejas y caballos.
- También se proporcionan métodos para utilizar el epítipo inmunogénico (por ejemplo, un epítipo de célula T) como un antígeno de diagnóstico serológico. En un aspecto, el epítipo se reconoce específicamente por un anticuerpo.
- También se proporcionan formulaciones de vacuna para administración farmacológica.
- 25 Formulaciones de vacuna pueden ser formulaciones de vacuna de ADN, formulaciones de vacuna recombinante o formulaciones de vacuna de epítipo de célula T.
- También se proporcionan anticuerpos aislados y purificados de OMP de *Leptospira* LP1454, o a un epítipo inmunogénico (por ejemplo, un epítipo de célula T), epítipo de una variante conservada o su fragmento péptido inmunológicamente reactivo. Estos anticuerpos incluyen, pero no están limitados a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de enlace de epítipo de cualquiera de los anteriores.
- 30 En una modalidad, un anticuerpo aislado y purificado de la invención puede reconocer específicamente uno o más epítopos de *Leptospira* LP1454, o epítopos de una variante conservada o sus fragmentos péptido inmunológicamente reactivos.
- 35 El anticuerpo aislado y purificado a las OMPs de *Leptospira* anteriores, puede conjugarse con porciones, incluyendo pero limitadas a un agente dirigido, una etiqueta, un portador, una droga, una toxina y un soporte sólido.
- Un hibridoma o línea celular inmortalizada también se proporciona que secreta un anticuerpo monoclonal que pueda reconocer específicamente uno o más epítopos de *Leptospira* LP1454, o un epítipo de una variante conservada o su fragmento péptido inmunológicamente reactivo.
- 40 Se proporcionan métodos para producir anticuerpos que reconocen específicamente uno o más epítopos de *Leptospira* LP1454, o un epítipo de una variante conservada, o su fragmento péptido inmunológicamente reactivo.
- En una modalidad, el método puede comprender inmunizar un animal hospedero, por inyección con una proteína o péptido de OMP, en donde a proteína OMP es un péptido de *Leptospira* LP1454, (por ejemplo, uno que corresponde a un dominio funcional de la proteína), su polipéptido truncado (en donde uno o más dominios se han eliminado), su equivalente funcional o su mutante.
- 45 En otra modalidad, el método puede comprender producir un hibridoma o línea celular inmortalizada que produce un anticuerpo que reconoce específicamente uno o más epítopos de OMP de *Leptospira* LP1454, o epítopos de sus variantes conservadas o sus fragmentos péptido inmunológicamente reactivos.
- 50 Se proporcionan métodos para evitar un desorden relacionado a *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo

requiere, que comprende administrar una cantidad de una vacuna o un anticuerpo de la invención, suficiente para conferir inmunidad al desorden relacionado de *Leptospira* al sujeto.

5 Se proporciona un método para tratar un desorden relacionado a *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo requiere, que comprende administrar una cantidad de un anticuerpo de la invención, suficiente para inhibir o disminuir la actividad de un patógeno de *Leptospira*.

En una modalidad, el método comprende administrar una cantidad de una vacuna de la invención, suficiente para inhibir o disminuir la actividad del patógeno de *Leptospira*.

En otra modalidad, la cantidad de la vacuna de la invención administrada, es suficiente para conferir al sujeto inmunidad a infección de *Leptospira* o un desorden relacionado con *Leptospira*.

10 En otra modalidad, el método para tratar el desorden relacionado con *Leptospira* puede no involucrar la administración de anticuerpos o una vacuna de la invención a un sujeto. Por ejemplo, anticuerpos de la invención pueden emplearse para exterminar organismos infecciosos *in vitro*, en donde el uso pretendido eventual es combatir infección en animales o humanos.

15 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que liga inmunoespecíficamente a una OMP de *Leptospira* LP1454; y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento o derivado de un anticuerpo que liga inmunoespecíficamente a una OMP de *Leptospira* LP1454; el fragmento derivado que contiene el dominio de enlace del anticuerpo; y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Se proporcionan métodos para ensayar la presencia o actividad de una proteína LP1454, utilizando anticuerpos a proteína de membrana externa de *Leptospira* (OMP) LP1454, o sus fragmentos.

Se proporcionan métodos para diagnosticar un desorden relacionado a *Leptospira* en un sujeto, que comprende:

proporcionar uno o más anticuerpos a una proteína de *Leptospira* LP1454 o su fragmento;

recolectar del sujeto, una muestra de tejido o célula, por ejemplo, una muestra de sangre,

25 contactar la muestra con los anticuerpos; y

ensayar por la presencia o actividad de una proteína de LP1454 en una muestra utilizando anticuerpos para LP1454 de *Leptospira* o sus fragmentos;

en donde la presencia o actividad de una proteína de es indicativa de la presencia de un desorden relacionado a *Leptospira* en el sujeto.

30 Se proporcionan métodos para diagnosticar o cribar o tamizar la presencia de un desorden relacionado *Leptospira* en un sujeto que comprende medir el nivel de una actividad funcional de proteína LP1454 en una muestra derivada del sujeto, en donde una disminución en el nivel de proteína LP1454 o actividad funcional de proteína LP1454 en la muestra, respecto al nivel de proteína LP1454 o actividad funcional de proteína LP1454 encontrada en una muestra análoga que no tiene el desorden, indica la presencia de la enfermedad o desorden o una predisposición para desarrollar el desorden.

35 También se proporcionan métodos para supervisar la terapia utilizando anticuerpos de OMP de *Leptospira* LP1454 o sus fragmentos.

40 Métodos para utilizar proteína recombinante LP1454 como agente de diagnóstico, también se proporcionan. En una modalidad, una proteína LP1454 se utiliza en un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas cinético (KELA ELISA = kinetic enzyme-linked immunosorbent assay).

Se proporciona un equipo que comprende en uno o más recipientes, un anticuerpo de la invención que liga inmunoespecíficamente a una proteína de *Leptospira* LP1454, Lp1118, LP1939, MCEII, CADF-like1, CADF-like2, CADF-like3, Lp0022, LP1499, Lp4337, Lp328 o L21.

45 Se proporciona un equipo que comprende en uno o más recipientes, un vector de expresión que comprende un plásmido, en donde el plásmido comprende un ADN recombinante que codifica una OMP LP1454 o un epítipo de una variante conservada o su fragmento péptido inmunológicamente reactivo.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La presente invención se describe aquí con referencia a los dibujos acompañante, en donde caracteres de referencia similares denotan elementos similares a través de las diversas vistas. Habrá de entenderse que en algunos casos, diversos aspectos de la invención pueden mostrarse exagerados o agrandados para facilitar una

comprensión de la invención.

Figura 1. Homología de proteínas de invasión de células de mamífero de hipótesis de *Leptospira*. La secuencia superior es Mcell, una proteína tipo Mcel hipotética de *L. interrogans serovar Pomona*. Esta proteína fue renombrada "Mcell" (Lp0607, SEQ ID NOs: 7-8) para distinguirla de la Mcel de *L. interrogans serovar Lai* (secuencia media). La secuencia media es Mcel de *L. interrogans serovar Lai* (Número de Acceso GenBank AAN49254; SEQ ID NO: 12). La secuencia inferior son los aminoácidos 31-293 de Rv 1968, un Mce de *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 (Número de Acceso GenBank AE000516, SEQ ID NOS: 13-14). La secuencia superior, Mcell, tiene aproximadamente 30% de homología con la secuencia media, Mcel de *L. interrogans serovar Lai*, y aproximadamente 25-30% de homología con la secuencia inferior, Rv 1968, Mce de *Mycobacterium tuberculosis*. Ver Sección 6.1.3 para detalles.

Figuras 2A-2D. SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de 18 proteínas de membrana externa recombinante purificadas de *L. interrogans serovar Pomona*. La Figura 2A representa proteínas de fusión GST purificada de 18 proteínas recombinantes de *Leptospira* en geles SDS-PAGE que se tiñeron con azul brillante Coomassie R-250. Las Figuras 2B, C, y D indican inmunotransferencias de sondas de proteínas recombinantes purificadas con anticuerpos policlonales a GST, suero bovino de infección experimental e infección natural, respectivamente. Tamaño de normas (en kilodaltons) se indica a la izquierda. Pistas: 1, marcador estándar de peso molecular de proteína SDS-PAGE (Bio-Rad); 2, Lp11 18; 3, Lp1228; 4, Lp1404; 5, MCEI; 6, Lp2268; 7, LigBVT; 8, Lp1332; 9, Lp1965; 10, Lp1 192; 11, Lp1947; 12, LigCon; 13, LIPL32; 14, Lp1495; 15, Lp1939; 16, MCEII; 17, Lp2471; 18, Lp1931; 19, Lp1454. Ver Sección 6.1.3 para detalles.

Figuras 3A-B. Inmunogenicidad de proteínas de membrana externa recombinante (OMPs) de *Leptospira* a suero bovino de infección experimental y natural. <sup>a</sup>*L. interrogans serovar Grippityphosa*; <sup>b</sup>*L. interrogans serovar Canicola*; <sup>c</sup>*L. interrogans serovar Copenhagenii*; <sup>d</sup>*L. borgpetersenii serovar Hardjo*. 0=negativo, 1=débil, 2=fuerte. Ver Sección 6.1 para detalles.

Figura 4. Expresión de OMPs recombinante de *Leptospira*. OMPs se clonaron, expresaron y purificaron como proteínas recombinantes. OMPs recombinantes purificadas (1.5-2 µg) se sometieron a electroforesis SDS-PAGE. Tamaños específicos (en kilodaltons) se indican a la izquierda. Pistas: 1 y 11, marcador estándar de peso molecular de proteína SDS-PAGE (Bio-Rad); 2, Lp1118; 3, LP1228; 4, LP1404; 5, MCEI; 6, LP1965; 7, LP1332; 9, LP1947; 10, 2471; 11, LP1939; 12, MCEII; 13, LP1932; 14, LP1454. Ver Sección 6.2.3 para detalles.

Figura 5. Respuesta de anticuerpo IgG de suero de hamsters inmunizados-rMCE II, rLP1454 y rLP1118. Ver Sección 6.2.3 para detalles.

Figuras 6A-E. Secuencias de genes para OMPs de *Leptospira* CADF-like1, CADF-like2, CADF-like3, Lp0022, Lp1499, Lp4337, Lp328 y L21.

## 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporciona proteína de membrana externa (OMP) de *Leptospira* LP1454 que puede servir como herramienta para desarrollar vacunas efectivas o métodos de diagnóstico para leptospirosis. Las propiedades antigénicas de OMP de *Leptospira* LP1454 pueden utilizarse para crear, fabricar o mejorar vacunas. Vacunas, incluyendo pero no limitadas a vacunas de ADN, vacunas recombinantes y vacunas de epítipo de célula T, con base en las anteriores OMPs, se proporcionan adicionalmente. Métodos para producir estas vacunas también se proporcionan. También se proporcionan métodos para utilizar genes OMP de *Leptospira*, proteínas y anticuerpos para técnicas de diagnóstico serológico.

Por claridad de descripción, y no a manera de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones establecidas a continuación.

### 5.1 Identificación de proteínas inmunogénicas a partir de proteínas de membrana externa (OMPs) putativas derivadas de genoma de *Leptospira*.

Proteínas inmunogénicas de OMPs putativas derivadas de genoma de *Leptospira* pueden identificarse utilizando métodos estándar conocidos en la especialidad. Por ejemplo, suero de animal infectado experimentalmente, por ejemplo suero bovino o canino, puede prepararse de acuerdo con métodos estándar (por ejemplo, Surujballi, et al. 1997. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans serovar hardjo* antibodies in bovine sera. Can. J. Vet. Res. 61:260-266).

Animales infectados pueden ser identificados por la exhibición de síntomas clínicos o por la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) utilizando métodos conocidos en la especialidad. MAT puede llevarse a cabo como se describió previamente (Cole, J. R., Jr., H. C. Ellinghausen, and H. L. Rubin. 1979. Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. Proc. Annu. Meet. U S Anim. Health Assoc: 189- 195), con los antígenos de células enteras de serovares de interés.

Pueden recolectarse sueros utilizando métodos estándar, por ejemplo de la vena yugular y almacenarse a -20

grados C hasta uso.

ADN genómico de un serovar de *Leptospira interrogans*, por ejemplo serovar Pomona *L. interrogans*, puede prepararse utilizando métodos estándar conocidos en la especialidad, por ejemplo un DNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). Secuencias de nucleótidos que codifican un gen de OMP rLP1454 o sus porciones, pueden obtenerse por amplificación PCR de ADN genómico de *Leptospira*. Fuentes de ADN útiles, incluyen preparaciones de ADN y ADN clonado en bibliotecas de ADN. Preparaciones de ADN de membrana externa o bibliotecas, se prefieren particularmente.

ADN genómico puede ser amplificado utilizando técnicas de amplificación PCR estándar conocidas en la especialidad. Cebadores para amplificar y clonar genes de proteína de membrana externa putativos, por ejemplo secuencias específicas de serovar *L. interrogans*, pueden diseñarse sin las reacciones PCR. También es posible variar la severidad de condiciones de hibridación empleadas para cebar las reacciones PCR, para permitir mayores o menores grados de similitud de secuencia de nucleótidos entre los cebadores degenerados y las secuencias correspondientes en la biblioteca de ADNc. Una persona con destreza ordinaria en la especialidad sabrá que las condiciones y parámetros de amplificación apropiados dependen en parte de la longitud y composición base de los cebadores y que dicha condición puede ser determinado utilizando fórmulas estándar. Protocolos para ejecutar todos los procedimientos PCR aquí discutidos son bien conocidos por aquellos con destreza en la técnica, y pueden encontrarse en referencias tales como Gelfand, 1989, PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich, ed., Stockton Press, New York; and Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 15, Ausubel et al., eds. 1988, New York, Wiley & Sons, Inc.

Amplificación PCR puede llevarse a cabo utilizando métodos estándar, por ejemplo por uso de un ciclador térmico PCR automatizado estándar y una Taq polimerasa tal como Accuprime Taq polymerase (Invitrogen, CA). Se puede elegir el sintetizar cebadores apropiados para utilizar en las reacciones PCR. También es posible variar la severidad de condiciones de hibridación empleadas para cebar las reacciones PCR, para permitir mayores o menores grados de similitud de secuencia de nucleótidos entre los cebadores degenerados y las secuencias correspondientes en la biblioteca de ADNc. Una persona con destreza ordinaria en la especialidad sabrá que las condiciones y parámetros de amplificación apropiados dependen en parte de la longitud y composición base de los cebadores y que dicha condición puede ser determinado utilizando fórmulas estándar. Protocolos para ejecutar todos los procedimientos PCR aquí discutidos son bien conocidos por aquellos con destreza en la técnica, y pueden encontrarse en referencias tales como Gelfand, 1989, PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich, ed., Stockton Press, New York; and Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 15, Ausubel et al., eds. 1988, New York, Wiley & Sons, Inc.

La amplificación puede utilizar, como el cebador 5' (i.e., cebador hacia adelante), un oligonucleótido degenerado que corresponde a un segmento de una secuencia de aminoácidos conocida LP1454 (u otra secuencia de aminoácidos OMP actual o putativa conocida), de preferencia de la región amino-terminal. El cebador 3' (es decir, cebador reverso) puede ser un oligonucleótido degenerado que corresponde a un segmento distante de la misma secuencia de aminoácidos conocida LP1454 (es decir, carboxilo a la secuencia que corresponde al cebador 5').

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína LP1454 (SEQ ID NOS: 1-2; GenBank / No. de Acceso Base de Datos de Proteínas NCBI Entrez AAN48653; Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information), Biblioteca Nacional de Medicina (National Library of Medicine), Bethesda, MD 20894), puede emplearse para diseñar cebadores 5' y 3' útiles. De preferencia, los cebadores corresponden a segmentos en N-terminal de la proteína (ver Sección 6.1, Tabla 1).

La secuencia de la sonda oligonucleótido degenerada óptima correspondiente a una secuencia de aminoácidos conocida, puede determinarse por algoritmos estándar conocidos en la especialidad. Ver por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Vol 2 (1989).

Productos PCR pueden operarse utilizando métodos estándar conocidos en la especialidad, en un gel de agarosa al 1% y visualizarse por tinción con bromuro de etidio. Productos PCR pueden eluirse del gel utilizando un equipo de elución de gel (por ejemplo de Qiagen, Valencia, CA).

Una secuencia amplificada por PCR puede ser clonada y secuenciada molecularmente. Por ejemplo, amplificado con PCR puede clonarse en un vector, por ejemplo un vector TOPO TA, como se describe por el fabricante (Invitrogen, CA).

La secuencia amplificada puede utilizarse como una sonda para aislar clones genómicos (o ADNc) de un gen LP1454.

Secuenciado de ADN puede realizarse con un secuenciador de ácido nucleico automatizado estándar, por ejemplo un secuenciador de ácido nucleico automatizado ABI modelo 377. Búsquedas de homología pueden realizarse utilizando métodos de búsqueda estándar, por ejemplo BLAST, en las bases de datos NCBI (Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410).

El ADN genómico puede insertarse en vectores convenientes, incluyendo pero no limitados a plásmidos, cósmidos, bacteriófagos lambda o T4, y cromosoma artificial de levadura (YAC = yeast artificial chromosome) o virus atenuados (tales como virus Herpes). Ver, por ejemplo Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. Glover (ed.), DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Ltd., Oxford, U.K., Vols. I y II (1985).

La identidad de una secuencia de genes OMP putativos amplificados o clonados, puede verificarse al comparar las

5 secuencias de aminoácidos de sus marcos de lectura abiertos con la secuencia de aminoácidos del gen (por ejemplo polipéptido *Leptospira* LP1454), cuya secuencia de aminoácidos es substancialmente similar a la de la proteína o polipéptido LP1454. La identidad de la secuencia de genes OMP clonados o amplificados además puede verificarse al examinar su patrón de expresión, que habrá de mostrar expresión altamente localizada en la membrana externa de las especies de *Leptospira* de las cuales se aisló la secuencia de genes (e.g., secuencias de genes LP1454).

Búsquedas de homología pueden realizarse utilizando métodos de búsqueda estándar en la base de datos NCBI y BLAST (Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410).

10 Aunque las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas de OMP LP1454 aquí descritas pueden derivarse de serovar Pomona *L. interrogans*, las secuencias pueden derivarse de otro organismo, derivado de cualquier fuente recombinante, sintetizarse *in vitro* o por síntesis química. Los nucleótidos en las secuencias de polinucleótido pueden ser ADN o ARN y pueden existir en una forma de doble-hebras, hebra-sencilla o doble-hebra parcial.

15 Ácidos nucleicos también pueden prepararse por cualesquiera medios convencionales típicamente empleados para preparar ácidos nucleicos en una gran cantidad. Por ejemplo, ADN y ARNs pueden ser sintetizados químicamente utilizando reactivos y sintetizadores comercialmente disponibles por métodos que son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo Gait, 1985, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Inglaterra). ARNs pueden producirse con alto rendimiento mediante transcripción *in vitro* utilizando plásmidos tales como SP65 (Promega Corporation, Madison, WI).

20 Los ácidos nucleicos pueden ser purificados por cualesquiera medios convenientes, como son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden ser purificados por HPLC de intercambio de iones o fase inversa, cromatografía de exclusión de tamaño o electroforesis en gel. Por supuesto, la persona con destreza reconocerá que el método de purificación dependerá en parte del tamaño del ADN a purificar.

## 25 5.2 Sistemas de Expresión

Utilizando métodos estándar, insertos pueden ser sub-clonados en vectores de expresión, por ejemplo pGEX-KG (Stratagene), pRSETA (InVivoGen, CA), vector de virus de herpes atenuado, etc., utilizando métodos estándar conocidos en la especialidad, y transformados en *E. coli* (BL21 DE3 o CQ21).

30 En una modalidad, se proporciona un vector capaz de expresar un ADN recombinante. El ADN recombinante puede seleccionarse del grupo que consiste de:

un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y

35 un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores,

y en donde el ADN recombinante se inserta en el vector, de manera tal que una proteína recombinante se expresa cuando el vector se proporciona en un hospedero apropiado.

40 En sistemas bacterianos, una cantidad de vectores de expresión pueden seleccionarse ventajosamente dependiendo del uso pretendido para los OMPs expresados tales como producto LP1454.

45 Por ejemplo, cuando grandes cantidades de proteína LP1454 se van a producir para la generación de anticuerpos, puede ser conveniente cribar bibliotecas péptido o formular composiciones farmacéuticas, vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Estos vectores incluyen pero no están limitados al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), en donde la secuencia de codificación LP1454 puede ser ligada en el vector en cuadro con la región de codificación *lacZ* de manera tal que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509); y semejantes. Vectores pGEX también pueden emplearse para expresar polipéptidos exógenos como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST = glutatone S-transferase). En general, estas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción en perlas de glutatona-agarosa seguida por elución en la presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir trombina o sitios de ruptura de factor Xa proteasa, de manera tal que el polipéptido clonado de interés puede liberarse de la porción GST.

50 En una modalidad tal de un sistema bacteriano, se agregan secuencias de ADN de longitud íntegra con sitios encuadro *Bam*HI en el extremo amino y sitios *Eco*RI en el extremo carboxilo utilizando metodologías PCR estándar

(Innis et al., 1990, *supra*) y ligan en el vector pGEX-2TK (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Construcción de ADNc resultante contiene un sitio de reconocimiento cinasa en el extremo amino para etiquetado radioactivo y secuencias de glutatona S-transferasa en el extremo carboxilo para purificación de afinidad (Nilsson, et al., 1985, EMBO J. 4: 1075; Zabeau and Stanley, 1982, EMBOJ. 1: 1217).

- 5 Las construcciones recombinantes de la presente invención pueden incluir un marcador seleccionable para propagación de la construcción. Por ejemplo, una construcción a propagarse en bacterias, de preferencia contiene un gen de resistencia a antibióticos, tal como uno que confiere resistencia a canamicina, tetraciclina, estreptomycin o cloranfenicol. Vectores convenientes para propagar la construcción incluyen plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o virus, por nombrar unos cuantos.
- 10 Además, las construcciones recombinantes pueden incluir genes marcadores expresables en células, seleccionables o susceptibles a criba para aislamiento, identificación o seguimiento de células transformadas por estas construcciones. Marcadores seleccionables incluyen, pero no están limitados a genes que codifican marcadores visibles tales como proteína fluorescente verde (GFP) o aquellos que confieren resistencia a antibióticos, (por ejemplo, resistencia a canamicina o higromicina).
- 15 En levadura, una cantidad de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles pueden emplearse (Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13; Grant et al., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; and Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y., Vol. 152, pp. 673-684; and The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, 1982, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II).
- 20

Otro sistema de expresión alterna que puede emplearse para expresar LP1454 es un sistema de insecto. En un sistema semejante, virus de polihedrosis nuclear *Autografa californica* (AcNPV = Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) se emplea como un vector para expresar genes extraños o exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación rLP1454 puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo el gen polihedro) del virus y colocarse bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor poliedro). Inserción exitosa de la secuencia de codificación rLP1454 resultará en inactivación del gen polihedro y producción de virus recombinantes no ocluidos (es decir, virus que carecen del revestimiento de proteináceo codificado por el gen polihedro). Estos virus recombinantes se utilizan entonces para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en donde el gen insertado se expresa (por ejemplo, ver Smith et al., 1983, J. Viol. 46:584; Smith, patente de los E.U.A. No. 4,215,051).

25

30

En células hospederas de mamífero, puede utilizarse una cantidad de sistemas de expresión de base viral, tal como vector de virus de herpes atenuado o un adenovirus.

En casos en donde el adenovirus se utiliza como un vector de expresión, la secuencia de codificación LP1454 puede ligarse con un complejo de control de traducción/transcripción de adenovirus, por ejemplo el promotor tardío y secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma de adenovirus por la recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3), resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar LP1454 en hospederos infectados (e.g., See Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). En forma alterna, puede utilizarse un vector derivado del virus vaccinia, que típicamente hará uso del promotor vaccinia 7.5K (Ver, e.g., Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419; Mackett et al., 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927-4931). Vectores de expresión regulables tales como los vectores represibles de tetraciclina también pueden emplearse para expresar las secuencias de codificación en una forma controlada.

35

40

Señales de inicio específicas también pueden requerirse para traducción eficiente de secuencias de codificación insertadas LP1454. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En casos en donde todo el gen LP1454, incluyendo su propio codón de inicio y secuencias adyacentes, se inserta en el vector de expresión apropiado, pueden no requerirse señales de control de traducción adicionales. Sin embargo, en casos en donde solo se inserta una porción de la secuencia de codificación LP1454, deben proporcionarse señales de control de traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el cuadro de lectura de la secuencia de codificación LP1454 para asegurar traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión pueden mejorarse por la inclusión de elementos mejoradores de transcripción apropiados, terminadores de transcripción, etc. (ver Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

45

50

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedera que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto de gen en la forma específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, ruptura) de productos de proteína, pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospederas tienen mecanismos característicos y específicos para procesamiento post-traducción y modificación de proteínas. Líneas celulares apropiadas o sistemas hospederos

55



pueden seleccionarse para asegurar la modificación correcta y procesamiento de la proteína extraña o exógena expresada. Para este objetivo, podrán emplearse células hospederas eucarióticas que poseen la maquinaria celular para adecuado procesamiento de la transcripción primaria, glicosilación y fosforilación del producto de gen.

5 Para producción a largo plazo con alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan en forma estable la proteína LP1454 pueden someterse a ingeniería. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, células hospederas pueden transformarse con la secuencia de codificación LP1454 controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras y/o mejoradores, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción de ADN exógeno, células de ingeniería genética puede permitirse que crezcan por 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren en forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos, que a su vez pueden clonarse y someterse a expansión en líneas celulares. Este método puede ser empleado ventajosamente para ingeniería de líneas celulares que expresa la proteína LP1454. Estas líneas de células de ingeniería son particularmente útiles para cribar moléculas o drogas que afectan la función LP1454, LP1118, LP1939, MCEII, CADF-like2, CADF-like3, Lp1499, Lp4337, Lp328 o L21

Una cantidad de sistemas de selección pueden emplearse, incluyendo pero no limitados a genes de virus herpes simplex timidina cinasa (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy, et al., 1980, Cell 22:817) puede emplearse en células tk<sup>-</sup>, hgprt<sup>-</sup> o aprt<sup>-</sup>, respectivamente. También, puede emplearse resistencia de antimetabolito, como base para selección de *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); *neo*, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); y *hygro*, que confiere resistencia a los genes de higromicina (Santerre, et al., 1984, Gene 30: 147). Genes seleccionables adicionales incluyen *trpB*, que permiten que células utilicen indol en lugar de triptofano; *hisD*, que permite que células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047); *ODC* (ornitina decarboxilasa), que confiere resistencia al inhibidor ornitina decarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, *DFMO* (McConlogue L., 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) y glutamina sintetasa (Bebbington et al, 1992, Biotech 10:169).

Las características de expresión de un gen endógeno LP1454 dentro de una línea celular, planta o microorganismo, pueden modificarse al insertar un elemento regulatorio de ADN heterólogo en el genoma de una línea celular estable, planta o microorganismo clonado, tal que el elemento regulatorio insertado se enlaza operativamente con el gen endógeno LP1454. Por ejemplo, un gen endógeno que normalmente es "silencioso en sentido de transcripción", es decir, un gen LP1454 que normalmente no se expresa o se expresa solo a muy bajos niveles en una línea celular, planta o microorganismo, puede activarse al insertar un elemento regulatorio que es capaz de promover la expresión de un producto de gen normalmente expresado en esa línea celular, planta o microorganismo. En forma alterna, un gen endógeno silencioso en sentido de transcripción, puede activarse al insertar un elemento regulatorio promiscuo que trabaja a través de tipos celulares.

40 Un elemento regulatorio heterólogo puede insertarse en una línea celular estable, planta o microorganismo clonado, de manera tal que se enlaza operativamente con un gen endógeno LP1454 utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con destreza en la especialidad, tales como recombinante homólogo objetivo (por ejemplo, en Chappel, patente de los E.U.A. No. 5,272,071; Publicación PCT No. WO 91/06667, publicada en mayo 16, 1991).

### 5.3 Producción de proteínas y polipéptidos de membrana externa de *Leptospira*

45 Mientras que polipéptidos y péptidos OMP leptospirales, tales como polipéptidos y péptidos de LP1454 pueden sintetizarse químicamente (por ejemplo, ver Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y.) grandes polipéptidos derivados de LP1454 y proteínas de longitud íntegra pueden producirse ventajosamente por tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con destreza en la técnica para expresar secuencias de ácido nucleico.

50 Métodos que son bien conocidos por aquellos con destreza en la técnica pueden emplearse para construir vectores de expresión que contienen la secuencia de codificación LP1454 y señales de control de traducción/transcripción apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. (Ver, por ejemplo las técnicas descritas por Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). ARN capaz de codificar polipéptido LP1454 también puede sintetizarse químicamente (Gait, ed., 1984, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford).

Una variedad de sistemas de vector de expresión de hospedero puede utilizarse para expresar los productos de gen. Estos sistemas de expresión de hospedero representan vehículos en los cuales los productos de gen de interés pueden producirse y subsecuentemente recuperarse y/o purificarse del cultivo u organismo (utilizando métodos de

purificación bien conocidos por aquellos con destreza en la técnica), pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, exhiben la proteína LP1454 *in situ*.

5 Estos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos tales como bacteria (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriofago recombinante, ADN plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de proteína LP1454; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen las secuencia de codificación de proteína; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación de proteína; sistemas de células de plantas infectados con  
10 vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus mosaico de coliflor, CaMV; virus mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene las secuencias de codificación de proteína; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de virus vaccinia 7.5K; el promotor/mejorador de citomegalovirus; etc.).

Dependiendo del sistema de hospedero/vector utilizado, cualquiera de una cantidad de elementos de transcripción y traducción convenientes, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, pueden emplearse en el vector de expresión. Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, promotores inducibles tales como pL de bacteriófago  $\lambda$ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac; promotor citomegalovirus) y semejantes pueden  
20 emplearse; cuando se clonan en sistemas de células de insectos, promotores tales como el promotor de poliédrico de baculovirus pueden emplearse; cuando se clonan en sistema de células de plantas, promotores derivados del genoma de células de planta (por ejemplo, promotores de choque térmico; el promotor para la pequeña subunidad de RUBISCO; el promotor para la proteína de enlace de clorofila  $\alpha/\beta$ ) o de virus de plantas (por ejemplo, el promotor 35S RNA de CaMV; el promotor de proteína de revestimiento de TMV) puede emplearse; cuando se clonan  
25 en sistemas de células de mamífero, promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de virus de vaccinia 7.5 K) puede emplearse; cuando se generan líneas celulares que contienen múltiples copias de la secuencia de codificación LP1454, vectores basados en SV40-, BPV- y EBV pueden emplearse con un marcador seleccionable apropiado.

30 Una región de proteína puede considerarse "homóloga" a una segunda región de proteína cuando la secuencia de aminoácidos de la primer región es al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 75%, 80%, 90% o 95% idéntica, cuando se compara con cualquier secuencia en la segunda región de un número igual de aminoácidos que el número contenido en la primer región o cuando se compara con una secuencia alineada de la segunda región que se ha alineado por un programa de homología de computadora conocida en la técnica, por ejemplo, el programa BLAST descrito  
35 anteriormente.

#### 5.4 Expresión *in situ* de proteínas de membrana externa

El gen rLP1454 muestra expresión altamente localizada en la membrana externa de *Leptospira*. Estos patrones de expresión pueden evaluarse al utilizar métodos conocidos en la técnica estándar tales como hibridación Northern, hibridaciones *in situ* utilizando aislamiento de sondas antisentido de OMPs de las membranas externas, o por  
40 métodos estándar de etiquetado con inmunooro (ver por ejemplo, Matsunaga J, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol. 2003 Aug; 49(4):929-45.

#### 5.5 Identificación y Purificación de Proteínas

Una vez que se expresa una proteína recombinante, puede identificarse por ensayos con base en las propiedades físicas o propiedades funcionales del producto, incluyendo etiquetado radioactivo del producto seguido por análisis por electroforesis en gel, radioinmunoensayo, ELISA, bioensayos, etc.

Una vez que se identifica la proteína codificada, puede aislarse y purificarse por métodos estándar incluyendo cromatografía (por ejemplo, cromatografía líquida de alto desempeño, intercambio de iones, afinidad y cromatografía de columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para  
50 la purificación de proteínas. Las condiciones actuales empleadas dependerán en parte de factores tales como carga neta, hidrofobicidad, hidrofiliidad, etc., y serán aparentes para aquellos que tienen destreza en la técnica. Las propiedades funcionales pueden evaluarse utilizando cualquier ensayo conveniente, por ejemplo un ensayo para la capacidad en alterar la formación de raíz. Para la práctica de la presente invención, se prefiere que el polipéptido sea al menos 80% purificado de otras proteínas. Se prefiere más que sea al menos 90% purificado. Para  
55 administración *in vivo*, se prefiere que sea mayor a 95% purificado, y más preferiblemente mayor a 99%. Por ejemplo, proteínas recombinantes pueden expresarse y purificarse como sigue. Cultivos de crecimiento exponencial ( $OD_{600}=0.6$ ) de plásmido recombinante que alojan CQ21 o *E. coli* (BL21 DE3) pueden ser inducidos para sintetizar proteínas de fusión por metodos estandar utilizando isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG; Sigma, St.

Louis, MO.). Para cada proteína recombinante, un experimento piloto puede realizarse con un volumen de cultivo de 3 mL.

El peso molecular de la proteína recombinante expresada puede verificarse por análisis SDS-PAGE. SDS-PAGE puede realizarse utilizando métodos estándar (por ejemplo, Chang, Y. F., D. P. Ma, J. Shi, and M. M. Chengappa. 1993. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. *Infect. Immun.* 61:2089-2095). Proteínas recombinantes pueden cargarse en gel SDS-PAGE y teñirse con azul brillante Coomassie R-250 seguido por decoloración.

El cultivo en masa puede realizarse de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, en 500 mL de caldo LB con ampicilina (50  $\mu$ g/mL). Las bacterias pueden recolectarse por métodos estándar, por ejemplo, por centrifugación a 5,000 RPM por 30 min. Los precipitados o gránulos celulares pueden entonces lavarse y suspenderse en PBS seguido al pasar a través de una celda de presión French (por ejemplo, American Instrument).

Lisados pueden ser centrifugados utilizando métodos estándar a 8,000 xg por 30 min y los cuerpos de inclusión lavados y purificados utilizando métodos estándar (por ejemplo, Palaniappan, et al. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J. Med. Microbiol.* 53:975-984, Palaniappan, et al. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 70:5924-5930) con model prep cell (BioRad, CA).

Proteína purificada puede aislarse por diálisis a 4 grados C con PBS al cambiar PBS por al menos 4 veces. La proteína purificada puede concentrarse y liofilizarse (Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, F. Hassan, S. P. McDonough, M. Pough, S. C. Barr, K. W. Simpson, H. O. Mohammed, S. Shin, P. McDonough, R. L. Zuerner, J. Qu, and B. Roe. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J. Med. Microbiol.* 53:975-984). Proteína liofilizada puede suspenderse con PBS estéril y cuantificarse por el ensayo Bradford (Bio-Rad).

Proteínas recombinantes pueden separarse utilizando métodos estándar, por ejemplo, al correr SDS-PAGE seguido por transferencia sobre membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) en una Trans Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.) e inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia western). Por ejemplo, después de transferencia, la membrana puede bloquearse con TBS más albúmina de suero bovino al 1% (BSA) por 1 h. Antisueros pueden entonces diluirse en TBS-BSA e incubarse con la transferencia por 1 h. Después de tres lavados en TBS más Tween 20 al 0.1%, la transferencia puede incubarse por 1 hora con IgG antibovino de cabra 1:2,000 conjugado con fosfatasa alcalina (KPL). La transferencia puede lavarse tres veces como se describió anteriormente y revelarse con NBT/BCIP como se describe por Chang et al. (1995. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63:3543-3549).

La expresión de proteína recombinante también puede estimarse inmunológicamente por inmunoensayos tales como radioinmuno-precipitación, inmunoensayos enlazados con enzima y semejantes. Esto puede lograrse al utilizar un anticuerpo anti-OMP, por ejemplo, anticuerpo de proteína anti-LP1454.

Expresión del producto de proteína también puede estimarse utilizando técnicas analíticas tales como secuenciado de aminoácidos, que pueden lograrse por ejemplo, mediante degradación Edman o espectroscopía en masa en tandem, o por análisis de las masas de péptidos generadas por hidrólisis parcial del producto de proteína utilizando espectroscopía de masas. En la identificación de una proteína de interés (por ejemplo, una proteína LP1454) por espectroscopía de masas, a menudo será conveniente el separar la proteína de interés de otros constituyentes de proteína de la célula mediante electroforesis en gel bi-dimensional, hidrolizar parcialmente la proteína aislada utilizando una proteasa específica de aminoácido (por ejemplo, Lys-C, tripsina), y después determinar la masa de los fragmentos péptido resultantes utilizando espectroscopía de masas.

La determinación de la masa péptido puede entonces emplearse para identificar la proteína como LP1454, o una variante de la misma, utilizando una base de datos de las masas pronosticadas de productos de proteólisis de proteínas y soporte lógico de análisis tales como Protein Prospector, que está disponible al público en internet en <http://prospector.ucsf.edu>.

## 5.6 Anticuerpos a Proteínas y Polipéptidos de Membrana Externa

Anticuerpos que reconocen específicamente uno o más epítomos de proteína de membrana externa de *Leptospira* tal como LP1454, o epítomos de una variante conservadas, o su fragmento péptido, también se proporcionan. Estos anticuerpos incluyen, pero no están limitados a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de enlace de epítomo de cualquiera de los anteriores.

Un método para producir un anticuerpo también se proporciona, en donde el método comprende: (a) proporcionar un microorganismo en un cultivo que contiene un ADN que codifica un polipéptido de fusión que comprende al menos un epítomo de una OMP *Leptospira*, en donde OMP de *Leptospira* se elige del grupo que consiste de LP1454, ligado a un polipéptido que facilita el aislamiento del polipéptido de fusión; (b) cultivar el microorganismo en un cultivo para

producir el polipéptido de fusión; (c) aislar el polipéptido de fusión; (d) producir el anticuerpo del polipéptido. En una modalidad preferida, el polipéptido se retira de la porción de antígeno del polipéptido de fusión.

5 Un método para producir un anticuerpo monoclonal también se proporciona, que comprende: (a) proporcionar un microorganismo en un cultivo que contiene un ADN que codifica un polipéptido de fusión que comprende al menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* se elige del grupo que consiste de LP1454, ligado a un polipéptido que facilita el aislamiento del polipéptido de fusión; (b) cultivar el microorganismo en un cultivo para producir el polipéptido de fusión; (c) aislar el polipéptido de fusión; y (d) producir el anticuerpo monoclonal del polipéptido. De preferencia, el polipéptido se retira de la porción de antígeno del polipéptido de fusión.

10 En una modalidad, un anticuerpo aislado y purificado de la invención puede reconocer específicamente uno o más epítopos de OMP de LP1454 de *Leptospira*, o epítopos de variantes conservadas o sus fragmentos péptido inmunológicamente reactivos.

El anticuerpo aislado y purificado a la OMP de LP1454 de *Leptospira*, puede conjugarse con porciones incluyendo pero limitadas a agente blanco o dirigido, una etiqueta, un portador, una droga, una toxina y un soporte sólido.

15 Para la producción de anticuerpos, diversos animales hospederos pueden ser inmunizados por inyección con la proteína péptido OMP de interés tal como el péptido Lp1P1454 (por ejemplo, uno que corresponde a un dominio funcional de la proteína), un polipéptido truncado (en donde uno o más dominios se han eliminado), equivalentes funcional de la proteína o mutantes de la proteína. Estas proteínas, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión pueden prepararse y obtenerse como se describió anteriormente. Animales hospederos pueden incluir, pero no están limitados a, perros, vacas, ovejas, caballos, conejos, ratas y ratones, por nombrar unos cuantos.

20 Diversos adyuvantes pueden emplearse para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies hospederas, incluyendo pero no limitados a, Freund's (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, poliols plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de erizo de mar, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

25 Anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de los animales inmunizados.

30 Una línea celular inmortalizada o hibridoma también se proporciona, que secreta un anticuerpo monoclonal de la invención. Una línea celular inmortalizada o hibridoma puede producirse utilizando métodos conocidos en la técnica que producen un anticuerpo que reconoce específicamente uno o más epítopos de OMP de *Leptospira* LP1454, o sus fragmentos péptido inmunológicamente reactivos.

35 Anticuerpos monoclonales a polipéptidos o proteínas de membrana externa de *Leptospira*, tales como proteínas o polipéptidos LP1454, pueden prepararse al utilizar cualquier técnica que permite la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen pero no están limitadas a la técnica de hibridoma u originalmente descrita por Kohler and Milstein, (Nature, 1975, 256:495-497), la técnica de hibridoma de célula B humana (Kosbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., 80:2026-2030) y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo, pero no limitados a IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

40 Adicionalmente, anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden elaborarse utilizando técnicas de ADN recombinante estándar, están dentro del alcance de la invención. Un anticuerpo quimérico es una molécula en donde porciones diferentes se derivan de especies diferentes, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Ver, e.g., Cabilly et al., patente de los E.U.A. No. 4,816,567; y Boss et al., patente de los E.U.A. No. 4,816,397, que se incorporan aquí por referencia en su totalidad). Anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones de determinación de complementariedad (CDRs = complementarily determining regions) de especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Ver, por ejemplo, Queen, patente de los E.U.A. No. 5,585,089, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad). Estos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en la especialidad, por ejemplo utilizando métodos descritos en la Publicación PCT No. WO 87/02671; solicitud de patente Europea 184,187; solicitud de patente Europea 171,496; solicitud de patente Europea 173,494; Publicación de PCT No. WO 86/01533; patente de los E.U.A. No. 4,816,567; solicitud de patente Europea 125,023; Better et al. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cane. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; y Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4:214; patente de los E.U.A. No. 5,225,539; Jones et al.

(1986) Nature 321 :552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; and Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141 :4053-4060.

5 Con respecto a tratamiento de una especie particular, tal como anticuerpos de vaca (o perro), bovino completo (o canino), son particularmente convenientes para tratamiento terapéutico. Estos anticuerpos pueden producirse por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógenas, pero que pueden expresar genes de cadenas pesadas y ligeras bovinas (o caninas). Los ratones transgénicos se inmunizan en la forma normal con un antígeno selecto, por ejemplo todo o una porción de un polipéptido de la invención. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos rearreglan durante diferenciación de célula B, y subsecuentemente se someten a cambio de clase y mutación somática. De esta manera, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA y IgE terapéuticamente útiles. Para una generalidad de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, ver Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir estos anticuerpos, ver por ejemplo, la patente de los E.U.A. No. 5,625,126; patente de los E.U.A. No. 5,633,425; patente de los E.U.A. No. 5,569,825; patente de los E.U.A. No. 5,661,016; y patente de los E.U.A. No. 5,545,806. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA), pueden ser contactadas para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno selecto utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.

20 Estos anticuerpos completamente específicos de especie que reconocen un epítipo selecto, pueden generarse utilizando una técnica referida como "selección guiada". En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano selecto, por ejemplo un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente específico de especie, por ejemplo, bovino o canino, que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al (1994) Bio/technology 12:899-903).

25 En forma alterna, técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de los E.U.A. No. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334:544-546) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla contra proteína LP1454. Anticuerpos de cadena sencilla se forman al enlazar los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente aminoácido que resulta en un polipéptido de cadena sencilla.

30 Fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden ser generados por técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen pero no están limitados a: los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab, que pueden ser generados al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. En forma alterna, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab (Huse et al., 1989, Science, 246: 1275-1281) para permitir rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

35 Anticuerpos a una proteína y/o polipéptido LP1454 pueden a su vez utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" LP1454, utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con destreza en la especialidad. (Ver, e.g., Greenspan & Bona, 1993, FASEB J 7(5):437-444; and Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8):2429-2438).

### 5.7 Técnicas de Diagnóstico Serológico: KELA ELISA, Transferencia Western (Inmunotransferencias) y PCR

40 Proteína recombinante LP1454 utilizada como agente de diagnóstico, también se proporciona. Una técnica de diagnóstico en donde la OMP anterior puede utilizarse, es ensayo inmunosorbente ligado a enzima cinético (KELA ELISA) (Appel MJ, et al. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection, J Infect Dis. 1993 Mar; 167(3):651-64; Chang YF, et al., Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by Borrelia burgdorferi. Infect Immun. 1995 Sep; 63(9):3543-9). KELA mide los niveles de anticuerpo en suero de *Leptospira* que están presentes en una muestra de suero. En esta técnica de diagnóstico, se agrega suero diluido (dilución 1:100) a pozos duplicados en placas de microtitulación que contienen antígenos de la OMP de interés.

Antígenos pueden expresarse y purificarse utilizando métodos conocidos en la especialidad, por ejemplos los antígenos pueden ser expresados en *E. coli*, como se describe aquí en la Sección 6.

50 Los anticuerpos ligados después se detectan al utilizar anticuerpos secundarios, por ejemplo, anticuerpos cabra, anti-canino, bovino, equino o porcino, de especificidad de cadena pesada y ligera, conjugadas con peroxidasa de rábano picante (HRP). El desarrollo de color se ve y mide utilizando el cromógeno tetrametilbenzidina con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un substrato, que se mide en forma cinética y expresa como la pendiente de la velocidad de reacción entre la enzima y solución de substrato. Cada unidad de pendiente se designa como una unidad KELA. El punto de corte entre muestras positiva y negativa se confirma entonces por transferencia Western contra una muestra de prensa French, por ejemplo muestra de *Leptospira*.

55 Análisis de transferencia Western puede llevarse a cabo utilizando métodos conocidos en la especialidad (por ejemplo, Appel MJ, et al. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection, J Infect Dis. 1993 Mar; 167(3):651-64; Chang YF, et al., Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by Borrelia burgdorferi. Infect Immun. 1995 Sep; 63(9):3543-9). LP1454 recombinante puede emplearse como

antígeno y someterse a electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida de sodio (SDS- PAGE). Análisis de transferencia Western se realiza en un miniblottter. Sueros de prueba de animales experimentales se emplean como un primer anticuerpo, seguido por ejemplo por IgG de cabra anti-canino, bovino, equino, canino o porcino conjugado con HRP como un segundo anticuerpo. Se desarrollan bandas al utilizar substratos, tales como 24 µg de 4-cloro-1-naftol en 8 ml de metil alcohol, 40 ml de solución de amortiguador Tris y 24 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

Otras proteína recombinante LP1454 para técnica de diagnóstico, puede emplearse para diagnóstico PCR. El ADN de muestras de biopsia de riñón o de tejidos postmortem o sangre, se extrae por técnicas conocidas en la especialidad (Palaniappan RU, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. Mol Cell Probes. 2005 Apr; 19(2): 111-7. Epub 2004 Dec 15; Chang YF, et al. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun. 1995 Sep; 63(9):3543-9). Para evitar contaminación de las mezclas y muestras, extracción de ADN, amplificación y detección de productos PCR pueden realizarse en diferentes sitios, por ejemplo en diferentes habitaciones. Amplificación de secuencias objetivo específicas de rLP1454 pueden llevarse a cabo en una mezcla de reacción de 50-µl. Como un control positivo, ADN genómico de *Leptospira* puede emplearse. Como un control negativo, puede emplearse agua destilada.

La mezcla de reacción puede pasarse a través de ciclo de amplificación de ADN, por ejemplo 40 ciclos de amplificación utilizando un ciclador térmico de ADN automatizado. Cada ciclo involucra calentar la mezcla de reacción a 94 grados C. De 1 minuto, para provocar que el ADN se desnaturalice; enfriar la mezcla de reacción a 69 grados C por 1 minuto, para permitir que los cebadores se alineen; y después calentar la mezcla de reacción a 72 grados C por 2 minutos, para permitir que ocurra extensión de cebador. Electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1.5%, se realiza para obtener visualización de los productos de amplificación PCR.

### 5.8 Composiciones Farmacéuticas y Vacunas

Composiciones farmacéuticas y vacunas también se proporcionan. Estas composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica o vacuna de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno Federal o Estatal o citada en la Farmacopea de los E.U.A., u otra farmacopea generalmente reconocida para utilizar en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Estos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y semejantes. Agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra en forma intravenosa. Soluciones salinas y soluciones de glicerol y dextrosa acuosa pueden también emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos convenientes incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, glicerol monoestearato, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propilen glicol, agua, etanol y semejantes. La composición, si se desea también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y semejantes. La composición puede formularse como un supositorio, con tradicionales aglutinantes y portadores tales como triglicéridos. Formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos convenientes se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Estas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del agente Terapéutico, de preferencia en forma purificada, junto con una cantidad conveniente de portador a fin de proporcionar la forma para adecuada administración al paciente. La formulación deberá ajustarse al modo de administración.

En una modalidad preferida, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, composiciones para administración intravenosa, son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. La composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína, para reducir el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran ya sea por separado o mezclados en conjunto en forma de dosis unitaria, por ejemplo como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua, en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampollita o saquito que indica la cantidad del agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede surtirse como una botella de infusión que contiene salino o agua grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampollita de agua estéril para inyección o salino puede proporcionarse, de manera tal que los ingredientes puedan mezclarse antes de administración.

En una modalidad, una composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que liga inmunoespecíficamente a proteína de *Leptospira* LP1454; y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, una composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un

fragmento o derivado de un anticuerpo que liga en forma inmunoespecífica a una proteína de *Leptospira* LP1454; el fragmento o derivado que contiene el dominio de enlace del anticuerpo; y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, una composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de una vacuna de la invención; y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 Formulaciones de vacuna para administración farmacológica también se proporcionan. Formulaciones de vacuna pueden ser por ejemplo, formulaciones de vacuna de ADN, formulaciones de vacuna recombinante, o formulaciones de vacuna de epítipo de célula T.

El uso de anticuerpos aislados y purificados a OMP de *Leptospira* LP1454, para mejorar vacunas para mamíferos, incluyendo pero no limitados a vacas, cerdos, perros, ovejas y caballos, también se proporciona.

- 10 Vacunas y métodos para producir las vacunas que protegen a un mamífero contra un desorden o trastorno relacionado con *Leptospira*, se proporcionan. En particular, se proporciona una vacuna que produce inmunidad activa contra una infección de leptospirosis que contiene cuando menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454.

- 15 Se proporciona una vacuna de ADN que produce inmunidad activa contra una infección de leptospirosis que comprende un ADN que codifica cuando menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454.

- 20 Una vacuna para proporcionar inmunidad pasiva a una infección de leptospirosis también se proporciona. La vacuna puede comprender anticuerpos que se dirigen contra cuando menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* se elige del grupo que consiste de LP1454. Los anticuerpos pueden seleccionarse del grupo que consiste de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales contra al menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454. En una modalidad preferida de la vacuna, la vacuna se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptado.

- 25 Además, se proporciona una vacuna para inmunización activa de un mamífero contra una infección de leptospirosis. La vacuna puede comprender un antígeno que contiene al menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454. En una modalidad, el antígeno es un polipéptido recombinante producido en un plásmido en un microorganismo diferente a *Leptospira*, de preferencia en *E. coli*. En una modalidad preferida, la vacuna se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptado. En otra modalidad, el antígeno de OMP de *Leptospira* puede proporcionarse como un polipéptido de fusión en donde un extremo amino y/o un extremo carboxilo del antígeno se fusionan a todo o una porción de un polipéptido que facilita el aislamiento del antígeno del microorganismo en donde se produce el antígeno. En una modalidad preferida, el polipéptido se elige del grupo que consiste de glutatona S-transferasa, proteína A, proteína de enlace de maltosa y polihistidina.
- 30

- Una vacuna para proteger un mamífero contra infección de leptospirosis también se proporciona. La vacuna puede comprender un ADN que codifica cuando menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* OMP es LP1454. En una modalidad preferida, el ADN se enlaza operativamente a un promotor para permitir transcripción del ADN en una célula de mamífero. De preferencia, la vacuna se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptado.
- 35

Se proporcionan métodos para utilizar OMP de *Leptospira* LP1454 como vacuna (o para mejorar las vacunas) o como antígeno de diagnóstico serológico.

- 40 Se proporcionan métodos para producir vacunas de ADN, vacunas recombinantes, y vacunas de epítipo de célula T con base en OMP de LP1454.

- Un método para vacunar un mamífero contra una infección de leptospirosis, también se proporciona. En una modalidad, el método puede comprender: (a) proporcionar un antígeno recombinante de OMP de *Leptospira*, en donde la OMP es LP1454 y en donde la OMP se produce de un cultivo de microorganismo en donde el microorganismo contiene un ADN que codifica un antígeno de la OMP de *Leptospira*; y (b) vacunar el mamífero. De preferencia, la vacuna es en un portador farmacéuticamente aceptado.
- 45

- En una modalidad preferida del método, el antígeno recombinante es un polipéptido de fusión que se fusiona en el extremo amino y/o extremo carboxilo con un polipéptido que facilita el aislamiento del antígeno recombinante. En particular, el polipéptido puede ser todo o una porción del polipéptido seleccionado del grupo que consiste de glutatona S-transferasa, proteína A, proteína de enlace de maltosa y polihistidina. Además, el método puede comprender el producir el antígeno de un ADN que está en un plásmido en un microorganismo en donde el ADN se enlaza operativamente con un promotor que permite la transcripción del ADN para producir el antígeno recombinante para la vacuna.
- 50

- También se proporciona un método para vacunar un mamífero contra una infección de leptospirosis, en donde el método comprende: (a) proporcionar en una solución portadora, un ADN en un plásmido que codifica al menos un epítipo de OMP de *Leptospira*, en donde OMP de *Leptospira* es LP1454; y (b) vacunar al mamífero con el ADN en
- 55

la solución portadora. De preferencia, el ADN es en una solución portadora que es aceptado farmacéuticamente para vacunas ADN. En una modalidad preferida, el ADN se enlaza operativamente a un promotor para permitir transcripción del ADN en una célula de mamífero.

5 Un método además se proporciona para suministrar inmunidad pasiva a una infección de leptospirosis en un mamífero, que comprende: (a) proporcionar anticuerpos seleccionados del grupo que consiste de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales que se dirigen contra cuando menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454; y (b) inocular al mamífero. De preferencia, los anticuerpos se proporcionan en un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Además, se proporciona un método para producir un antígeno, en donde el método comprende: (a) proporcionar un microorganismo en un cultivo que contiene un ADN que codifica un polipéptido de fusión que comprende al menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454, y un polipéptido que facilita el aislamiento del polipéptido de fusión; (b) cultivar el microorganismo en un cultivo para producir el polipéptido de fusión; y (c) aislar el polipéptido de fusión.

15 En una modalidad, el polipéptido de fusión se aísla por cromatografía de afinidad que puede ser cromatografía de afinidad que comprende una resina enlazada a IgG cuando el polipéptido consiste de todo o una porción de proteína A, una resina Ni<sup>2+</sup> cuando el polipéptido es polihistidina, resina amilosa cuando el polipéptido es todo o parte de la proteína de enlace maltosa, o resina glutatona Sepharose 4B, cuando el polipéptido es todo o parte de glutatona S-transferasa.

20 Una vacuna para mamífero también se proporciona, que comprende una proteína recombinante asilada codificada por un ADNc producido de ARN de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454, y un portador de vacuna. En otra modalidad, la vacuna para un mamífero comprende un vector de virus recombinante que comprende ADN que codifica un epítipo de una OMP de *Leptospira*, cuando la OMP de *Leptospira* es LP1454, y un portador de vacuna. En otra modalidad, la presente invención comprende una vacuna de ADN para un mamífero que comprende un ADN que contiene plásmido que codifica un epítipo de una OMP de *Leptospira*.

25 También se proporciona un método para proteger a un mamífero contra una infección de leptospirosis, que comprende proporcionar una vacuna que cuando se inyecta en el mamífero, provoca que el mamífero produzca anticuerpos e inmunidad mediada por células contra un antígeno de OMP de *Leptospira*, en donde los anticuerpos evitan infección por el organismo de *Leptospira*. En particular, la vacuna comprende al menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454 en un portador de vacuna. Una vacuna además se proporciona que comprende un vector de virus recombinante que expresa el antígeno de OMP de *Leptospira*. La presente invención además en forma adicional proporciona una vacuna que comprende un plásmido de ADN que codifica el antígeno OMP de *Leptospira*.

30 La presente invención además comprende un anticuerpo monoclonal que liga selectivamente a cuando menos un epítipo de una OMP de *Leptospira*, en donde la OMP de *Leptospira* es LP1454.

35 Se proporcionan equipos que comprenden en uno o más recipientes, un anticuerpo de la invención que liga en forma inmuno-específica a proteína de *Leptospira* LP1454.

También se proporcionan equipos que comprenden en uno o más recipientes, una vacuna de la invención.

También se proporcionan equipos que comprenden en uno o más recipientes, un plásmido que comprende un gen de LP1454 en un vector de expresión.

#### 40 **5.8.1 Vacuna de ADN**

Una vacuna de ADN recombinante, se proporciona. En una modalidad, la vacuna de ADN comprende:

a) un ADN recombinante en donde el ADN recombinante se elige del grupo que consiste de:

un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

45 un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y

un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores; y

50 b) un vector capaz de expresar el ADN recombinante cuando el ADN recombinante se inserta en el vector, en donde el ADN recombinante se inserta en el vector de manera tal que se expresa una proteína recombinante cuando el vector se proporciona en un hospedero apropiado.

Una vacuna de ADN puede construirse al sub-clonar el gen de interés en un vector plásmido eucariótico. Vectores



candidatos pueden incluir, pero no están limitados a pcDNA3, pCI, VRI 012, y VR 1020, todos los cuales son vectores bien conocidos en la técnica. Esta construcción puede entonces emplearse como una vacuna.

pcDNA3 es bien conocido en la técnica como un vector de clonación y está comercialmente disponible de e.g., Invitrogen, Carlsbad, CA. pCI es bien conocido en la técnica como un vector de expresión de mamífero y e.g. está comercialmente disponible de, Promega Corporation, Madison, WI. Los vectores VR1012 y VR1020 son ambos conocidos en la técnica y están disponibles de Vical, San Diego, CA.

Una proteína LP1454 puede emplearse para crear una vacuna de ADN (revisado en Robinson, 1997). Además, cualquier porción inmunológicamente activa de esta proteína es un candidato potencial para la vacuna. Un plásmido que contiene uno de estos genes en un vector de expresión, se construye. El gen debe insertarse en la orientación correcta para que los genes se expresen bajo el control de promotores eucarióticos. Posibles promotores incluyen pero no están limitados al citomegalovirus (CMV) promotor temprano inmediato, el gen activador de plasminógeno de tejido humano (t-PA) (ver, por ejemplo Degen et al., 1986, J. Biol. Chem. 1986 May 25; 261(15):6972-85), y la región de promotor/mejorador del factor de elongación humano (EF-1  $\alpha$ ) (ver, e.g., Kim et al., Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system, Gene. 1990 Jul 16; 91(2):217-23; Uetsuki et al., Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. J. Biol. Chem. 1989 Apr 5; 264(10):5791-8). La orientación puede ser identificada por digestión de endonucleasa de restricción y secuenciado de ADN.

Expresión de estos productos de genes puede confirmarse por tinción inmunofluorescente indirecta de células COS transfectadas en forma transitoria, células CHO u otras células convenientes. El mismo plásmido sin estos genes se utiliza como un control. El ADN plásmido se transforma en *E. coli* DH5  $\alpha$ . El ADN puede purificarse utilizando métodos conocidos en la especialidad, por ejemplo por gradientes de cloruro de cesio, y la concentración puede determinarse por un protocolo estándar conocido en la especialidad (Nyika et al., 1998, A DNA vaccine protects mice against the rickettsial agent *Cowdria ruminantium*, Parasite Immunol. 1998 Mar; 20(3):111-9).

Una vez que se purifica el ADN, el vector que contiene el ADN inserto puede suspenderse en solución de salino amortiguado con fosfato e inyectarse directamente en los animales de prueba tales como perros o ganado. La inoculación en un músculo puede realizarse utilizando métodos estándar, con una aguja o en forma intravenosa. De manera alterna, una pistola genética puede emplearse para transportar perlas de oro revestidas con ADN en células utilizando métodos conocidos en la técnica, estándar (Fynan et al., 1993, DNA vaccines protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 1993 Dec 15; 90(24): 11478-82).

El hospedero inoculado puede expresar el ADN plásmido en sus células, y puede producir una proteína que eleva una respuesta inmune. Cada uno de los genes nuevamente identificados puede emplearse para crear una vacuna mediante esta técnica.

Moléculas CpG pueden emplearse como un adyuvante en la vacuna (Klinman et al., 1997, Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. J. Immunol. 1997 Apr 15; 158(8):3635-9). Los adyuvantes son materiales que ayudan a antígenos o incrementan la respuesta inmune a un antígeno. Los motivos consisten de un dinucleótido CpG no metilado flanqueado por dos 5' purinas y dos 3' pirimidinas. Oligonucleótidos que contienen motivos CpG se han mostrado que activan el sistema inmune, de esta manera reforzando una inmunorrespuesta específica de antígeno. Este efecto puede utilizarse al mezclar los oligonucleótidos CpG con la vacuna de ADN, o enlazar físicamente los motivos CpG al ADN plásmido utilizando técnicas estándar conocidas en la especialidad.

En una modalidad específica, se proporciona un método para producir una vacuna contra un desorden relacionado con *Leptospira* que comprende:

a) proporciona un ADN recombinante, en donde el ADN recombinante se elige del grupo que consiste de:

un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

un ADN recombinante que codifica una epitopo inmunogenico o fragmento inmunologicamente activo de la proteína anterior, y

un ADN recombinante que codifica una fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores;

b) proporcionar un vector capaz de expresar el ADN recombinante cuando el ADN recombinante se inserta en el vector; y

c) insertar ADN recombinante en el vector, en donde el ADN recombinante se inserta en el vector, de manera tal que la proteína recombinante se expresa cuando el vector se proporciona en un hospedero apropiado.

En una modalidad específica, se proporciona un método para producir una vacuna contra un desorden relacionado con *Leptospira* que comprende:

a) proporciona un ADN recombinante, en donde el ADN recombinante se elige del grupo que consiste de:

un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

5 un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y

un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores;

b) construir un vector de expresión que comprende un plásmido, en donde el plásmido comprende el ADN recombinante; y

10 c) inocular un hospedero con el vector de expresión, en donde el ADN recombinante se expresa en el hospedero para producir una proteína recombinante y en donde la proteína recombinante desarrolla una respuesta inmune en el hospedero.

### 5.8.2 Vacuna Recombinante

Se proporciona una vacuna recombinante. En una modalidad, la vacuna comprende:

15 una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se elige del grupo que consiste de:

una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y

un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores.

20 Para desarrollar una vacuna recombinante, un gen OMP, tal como LP1454, se subclona individualmente en vectores de sobre expresión, y después purifica para desarrollo de vacuna utilizando métodos conocidos en la técnica. La OMP de interés puede expresarse en un plásmido con un fuerte promotor tal como el promotor tac, T5, o T7. En forma alterna, fragmentos inmunológicamente activos de la OMP pueden emplearse en el desarrollo de una vacuna. Cada uno de estos genes puede subclonarse en un plásmido y transformarse en una cepa de *E. coli*, como se describió anteriormente.

25 La proteína recombinante puede ser sobre expresada, utilizando técnicas conocidas en la especialidad en un vector con un fuerte promotor. Vectores que pueden ser adecuados para utilizar en esta técnica incluyen pREST (Invitrogen Inc., Calif.), pK.K.233-3 (Farmacia, Calif.), y el sistema pET (Promega, Wis.), aunque puede emplearse cualquier vector con un fuerte promotor. Después de sobre expresión, las proteínas pueden ser purificadas y mezcladas con adyuvante. Adyuvantes potenciales incluyen, pero no están limitados a, hidróxido de aluminio Quil A o MONTANIDE®. Quil A es bien conocido en la especialidad como una forma altamente refinada de saponina, un producto bioquímico derivado de plantas que estimula tanto respuestas inmunes mediadas por células como humorales. MONTANIDE® es la marca registrada de los E.U.A. para una formulación específica para un emulsificador producido por la compañía Seppic (Paris, Francia). MONTANIDE® es bien conocido en la técnica por su uso como un adyuvante.

30 La forma purificada puede emplearse como inmunogeno para vacunar perros por técnicas conocidas en la especialidad (ver por ejemplo, Palaniappan RU, et al. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. Infect Immun. 2006, Mar; 74(3): 1745-50, incorporada aquí por referencia).

40 Brevemente, la proteína individual se expresa y purifica de *E. coli*. Después, animales de prueba, tales como perros o ganado, se inyectan intramuscularmente o en forma subcutánea con la vacuna recombinante purificada y adyuvante. Esta inyección puede producir una inmuno respuesta.

En una modalidad, un método para producir una vacuna contra un desorden relacionado con *Leptospira*, comprende:

45 a) proporciona un ADN recombinante, en donde el ADN recombinante se elige del grupo que consiste de:

un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y

50 un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%,

70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores;

b) proporcionar un vector capaz de expresar el ADN recombinante cuando el ADN recombinante se inserta en el vector;

c) insertar el ADN recombinante en el vector;

5 d) proporcionar una cepa bacteriana;

e) transformar el vector en la cepa bacteriana de manera tal que se exprese una proteína recombinante cuando el vector se transforma en la cepa bacteriana; y

f) cosechar la proteína recombinante de la cepa bacteriana.

En otra modalidad, se proporciona un método para producir una vacuna recombinante que comprende:

10 subclonar un gen LP1454 o una secuencia de ADN que codifica una porción inmunológicamente activa de una proteína LP1454 en un vector de sobre expresión,

expresar una proteína, péptido o fragmento inmunológicamente activo de LP1454; y

purificar la proteína, péptido o fragmento inmunológicamente activo expresado de LP1454.

### 5.8.3 Cartografía de Epítipo y Vacuna de Epítipo de Célula T

15 Citotoxicidad de células directa mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) es el mecanismo mayor de defensa contra patógenos intracelulares. Este linfocito efector elimina células infectadas al reconocer péptidos cortos asociados con las moléculas clase I MHC en la superficie celular. Antígenos exógenos entran a la ruta endosomal y se presentan a las células T CD4<sup>+</sup> en asociación con moléculas clase II, mientras que antígenos endógenamente sintetizados se presentan a células T CD8<sup>+</sup> en asociación con las moléculas clase I MHC.

20 *Leptospira* es un patógeno intracelular que reside en monocitos y macrófagos. Una respuesta CTL específica de *Leptospira* puede generarse, que puede eliminar el organismo de monocitos o macrófagos de animales infectados.

Para incrementar la respuesta protectora de una vacuna de proteína, un animal de prueba puede inmunizarse con epítipos selectivos de la proteína. El raciocinio que respalda esto es que una vacuna epítipo contiene los componentes epítipo inmunogénicos más relevantes sin las porciones irrelevantes. Por lo tanto, puede realizarse una búsqueda por las porciones más altamente antigénicas de las proteínas recientemente identificadas.

25 En una modalidad, se proporciona una vacuna epítipo de célula T. La vacuna epítipo de célula T puede comprender una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante comprende un epítipo de célula T, y en donde el epítipo de célula T comprende un fragmento péptido de aminoácidos de una proteína seleccionada del grupo que consiste de:

30 una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior y

un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores.

35 Para identificar epítipos de célula T de una OMP recientemente descubierta u OMP putativa, una mezcla electrónica inicial para secuencias homólogas por epítipos de célula T conocidos, se realiza utilizando métodos de búsqueda conocidos en la técnica estándar tales como búsqueda BLAST, en la base de datos NCBI.

40 En una modalidad, un epítipo de célula T consiste de o comprende un fragmento de una OMP de *Leptospira*, en donde se proporciona la OMP de *Leptospira* es LP1454. En una modalidad específica, se proporciona el epítipo de célula T consiste de al menos 10 aminoácidos (continuos) de la OMP de *Leptospira*. En otras modalidades, el fragmento consiste de al menos 20 o 50 aminoácidos de la proteína OMP de *Leptospira*. En modalidades específicas, estos fragmentos no son más grandes que 35, 100 o 200 aminoácidos. Derivados o análogos de epítipos de célula T OMP de *Leptospira* incluyen pero no están limitados a OMP aquellas moléculas que comprenden regiones que son substancialmente homólogas a epítipos de célula T OMP de *Leptospira* o sus fragmentos (por ejemplo, en diversas modalidades, al menos 60% o 70% o 80% o 90% o 95% de identidad sobre una secuencia de aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se comparan con una secuencia alineada en donde el alineamiento se realiza por un programa de homología por computadora conocido en la técnica) o cuyo ácido nucleico codificador es capaz de hibridizar a una secuencia epítipo OMP de *Leptospira* de codificación, bajo condiciones severas, moderadamente severas o no severas.

50 Además, puede llevarse a cabo extensa cartografía de epítipo de célula T. La OMP de LP1454 puede probarse para fragmentos péptido inmunogénicos. La cartografía de epítipos de célula T es bien conocida en la especialidad

(ver, e.g., Launois et al., 1994, T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy, *Infect Immun.* 1994 Sep; 62(9):3679-87; Lee and Horwitz, 1999, T-cell epitope mapping of the three most abundant extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in outbred guinea pigs, *Infect Immun.* 1999 May; 67(5):2665-70).

- 5 Brevemente, pueden sintetizarse secuencias péptido superpuestas cortas, (de 9-20 aminoácidos) sobre toda la longitud de la proteína en cuestión. Estos cortos fragmentos péptido pueden probarse utilizando vacas sanas, que pueden ser inmunizadas con la proteína de interés. Células mononucleares de sangre periférica de las vacas pueden probarse para propiedades estimuladoras de célula T y que inducen IFN- $\gamma$ . Aquellos fragmentos que producen la más fuerte respuesta pueden ser los candidatos preferidos para una vacuna de epítipo de célula T.
- 10 Una vez que se identifican los fragmentos que pueden hacer un epítipo preferido, se construye una adenilato ciclasa recombinante de *Bordetella bronchiseptica*, que transporta un epítipo de célula T CD8+ de *Leptospira*. La toxina adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella bronchiseptica* produce una respuesta inmune. Además, CyaA es bien adecuada para hacer blanco intracitoplásmico. Su dominio catalítico (AC), correspondiente a los 400 residuos aminoácidos N-terminales de la proteína de 1,706-residuos de largo, puede suministrarse a muchas células eucarióticas, incluyendo células del sistema inmune. También, la internalización de toxina es independiente de endocitosis mediada por receptor, sugiriendo que el dominio catalítico puede suministrarse directamente al citosol de células objetivo a través de la membrana citoplásmica.

La exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) es otra toxina que puede emplearse en este procedimiento para suministrar péptidos o proteínas en células (Donnelly et al., 1993, Targeted delivery of peptide epitopes to class I major histocompatibility molecules by a modified *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15; 90(8):3530-4).

Péptidos exógenos (16 residuos) se han insertado en diversos sitios del dominio AC de CyaA sin alterar su estabilidad o propiedades de enlace de calmodulina o catalíticas. De esta manera, la ingeniería de proteínas permite el diseño y suministro de antígenos que estimulan específicamente CTLs.

- 25 El gen de toxina adenilato ciclasa (AC) (*cya*) de *B. bronchiseptica*, se ha clonado. Un oligonucleótido de doble hebra sintético que codifica un epítipo de célula T clase I de 9 a 20 aminoácidos de LP1454 puede diseñarse utilizando métodos estándar de acuerdo con el uso del codón de *B. bronchiseptica*. Los oligonucleótidos complementarios pueden insertarse en la región hipervariable de la secuencia de codificación AC clonada de *cya*. Esta técnica se conoce en la especialidad en otros sistemas (ver, e.g., Sebo et al., 1995, Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8+ cytotoxic T cells, *Infect Immun.* 1995 Oct; 63(10):3851-7; Guermonprez et al., 1999, Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J. Immunol.* 1999 Feb 15; 162(4): 1910-6).

Plásmidos recombinantes que transportan el gen *cya* quimérico pueden secuenciarse utilizando métodos de secuenciado estándar para determinar el número de copia y orientación del epítipo insertado. Un plásmido con una copia completa del inserto que especifica el epítipo de célula T (CD8+) en la orientación correcta, puede seleccionarse de los plásmidos secuenciados. La capacidad de la nueva proteína quimérica para entrar a células eucarióticas, puede utilizarse en asegurar que se haga blanco intracelular de los epítipos (Fayolle et al., 1996, Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope, *J. Immunol.* 1999 Apr 1; 162(7):4157-62).

- 40 Una vacuna puede ser creada en varias formas. Por ejemplo, una proteína quimérica recombinante puede ser purificada y utilizada para inocular animales de prueba, por ejemplo, perros o vacas. En forma alterna, una cepa de *B. bronchiseptica* atenuada que transporta un gen epítipo de célula T o un gen LP1454 por inserción en cuadro en adenilato ciclasa, puede crearse por intercambio alélico como se conoce en la técnica (Cotter PA and Miller JF. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 1994 Aug; 62(8):3381-90).

En una modalidad específica, se proporciona un método para producir una vacuna de epítipo de célula T que comprende:

- a) proporcionar una proteína recombinante que comprende un epítipo de célula T, en donde el epítipo de célula T comprende un fragmento péptido de aminoácidos y una proteína seleccionada del grupo que consiste de:
- 50 una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP 1454),  
un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y  
un fragmento de proteína de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la longitud de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores;
- b) identificar el epítipo de célula T de la proteína;

c) insertar ADN que codifica el epítipo de célula T en una construcción capaz de expresar el epítipo de célula T como una proteína; y

d) recolectar la proteína.

5 Finalmente, protección contra infección de leptospirosis en animales de prueba, por ejemplo perros, vacas, cerdos o caballos, que se vacunaron con la proteína quimérica de adenilato ciclasa -LP1454 puede ser determinada. Utilizando métodos estándar, ACs y CyAs de tipo silvestre y recombinantes, pueden diluirse a concentraciones de trabajo en PBS y la proteína quimérica puede inyectarse en los animales de prueba, por ejemplo perros o vacas, ya sea en forma intramuscular o subcutánea. En forma alterna, el epítipo de célula T puede insertarse en el gen de adenilato ciclasa de una cepa *B. bronchiseptica* atenuada en cuadro, y los animales de prueba subsecuentemente vacunados o inoculados con bacterias vivas.

15 Antígenos recombinantes son candidatos promisorios para vacunación de humanos y animales contra diversos patógenos. Sin embargo, una seria desventaja es la deficiente inmunogenicidad de antígenos recombinantes en comparación con antígenos nativos. Un reto principal en el desarrollo de una nueva vacuna recombinante, por lo tanto es tener un nuevo sistema adyuvante que aumenta la inmunogenicidad de antígenos. Citoquinas o citocinas son moléculas inmunoregulatorias poderosas. Las citocinas que pueden emplearse como adyuvantes, incluyen pero no están limitadas a IL-12 (interleucina-12), GM-CSF (factor de estímulo de colonia de macrófago-granulocito), IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ) y  $\gamma$ -IFN (gamma interferona).

20 Estas citocinas pueden tener efectos secundarios negativos incluyendo síntomas pirogénicos y/o pro-inflamatorios en el hospedero vacunado. Por lo tanto, para evitar los efectos secundarios de una proteína de citocina entera, un enfoque alterno puede ser utilizar fragmentos péptidos sintéticos con las propiedades inmunoestimuladoras deseadas. La secuencia nonapéptido VQGEESNDK (SEQ ID NO: 15) de la proteína IL-1 $\beta$  está dotada con propiedades de immuno-mejora poderosas, y se discute aquí para ilustrar el uso de una citocina para incrementar la inmunogenicidad.

25 Este nonapéptido puede insertarse en la OMP, por ejemplo una proteína LP1454 y su inmunogenicidad puede ser comparada con la de la proteína nativa. Según se reporta, la inserción de esta secuencia en un antígeno recombinante deficientemente inmunogénico, aumenta la posibilidad de una respuesta inmune protectora fuerte después de vacunación. Este péptido puede mejorar la immuno respuesta *in vivo* tanto contra antígenos dependientes de T como independientes de T. La secuencia bovina IL-1 $\beta$ , puede imitar muchas actividades inmunomoduladoras de toda la molécula de IL-1 $\beta$  mientras que aparentemente carece de muchas de sus propiedades pro-inflamatorias indeseables. Esta estrategia puede emplearse para incrementar la inmunogenicidad de los antígenos de OMP.

30 La eficacia de las proteínas recombinantes como vacunas, puede probarse en ganado, cerdos, caballos o perros. La proteína purificada puede inyectarse, por ejemplo en forma intraperitoneal en el animal de interés.

35 Por ejemplo, cuando se prueba la eficacia de la proteína recombinante como vacuna en perros, pueden emplearse perros específicos libres de patógenos (SPF = specific pathogen free). Los perros SPF pueden dividirse en cinco grupos: a un grupo se le puede dar adenilato ciclasa recombinante de epítipos de célula T CD8+ que transportan *Bordetella bronchiseptica* derivados de LP1454, a un grupo se le da adenilato ciclasa recombinante de *Bordetella bronchiseptica* como un control, a un grupo se le puede dar la proteína LP1454 más un inserto IL-1 $\beta$  163-171 bovino, un grupo se le puede dar un epítipo de célula T derivado de LP1454 solo, y al último grupo se le puede dar PBS como un control negativo.

40 Los animales pueden ser vacunados utilizando métodos estándar conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Chang, Y.-F. et al. 1995. Recombinant OspA Protects Dogs against Infection and Disease Caused by *Borrelia burgdorferi*, Infection and Immunity 63 (9): 3543—3549).

45 Por ejemplo, los perros pueden ser vacunados dos veces (por ejemplo 30-40  $\mu$ g para cada vacunación). Los perros pueden ser expuestos 21 días después de la última vacunación con una cepa virulenta de *Leptospira spp.*. El día cinco posterior a la exposición, puede recolectarse aproximadamente 1 ml de sangre de cada perro en un tubo EDTA. Si los grupos vacunados eliminan el organismo en comparación con el grupo de control, puede probarse por cultivo estándar y métodos PCR.

50 La amplificación del producto de gen puede realizarse utilizando métodos estándar conocidos en la especialidad. Por ejemplo, dos cebadores derivados de los genes clonados, pueden ser utilizados para amplificar el producto de gen de los tejidos o muestras de sangre de estos perros. El cebador interno también puede diseñarse para utilizar como una sonda oligonucleótido para hibridizar el producto de gen PCR.

### 5.9 Métodos para prevención y tratamiento de un desorden relacionado a *Leptospira*

55 Un método se proporciona para evitar un desorden relacionado con *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo requiere, que comprende administrar una cantidad de anticuerpo de la invención, suficiente para conferir al sujeto inmunidad al desorden relacionado con *Leptospira*.

También se proporciona un método para evitar un desorden relacionado con *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo requiere, que comprende administrar una cantidad de una vacuna de la invención, suficiente para conferir inmunidad al sujeto al desorden relacionado a *Leptospira*.

5 También se proporciona un método para tratar un desorden relacionado a *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo requiere, que comprende administrar una cantidad de un anticuerpo de la invención, suficiente para inhibir o disminuir la actividad del patógeno de *Leptospira*.

En una modalidad, el método comprende administrar una cantidad de una vacuna de la invención, suficiente para inhibir o disminuir la actividad del patógeno de *Leptospira*.

10 En otra modalidad, la cantidad de la vacuna de la invención administrada, es suficiente para conferir inmunidad al sujeto a la infección de *Leptospira* o un desorden relacionado a *Leptospira*.

En otra modalidad, el método para tratar el desorden relacionado a *Leptospira* puede no involucrar administración de anticuerpos o una vacuna de la invención a un sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden emplearse para exterminar organismos infecciosos *in vitro* en donde el uso pretendido eventual es combatir infección en animales o humanos.

## 15 5.10 Métodos para ensayo, diagnóstico y supervisión de terapia

Se proporcionan métodos para ensayar la presencia o actividad de una proteína LP1454 utilizando anticuerpos de OMP de *Leptospira* LP1454 o sus fragmentos.

Se proporcionan métodos para diagnóstico de un desorden relacionado a *Leptospira* en un sujeto, que comprenden: proporcionar uno o más anticuerpos a un OMP de *Leptospira* LP1454 o su fragmento;

20 recolectar una muestra de tejido o de célula, por ejemplo una muestra de sangre, del sujeto,

poner en contacto la muestra con los anticuerpos; y

ensayar la presencia o actividad de una proteína LP1454 en la muestra utilizando anticuerpos a la OMP o su fragmento;

25 en donde la presencia o actividad de una proteína de LP1454 es indicativa de la presencia de un desorden relacionado a *Leptospira* en el sujeto.

Se proporcionan métodos para diagnóstico o criba por la presencia de un desorden relacionado a *Leptospira* en un sujeto, que comprende medir el nivel de una proteína o actividad funcional de proteína de LP1454 en una muestra derivada del sujeto, en donde una disminución en el nivel de proteína o actividad funcional de proteína LP1454 en la muestra, respecto al nivel de proteína o actividad funcional de proteína LP1454 que se encuentra en una muestra análoga que no tiene el desorden, indica la presencia de la enfermedad o desorden o una predisposición para desarrollar el desorden.

También se proporcionan métodos para supervisar terapias utilizando anticuerpos a OMP de *Leptospira* LP1454 o sus fragmentos.

35 Métodos para utilizar proteína recombinante LP1454 como agente de diagnóstico, también se proporcionan. En una modalidad, una proteína LP1454 se utiliza en un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima cinético (KELA ELISA = kinetic enzyme-linked immunosorbent assay).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera de ilustración y no a manera de limitación.

## 6. EJEMPLOS

40 **6.1 Ejemplo 1: Identificación de proteínas inmunogénicas de membrana externa putativa derivada de genoma de *Leptospira***

### 6.1.1 Introducción

Estudio de proteínas de membrana externa (OMPs) de *Leptospira* puede ayudar a comprender el modo de infección de *Leptospira*, ya que *Leptospira* utiliza extensamente proteínas de membrana durante la infección. Ya que las leptospiros sobreviven fuera así como dentro del hospedero, algunas OMPs se regulan en forma diferencial, por ejemplo se reduce la expresión de lipoproteína LipL36 mientras que se favorece la expresión de la proteína Lig durante infección (Matsunaga, J., M. A. Barocchi, J. Croda, T. A. Young, Y. Sanchez, I. Siqueira, C. A. Bolin, M. G. Reis, L. W. Riley, D. A. Haake, and A. I. Ko. 2003. Las especies de *Leptospira* patogénicas expresan proteínas expuestas en superficie que pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulina bacteriana. Mol. Microbiol. 49:929-945, Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, S. S. Jusuf, S. Artiushin, J. F. Timoney, S. P. McDonough, S. C. Barr, T. J. Divers, K. W. Simpson, P. L. McDonough, and H. O. Mohammed. 2002. Cloning and molecular characterization of

an immunogenic Lig A protein of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 70:5924-5930).

Por lo tanto, la identificación de proteínas de membrana externa que se expresan solamente durante infección, puede ayudar en desarrollar reactivos de diagnóstico para leptospirosis. 15 proteínas de membrana externa putativas de *Leptospira* que no muestran homología significativa con otros organismos en la base de datos NCBI, fueron seleccionadas al azar de las secuencias genómicas disponibles de *Leptospira* y expresaron como proteínas de fusión GST en *Escherichia coli*. Proteínas de membrana externa putativas recombinantes purificadas, junto con región conservada recombinante de LigA y B, región variable de LigB y LipL32, se evaluaron por análisis de inmunotransferencia con sueros bovinos de animales infectados en forma natural, infectados en forma experimental y sanos. Excepto por la proteína recombinante ("r"), rLA1947, todas las proteínas de membrana externa recombinantes (OMPs) mostraron reactividad con sueros bovinos infectados en forma experimental. Sin embargo, reactividad variable de OMPs se encontró con sueros de infección natural. Sin embargo, rLP1939 y rMCEII mostraron reactividad consistentemente fuerte a todos los animales infectados en forma natural, independientemente del título de MAT indicando que estas proteínas inmunogénicas de *Leptospira* pueden servir como herramientas de diagnóstico efectivas o vacunas para leptospirosis.

Investigamos la expresión e inmunogenicidad de proteínas de membrana externa putativas derivadas de genoma para el desarrollo de reactivos de diagnóstico efectivos y/o proteínas recombinantes/vacuna de ADN para leptospirosis. Seleccionamos 15 proteínas de membrana externa que no muestran homología significativa con otras proteínas en la base de datos NCBI y las expresamos como proteínas de fusión GST en *E. coli*. Análisis antigénico de las OMPs recombinantes purificadas, junto con región conservada de LigA y B y región variable de LigB y LipL32, se evaluaron por inmunotransferencia con sueros de ganado naturalmente y experimentalmente infectado. Los datos indican que rLP1939 y rMcell ilustran reactividad consistentemente más fuerte con muestras de suero infectadas, indicando que estas proteínas pueden servir como antígenos de diagnóstico efectivos para leptospirosis.

### 6.1.2 Materiales y Métodos

**Cepas y crecimiento bacteriano.** *L. interrogans serovar Pomona* (NVSL 1427-35- 093002) se empleó en este estudio. Se desarrollaron *Leptospiras* en medio EMJH a 30 grados C. El crecimiento se supervisó por microscopía en campo oscuro.

**Antisueros.** Sueros bovinos infectados en forma experimental a serovares Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa and Hardjobovis se describieron previamente (Surujballi, O. P., R. M. Marenger, M. D. Eaglesome, and E. A. Sugden. 1997. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans serovar hardjo* antibodies in bovine sera. Can. J. Vet. Res. 61:260-266). Animales infectados fueron identificados por exhibición de síntomas clínicos y MAT. Sueros bovinos infectados en forma natural se obtuvieron de New York State Animal Health Diagnostic Center en Cornell University (Ithaca, NY) de animales que probaron positivos para infección leptospiral por MAT. Sueros bovinos de control negativos se obtuvieron de animales sanos, utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Todos los sueros se recolectaron de la vena yugular y almacenaron a -20 grados C hasta utilizarse.

**Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).** MAT se llevó a cabo como se describió previamente (Cole, J. R., Jr., H. C. Ellinghausen, and H. L. Rubin. 1979. Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. Proc. Annu. Meet. U S Anim. Health Assoc: 189-195) con los antígenos de células enteras de los siguientes serovares: Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Canicola, Autumnalis y Bratislava.

**Clonación y expresión de OMPs leptospirales.** Cebadores para los genes de proteína de membrana externa putativos se diseñaron sin las secuencias de señal utilizando métodos estándar conocidos en la especialidad y se citan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores empleados para amplificar y clonar secuencias específicas de *L. interrogans serovar*

Gen No. <sup>a</sup>	Número de Acceso GenBank	SEQ ID NO:	Secuencias Cebadoras <sup>c</sup>	Peso mol Calc. (kDa)	Par base (bp)
LP1118	AAN48316	16 17	CGCGGATCCACGTTAGGCAACT CCGCTCGAGTTAGTTTTGTTT	34.8	873
LP1228	AAN48427	18 19	CGCGGATCCAATCCGATAACGAAT CCGCTCGAGTTAATGATATTCGTTTT	23	507
LP1404	ANN48603	20 21	CGCGGATCCAGAGTTCCTTTTTTTT CCGCTCGAGTTAAGGAACGTTT	43	1100
MCEI LP2025	AAN49254	22 23	TTTGGATCCGCGATTACCGTA CTTCTCGAGTTAAAAGCACTT	27	753

ES 2 395 548 T3

Gen No. <sup>a</sup>	Número de Acceso GenBank	SEQ ID NO:	Secuencias Cebadoras <sup>c</sup>	Peso mol Calc. (kDa)	Par base (bp)
LP2268	AAN49267	24 25	CGCGGATCCCCGACTTAAATGT CCGCTCGAGTCAAAGTATCGAAT	50	1056
LigBVT	AF534640	26 27	CGCGGATCCGTCAATAACAACATTG C CCGCTCGAGTTGGTTTCCTTTTACG TT	66	1500
LP1332	AAN48531	28 29	CGCGGATCCATGTTGTTACAC CCGCTCGAGCTACTGAGAAATCTTT	36	984
LP1965	AAN49164	30 31	CGCGGATCCTCTCCCGAATGG CCGCTCGAGTTATCTCGTATCAAA	28	~710
LP1192	AAN48391	32 33	CGCGGATCCATAGTACGTTAAAA CCGCTCGAGTAAAAACTGTGGGA	59.5	~1500
LP1947	AAN49146	34 35	CGCGGATCCCAATCAAAATCGGC CCGCTCGAGTTAATCCTCTAAATCT	45	1140
LigCon	AF534640	36 37	TCCCCCGGGGCTGGCAAAAAGA CCCTCGAGAATATCCGTATTAGA	66	1797
LP2637 LIPL32	AAN49836	38 39	AGGGGAATTCTATGAAAACTTTCG AT CCCTCGAGCTTAGTCGCGTCAG	32	900
LP1495	AAN48694	40 41	CGCGGATCCGATCAGATCAACTT CCGCTCGAGTTAATTTTGTTT	37.5	921
LP1939	AAN49138	42 43	CGCGGATCCTGCAAACAAGAT CGCCTCGAGTTATTGAGAAGCGTAT	17	411
MCEII LP0607	AAN47806	44 45	CGCGGATCCGAAAAGCCGGAA CCGCTCGAGTTATAACTTTCCGAAA T	25	718
LP2471	AAN49670	46 47	CGCGGATCCTTCCAGAAATTTCT CCGCTCGAGTTAATAATATCTTTGT	37.5	909
LP1931	AAN49130	48 49	CGCGGACCATTGCACAAATC CCGCTCGAGTCAAAGAGCAAACCTT	42	~1100
LP1454	AAN48653	50 51	CGCGGATCCGAAGAAAGATCCT CCGCTCGAGTCATCTTTTATCTTT	42	981
<sup>a</sup> Números de genes son de GenBank y <a href="http://www.chgc.org.cn/">http://www.chgc.org.cn/</a> <sup>b</sup> For, hacia adelante; Rev, reverso <sup>c</sup> Citado 5' a 3' <sup>d</sup> N indica que no hay ubicación confirmada en el genoma de <i>Leptospira</i>					

ADN genómico de *L. interrogans* serovar Pomona se preparó utilizando un equipo DNAeasy (Qiagen, Valencia, CA) y sometió a PCR como se describe por el fabricante utilizando Accuprime Taq polymerase (Invitrogen, CA). Productos PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% y visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Productos PCR se eluyeron del gel utilizando un equipo de elución de gel (Qiagen, Valencia, CA) y clonaron en el vector TOPO TA como se describe por el fabricante (Invitrogen, CA). Excepto por LP1947, que fue subclonado en pRSETA (Invitrogen, CA), todos los insertos fueron sub-clonados en el vector de expresión pGEX-KG (Stratagene) y transformaron en *E. coli* (BL21 DE3 o CQ21). Secuenciado de ADN se realizó con un secuenciador de ácido nucleico automatizado ABI modelo 377 en Bioresource Center, Cornell University. Búsquedas de homología se realizaron utilizando la base de datos NCBI y BLAST (Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410).

**Expresión y purificación de proteínas recombinantes.** Cultivos de crecimiento exponencial (OD<sub>600</sub>=0.6) de *E. coli* (BL21 DE3) o CQ21 que alojan plásmidos recombinantes, se indujeron para sintetizar las proteínas de fusión con



isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG; Sigma, St. Louis, Mo.). Por cada proteína recombinante, se realizó un experimento piloto con un volumen de cultivo de 3 mL y el peso molecular de la proteína recombinante expresada se verificó por análisis SDS-PAGE. Cultivo en masa se realizó en 500 mL de caldo LB con ampicilina (50  $\mu$ g/mL). Se recolectaron bacterias por centrifugación a 5,000 RPM por 30 minutos y los gránulos o precipitados celulares se lavaron y suspendieron en PBS seguido por paso a través de una celda de prensa French (American Instruments). Los lisados se centrifugaron a 8,000 xg por 30 min y los cuerpos de inclusión se lavaron y purificaron (Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, F. Hassan, S. P. McDonough, M. Pough, S. C. Barr, K. W. Simpson, H. O. Mohammed, S. Shin, P. McDonough, R. L. Zuerner, J. Qu, and B. Roe. 2004). La expresión de proteína tipo inmunoglobulina leptospiral por *Leptospira interrogans* y evaluación de su potencial de diagnóstico en un ELISA cinético, J. Med. Microbiol. 53:975-984, Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, S. S. Jusuf, S. Artiushin, J. F. Timoney, S. P. McDonough, S. C. Barr, T. J. Divers, K. W. Simpson, P. L. McDonough, and H. O. Mohammed. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 70:5924-5930) con model prep cell (BioRad, CA).

La proteína purificada se dializó a 4 grados C con PBS al cambiar PBS al menos 4 veces. La proteína purificada se concentró y liofilizó (Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, F. Hassan, S. P. McDonough, M. Pough, S. C. Barr, K. W. Simpson, H. O. Mohammed, S. Shin, P. McDonough, R. L. Zuerner, J. Qu, and B. Roe. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J. Med. Microbiol. 53:975-984). La proteína liofilizada se suspendió con PBS estéril y cuantificó por el ensayo Bradford (Bio-Rad).

**SDS-PAGE y transferencia western.** SDS-PAGE se realizó como se describió previamente (Chang, Y. F., D. P. Ma, J. Shi, and M. M. Chengappa. 1993. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. Infect. Immun. 61:2089-2095). Cantidades iguales de proteínas recombinantes (1.5-2  $\mu$ g) se cargaron en un gel SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul brillante Coomassie R-250 seguido por decoloración. Para inmunotransferencia, se separaron proteínas recombinantes al correr SDS-PAGE seguido por transferencia en una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.) en un Trans Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Después de transferencia, la membrana se bloqueó con TBS más albúma de suero bovino al 1% (BSA) por 1 hora. Se diluyeron antisueros como se muestra en las Figuras 3A-3B en TBS-BSA y se incubaron con la transferencia por 1 h. Después de tres lavados en TBS más Tween 20 0.1%, la transferencia se incubó por 1 h con IgG anti-bovino cabra 1:2,000 conjugado con fosfatasa alcalina (KPL). La transferencia se lavó tres veces como se describió anteriormente y reveló con NBT/BCIP como se describe por Chang et al. (1995). Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 63:3543- 3549).

### 6.1.3 Resultados

Identificación, expresión y purificación de proteínas de membrana externa. Las secuencias genómicas de *L. interrogans serovar Icterohaemorrhagiae* codifican 131 proteínas de membrana externa putativas, se conocen en la técnica (ver, por ejemplo las citas en la dirección: [www.chgc.org.cn](http://www.chgc.org.cn)). 15 proteínas de membrana exterior, incluyendo Mcel y II, que no muestran alta homología a proteínas de otros patógenos dentro de la base de datos NCBI, se seleccionaron al azar de la secuencias genómicas disponibles de *Leptospira*. Estas 15 OMPs muestran 98-100% de homología con los genomas de *L. interrogans serovar Pomona* y *L. interrogans serovar Copenhageni*.

La Figura 1 muestra la homología de proteínas de invasión celular de mamífero hipotéticas de *Leptospira*. La secuencia superior es Mcell, una proteína tipo Mcel hipotética de *L. interrogans serovar Pomona*. Esta proteína fue renombrada "Mcell" (Lp0607, SEQ ID NOS: 7-8) para distinguirla de Mcel de *L. interrogans serovar Lai* (secuencia media). La secuencia media es Mcel de *L. interrogans serovar Lai* (número de acceso GenBank AAN49254; SEQ ID NO: 12). La secuencia inferior son los aminoácidos 31-293 de Rv 1968, una Mce de *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 (número de acceso GenBank AE000516, SEQ ID NOS: 13-14). La secuencia superior, Mcell, tiene aproximadamente 30% de homología con la secuencia media, Mcel de *L. interrogans serovar Lai*, y aproximadamente 25-30% de homología con la secuencia inferior, Rv 1968 Mce de *Mycobacterium tuberculosis*.

Todos estos genes que codifican OMPs y además, LigBVT (regiones variables de LigB), LigCon (región conservada de LigA y B) y LipL32, se expresaron exitosamente en *E. coli* como proteínas de fusión glutationa-S-transferasa (GST). Estas proteínas recombinantes migraron aproximadamente al peso molecular esperado (Figura 2A). Los resultados se confirmaron adicionalmente por inmunotransferencia utilizando anticuerpos policlonales a GST (Figura 2B). Las Figuras 3A-3B citan el número de pares base y tamaño molecular calculado para cada proteína OMP de *Leptospira*.

**Análisis de inmunogenicidad de proteínas de fusión con suero bovino de vacas con infección natural, infección experimental y sanas.** Sueros bovinos de vacas infectadas experimentalmente, infectadas en forma natural y sanas, se evaluaron por reactividad con proteínas de células enteras de serovar Pomona. Los sueros infectados en forma experimental y infectados en forma natural mostraron reactividad a antígeno de células enteras, mientras que los sueros de vacas sanas no. Estos sueros también se probaron por reactividad con proteína GST y ninguno de ellos mostró reactividad a GST (datos no mostrados).

Para determinar la inmunogenicidad de proteínas recombinantes específicamente a infección con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, *L. interrogans* serovar Grippotyphosa, *L. interrogans* serovar Copenhagenii and *L. interrogans* serovar Canicola, la inmunotransferencia con proteínas de membrana externa recombinante purificadas se sondeo con sueros de ganado infectado experimentalmente. Excepto por la proteína recombinante LAI 947, todas las OMPs recombinantes mostraron reactividad a la infección experimental (Figura 2C). Sin embargo, LigCon, LipL32, LA1939 y Mcell mostraron más fuerte reactividad que otras proteínas recombinantes (Figuras 3A-3B).

Para examinar la inmunogenicidad de OMPs recombinantes a infección natural, sueros de vacas infectadas naturalmente con diferentes títulos de MAT, también se evaluaron. Las proteínas recombinantes reaccionaron en forma variable con sueros infectados naturalmente (por ejemplo, ver Figura 2D). Sin embargo, LigCon, LipL32, LA 1939 y Mcell mostraron reactividad consistente a todos los sueros infectados en forma natural (Figuras 3A-3B). Sueros de control de ganado sano no exhibieron anticuerpos a las proteínas de fusión recombinantes (datos no mostrados).

Sueros de ganado experimentalmente infectado con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, durante estudios de infección de curso de tiempo (Día0, Día28, Día50) también se evaluaron por reactividad a las OMPs recombinantes. Como se discutió anteriormente, LA1939 y Mcell mostraron más fuerte reactividad que otras proteínas recombinantes (Figuras 3A-3B). Estos datos preliminares indican que las proteínas codificadas por LP1939 y Mcell pueden servir como antígenos de diagnóstico potenciales o vacunas para infección leptospiral, aparte de LigA/B.

#### 6.1.4 Discusión

La Leptospirosis ha emergido como una enfermedad infecciosa globalmente importante. Ocurre en regiones urbanas así como en rurales de países industrializados y en desarrollo (Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14:296-326). Las tasas de mortalidad e infección permanecen significantes y están relacionadas con retardos en diagnóstico, falta de infraestructura y adecuada sospecha clínica, y también otras razones deficientemente comprendidas que pueden incluir patogenicidad inherente de algunas cepas leptospirales o respuestas inmuno patológicas de hospedero genéticamente determinadas. Herramientas de diagnóstico se requieren fuertemente que identifiquen en forma precisa a los animales infectados, y de esa manera juegan un papel vital para evitar la enfermedad. Una prueba altamente específica que puede distinguir entre animales infectados y no infectados dentro de manadas puede tener un impacto mayor e inmediato en la industria lechera que cualquier otro enfoque de manejo actual, incluyendo vacunación (Masuzawa, T., T. Matsumoto, R. Matsumoto, R. Suzuki, T. Shimizu, and Y. Yanagihara. 1990. Protective activity of glycolipid antigen against infection by *Leptospira interrogans* serovar canicola. J. Gen. Microbiol. 136:327-330).

Debido a un bajo índice de manifestaciones clínicas, diversos tipos de métodos de diagnóstico se emplean actualmente, tales como cultivo, ensayos PCR, pruebas de aglutinación microscópica (MAT) y ensayos serológicos (Matsuo, K., E. Isogai, and Y. Araki. 2000. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. Microbiol. Immunol. 44:887-890). Las desventajas de cultivo y aislamiento de leptospiras de especímenes clínicos son que son insensibles y lentas. Un ensayo PCR cuantitativo en tiempo real utilizando química TaqMan para detectar leptospiras en muestras clínicas y ambientales, se ha reportado (Palaniappan et al. 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. Mol. Cell Probes 19: 111-117). Este ensayo PCR es sensible y puede diferenciar entre especies patogénicas y no patogénicas. Sin embargo, requiere instrumentos avanzados y es difícil de aplicar ampliamente.

La serología actualmente es el enfoque de diagnóstico más frecuentemente empleado para leptospirosis. La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba estándar para diagnóstico serológico de leptospiras, debido a su alta sensibilidad y especificidad (Murray, R. D. 1990. A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. Vet. Rec. 127:543-547). MAT detecta anticuerpos aglutinantes en suero, pero requiere destreza significativa de sus usuarios, y variaciones interlaboratorio en los resultados son elevadas. Pruebas de diagnóstico basadas en antígeno de célula entera para leptospirosis contienen antígenos indefinidos que pueden exhibir reactividad cruzada con otras bacterias. Por lo tanto, pruebas de diagnóstico basadas en proteína recombinante y especialmente basadas en OMP, pueden servir como una herramienta ideal para diagnóstico de leptospirosis.

Para desarrollar pruebas desarrolladas basadas en antígeno más confiables tales como ELISAs, la identificación de antígenos leptospirales que se expresan o favorece la expresión solo durante infección, se realiza en el presente estudio. Con las secuencias genómicas disponibles para *Leptospira*, 15 OMPs de *Leptospira* se seleccionaron y se clonaron y expresaron en *E. coli*. Estas OMPs seleccionadas al azar, no muestran alta homología con otras proteínas de otros patógenos en base de datos NCBI. Análisis de antigenicidad de OMPs indica que todas las proteínas recombinantes excepto LA1947 mostraron inmunoreactividad a ganado infectado experimentalmente. Sueros de ganado infectado experimentalmente durante un estudio de infección de curso de tiempo reaccionó fuertemente a LA1939 y Mcell. Mayor evaluación de OMPs recombinantes con ganado infectado en forma natural también confirman la inmunogenicidad de OMPs recombinantes de LA1939 y Mcell. Por lo tanto, LA1939 y Mcell pueden servir como antígenos de diagnóstico potenciales.

Un sistema de expresión de *E. coli* con proteínas de fusión GST para OMPs de *Leptospira* también se desarrolló en

este estudio. Expresión estable de antígeno intacto fue óptima solo con proteína de fusión GST. La etiqueta de afinidad de GST empleada en este estudio tiene ventajas distintas (Deutz, A., K. Fuchs, N. Nowotny, H. Auer, W. Schuller, D. Stunzner, H. Aspöck, U. Kerbl, and J. Kofer. 2003. Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters—comparative analysis with veterinarians, farmers, and abattoir workers. *Wien Klin Wochenschr* 115 Suppl 3:61-67). En general, la expresión de proteínas recombinantes como una proteína de fusión con GST puede superar problemas tales como toxicidad en *E. coli*, bajos niveles de expresión, incluyendo formación de cuerpo e insolubilidad. La desventaja de GST es el tamaño de la etiqueta de afinidad, que complica cualesquiera inmunoensayos corriente abajo. La falta de reactividad de sueros de ganado infectado en forma experimental y natural, así como vacas sanas, a rGST confirma la ausencia de anticuerpos a proteínas GST en estas muestras. Sin embargo, el desarrollo de inmunoensayos sin GST puede realizarse para evaluar la utilización de estos antígenos recombinantes en las muestras en campo.

Pruebas de diagnóstico actualmente disponibles no pueden discriminar entre vacunación e infección. En forma aparente, la administración de vacunas de antígeno de células entera definitivamente incrementará el título de anticuerpos a OMPs y otras proteínas. Por lo tanto, hacer blanco a las proteínas a las que se favorece su expresión durante infección, puede utilizarse para desarrollar inmunoensayos para discriminar infección y vacunación. Las OMPs recombinantes de LP1939 y Mcell pueden servir por lo tanto con una herramienta de diagnóstico ideal para identificar infección, y puede realizarse adicional evaluación de estos antígenos con animales vacunados e infectados.

En una conclusión, 15 OMPs putativas de *Leptospira* fueron seleccionadas aleatoriamente, clonadas y expresadas en *E. coli*. Las proteínas recombinantes se evaluaron para uso potencial en diagnóstico de leptospirosis. De las 15 proteínas recombinantes, LP1939 y Mcell mostraron reactividad consistentemente más fuerte a sueros de animales infectado en forma experimental y natural.

## 6.2 Ejemplo 2: Inmunogenicidad de proteínas de membrana externa leptospiral recombinante y sus usos como candidato de vacuna

### 6.2.1 Introducción

Proteínas de membranas externas *Leptospirales* (OMPs) pueden ser componentes de vacunas efectivas para leptospirosis. Secuenciado genómico de *Leptospira* nos ha permitido el hacer blanco en OMPs putativas para el desarrollo de vacunas recombinantes. Nos enfocamos en 12 OMPs que no tienen homología con otros organismos citados en la base de datos NCBI excepto Mcel y Mcell de *Leptospira*. Se clonaron todas las OMPs putativas, expresaron y purificaron como proteínas de fusión de glutionina-S-transferasa (GST). Criba primaria para potencial inmutoprotector se realizó en hámsters tratados con inoculo de LD50 de serovar Pomona inactivado o atenuado con bajo número de pases. Las proteínas de fusión rLP1454, rLP1118 y rMCEII fueron protectoras cuando se administran a hámsters, en comparación con rGST, que se administró como el control negativo. Todas estas proteínas recombinantes se evaluaron de nuevo para eficacia protectora con base en letalidad, lesiones histopatológicas y respuestas de anticuerpo, rLPI 454, rLP1118 y rMCEII mostraron protección en lo que se refiere a letalidad. Análisis histopatológico de animales inmunizados con rLP1454, rLP1118 y rMCEII, solo mostró menores lesiones renales, en contraste con animales inmunizados con rGST (grupo de control), que mostró serias lesiones. Para mejorar la eficacia protectora, tres antígenos protectores recombinantes se evaluaron en combinación con rGST y rLigA como control negativo y positivo, respectivamente. Los resultados indican que rLP1454, rLP1118 y rMCEII muestran protección en forma individual y sinérgica contra infección serovar Pomona, que puede emplearse para desarrollar una vacuna de múltiples componentes para leptospirosis.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica mundial provocada por espiroquetas gram-negativas que pertenecen al género *Leptospira*. La gente que contrae leptospirosis, ya sea en forma directa a través de contacto con animales infectados o indirectamente de un ambiente contaminado, a menudo desarrolla fallas de riñones e hígado (Bain et al. 1973. Renal failure and transient paraproteinemia due to *Leptospira pomona*. Case reports and literature review. *Arch. Intern. Med.* 131:740-745; Divers, et al. 1992. Renal dysfunction associated with infection of *Leptospira interrogans* in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201:1391-1392; Garcia Garcia, et al. 1979. Icterohemorrhagic leptospirosis with acute renal failure (author's transl). *Med. Clin. (Bare)* 73:362-366; Kager, et al. 2001. Fever and chills due to leptospirosis after travel to Thailand. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 145: 184-186; Menzies, et al. 1989. *Leptospira icterohaemorrhagiae* infection presenting as acute renal failure. *Scott Med. J.* 34:410; Petros, et al. 2000. Serum procalcitonin and proinflammatory cytokines in a patient with acute severe leptospirosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 32: 104-105; San Segundo, et al. 1982. Leptospirosis caused by *L. grippityphosa* accompanied by acute renal failure (author's transl). *Med. Clin. (Bare)* 78:28-31; Schubert, et al. Acute renal failure in leptospirosis (with a report on the differential diagnosis of *Leptospira sejroe* and *Leptospira icterohaemorrhagiae*). *Munch. Med. Wochenschr.* 113:80-86; Winearls, et al. 1984. Acute renal failure due to leptospirosis: clinical features and outcome in six cases. *Q. J. Med.* 53:487-495). Infection in horses, cattle, dogs and pigs can cause abortion, still birth, renal failure, and uveitis (Akkermans, J. P. 1966. Incidence of abortion and sterility in swine in the Netherlands due to infection with *Leptospira hyos*. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 66:849-866; Andreani, E., F. Tolari, and R. Farina. 1983. Experimental infection in sheep with *Leptospira interrogans* serotype hardjo. *Br. Vet. J.* 139:165-170; Bernard, W. V. 1993. Leptospirosis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9:435-444; Bolin, C. A., J. A. Cassells, H. T. Hill, J. C. Frantz, and J. N. Nielsen. 1991. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection of swine. *J. Vet. Diagn.*

Invest. 3: 152-154; Broil, S., A. S. Waldvogel, M. Roskopf, L. Corboz, and A. Pospischil. 1993. The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. Zentralbl. Veterinarmed. B 40:641-653; Donahue, J. M., B. J. Smith, J. K. Donahoe, C. L. Rigsby, R. R. Tramontin, K. B. Poonacha, and M. A. Wilson. 1992. Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1990 foaling season. J. Vet. Diagn. Invest. 4:279-284; Donahue, J. M., B. J. Smith, K. B. Poonacha, J. K. Donahoe, and C. L. Rigsby. 1995. Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling season. J. Vet. Diagn. Invest. 7:87-91; Donahue, J. M., B. J. Smith, K. J. Redmon, and J. K. Donahue. 1991. Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. J. Vet. Diagn. Invest. 3:148-151; Donahue, J. M., and N. M. Williams. 2000. Emergent causes of placentitis and abortion. Vet. CHn. North Am. Equine Pract. 16:443-456, viii; Elder, J. K., P. M. Pepper, M. W. Hill, and W. H. Ward. 1985. The significance of leptospiral titres associated with bovine abortion. Aust. Vet. J. 62:258-262; Ellis, T. M., G. M. Robertson, L. Hustas, and M. Kirby. 1983. Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. Aust. Vet. J. 60:364-367; Ellis, W. A., D. G. Bryson, and J. B. McFerran. 1976. Abortion associated with mixed *Leptospira*/equid herpesvirus 1 infection. Vet. Rec. 98:218-219; Rocha, T. 1990. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar mozdok from aborted swine fetuses in Portugal. Vet. Rec. 126:602) e incluso puede llevar a falla de múltiples órganos.

Vacunas leptospirales de células enteras actualmente disponibles en general estimulan solo inmunidad a corto plazo y no proporcionan protección cruzada contra los 250 serovares conocidos de *Leptospira* patogénica. Además, la infección de *Leptospira* puede activar enfermedad auto inmune en caballos y personas (Parma, A. E., S. I. Cerone, and S. A. Sansinanea. 1992. Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. Vet. Immunol. Immunopathol. 33: 179-185; Parma, A. E., S. I. Cerone, S. A. Sansinanea, and M. Ghezzi. 1992. C3 fixed in vivo to cornea from horses inoculated with *Leptospira interrogans*. Vet. Immunol. Immunopathol. 34:181-187; Parma, A. E., A. S. Fernandez, C. G. Santisteban, R. A. Bowden, and S. I. Cerone. 1987. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. Vet. Immunol. Immunopathol. 14:181-185; Parma, A. E., M. E. Sanz, P. M. Lucchesi, J. Mazzone, and M. A. Petrucci. 1997. Detection of an antigenic protein of *Leptospira interrogans* which shares epitopes with the equine cornea and lens. Vet. J. 153:75-79; Rathnam, S. R., S. Rathnam, S. Selvaraj, D. Dean, R. A. Nozik, and P. Namperumalsamy. 1997. Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. Am. J. Ophthalmol. 124:71-79. De esta manera, la severidad y eficacia de vacunas leptospirales pueden mejorarse al administrar subunidades inmunoprotectoras en vez de administrar antígenos de células enteras.

El enfoque convencional a desarrollo de vacuna depende de la identificación de antígenos protectores para utilizar como vacunas subunitarias (Rappuoli, R., and G. Del Giudice. 1999. Identification of vaccine targets. CRC, Boca Raton). Estudios de extractos leptospirales indican que los componentes de membrana externa contienen antígenos protectores. De manera importante, algunas de estas OMPs protectoras se expresan solo a bajos niveles o pueden no ser expresadas de hecho por leptospiras desarrolladas en medio artificial (Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, S. S. Jusuf, S. Artiushin, J. F. Timoney, S. P. McDonough, S. C. Barr, T. J. Divers, K. W. Simpson, P. L. McDonough, and H. O. Mohammed. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 70:5924-5930). Diversas OMPs leptospirales tales como OmpLI, LipL41, LipL32, LipL36, Lig y LipL21 se han clonado y caracterizado (Cullen, P. A., S. J. Cordwell, D. M. Bulach, D. A. Haake, and B. Adler. 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Infect. Immun. 70:2311-2318; Haake, D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology 146:1491-1504; Haake, D. A., C. Martinich, T. A. Summers, E. S. Shang, J. D. Pruetz, A. M. McCoy, M. K. Mazel, and C. A. Bolin. 1998. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log- phase growth and mammalian infection. Infect. Immun. 66:1579-1587; Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, F. Hassan, S. P. McDonough, M. Pough, S. C. Barr, K. W. Simpson, H. O. Mohammed, S. Shin, P. McDonough, R. L. Zuerner, J. Qu, and B. Roe. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J. Med. Microbiol. 53:975-984; Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, S. S. Jusuf, S. Artiushin, J. F. Timoney, S. P. McDonough, S. C. Barr, T. J. Divers, K. W. Simpson, P. L. McDonough, and H. O. Mohammed. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 70:5924-5930; Palaniappan, R. U., S. P. McDonough, T. J. Divers, C. S. Chen, M. J. Pan, M. Matsumoto, and Y. F. Chang. 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. Infect. Immun. 74:1745-1750; Shang, E. S., M. M. Exner, T. A. Summers, C. Martinich, C. I. Champion, R. E. Hancock, and D. A. Haake. 1995. The rare outer membrane protein, OmpLI, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. Infect. Immun. 63:3174-3181). LipL32 protege animales cuando se utilizan en una fórmula de vacuna de ADN, pero no como proteína recombinante (Branger, C. B. Chatrenet, A. Gauvrit, F. Aviat, A. Aubert, J. M. Bach, and G. Andre-Fontaine. 2005. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. Infect. Immun. 73:4062-4069). En contraste, la proteína recombinante LigA es capaz de inducir inmunoprotección contra leptospirosis (Koizumi, N., and H. Watanabe. 2003. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. J. Med. Microbiol. 52:585-589; Palaniappan, R. U., S. P. McDonough, T. J. Divers, C. S. Chen, M. J. Pan, M. Matsumoto, and Y. F. Chang. 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. Infect. Immun. 74: 1745-1750).

Aunque son promisorios los resultados de experimentos de protección en hámster y ratones con proteínas Lig, una

combinación de antígenos clave y/o epítomos es probable que sea más eficaz contra múltiples serovares de *Leptospira*, especialmente en animales no consanguíneos. Esta vacuna de múltiples componentes supera los problemas de restricción genética de hospedero y variabilidad antigénica asociados con vacunas basadas en un solo antígeno.

- 5 Recientemente, el desarrollo de vacuna ha aprovechado la secuencia de genoma de bacterias patogénicas (Kelly, D. F., and R. Rappuoli. 2005. Reverse vaccinology and vaccines for serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 568:217-223; Rappuoli, R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:445-450; Rappuoli, R. 2001. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19:2688-2691; Rappuoli, R., and A. Covacci. 2003. Reverse vaccinology and genomics. *Science* 302:602).
- 10 Este enfoque no solo identifica todos los antígenos descritos por métodos convencionales, sino que también permite el descubrimiento de antígenos novedosos. Ya que las OMPs son los componentes bacterianos primarios que interactúan con células hospederas, el dirigir las OMPs para desarrollo de vacuna recombinante es ventajoso.

En este estudio, nos enfocamos en 13 OMPs que no tienen homología con otras proteínas bacterianas citadas en la base de datos NCBI así como Mcel y II de *Leptospira*. Todas estas OMPs fueron clonadas, expresadas y purificadas como proteínas de fusión GST. La criba para eficacia protectora de OMPs recombinantes se realizó en un modelo de hámster. De estas, rMcell, rLP1118 y rLP1454 sirven como antígenos inmunoprotectores contra infección de serovar Pomona *L. interrogans*. Todos estos antígenos recombinantes se evaluaron por separado así como en combinación junto con rLigA (control positivo) y rGST (control negativo) sugiriendo que rMcell, rLP1118 y rLPI 454 pueden servir como antígenos protectores en forma individual y sinérgica, allanando el camino para el desarrollo de una vacuna de múltiples componentes contra leptospirosis.

## 6.2.2 Materiales y Métodos

**Cepas bacterianas, medios y plásmidos.** Serovar Pomona *L. interrogans* se emplea como se describió previamente (Palaniappan, et al. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 70:5924-5930). *Leptospira* were maintained on EMJH medium at 30°C (Palaniappan, et al. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 70:5924-5930). Para aislar cultivos de inactivación/atenuado con bajo número de pases de leptospirosis, se insertaron experimentalmente hámsters con una dosis subletal de serovar Pomona *L. interrogans* (NVSL 1427-35-093002). Tejido de hámsteres infectados se recolectaron asépticamente, homogenizaron con PBS estéril y los lisados se inocularon en medio EMJH. El crecimiento se supervisó utilizando microscopía de campo oscuro.

**Valor LD<sub>50</sub> de *L. interrogans* en hámsters.** Veinte cuatro hámsteres sirios Dorados de 8 a 9 semanas de edad (Harlan Sprague Dawley) se dividieron en 4 grupos iguales. Cada grupo fue infectado intraperitonealmente con 10<sup>9</sup> a 10<sup>7</sup> *L. interrogans* serovar Pomona de inactivación/atenuado con bajo número de pases (3 a 4 pases) (NVSL 1427-35-093002). Un grupo de hámster recibió solo PBS (control). Los animales se supervisaron diariamente. Tejidos se recolectaron en forma aséptica de animales que murieron debido a infección y sometieron a cultivo y análisis histopatológico.

**Clonación y expresión de OMP.** Cebadores para la membrana externa putativa se diseñaron sin las secuencias de señal y se cita en la Tabla 1 (Sección 6.1). ADN genómico de *L. interrogans* serovar Pomona se preparó utilizando un DNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) y sometió a PCR como se describe por el fabricante utilizando Accuprime Taq polymerase (Invitrogen, CA). Productos PCR se corrieron en gel de agarosa al 1% y visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Productos PCR se eluyeron del gel utilizando "gel elution kit" (Qiagen, Valencia, CA) y clonaron en Vector TOPO TA como se describe por el fabricante (Invitrogen, CA). El inserto después fue sub-clonado en el vector de expresión pGEX-KG (Stratagene). LP1454, 1118 y 0607(MCEII) también se insertaron en pRSETA (InvitroGen, CA) para expresar proteínas recombinantes para prueba serológica. Secuenciado de ADN se analizó con un secuenciador de ácido nucleico automático ABI modelo 377 en Bioresource Center, Cornell University. Búsquedas de homología se realizaron con las bases de datos NCBI y BLAST (Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410).

**Expresión y purificación de proteínas recombinantes.** Cultivos de crecimiento exponencial (OD<sub>600</sub>=0.6) de *E. coli* (BL21 DE3) o plásmidos recombinantes que alojan CQ21 se indujeron con o sin isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1mM (IPTG; Sigma, St. Louis, Mo.). Para cada proteína recombinante, se realizó un experimento piloto con 3 mL en volumen de cultivo y el peso molecular de las proteínas recombinantes expresadas se verificó por análisis SDS-PAGE. Cultivo en masa se realizó en 1,000 mL de caldo LB con ampicilina (50 µg/mL). Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 5000 RPM por 30 min. Los precipitados o gránulos celulares se lavaron y suspendieron en PBS y sometieron a una celda de prensa French (American Instruments). Los lisados se centrifugaron a 8,000 xg por 30 min y los cuerpos de inclusión se lavaron y purificaron como se mencionó previamente (Palaniappan, et al. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J. Med. Microbiol.* 53:975-984; Palaniappan, et al. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 70:5924-5930) con "model prep cell" (BioRad, CA). La proteína purificada se dializó a 4 grados C con PBS.

La proteína purificada se concentró y liofilizó (Palaniappan, et al. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J. Med. Microbiol. 53:975-984). La proteína liofilizada se suspendió con PBS estéril y cuantificó utilizando ensayo de proteína Bio-Rad.

5 **SDS-PAGE.** SDS-PAGE se realizó como se describió previamente (Chang, et al. 1993. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. Infect. Immun. 61:2089-2095). La cantidad igual de proteína recombinante (1.5 µg) se sometió a SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul brillante Coomassie R-250 seguido por decoloración (Chang, et al. 1993. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. Infect. Immun. 61:2089-2095).

10 **Experimentos de inmunización y desafío.** Criba preliminar de proteínas de membrana externa putativas recombinantes se realizó en un grupo de hámsters Sirio dorado de 4 semanas de edad (Harlan Sprague Dawley; 3 hámsters por grupo). Hámsters se inmunizaron dos veces por inyección subcutánea con proteínas recombinantes (50 µg) a un intervalo de tres semanas (Día 0 y Día 21). Hámsters que reciben rGST se consideraron como un grupo de control. Antes de inmunización, las proteínas recombinantes o rGST se mezclaron con un volumen igual de hidróxido de aluminio (Alhydrogel, Accurate Chemical & Scientific Corp, Westbury, NY). Sangre para separación de suero se recolectó los días 0 (pre-vacunación), 21 y 42 directamente de la vena safenosa.

Hámsters inmunizados se desafiaron intraperitonealmente con el valor estimado LD<sub>50</sub> de 10<sup>8</sup> leptospiras en D42. Los animales se supervisaron dos veces al día, sacrificaron el día 71 y se recolectó sangre por punción cardíaca. Los tejidos de animales infectados se recolectaron asépticamente para análisis y cultivo histopatológico.

20 Antígenos protectores recombinantes (rLP1454, rLP1118 y rMCETT) se analizaron de nuevo como se discutió anteriormente en un grupo de hámsters (8 animales por grupo). Animales inmunizados con rGST y rLigA se consideraron como controles negativos y positivos, respectivamente. La eficacia protectora de los tres antígenos recombinantes en combinación (50 µg de cada antígeno) fue estimada en un grupo de hámsters (8 hámsters por grupo) con rGST y rLigA considerados como controles negativo y positivo, respectivamente.

25 **Cultivo.** Tejidos de hámsters tales como hígado, riñón, bazo, pulmones, vejiga urinaria y sangre, se recolectaron asépticamente de cada animal, homogeneizaron en 0.5 ml de medio EMJH, transfirieron en 20 ml de medio EMJH y mantuvieron a 30 grados C por 4 semanas (Palaniappan, et al. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 70:5924-5930; et al. 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. Infect. Immun. 74: 1745- 1750). El crecimiento se supervisó utilizando microscopía de campo oscuro.

30 **Histopatología.** Tejidos de hámster se fijaron por inmersión en formalina amortiguada neutra al 10%, incrustaron en parafina, seccionaron a 5 µm, tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) utilizando técnicas histológicas estándar, y examinaron por microscopía de luz. Severidad de nefritis tubulointersticial inducida con *Leptospira* se graduó por un patólogo veterinario (SPMcD) que estaba ciego a la identidad de los grupos de tratamiento y quien graduó en la siguiente escala: 0 = normal, 1 = medio, 2 = moderado y 3 = severo.

35 Lesiones renales leves tuvieron infiltrados intersticiales de pequeños números de linfocitos mezclados ocasionalmente con unos cuantos heterófilos y macrófagos. Túbulos ocasionales fueron ligeramente dilatados y distendidos con material hialina que contiene células epiteliales desprendidas raras. El epitelio de revestimiento también fue moderadamente atenuado. En forma rara, células epiteliales descamadas y heterófilos formaron matrices mixtas con material hialina dentro de lúmina de convolución próxima. Lesiones renales moderadas tuvieron acumulaciones perivasculares prominentes de linfocitos en mezcla con número menor de células de plasma, macrófagos y heterófilos ocasionales. Cambios tubulares fueron más comunes que en riñones levemente afectados y se notaron ocasionalmente matrices de hialina. Riñones severamente afectados se encogieron en forma irregular con fibrosis intersticial extensa acompañada por degeneración extensa y pérdida de túbulos de convolución próxima.

40 Matrices de hialina fueron numerosas pero cambios glomerulares en general fueron leves. Las cápsulas de Bowman de glomérulos en regiones de severa atrofia tubular y fibrosis se dilataron y los espacios uriníferos se llenaron con un material imperceptible, débilmente eosinofílico. Algunos glomérulos tienen penachos glomerulares encogidos mientras que otros tienen aumentos en parches en la cantidad de matriz mesangial. Ligeramente hipertrofia de las cápsulas de Bowman que revisten el epitelio parietal también estuvo presente en un sub-conjunto de glomérulos afectados.

45

50

#### **Ensayo Inmunsorbente Ligado a Enzima Cinética (KELA) con antígenos recombinantes**

Sueros de hámsters a los que se les suministran antígenos recombinantes y rGST, se evaluaron por la presencia de IgG específico utilizando un ensayo KELA con antígenos recombinantes (Palaniappan, et al. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J. Med. Microbiol. :975-984). Una titulación ajedrezada fue seguida para optimizar las concentraciones de reactivos y el ensayo KELA se realizó como se describió previamente (Koizumi, N., and H. Watanabe. 2003. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. J. Med. Microbiol. 52:585-589; Naiman, et al. 2002. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T

55

cells. Infect. Immun. 70:6147-6157; et al. 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol. Cell. Probes 19:111-117).

5 Brevemente, la concentración óptima de proteínas de fusión Histag recombinantes (rMcell, rLP1454 y rLP1118) se diluyeron en amortiguador bicarbonato de 0.1 M, revistieron en placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc, Dinamarca), sacudieron por 1 hora, y después incubaron durante la noche a 4 grados C. Las placas se lavaron tres veces con PBS 0.1 M que contiene Tween 20 0.05% (PBST). A continuación, 100 µl de suero de hámster (anticuerpo primario) diluido 1:100 en PBST, se agregan a cada pozo e incuban por 1 hora a 37 grados C en una cámara húmeda. Las placas se lavaron tres veces como se describió anteriormente con PBST e incubaron con 100 µl de una dilución 1:1000 de IgG anti-hámster cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Cappel, Durham, NC) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo tres veces con PBST y 100 µl de TMB (Kirkegaard, MD) se agregaron a cada pozo. Cada placa se leyó tres veces a 650 nm de OD con un intervalo de 1 minuto (Biotek EL-312, Winoski, VT).

15 Los resultados se calcularon por el programa de computadora KELA (disponible al público para uso en Animal Health Diagnostic Center, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca NY) y expresaron como la pendiente de la reacción entre la enzima y el sustrato a la cantidad de anticuerpo ligado (Chang et al. 1999. Vaccination against lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. Vaccine 18:540-548; Chang, et al. 1995. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 63:3543-3549).

**6.2.3 Resultados**

20 **Expresión y purificación de proteínas de membrana externa putativas recombinantes como proteínas de fusión GST:** Las secuencias genómicas de *Leptospira* pronostican varias OMPs putativas. De estas, 13 proteínas de membrana externa putativas y también MCEI y 11 se dirigieron para desarrollo de vacuna. Todas estas OMPs se clonaron y expresaron como proteínas de fusión GST. Proteínas de fusión GST recombinantes purificadas aparecen como una sola banda por análisis SDS-PAGE (Figura 4).

25 **Valor LD50 para *L. interrogans* serovar Pomona en modelo de hámster:** hámsters (8 animales por grupo) que reciben 10<sup>9</sup> sufrieron 100% de mortalidad. Sin embargo, 5 de 8 hámsters sobrevivieron después de recibir una dosis de 10<sup>8</sup> leptospiras. Todos los hámsters que recibieron una dosis de 10<sup>7</sup> leptospiras sobrevivieron, indicando que la LD<sub>50</sub> para infección de *L. interrogans* serovar Pomona fue aproximadamente 10<sup>8</sup>.

30 **Respuestas de anticuerpo a antígenos recombinantes:** Para examinar si hámsters a los que se les da antígenos recombinantes, desarrollaron respuesta de anticuerpo IgG contra los antígenos, hámsters inmunizados con 50 µg de proteínas recombinantes (rMCEI, rLP1454 y rLP1118) en forma individual y en combinación, se evaluaron por nivel de anticuerpo IgG de suero. Sueros de animales recolectados los días 0, 21, 42 y 71, se analizaron por KELA utilizando rMcell, rLA454, rLP1118 y rLigA. Hámsters mostraron anticuerpos IgG a rMcell, rLA454, rLPI 118 y rLigA, indicando la inmuno respuesta contra proteína recombinante (Figura 5). La Figura 5 muestra que el suero de animales inmunizados se recolectó en DO (pre-inmune) D21 (muestras de suero después de primer inmunización), D42 (muestras de suero después de segunda inmunización) y D72 (29 días después del desafío). La Figura 5 representa hámsters inmunizados individualmente con proteínas recombinantes (rLP1454, rLP0607, y rLP111b) o inmunizados con combinación de proteínas recombinantes (rLP1454C, rLP0607C, y rLP111hC).

40 **Antígenos recombinantes rMcell, rLP1118 y r1454 confieren inmunidad protectora en modelo de hámster:** Criba preliminar se evalúa en hámsters (3 animales por grupo) a los que se les da ya sea OMP recombinante o rGST como control negativo. Sucumbieron todos los animales a los que se les dió rGST (Tabla 2).

Tabla 2. Criba preliminar de eficacia protectora de proteínas recombinantes de OMPs en un modelo de hámster

No.	Grupo	Número de animales supervivientes/ número total de animales
1	rGST (control)	0/3 (0)
2	rLA2471	0/3 (0)
3	rLA1454	2/3 (66)
4	rLA1495	0/3 (0)
5	rLA1939	0/3 (0)
6	rLA1965	0/3 (0)
7	rLA1332	0/3 (0)
8	rMCEI	1/2 (50)

No.	Grupo	Número de animales supervivientes/ número total de animales
9	rLA1404	1/2 (50)
10	rLA1228	1/3 (33)
11	rLA1118	2/3 (66)
12	rLA1947	1/3 (33)
13	rMCEII	2/3 (66)

Sin embargo, 2/3 de los hámsters que recibieron rMcell, rLP1118 y r1454 sobrevivieron después el desafío, indicando que estas proteínas recombinantes puedan servir como antígenos protectores.

- 5 Para confirmar la eficacia protectora de rMcell, rLP1118 y r1454, se analizaron estos antígenos recombinantes de nuevo en hámsters (8 hámsters por grupo) con rLigA y rGST como controles positivo y negativo, respectivamente. En comparación con los animales inmunizados con rGST, en donde solo 3/7 hámsters sobrevivieron, 5/7, 6/8, 7/7 y 8/8 hámsters a los que se les dio rLP1454, rLP1118, rMCEII y rLigA, respectivamente, sobrevivieron (Tabla 3).

Tabla 3. Confirmación de efecto protector de rLP1454, rLP1118 y rMCEII

No.	Grupo	Número de animales supervivientes/ número total de animales
1	rLA1454	5/7 (71%)
2	rLA1118	6/8 (75%)
3	rMCEII	7/7 (100%)
4	rGST(control)	3/7 (43%)

De esta manera, rMcell, rLP 1454 y LP1118 proporcionan protección para los efectos letales de infección de *L. interrogans* serovar Pomona.

- 10 Para evaluar si estas proteínas recombinantes pueden mejorar protección sinérgicamente, se les dio a hámsters una combinación de antígenos (rLP1454, rLP1118 y rMCEII) y evaluaron contra un inóculo LD50 de *L. interrogans* serovar Pomona. Casi todos los hámsters que se les dio la combinación OMP recombinante sobrevivieron (7/8) mientras que solo 4/8 hámsters sobrevivieron en el grupo de control (animales inmunizados con rGST). Estos resultados confirman el efecto inmunoprotector sinérgico de estos antígenos recombinantes (Tabla 4).

15 Tabla 4. Efecto protector sinérgico de rLP 1454, rLP1118 y rMCEH

No.	Grupo	No. de animales supervivientes/no. total de animales
1	rLP1454-LP1118-MCEII (combinación)	7/8 (87.5)
2	rLigA	8/8 (100)
3	rGST (control)	4/8 (50)

**Análisis Histopatológico.** Todos excepto dos hámsters que recibieron rGST, desarrollaron severa nefritis tubulointersticial (Tabla 6) mientras que aquellos a los que se les dio rLig, estaban completamente protegidos de severa enfermedad.

20 Tabla 5. Efecto de vacunación de proteína de membrana externa recombinante en la severidad de nefritis tubulointersticial en hámsters expuestos a *L. interrogans* serovar Pomona

Antígeno Recombinante	Proporción con Severa Nefritis Tubulointersticial (grado 3)*
rGST	85%
rLigA	0%
r1454	77% p = 0.6188



R1118	36% p = 0.0098
rMCEII	71% p = 0.4102
(r1454+r1118+rMCEII)	25% p = 0.0261

\* Una prueba Chi-cuadrado para heterogeneidad o independencia, se empleó para determinar la diferencia en lesión histopatológica de riñón al grupo de control (GST). Significancia estadística se reclamó si  $p < 0.05$ .

Las OMPs recombinantes LP 1454 y MCE II solo tienen efectos protectores modestos pero rLP1118 disminuyeron marcadamente la incidencia de nefritis tubulointersticial severa. De manera interesante, cuando rLP1454, rLP1118 y rMCE II se dieron en combinación, los efectos protectores aparecieron sinérgicos, con solo 25% de hámsters que desarrollan severas lesiones renales. Una prueba Chi-Cuadrado para heterogeneidad o independencia se empleó para determinar la diferencia en lesión histopatológica de riñón al grupo de control (GST). Significancia estadística se reclamó si  $p < 0.05$ .

**Cultivo de *Leptospira* de tejidos.** Riñón, hígado, vejiga urinaria, pulmones y bazo de todos los hámsters, incluyendo hámsters inmunizados y de control, fueron evaluados por la presencia de leptospiros por cultivo. Excepto por los grupos de control que cultivaron positivos en riñones, vejiga urinaria y/o bazo en cada animal, todos los otros grupos vacunados fueron positivos solo en dos o tres animales por grupo en riñón y/o vejiga urinaria solamente.

#### 6.2.4 Discusión

En este estudio, nos enfocamos en OMPs putativas del genoma de *Leptospira* para desarrollar una vacuna basada en proteína para la prevención y/o tratamiento de leptospirosis.

Hemos demostrado la factibilidad en desarrollar vacunas recombinantes con base en OMPs. Considerando el aumento en serovares de *Leptospira* y también restricción de hospedero de algunos de los serovares (por ejemplo, serovar Hardjo en ganado), es ventajoso cribar más antígenos protectores para desarrollar una vacuna de múltiples componentes. Enfoques convencionales a desarrollo de vacuna son consumidores de tiempo e identifican solo antígenos abundantes que pueden o no proporcionar inmunidad.

Vacunología inversa (es decir enfoques de base genómica a desarrollar vacuna) puede superar estos problemas y permitir la identificación de candidatos de vacuna novedosos. Todas las OMPs dirigidas en el presente estudio para desarrollo de vacuna, mostraron 98-100% de homología en secuencias de aminoácidos entre *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, *L. interrogans* serovar Copenhageni y *L. interrogans* serovar Pomona. De manera interesante, 13 OMPs putativas no muestran homología a otros organismos en la base de datos NCBI, excepto MCEI y II mostraron 25-30% de similitudes a MCE de *M. tuberculosis* (datos no mostrados). La respuesta de anticuerpos a animales inmunizados con Mcell mostró un nivel menor en comparación con otras proteínas recombinantes. La evaluación de inmunogenicidad de proteínas recombinantes con sueros bovinos de infección experimental y natural indica que MCEII es altamente inmunogénica en comparación con otras proteínas recombinantes de *Leptospira* (nuestros datos sin publicar). Inmunización de hámsters con rMcell desnaturalizada puede provocar un nivel menor de respuestas de anticuerpos (Figura 5). Aunque MCE no proporciona inmunoprotección en microbacterias intracelulares, encontramos la eficacia protectora de rMCE II en un modelo de hámster. MCE está involucrada en invasión de *Mycobacterium* (Chitale et al. 2001. Recombinant Mycobacterium tuberculosis protein associated with mammalian cell entry. Cell. Microbiol. 3:247-254).

Hemos evaluado el potencial protector de proteínas recombinantes utilizando un modelo de exposición intraperitoneal de hámster. El hámster es un modelo preferido de enfermedad de leptospirosis y también nos muestra el estudio de la eficacia protectora contra una exposición heteróloga. El estudio aquí descrito, en donde tamizamos o cribamos para estimar el potencial inmunoprotector contra *Leptospira* en un modelo de hámster, sugiere que rLP1454, rLP1118 y MCEII son antígenos protectores con base en letalidad. Previamente hemos mostrado protección conferida por proteína LigA recombinante (Palaniappan et al. 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. Infect. Immun. 74: 1745-1750). Para mejorar la eficacia protectora de los antígenos recombinantes identificados en este estudio, la aplicación sinérgica de rLP1454, rLP1118 y rMCEII se intentó con rLigA y rGST como controles positivo y negativo, respectivamente. Los resultados implican que un efecto sinérgico con mejor protección se obtuvo con todos los tres antígenos que solos.

En términos generales, la respuesta efectora inmunológica predominante para una bacteria extracelular tal como *Leptospira*, es mediada por anticuerpo con lo que la bacteria ya se extermina directamente por activación de complemento o es opsonizada por fagocitosis. Otros mecanismos además de actividad bactericida mediada por complemento, pueden ser responsables por la protección demostrada en el presente estudio y la contribución de otros aspectos del sistema inmune a la defensa contra infección leptospiral, también puede estimarse. Una vacuna Leptospiral monovalente se ha reportado que induce inmuno respuesta protectora tipo 1 (Naiman, et al. 2002. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. Infect. Immun. 70:6147-6157).

5 Recientemente, inmunización pasiva de anticuerpos policlonales de rLigA falló en proporcionar protección contra infección (Palaniappan, et al. 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. Mol. Cell. Probes 19:1 1 1-117). Por lo tanto aparece que tanto inmunidad humoral como mediada por células puede jugar un papel en inmunoprotección. La generación de los antígenos protectores identificados en este estudio tiene el potencial por mejorar la eficacia de una vacuna de base recombinante y también puede llevar al desarrollo de vacunas de múltiples componentes para generar protección cruzada contra un amplio intervalo creciente de serovares de *Leptospira*.

10 La presente invención no se limita en alcance por las modalidades específicas aquí descritas. Sin duda, diversas modificaciones de la invención además de aquellas aquí descritas serán aparentes para aquellos con destreza en la técnica a partir de la descripción anterior. Estas modificaciones se pretende que caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las referencias aquí citadas se incorporan por referencia en su totalidad y para todos los propósitos en la misma extensión como si cada publicación individual, patente o solicitud de patente se indicara en forma específica e individual incorporada por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

15 La cita de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no habrá de considerarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteponer fecha a dicha publicación en virtud de invención previa.

# ES 2 395 548 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chang, Yung-Fu

5 <120> PROTEINAS INMUNOGÉNICAS DE MEMBRANA EXTERIOR DERIVADA DE GENOMA DE LEPTOSPIRA Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS BASADOS EN LAS MISMAS

<130> 1258\_3959PCT

10 <150> 60/976,088  
<151> 2007-09-28

<150> 60/974,818  
<151> 2007-09-24

15 <160> 67

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1  
<211> 1077  
<212> ADN  
<213> Leptospira interrogans serovar Pomona

25 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1077)

<300>

30 <308> GenBank / AAN48653  
<309> 2006-02-01  
<313> (1)..(1077)

<400> 1

35

gtg ggg aaa aac aat tcg ttc aga ccg aaa aat tct ttc tta aag ttc	48
Met Gly Lys Asn Asn Ser Phe Arg Pro Lys Asn Ser Phe Leu Lys Phe	
1 5 10 15	
caa gtt gta ttc ggt ttt ttt ctt ttg agt ttt att tct tta aat tca	96
40 Gln Val Val Phe Gly Phe Phe Leu Leu Ser Phe Ile Ser Leu Asn Ser	
20 25 30	
gaa gaa aga tcc tca att tta gat cct acg ttt ttt tta att cat aag	144
Glu Glu Arg Ser Ser Ile Leu Asp Pro Thr Phe Phe Leu Ile His Lys	
35 40 45	
aat ctg aat cct tct tta gga ggt tta ttc gaa acc aga aaa aaa ttt	192
Asn Leu Asn Pro Ser Leu Gly Gly Leu Phe Glu Thr Arg Lys Lys Phe	
50 55 60	
act tct tat gga gcc tgg ttt gaa ctt cca gtt tgg aaa cga gaa cgt	240
Thr Ser Tyr Gly Ala Trp Phe Glu Leu Pro Val Trp Lys Arg Glu Arg	
65 70 75 80	
aaa cat ttt tgg aaa acc cat ttt ctt tat gag aat cac aag act ttt	288
Lys His Phe Trp Lys Thr His Phe Leu Tyr Glu Asn His Lys Thr Phe	
85 90 95	
tca gtc gtt cat caa act tac ata gga ctt gaa tat tct ttt att tca	336
55 Ser Val Val His Gln Thr Tyr Ile Gly Leu Glu Tyr Ser Phe Ile Ser	
100 105 110	
gaa aag aag gat ctg cac cct tcc gtt ttt gta ggt tgg gaa aga gga	384
Glu Lys Lys Asp Leu His Pro Ser Val Phe Val Gly Trp Glu Arg Gly	
115 120 125	
60 gaa aag gat tta gga att ttc gga atc cac ctt aca att ccg gac aaa	432

ES 2 395 548 T3

	Glu	Lys	Asp	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Ile	His	Leu	Thr	Ile	Pro	Asp	Lys	
		130					135					140					
	caa	acg	atc	caa	ggt	ttt	gga	aaa	act	gga	aaa	gat	ttt	aaa	agt	ggt	480
5	Gln	Thr	Ile	Gln	Val	Phe	Gly	Lys	Thr	Gly	Lys	Asp	Phe	Lys	Ser	Gly	
	145					150					155				160		
	tct	atc	ttt	ctt	cat	tct	aac	ttt	gat	act	gga	ctt	caa	tta	ttt	tta	528
	Ser	Ile	Phe	Leu	His	Ser	Asn	Phe	Asp	Thr	Gly	Leu	Gln	Leu	Phe	Leu	
					165					170					175		
10	gga	ttt	tca	agg	aca	tgg	gac	aaa	tcc	tat	acc	gaa	gat	caa	ttc	act	576
	Gly	Phe	Ser	Arg	Thr	Trp	Asp	Lys	Ser	Tyr	Thr	Glu	Asp	Gln	Phe	Thr	
				180					185					190			
	ctt	gga	atc	agg	ggt	tct	tgg	gaa	aaa	att	tac	tct	tct	ttt	ttc	tgg	624
	Leu	Gly	Ile	Arg	Val	Ser	Trp	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe	Phe	Trp	
			195					200					205				
15	aat	caa	acg	cag	gaa	gaa	gaa	tca	ttt	cta	acc	ggg	aaa	ttt	gga	atc	672
	Asn	Gln	Thr	Gln	Glu	Glu	Glu	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Gly	Ile	
			210				215					220					
	agt	aat	ttc	caa	caa	gat	ctc	aaa	tct	aaa	aca	ctt	ttt	gaa	tcc	aca	720
20	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Ser	Thr	
	225				230						235				240		
	gac	gaa	ttt	cag	tcg	aat	tca	ctt	ttt	aaa	tct	aaa	aat	tta	agt	tct	768
	Asp	Glu	Phe	Gln	Ser	Asn	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Leu	Ser	Ser	
				245					250					255			
25	aaa	aac	aca	aaa	tca	aaa	tcg	ttc	gaa	act	tct	ctt	tta	gaa	aaa	gat	816
	Lys	Asn	Thr	Lys	Ser	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Asp	
			260					265					270				
	aaa	aca	aat	tat	tcc	tac	ata	agt	tca	ttt	att	cg	agt	tat	acg	aat	864
	Lys	Thr	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Phe	Ile	Arg	Ser	Tyr	Thr	Asn	
			275				280					285					
30	att	tcg	att	tcc	ggt	cag	gaa	tta	ttg	tcc	gcc	ggt	ttt	act	ctt	tcc	912
	Ile	Ser	Ile	Ser	Val	Gln	Glu	Leu	Leu	Ser	Ala	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	
			290				295					300					
	tcc	gct	ttg	gaa	att	tct	aag	gcg	agc	tat	aac	tct	aaa	gaa	gaa	ttt	960
	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Ser	Lys	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ser	Lys	Glu	Glu	Phe	
35	305				310						315				320		
	cta	aag	tta	ttt	cat	tct	ctt	tca	gta	aaa	gaa	caa	acc	aaa	att	ttc	1008
	Leu	Lys	Leu	Phe	His	Ser	Leu	Ser	Val	Lys	Glu	Gln	Thr	Lys	Ile	Phe	
				325					330					335			
40	ggt	ctt	ttg	aaa	aag	aaa	aat	ccg	aag	cac	att	ctt	aaa	aat	tca	att	1056
	Val	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Pro	Lys	His	Ile	Leu	Lys	Asn	Ser	Ile	
				340					345					350			
	ctt	ccc	aaa	gat	aaa	aga	tga									1077	
	Leu	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg											
			355														
45	<210>	2															
	<211>	358															
	<212>	PRT															
	<213>	Leptospira interrogans serovar Pomona															
50	<400>	2															
	Met	Gly	Lys	Asn	Asn	Ser	Phe	Arg	Pro	Lys	Asn	Ser	Phe	Leu	Lys	Phe	
	1			5						10					15		
55	Gln	Val	Val	Phe	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Ser	Phe	Ile	Ser	Leu	Asn	Ser	
				20					25					30			
	Glu	Glu	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Ile	His	Lys	
			35					40					45				
60	Asn	Leu	Asn	Pro	Ser	Leu	Gly	Gly	Leu	Phe	Glu	Thr	Arg	Lys	Lys	Phe	
	50						55					60					

ES 2 395 548 T3

Thr Ser Tyr Gly Ala Trp Phe Glu Leu Pro Val Trp Lys Arg Glu Arg  
65 70 75 80  
Lys His Phe Trp Lys Thr His Phe Leu Tyr Glu Asn His Lys Thr Phe  
85 90 95  
5 Ser Val Val His Gln Thr Tyr Ile Gly Leu Glu Tyr Ser Phe Ile Ser  
100 105 110  
Glu Lys Lys Asp Leu His Pro Ser Val Phe Val Gly Trp Glu Arg Gly  
115 120 125  
10 Glu Lys Asp Leu Gly Ile Phe Gly Ile His Leu Thr Ile Pro Asp Lys  
130 135 140  
Gln Thr Ile Gln Val Phe Gly Lys Thr Gly Lys Asp Phe Lys Ser Gly  
145 150 155 160  
Ser Ile Phe Leu His Ser Asn Phe Asp Thr Gly Leu Gln Leu Phe Leu  
165 170 175  
15 Gly Phe Ser Arg Thr Trp Asp Lys Ser Tyr Thr Glu Asp Gln Phe Thr  
180 185 190  
Leu Gly Ile Arg Val Ser Trp Glu Lys Ile Tyr Ser Ser Phe Phe Trp  
195 200 205  
20 Asn Gln Thr Gln Glu Glu Glu Ser Phe Leu Thr Gly Lys Phe Gly Ile  
210 215 220  
Ser Asn Phe Gln Gln Asp Leu Lys Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ser Thr  
225 230 235 240  
Asp Glu Phe Gln Ser Asn Ser Leu Phe Lys Ser Lys Asn Leu Ser Ser  
245 250 255  
25 Lys Asn Thr Lys Ser Lys Ser Phe Glu Thr Ser Leu Leu Glu Lys Asp  
260 265 270  
Lys Thr Asn Tyr Ser Tyr Ile Ser Ser Phe Ile Arg Ser Tyr Thr Asn  
275 280 285  
30 Ile Ser Ile Ser Val Gln Glu Leu Leu Ser Ala Gly Phe Thr Leu Ser  
290 295 300  
Ser Ala Leu Glu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Asn Ser Lys Glu Glu Phe  
305 310 315 320  
Leu Lys Leu Phe His Ser Leu Ser Val Lys Glu Gln Thr Lys Ile Phe  
325 330 335  
35 Val Leu Leu Lys Lys Lys Asn Pro Lys His Ile Leu Lys Asn Ser Ile  
340 345 350  
Leu Pro Lys Asp Lys Arg  
355

40 <210> 3  
<211> 951  
<212> ADN  
<213> Leptospira interrogans serovar Pomona

45 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(951)

<300>  
50 <308> GenBank / AAN48316  
<309> 2006-02-01  
<313> (1)..(951)

<400> 3

55 gtg aaa cat cca aaa atg aac ctc ttg gga gcg ctt tta ctt agc tcc 48  
Met Lys His Pro Lys Met Asn Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Ser Ser  
1 5 10 15  
tta ttc tta aat cct ttg aat tcc gac cct acg tta ggc aac tgt gaa 96  
60 Leu Phe Leu Asn Pro Leu Asn Ser Asp Pro Thr Leu Gly Asn Cys Glu



ES 2 395 548 T3

<400> 4

5 Met Lys His Pro Lys Met Asn Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Ser Ser  
5 5 10 15  
Leu Phe Leu Asn Pro Leu Asn Ser Asp Pro Thr Leu Gly Asn Cys Glu  
20 25 30  
Val Phe Pro Thr Asn Asn Ile Trp Asn Thr Pro Val Asp Thr Leu Pro  
35 40 45  
10 Leu His Pro Phe Ser Glu Ser Tyr Val Arg Ser Ile Gly Ala Gln Lys  
50 55 60  
Lys Leu Lys Ala Asp Phe Gly Ser Gly Leu Trp Glu Gly Met Pro Ile  
65 70 75 80  
Gly Ile Pro Phe Ile Leu Thr Ser Gly Ala Asn Pro Val Pro Val Ser  
15 85 90 95  
Phe Glu Tyr Thr Asp Glu Ser Glu Pro Gly Pro Tyr Pro Ile Pro His  
100 105 110  
Asn Ala Pro Ile Glu Gly Gly Glu Thr Ser Asp Gly Asp Arg His Val  
115 120 125  
20 Leu Val Val Glu Gln Lys Thr Cys Lys Leu Tyr Glu Leu Tyr Ser Ala  
130 135 140  
Arg Lys Lys Gly Lys Ser Trp Thr Ala Val Ser Gly Ala Val Phe Asp  
145 150 155 160  
Leu Lys Ser Asn Gln Leu Arg Pro Ala Asn Trp Thr Ser Ala Asp Ala  
25 165 170 175  
Ala Gly Leu Pro Ile Leu Pro Gly Leu Val Arg Tyr Glu Glu Ile Ala  
180 185 190  
Ser Gly Glu Ile Lys His Ala Ile Arg Phe Thr Ala Lys Lys Thr Gln  
195 200 205  
30 Lys Ala Tyr Leu Trp Pro Ala Arg His Tyr Ala Ser Lys Ile Thr Asp  
210 215 220  
Lys Asn Val Pro Pro Met Gly Thr Arg Phe Arg Leu Lys Ala Ser Phe  
225 230 235 240  
Asn Ile Asp Gly Phe Ser Lys Glu Asn Gln Val Ile Leu Arg Ala Leu  
35 245 250 255  
Lys Lys Tyr Gly Met Ile Leu Ala Asp Asn Gly Ser Asp Trp Phe Leu  
260 265 270  
Ser Gly Ala Pro Asn Glu Lys Trp Asn Asn Asp Gln Leu His Lys Leu  
275 280 285  
40 Gly Lys Val Leu Gly Asp Gln Phe Glu Ala Val Asp Ser Glu Ser Leu  
290 295 300  
Met Ile Ser Thr Asp Ser Gly Glu Ala Lys Gln Asn  
305 310 315

45 <210> 5  
<211> 480  
<212> ADN  
<213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona

50 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(480)

<300>  
55 <308> GenBank / AAN49138  
<309> 2006-02-01  
<313> (1)..(480)

<400> 5  
60

ES 2 395 548 T3

atg aaa aaa cat tct atc agt aaa atc att ata act gct tgt tgc att 48  
 Met Lys Lys His Ser Ile Ser Lys Ile Ile Ile Thr Ala Cys Cys Ile  
 1 5 10 15  
 5 ttt ctt tta aca tac gga tgc aaa caa gat cca gta gat tac aat aat 96  
 Phe Leu Leu Thr Tyr Gly Cys Lys Gln Asp Pro Val Asp Tyr Asn Asn  
 20 25 30  
 aaa atc atg gaa atc atg aac gct tct aca aac gat tta gat gcg tta 144  
 Lys Ile Met Glu Ile Met Asn Ala Ser Thr Asn Asp Leu Asp Ala Leu  
 35 40 45  
 10 aac gca gcc atg gaa aag gaa gac ctt aca aac gca gaa aat gtt aga 192  
 Asn Ala Ala Met Glu Lys Glu Asp Leu Thr Asn Ala Glu Asn Val Arg  
 50 55 60  
 aaa gct tgg gaa aca aag cta gtt tct tca ctc gat aag ctt aaa gga 240  
 Lys Ala Trp Glu Thr Lys Leu Val Ser Ser Leu Asp Lys Leu Lys Gly  
 15 65 70 75 80  
 atc agt gat ttt aaa gga gat tcc agt ttt aaa aat gca agc gtc caa 288  
 Ile Ser Asp Phe Lys Gly Asp Ser Ser Phe Lys Asn Ala Ser Val Gln  
 85 90 95  
 20 gct ctc gaa act tat ttg aac ata gta agt aaa gac tac aaa cgt ttg 336  
 Ala Leu Glu Thr Tyr Leu Asn Ile Val Ser Lys Asp Tyr Lys Arg Leu  
 100 105 110  
 atc gaa tta cga gga tta ggt gac aaa gca gac tca aat gaa atc aac 384  
 Ile Glu Leu Arg Gly Leu Gly Asp Lys Ala Asp Ser Asn Glu Ile Asn  
 115 120 125  
 25 caa gtt ctc aat cgt att aat cag gat ttt gaa aaa gct gca aat act 432  
 Gln Val Leu Asn Arg Ile Asn Gln Asp Phe Glu Lys Ala Ala Asn Thr  
 130 135 140  
 ctc aat gct gct tct gat aaa ttt gcg aaa gaa tac gct tct caa taa 480  
 Leu Asn Ala Ala Ser Asp Lys Phe Ala Lys Glu Tyr Ala Ser Gln  
 30 145 150 155  
  
 <210> 6  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 35 <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona  
  
 <400> 6  
 Met Lys Lys His Ser Ile Ser Lys Ile Ile Ile Thr Ala Cys Cys Ile  
 1 5 10 15  
 40 Phe Leu Leu Thr Tyr Gly Cys Lys Gln Asp Pro Val Asp Tyr Asn Asn  
 20 25 30  
 Lys Ile Met Glu Ile Met Asn Ala Ser Thr Asn Asp Leu Asp Ala Leu  
 35 40 45  
 Asn Ala Ala Met Glu Lys Glu Asp Leu Thr Asn Ala Glu Asn Val Arg  
 45 50 55 60  
 Lys Ala Trp Glu Thr Lys Leu Val Ser Ser Leu Asp Lys Leu Lys Gly  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Asp Phe Lys Gly Asp Ser Ser Phe Lys Asn Ala Ser Val Gln  
 85 90 95  
 50 Ala Leu Glu Thr Tyr Leu Asn Ile Val Ser Lys Asp Tyr Lys Arg Leu  
 100 105 110  
 Ile Glu Leu Arg Gly Leu Gly Asp Lys Ala Asp Ser Asn Glu Ile Asn  
 115 120 125  
 Gln Val Leu Asn Arg Ile Asn Gln Asp Phe Glu Lys Ala Ala Asn Thr  
 55 130 135 140  
 Leu Asn Ala Ala Ser Asp Lys Phe Ala Lys Glu Tyr Ala Ser Gln  
 145 150 155  
  
 <210> 7  
 60 <211> 801



ES 2 395 548 T3

<212> ADN  
 <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona

<220>  
 5 <221> CDS  
 <222> (1)..(801)

<400> 7

10	atg aat ctt tcc aaa cac aca gcc gtt ctc aca ggg att gtt ttc ttc	48
	Met Asn Leu Ser Lys His Thr Ala Val Leu Thr Gly Ile Val Phe Phe	
	1 5 10 15	
	tta gca ttt tcc tta agt atg tat gtc tcc gtt att gaa aaa gcc gga	96
	Leu Ala Phe Ser Leu Ser Met Tyr Val Ser Val Ile Glu Lys Ala Gly	
	20 25 30	
15	acc aaa gac gaa tat cca tat acc atg aaa att tat tat ccc cgt ttg	144
	Thr Lys Asp Glu Tyr Pro Tyr Thr Met Lys Ile Tyr Tyr Pro Arg Leu	
	35 40 45	
	gaa gga att cat cca ggt gca ccc gtt cga att tta gga gta gaa aaa	192
	Glu Gly Ile His Pro Gly Ala Pro Val Arg Ile Leu Gly Val Glu Lys	
	50 55 60	
20	gga att gta cgt agt tta gac gtg gtt ccg att gac gaa gta gaa gat	240
	Gly Ile Val Arg Ser Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Glu Val Glu Asp	
	65 70 75 80	
	caa aga ttc ctc aat aag gat caa acg aag gca atc gaa att att gtt	288
	Gln Arg Phe Leu Asn Lys Asp Gln Thr Lys Ala Ile Glu Ile Ile Val	
	85 90 95	
	aga ctg aaa gag cca atc aca ctc tgg gac aat tat aaa att aca ttc	336
	Arg Leu Lys Glu Pro Ile Thr Leu Trp Asp Asn Tyr Lys Ile Thr Phe	
	100 105 110	
30	caa acc aac acg att ctc tct gga aga acc atc gat ata gac cct gga	384
	Gln Thr Asn Thr Ile Leu Ser Gly Arg Thr Ile Asp Ile Asp Pro Gly	
	115 120 125	
	tct ttc gat aaa gaa gag acg tcc ttt ttt caa cct act tac tta gaa	432
	Ser Phe Asp Lys Glu Glu Thr Ser Phe Phe Gln Pro Thr Tyr Leu Glu	
	130 135 140	
35	gaa gaa caa aaa tct cca gac ttc tta cct tct gca gat tac ttt gaa	480
	Glu Glu Gln Lys Ser Pro Asp Phe Leu Pro Ser Ala Asp Tyr Phe Glu	
	145 150 155 160	
40	gat ttt ttc gcg gct tcc acg gga gtc atc cga gaa aat cgt gaa gac	528
	Asp Phe Phe Ala Ala Ser Thr Gly Val Ile Arg Glu Asn Arg Glu Asp	
	165 170 175	
	atc cga act tct ttt aat aat ttt tat gaa att tca gaa aaa ttg aaa	576
	Ile Arg Thr Ser Phe Asn Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Glu Lys Leu Lys	
	180 185 190	
45	tca aat cga gga aca att cct cag atc att aac tct ccg gaa acg tac	624
	Ser Asn Arg Gly Thr Ile Pro Gln Ile Ile Asn Ser Pro Glu Thr Tyr	
	195 200 205	
	gat aac gtg ata gaa tta ctt aca gat gct aga att ttc ggt aac gat	672
	Asp Asn Val Ile Glu Leu Thr Asp Ala Arg Ile Phe Gly Asn Asp	
	210 215 220	
50	gct cgt cgt tat ctg gaa ggg aac cgt aag ttg gaa cgt tct gct ccg	720
	Ala Arg Arg Tyr Leu Glu Gly Asn Arg Lys Leu Glu Arg Ser Ala Pro	
	225 230 235 240	
55	att cca ctc acg att aat atg tat cgt aga act act ttg atc gga aac	768
	Ile Pro Leu Thr Ile Asn Met Tyr Arg Arg Thr Thr Leu Ile Gly Asn	
	245 250 255	
	gtg agt aat cgg tat tat ttc gga aag tta taa	801
	Val Ser Asn Arg Tyr Tyr Phe Gly Lys Leu	
	260 265	

60

ES 2 395 548 T3

```

<210> 8
<211> 266
<212> PRT
<213> Leptospira interrogans serovar Pomona
5
<400> 8
Met Asn Leu Ser Lys His Thr Ala Val Leu Thr Gly Ile Val Phe Phe
1      5      10
Leu Ala Phe Ser Leu Ser Met Tyr Val Ser Val Ile Glu Lys Ala Gly
10     20     25     30
Thr Lys Asp Glu Tyr Pro Tyr Thr Met Lys Ile Tyr Tyr Pro Arg Leu
35     40     45
Glu Gly Ile His Pro Gly Ala Pro Val Arg Ile Leu Gly Val Glu Lys
50     55     60
15 Gly Ile Val Arg Ser Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Glu Val Glu Asp
65     70     75     80
Gln Arg Phe Leu Asn Lys Asp Gln Thr Lys Ala Ile Glu Ile Ile Val
85     90     95
Arg Leu Lys Glu Pro Ile Thr Leu Trp Asp Asn Tyr Lys Ile Thr Phe
100    105    110
20 Gln Thr Asn Thr Ile Leu Ser Gly Arg Thr Ile Asp Ile Asp Pro Gly
115    120    125
Ser Phe Asp Lys Glu Glu Thr Ser Phe Phe Gln Pro Thr Tyr Leu Glu
130    135    140
25 Glu Glu Gln Lys Ser Pro Asp Phe Leu Pro Ser Ala Asp Tyr Phe Glu
145    150    155    160
Asp Phe Phe Ala Ala Ser Thr Gly Val Ile Arg Glu Asn Arg Glu Asp
165    170    175
30 Ile Arg Thr Ser Phe Asn Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Glu Lys Leu Lys
180    185    190
Ser Asn Arg Gly Thr Ile Pro Gln Ile Ile Asn Ser Pro Glu Thr Tyr
195    200    205
Asp Asn Val Ile Glu Leu Leu Thr Asp Ala Arg Ile Phe Gly Asn Asp
210    215    220
35 Ala Arg Arg Tyr Leu Glu Gly Asn Arg Lys Leu Glu Arg Ser Ala Pro
225    230    235    240
Ile Pro Leu Thr Ile Asn Met Tyr Arg Arg Thr Thr Leu Ile Gly Asn
245    250    255
40 Val Ser Asn Arg Tyr Tyr Phe Gly Lys Leu
260    265

<210> 9
<211> 1263
<212> ADN
45 <213> Leptospira interrogans serovar Pomona

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1263)
50
<400> 9
atg ctc aac aca aaa ata aag aaa aaa tta ttt ctc tca gtt att ttt      48
Met Leu Asn Thr Lys Ile Lys Lys Lys Leu Phe Leu Ser Val Ile Phe
1      5      10
55 ttt cta ttt cta cca tcg gtc gcc tgt gcg gaa aaa agt ttt cgt aaa      96
Phe Leu Phe Leu Pro Ser Val Ala Cys Ala Glu Lys Ser Phe Arg Lys
20     25     30
cat atc gcg gac tca aaa ctc att cct tcc gaa atc gaa ttt tat tct      144
His Ile Ala Asp Ser Lys Leu Ile Pro Ser Glu Ile Glu Phe Tyr Ser
35     40     45

```

ES 2 395 548 T3

	aac att ctt ccc gga ctt tcc gga aaa aat gtc att cta att aca aac	192
	Asn Ile Leu Pro Gly Leu Ser Gly Lys Asn Val Ile Leu Ile Thr Asn	
	50 55 60	
5	cca tct gga atc gga aga agc ccc gaa agg att tta cga gaa ttt aaa	240
	Pro Ser Gly Ile Gly Arg Ser Pro Glu Arg Ile Leu Arg Glu Phe Lys	
	65 70 75 80	
	aaa cac gac gta aaa atc aaa cat ctc atc gga ttg gaa cac gga ttt	288
	Lys His Asp Val Lys Ile Lys His Leu Ile Gly Leu Glu His Gly Phe	
	85 90 95	
10	tta gga ctc gag gag gac ttc agt aaa tct ccc gtt acg gtg gat gaa	336
	Leu Gly Leu Glu Glu Asp Phe Ser Lys Ser Pro Val Thr Val Asp Glu	
	100 105 110	
	ttt ttt aat ctc cca atc tat cat atc tat cga gtc aag aac gca gaa	384
	Phe Phe Asn Leu Pro Ile Tyr His Ile Tyr Arg Val Lys Asn Ala Glu	
15	115 120 125	
	ctt cct acg att ttg aaa gga gcc gac gcg att ctt ttt gat gtg caa	432
	Leu Pro Thr Ile Leu Lys Gly Ala Asp Ala Ile Leu Phe Asp Val Gln	
	130 135 140	
20	gat atg ggg atg aga tgt tat act tat cta acc gtt tta aaa aga att	480
	Asp Met Gly Met Arg Cys Tyr Thr Tyr Leu Thr Val Leu Lys Arg Ile	
	145 150 155 160	
	atg gat gga att cca gat cct aca aat acg aga ctg atc gtt ttg gat	528
	Met Asp Gly Ile Pro Asp Pro Thr Asn Thr Arg Leu Ile Val Leu Asp	
	165 170 175	
25	cac gta aac ccc gct ctt tat tta aaa gga aga gga gaa atg atc gat	576
	His Val Asn Pro Ala Leu Tyr Leu Lys Gly Arg Gly Glu Met Ile Asp	
	180 185 190	
	aaa cgt ttc tta aat ttt gca gga gaa ttc cct tct ctt ttt ttt gga	624
	Lys Arg Phe Leu Asn Phe Ala Gly Glu Phe Pro Ser Leu Phe Phe Gly	
30	195 200 205	
	ggt ttg acc ttg gga gaa tca gcg gtt tat tat aac tct gaa tat tta	672
	Gly Leu Thr Leu Gly Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Asn Ser Glu Tyr Leu	
	210 215 220	
35	gat aaa aag gtt cgt tta gaa gtg gta tct cct aaa aac gca aaa cga	720
	Asp Lys Lys Val Arg Leu Glu Val Val Ser Pro Lys Asn Ala Lys Arg	
	225 230 235 240	
	tct ttt gat tgg gat aga gaa gga att cct tgg act aca cct tct cct	768
	Ser Phe Asp Trp Asp Arg Glu Gly Ile Pro Trp Thr Thr Pro Ser Pro	
	245 250 255	
40	aat tta cca act ata gat tct gcg atc aat tat ctg ggg ctt gtt ttg	816
	Asn Leu Pro Thr Ile Asp Ser Ala Ile Asn Tyr Leu Gly Leu Val Leu	
	260 265 270	
	tta gaa gga gtg aac gtt tct gtg gga agg ggt aca acc gca cct ttt	864
	Leu Glu Gly Val Asn Val Ser Val Gly Arg Gly Thr Thr Ala Pro Phe	
45	275 280 285	
	gta tat ttc gga gcg cct tgg atg aca gag ccc gaa aag tta gcg gaa	912
	Val Tyr Phe Gly Ala Pro Trp Met Thr Glu Pro Glu Lys Leu Ala Glu	
	290 295 300	
50	gaa tta aat caa aat tca ggt gga gaa tat tat tat cag act gtg ttt	960
	Glu Leu Asn Gln Asn Ser Gly Gly Glu Tyr Tyr Gln Thr Val Phe	
	305 310 315 320	
	ttt aaa cct gta ttt ggt cct tac aag aat gag att tgt aga gga ttg	1008
	Phe Lys Pro Val Phe Gly Pro Tyr Lys Asn Glu Ile Cys Arg Gly Leu	
	325 330 335	
55	cgc cta acg gta gta aat cga aag tat gat cct tta aaa atg gca ttc	1056
	Arg Leu Thr Val Val Asn Arg Lys Tyr Asp Pro Leu Lys Met Ala Phe	
	340 345 350	
	cag ttg atc tcc gct tta aaa tcg aat tat aaa gaa ttt aaa tgg aga	1104
	Gln Leu Ile Ser Ala Leu Lys Ser Asn Tyr Lys Glu Phe Lys Trp Arg	
60	355 360 365	

ES 2 395 548 T3

```

    tcg tat ccg gat gga acc tac aat ata gat ttc cta tgg gga acg gaa      1152
    Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Asn Ile Asp Phe Leu Trp Gly Thr Glu
        370                      375                      380
5   tcg ttt cga aaa acg atc gac gcc gga aaa aaa tac gat caa tat gcg      1200
    Ser Phe Arg Lys Thr Ile Asp Ala Gly Lys Lys Tyr Asp Gln Tyr Ala
    385                      390                      395                      400
    gaa tac tta agt tcc att gag aaa gaa tat aat gaa aaa att aag aaa      1248
    Glu Tyr Leu Ser Ser Ile Glu Lys Glu Tyr Asn Glu Lys Ile Lys Lys
        405                      410                      415
10  tat tat ctc tac tga
    Tyr Tyr Leu Tyr
        420
    <210> 10
15  <211> 420
    <212> PRT
    <213> Leptospira interrogans serovar Pomona
    <400> 10
20  Met Leu Asn Thr Lys Ile Lys Lys Lys Leu Phe Leu Ser Val Ile Phe
    1                      5                      10                      15
    Phe Leu Phe Leu Pro Ser Val Ala Cys Ala Glu Lys Ser Phe Arg Lys
        20                      25                      30
25  His Ile Ala Asp Ser Lys Leu Ile Pro Ser Glu Ile Glu Phe Tyr Ser
    35                      40                      45
    Asn Ile Leu Pro Gly Leu Ser Gly Lys Asn Val Ile Leu Ile Thr Asn
    50                      55                      60
    Pro Ser Gly Ile Gly Arg Ser Pro Glu Arg Ile Leu Arg Glu Phe Lys
    65                      70                      75                      80
30  Lys His Asp Val Lys Ile Lys His Leu Ile Gly Leu Glu His Gly Phe
    85                      90                      95
    Leu Gly Leu Glu Asp Phe Ser Lys Ser Pro Val Thr Val Asp Glu
        100                      105                      110
35  Phe Phe Asn Leu Pro Ile Tyr His Ile Tyr Arg Val Lys Asn Ala Glu
    115                      120                      125
    Leu Pro Thr Ile Leu Lys Gly Ala Asp Ala Ile Leu Phe Asp Val Gln
    130                      135                      140
    Asp Met Gly Met Arg Cys Tyr Thr Tyr Leu Thr Val Leu Lys Arg Ile
    145                      150                      155                      160
40  Met Asp Gly Ile Pro Asp Pro Thr Asn Thr Arg Leu Ile Val Leu Asp
    165                      170                      175
    His Val Asn Pro Ala Leu Tyr Leu Lys Gly Arg Gly Glu Met Ile Asp
    180                      185                      190
45  Lys Arg Phe Leu Asn Phe Ala Gly Glu Phe Pro Ser Leu Phe Phe Gly
    195                      200                      205
    Gly Leu Thr Leu Gly Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Asn Ser Glu Tyr Leu
    210                      215                      220
    Asp Lys Lys Val Arg Leu Glu Val Val Ser Pro Lys Asn Ala Lys Arg
    225                      230                      235                      240
50  Ser Phe Asp Trp Asp Arg Glu Gly Ile Pro Trp Thr Thr Pro Ser Pro
    245                      250                      255
    Asn Leu Pro Thr Ile Asp Ser Ala Ile Asn Tyr Leu Gly Leu Val Leu
    260                      265                      270
55  Leu Glu Gly Val Asn Val Ser Val Gly Arg Gly Thr Thr Ala Pro Phe
    275                      280                      285
    Val Tyr Phe Gly Ala Pro Trp Met Thr Glu Pro Glu Lys Leu Ala Glu
    290                      295                      300
    Glu Leu Asn Gln Asn Ser Gly Gly Glu Tyr Tyr Tyr Gln Thr Val Phe
    305                      310                      315                      320
60  Phe Lys Pro Val Phe Gly Pro Tyr Lys Asn Glu Ile Cys Arg Gly Leu

```

ES 2 395 548 T3

```

          325              330              335
Arg Leu Thr Val Val Asn Arg Lys Tyr Asp Pro Leu Lys Met Ala Phe
          340              345              350
5  Gln Leu Ile Ser Ala Leu Lys Ser Asn Tyr Lys Glu Phe Lys Trp Arg
          355              360              365
Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Asn Ile Asp Phe Leu Trp Gly Thr Glu
          370              375              380
Ser Phe Arg Lys Thr Ile Asp Ala Gly Lys Lys Tyr Asp Gln Tyr Ala
          385              390              395              400
10  Glu Tyr Leu Ser Ser Ile Glu Lys Glu Tyr Asn Glu Lys Ile Lys Lys
          405              410              415
Tyr Tyr Leu Tyr
          420

15  <210>  11
     <211> 266
     <212> PRT
     <213> Leptospira interrogans serovar Lai

20  <300>
     <308> GenBank / AAN47806
     <309> 2006-02-01
     <313> (1)..(266)

25  <400>  11

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

```

ES 2 395 548 T3

<210> 12  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 5 <213> *Leptospira interrogans* serovar Lai  
  
 <300>  
 <308> GenBank / AAN49254  
 <309> 2006-02-01  
 10 <313> (1)..(251)  
  
 <400> 12  
  
 Met Asn Met Asn Ser Leu Arg Tyr Leu Leu Val Gly Ile Ile Phe Thr  
 15 1 5 10 15  
 Ala Ala Ile Thr Val Val Gly Tyr Phe Thr Ile Ile Thr Glu Gly Gly  
 20 20 25 30  
 Pro Ile Lys Lys Lys Gly Glu Phe Met Lys Val Thr Phe Arg Asn Ala  
 25 35 40 45  
 Glu Gly Ile Lys Val Gly Asn Lys Val Thr Val Gln Gly Val Pro Phe  
 30 50 55 60  
 Gly Tyr Val Ser Ala Ile Arg Leu Ile Gln Ile Asp Glu Asn Gly Thr  
 35 65 70 75 80  
 Glu Val Gln Ser Gly Glu Met Gly Ile Gly Thr Arg Val Glu Ile Thr  
 40 85 90 95  
 Met Leu Leu Arg Glu Lys Ile Ser Leu Tyr Asp Asn Tyr Asp Ile Ile  
 45 100 105 110  
 Ile Lys Asn Glu Ser Leu Leu Thr Gly Arg Val Ile Ala Ile Asp Pro  
 50 115 120 125  
 Gly Thr Ala Asp Leu Glu Pro Lys Gln Leu Lys Thr Arg Thr Thr Pro  
 55 130 135 140  
 Ile Thr Met Ile Asp Tyr Lys Thr Thr Gly Ser Leu Lys Gly Arg Val  
 60 145 150 155 160  
 Leu Gln Asp Pro Leu Val Ser Leu Ser Glu Leu Ile Ser Glu Asn Arg  
 65 165 170 175  
 Gly Asp Ile Arg Lys Thr Phe Ser Asn Ile Ala Asp Ile Thr Thr Lys  
 70 180 185 190  
 Ile Asn Thr Gly Asp Gly Ser Leu Gly Arg Leu Ile Asn Asn Asp Asp  
 75 195 200 205  
 Val His Lys Asn Val Asn Thr Val Leu Thr Asp Ala Gln Ile Val Leu  
 80 210 215 220  
 Arg Glu Leu Arg Glu Gly Leu Glu Asp Thr Arg Glu Gln Thr Pro Val  
 85 225 230 235 240  
 Thr Ser Phe Ile Arg Ala Ala Leu Ser Ala Phe  
 90 245 250  
  
 <210> 13  
 <211> 1323  
 <212> ADN  
 50 <213> *Tuberculosis Mycobacterium* CDC1551  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1323)  
 55  
 <300>  
 <308> GenBank / AE000516  
 <309> 2004-08-04  
 <313> (91)..(879)  
 60

ES 2 395 548 T3

<400> 13

	gtg cga cgt cgt gct caa ggt caa cgg caa ggg cgg cca gcc ggt gta	48
5	Met Arg Arg Arg Ala Gln Gly Gln Arg Gln Gly Arg Pro Ala Gly Val 1 5 10 15	
	cat caa gct ggc cgg tca gga cag cgg gcg gtg cgc gcc gaa atg aaa	96
	His Gln Ala Gly Arg Ser Gly Gln Arg Ala Val Arg Ala Glu Met Lys 20 25 30	
10	tcc ttc gcc gaa cgc aac cgt ctg gcc atc ggc aca gtc ggc atc gtc	144
	Ser Phe Ala Glu Arg Asn Arg Leu Ala Ile Gly Thr Val Gly Ile Val 35 40 45	
	gtc gtc gcc gcc gtt gcg ctg gcc gcg ctg caa tac cag cgg ctg ccg	192
	Val Val Ala Ala Val Ala Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Gln Arg Leu Pro 50 55 60	
15	ttt ttc aac cag ggc acc agg gtc tcc gcc tat ttc gcc gac gcc ggc	240
	Phe Phe Asn Gln Gly Thr Arg Val Ser Ala Tyr Phe Ala Asp Ala Gly 65 70 75 80	
	ggg ctg cgc acc ggc aac acc gtc gag gtc tcc ggc tat ccg gtg gga	288
20	Gly Leu Arg Thr Gly Asn Thr Val Glu Val Ser Gly Tyr Pro Val Gly 85 90 95	
	aag gtg tcc agc atc tcg ctc gac gga ccg ggc gtg ctg gtg gag ttc	336
	Lys Val Ser Ser Ile Ser Leu Asp Gly Pro Gly Val Leu Val Glu Phe 100 105 110	
25	aag gtc gac acc gac gtc cga ctc gga aac cgc acc gaa gtg gca atc	384
	Lys Val Asp Thr Asp Val Arg Leu Gly Asn Arg Thr Glu Val Ala Ile 115 120 125	
	aaa acc aag ggc ttg ttg ggc agc aag ttc ctc gac gtc acc ccc cgc	432
	Lys Thr Lys Gly Leu Leu Gly Ser Lys Phe Leu Asp Val Thr Pro Arg 130 135 140	
30	ggg gac ggc cga ctc gat tct ccg atc ccg atc gag cgg acc acg tcg	480
	Gly Asp Gly Arg Leu Asp Ser Pro Ile Pro Ile Glu Arg Thr Thr Ser 145 150 155 160	
	ccc tac caa ctg ccc gac gcc ctt ggc gat ttg gcc gcc acg atc agc	528
35	Pro Tyr Gln Leu Pro Asp Ala Leu Gly Asp Leu Ala Ala Thr Ile Ser 165 170 175	
	ggg ttg cac acc gag cgg ctg tcc gaa tcg ctg gcc acc ctg gcg cag	576
	Gly Leu His Thr Glu Arg Leu Ser Glu Ser Leu Ala Thr Leu Ala Gln 180 185 190	
40	acc ttt gcc gat acg ccg gcg cac ttc cgc aac gcc ata cac ggg gtg	624
	Thr Phe Ala Asp Thr Pro Ala His Phe Arg Asn Ala Ile His Gly Val 195 200 205	
	gcc cgg ctc gcc caa acc ctc gat gag cgc gac aac caa ctg cgc agc	672
	Ala Arg Leu Ala Gln Thr Leu Asp Glu Arg Asp Asn Gln Leu Arg Ser 210 215 220	
45	ctg ctg gcc aac gcg gcc aaa gcc acc ggg gtg ctg gcc aac cgc acc	720
	Leu Leu Ala Asn Ala Ala Lys Ala Thr Gly Val Leu Ala Asn Arg Thr 225 230 235 240	
	gac cag atc gtc ggc ctg gtg cgc gac acg aat gtg gtc ttg gcg cag	768
50	Asp Gln Ile Val Gly Leu Val Arg Asp Thr Asn Val Val Leu Ala Gln 245 250 255	
	ctg cgc acc caa agc gcc gcc ctg gac cgg atc tgg gcg aac atc tcg	816
	Leu Arg Thr Gln Ser Ala Ala Leu Asp Arg Ile Trp Ala Asn Ile Ser 260 265 270	
55	gcg gtg gcc gaa caa ctg cgg ggc ttc atc gct gag aac cgc cag cag	864
	Ala Val Ala Glu Gln Leu Arg Gly Phe Ile Ala Glu Asn Arg Gln Gln 275 280 285	
	ctg cgc ccg gcg ctg gac aag ctc aac ggg gtg ctg gct atc gtc gaa	912
	Leu Arg Pro Ala Leu Asp Lys Leu Asn Gly Val Leu Ala Ile Val Glu 290 295 300	
60	aac cgc aaa gag cgt gtg cgg cag gcc atc ccg ctg atc aac acc tat	960

ES 2 395 548 T3

	Asn	Arg	Lys	Glu	Arg	Val	Arg	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Ile	Asn	Thr	Tyr	
	305					310					315					320	
	gtc	atg	tcg	ctg	ggt	gag	tcg	ctg	tcg	tcg	ggc	ccg	ttc	ttc	aag	gca	1008
	Val	Met	Ser	Leu	Gly	Glu	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Pro	Phe	Phe	Lys	Ala	
5					325					330					335		
	tac	gtg	gtg	aac	ctg	ctg	ccg	ggt	cag	ttc	gtg	caa	ccg	ttc	atc	agc	1056
	Tyr	Val	Val	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Gln	Phe	Val	Gln	Pro	Phe	Ile	Ser	
				340					345					350			
	gcc	gcg	ttc	tcc	gac	ctg	ggg	ctc	gac	ccg	gcc	acg	ttg	ctg	ccg	tcg	1104
10	Ala	Ala	Phe	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Ser	
			355					360					365				
	cag	ctg	acc	gac	cca	ccg	acc	ggt	caa	ccc	gga	acc	ccg	ccg	ttg	ccg	1152
	Gln	Leu	Thr	Asp	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Pro	Leu	Pro	
			370				375					380					
15	atg	ccc	tac	ccg	cgc	acg	ggc	cag	ggc	ggt	gag	ccg	cgg	ctg	acg	ctg	1200
	Met	Pro	Tyr	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Gly	Gly	Glu	Pro	Arg	Leu	Thr	Leu	
	385					390					395					400	
	ccc	gac	gcg	atc	acc	ggc	aat	ccc	ggc	gat	ccg	cgc	tat	ccg	tac	cgg	1248
	Pro	Asp	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Pro	Gly	Asp	Pro	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Arg	
20					405					410					415		
	ccg	gag	ccg	ccc	gcg	ccg	ccg	ccc	ggc	ggg	ccg	ccg	ccc	ggc	ccg	ccc	1296
	Pro	Glu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	
					420					425				430			
	gcg	cag	cag	ccg	gga	gac	caa	ccg	tga								1323
25	Ala	Gln	Gln	Pro	Gly	Asp	Gln	Pro									
			435					440									
	<210>		14														
	<211>		440														
30	<212>		PRT														
	<213>		Tuberculosis														
	<400>		14														
	Met	Arg	Arg	Arg	Ala	Gln	Gly	Gln	Arg	Gln	Gly	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	
35	1				5					10					15		
	His	Gln	Ala	Gly	Arg	Ser	Gly	Gln	Arg	Ala	Val	Arg	Ala	Glu	Met	Lys	
				20					25					30			
	Ser	Phe	Ala	Glu	Arg	Asn	Arg	Leu	Ala	Ile	Gly	Thr	Val	Gly	Ile	Val	
			35					40					45				
40	Val	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Tyr	Gln	Arg	Leu	Pro	
			50				55					60					
	Phe	Phe	Asn	Gln	Gly	Thr	Arg	Val	Ser	Ala	Tyr	Phe	Ala	Asp	Ala	Gly	
	65					70					75					80	
	Gly	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Thr	Val	Glu	Val	Ser	Gly	Tyr	Pro	Val	Gly	
45					85						90				95		
	Lys	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Asp	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Glu	Phe	
				100					105					110			
	Lys	Val	Asp	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Gly	Asn	Arg	Thr	Glu	Val	Ala	Ile	
			115					120					125				
50	Lys	Thr	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Lys	Phe	Leu	Asp	Val	Thr	Pro	Arg	
			130				135					140					
	Gly	Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Ser	Pro	Ile	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	
	145					150					155					160	
	Pro	Tyr	Gln	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	
55					165						170				175		
	Gly	Leu	His	Thr	Glu	Arg	Leu	Ser	Glu	Ser	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	
				180						185				190			
	Thr	Phe	Ala	Asp	Thr	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Asn	Ala	Ile	His	Gly	Val	
			195					200					205				
60	Ala	Arg	Leu	Ala	Gln	Thr	Leu	Asp	Glu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Arg	Ser	



# ES 2 395 548 T3

	210		215		220											
	Leu	Leu	Ala	Asn	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Gly	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr
	225					230						235				240
5	Asp	Gln	Ile	Val	Gly	Leu	Val	Arg	Asp	Thr	Asn	Val	Val	Leu	Ala	Gln
					245					250					255	
	Leu	Arg	Thr	Gln	Ser	Ala	Ala	Leu	Asp	Arg	Ile	Trp	Ala	Asn	Ile	Ser
				260					265					270		
	Ala	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Gly	Phe	Ile	Ala	Glu	Asn	Arg	Gln	Gln
				275				280						285		
10	Leu	Arg	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Leu	Asn	Gly	Val	Leu	Ala	Ile	Val	Glu
				290			295						300			
	Asn	Arg	Lys	Glu	Arg	Val	Arg	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Ile	Asn	Thr	Tyr
	305					310						315				320
15	Val	Met	Ser	Leu	Gly	Glu	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Pro	Phe	Phe	Lys	Ala
					325						330				335	
	Tyr	Val	Val	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Gln	Phe	Val	Gln	Pro	Phe	Ile	Ser
				340					345					350		
	Ala	Ala	Phe	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Ser
			355					360						365		
20	Gln	Leu	Thr	Asp	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Pro	Leu	Pro
				370			375					380				
	Met	Pro	Tyr	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Gly	Gly	Glu	Pro	Arg	Leu	Thr	Leu
	385					390					395					400
25	Pro	Asp	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Pro	Gly	Asp	Pro	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Arg
					405					410					415	
	Pro	Glu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro
					420				425					430		
	Ala	Gln	Gln	Pro	Gly	Asp	Gln	Pro								
			435					440								
30	<210> 15															
	<211> 9															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
35	<220>															
	<223> Nonapéptido IL-1beta															
	<400> 15															
40	Val	Gln	Gly	Glu	Glu	Ser	Asn	Asp	Lys							
	1				5											
	<210> 16															
45	<211> 22															
	<212> ADN															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
50	<223> Cebador															
	<400> 16															
55	cgcggatcca cgtaggcaa ct															
	<210> 17															
	<211> 21															
	<212> ADN															
	<213> Secuencia Artificial															
60																

	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	17	
5	ccgctcgagt	tagttttggt t	21
	<210>	18	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	18	
15	cgcgatcca	atccgataac gaat	24
	<210>	19	
	<211>	26	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
25	<400>	19	
	ccgctcgagt	taatgatatt cgtttt	26
	<210>	20	
30	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador	
	<400>	20	
	cgcgatcca	gagttccttt tttt	24
40	<210>	21	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
45	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	21	
50	ccgctcgagt	taaggaacgt tt	22
	<210>	22	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
55	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	22	
60	tttgatccg	cgattaccgt a	21

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 10 <400> 23  
 cttctcgagt taaaagcact t 21  
  
 <210> 24  
 <211> 23  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20  
 <400> 24  
 cgcggatccc ccgacttaaa tgt 23  
  
 <210> 25  
 25 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Cebador  
  
 <400> 25  
 ccgctcgagt caaagtatcg aat 23  
  
 35 <210> 26  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 26  
 45 cgcggatccg tcaataacaa cattgc 26  
  
 <210> 27  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 27  
 55 ccgctcgagt tggtttcctt ttacgtt 27  
  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
 5 <400> 28  
 cgcggatcca tgttgttaca c 21  
 <210> 29  
 <211> 25  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 15 <400> 29  
 ccgctcgagc tactgagaaa tcttt 25  
 20 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 30  
 30 cgcggatcct ctcccgaatg g 21  
 <210> 31  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 31  
 ccgctcgagt tatctcgtat caaa 24  
 <210> 32  
 45 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador  
 <400> 32  
 cgcggatcca tagtacgttt aaaa 24  
 55 <210> 33  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60

<220>  
 <223> Cebador  
 <400> 33  
 5 ccgctcgagt taaaaactgt ggga 24  
 <210> 34  
 <211> 23  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 15 <400> 34  
 cgcggatccc aatcaaaatc ggc 23  
 20 <210> 35  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 35  
 30 ccgctcgagt taatcctcta aatct 25  
 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 36  
 tccccgggg ctggcaaaag a 21  
 <210> 37  
 <211> 23  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 37  
 ccctcgagaa tatccgtatt aga 23  
 55 <210> 38  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>

<223> Cebador  
 <400> 38  
 5 aggggaattc tatgaaaaac tttcgat 27  
 <210> 39  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 15 <400> 39  
 ccctcgagct tagtcgcgtc ag 22  
 <210> 40  
 20 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador  
 <400> 40  
 cgcggatccg atcagatcaa ctt 23  
 30 <210> 41  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 41  
 40 ccgctcgagt taatdddgtg ttttt 25  
 <210> 42  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 42  
 cgcggatcct gcaaacaaga t 21  
 55 <210> 43  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>

<223> Cebador  
 <400> 43  
 5 cgcctcgagt tattgagaag cgtat 25  
 <210> 44  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 15 <400> 44  
 cgcggatccg aaaaagccgg aa 22  
 <210> 45  
 20 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador  
 <400> 45  
 cgctcgagt tataactttc cgaaat 26  
 30 <210> 46  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 46  
 40 cgcggatcct ttccagaaat ttct 24  
 <210> 47  
 <211> 25  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 47  
 ccgctcgagt taataatc tttgt 25  
 55 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>

ES 2 395 548 T3

```

<223> Cebador
<400> 48
5  cgcggatcca ttgcacaaat c 21
    <210> 49
    <211> 24
    <212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Cebador
15 <400> 49
    ccgctcgagt caaagagcaa actt 24
    <210> 50
20 <211> 22
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
25 <223> Cebador
    <400> 50
30 cgcggatccg aagaaagatc ct 22
    <210> 51
    <211> 24
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
35 <220>
    <223> Cebador
    <400> 51
40 ccgctcgagt catcttttat cttt 24
    <210> 52
    <211> 2064
45 <212> ADN
    <213> Leptospira interrogans serovar Pomona
    <220>
    <221> CDS
50 <222> (1)..(2064)
    <400> 52
55 atg cgt cct ttt tct aaa tta att ttt att ctg gcc ttt tgt att ttt 48
    Met Arg Pro Phe Ser Lys Leu Ile Phe Ile Leu Ala Phe Cys Ile Phe
    1 5 10 15
    ttg ccc gtt ttc tct caa cct cta ccg gac ctt ccg gaa aaa caa ttt 96
    Leu Pro Val Phe Ser Gln Pro Leu Pro Asp Leu Pro Glu Lys Gln Phe
    20 25 30
60 ggt caa cct ctt aat aca caa aac gac gaa tac aat cct ata gta agc 144

```



ES 2 395 548 T3

	Gly	Gln	Pro	Leu	Asn	Thr	Gln	Asn	Asp	Glu	Tyr	Asn	Pro	Ile	Val	Ser	
			35					40					45				
	cca	gat	gga	aga	tac	atc	gta	ttc	cag	tcc	aac	cgt	cca	ggc	gga	gaa	192
5	Pro	Asp	Gly	Arg	Tyr	Ile	Val	Phe	Gln	Ser	Asn	Arg	Pro	Gly	Gly	Glu	
		50					55				60						
	gga	gga	atg	gac	att	tgg	att	tcc	gag	aac	att	cgc	ttt	tta	gat	aag	240
	Gly	Gly	Met	Asp	Ile	Trp	Ile	Ser	Glu	Asn	Ile	Arg	Phe	Leu	Asp	Lys	
	65				70						75					80	
10	gag	ata	cca	gca	gaa	tgg	act	aaa	ccc	gta	aat	atg	aat	caa	aat	att	288
	Glu	Ile	Pro	Ala	Glu	Trp	Thr	Lys	Pro	Val	Asn	Met	Asn	Gln	Asn	Ile	
				85						90					95		
	tgg	gaa	gaa	tta	aaa	cgt	cca	cca	gct	gct	gga	ggt	cgt	aaa	cca	aat	336
	Trp	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Arg	Lys	Pro	Asn	
				100					105					110			
15	cta	ttc	aac	tct	aac	gcg	ttt	gaa	ggt	gga	att	tca	att	ctt	ttc	gat	384
	Leu	Phe	Asn	Ser	Asn	Ala	Phe	Glu	Gly	Gly	Ile	Ser	Ile	Leu	Phe	Asp	
			115						120					125			
	tct	aac	aac	gcg	cct	tcg	gaa	att	tat	ttt	act	tct	aca	att	aac	ctt	432
20	Ser	Asn	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Ile	Tyr	Phe	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Leu	
		130					135							140			
	gct	ggt	ggg	cgt	tcc	ggt	ttt	gaa	ggt	ttg	aat	att	tat	aga	aca	att	480
	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Gly	Phe	Glu	Gly	Leu	Asn	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ile	
	145				150						155					160	
25	aaa	gat	aaa	aaa	aca	gga	aga	tgg	aca	gac	cca	gaa	cat	ctc	agt	gaa	528
	Lys	Asp	Lys	Lys	Thr	Gly	Arg	Trp	Thr	Asp	Pro	Glu	His	Leu	Ser	Glu	
					165					170					175		
	att	aat	tcc	aac	ttc	aat	gat	aag	atg	ccc	gca	att	tct	ccc	gat	gga	576
	Ile	Asn	Ser	Asn	Phe	Asn	Asp	Lys	Met	Pro	Ala	Ile	Ser	Pro	Asp	Gly	
				180					185					190			
30	aat	ttt	ttg	atc	ttc	tct	tcg	gac	cgt	ccg	ggg	ggt	tac	ggt	gat	ttc	624
	Asn	Phe	Leu	Ile	Phe	Ser	Ser	Asp	Arg	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gly	Asp	Phe	
			195						200					205			
	gat	ctt	tgg	atc	tcg	ggt	cgt	aat	cca	aaa	aac	gga	agt	tgg	tcc	caa	672
35	Asp	Leu	Trp	Ile	Ser	Val	Arg	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Ser	Trp	Ser	Gln	
		210						215						220			
	cct	aaa	aat	tta	ggt	tct	ccc	ctc	aac	tct	tcc	gaa	agt	gaa	att	ctt	720
	Pro	Lys	Asn	Leu	Gly	Ser	Pro	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Ser	Glu	Ile	Leu	
					225							235				240	
40	cct	ttc	att	cat	caa	gac	gga	gaa	caa	ctt	tat	ttc	agt	tct	aat	cga	768
	Pro	Phe	Ile	His	Gln	Asp	Gly	Glu	Gln	Leu	Tyr	Phe	Ser	Ser	Asn	Arg	
				245							250				255		
	gaa	gac	gaa	aga	aaa	aaa	ttt	aag	att	ttt	aga	ata	ttc	tta	aaa	tat	816
	Glu	Asp	Glu	Arg	Lys	Lys	Phe	Lys	Ile	Phe	Arg	Ile	Phe	Leu	Lys	Tyr	
				260					265					270			
45	aaa	tct	gct	cta	gac	aac	atg	tta	gaa	gac	gaa	gaa	gaa	acc	gaa	gaa	864
	Lys	Ser	Ala	Leu	Asp	Asn	Met	Leu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Thr	Glu	Glu	
			275					280						285			
	act	cct	aca	acc	aaa	ccg	act	gaa	att	tta	att	cct	aaa	att	gat	caa	912
50	Thr	Pro	Thr	Thr	Lys	Pro	Thr	Glu	Ile	Leu	Ile	Pro	Lys	Ile	Asp	Gln	
		290						295						300			
	tct	tct	tta	tta	ctt	ctt	ccc	aaa	ccg	ttt	aac	act	gat	aag	tgg	gaa	960
	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Lys	Pro	Phe	Asn	Thr	Asp	Lys	Trp	Glu	
					305											320	
	ggt	ttt	gat	aac	gaa	gga	atc	agt	ttt	gac	aaa	gac	ggt	atc	tgg	gct	1008
55	Gly	Phe	Asp	Asn	Glu	Gly	Ile	Ser	Phe	Asp	Lys	Asp	Gly	Ile	Trp	Ala	
				325								330			335		
	tat	att	tct	tcc	aat	cgt	tct	ggt	gga	gaa	ggt	caa	ttt	gac	att	ttc	1056
	Tyr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Glu	Gly	Gln	Phe	Asp	Ile	Phe	
				340							345				350		
60	cgc	ttt	caa	ggt	ccg	gaa	tct	att	cgc	aac	tcc	tat	act	tta	aac	ttc	1104

ES 2 395 548 T3

	Arg	Phe	Gln	Val	Pro	Glu	Ser	Ile	Arg	Asn	Ser	Tyr	Thr	Leu	Asn	Phe	
			355					360					365				
	aaa	ggt	cta	ggt	ttg	gat	ggt	tcc	gaa	aag	acg	atg	att	gga	tta	gat	1152
5	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Thr	Met	Ile	Gly	Leu	Asp	
		370				375					380						
	tct	act	tta	aaa	att	tat	gat	gga	act	aaa	ccg	gct	aac	gta	atc	act	1200
	Ser	Thr	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asp	Gly	Thr	Lys	Pro	Ala	Asn	Val	Ile	Thr	
		385			390						395				400		
10	tcg	aaa	aga	atc	gga	gga	gat	ctt	acc	aaa	gga	aaa	cct	tct	aat	ttt	1248
	Ser	Lys	Arg	Ile	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Lys	Gly	Lys	Pro	Ser	Asn	Phe	
				405					410						415		
	gca	aca	act	ctt	caa	acc	gga	aag	ggt	tat	aaa	ata	gaa	att	agt	tct	1296
	Ala	Thr	Thr	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	Val	Tyr	Lys	Ile	Glu	Ile	Ser	Ser	
			420						425					430			
15	cct	ggc	ttt	cat	cct	caa	gag	gat	att	ttg	gat	tta	aga	gga	aac	ata	1344
	Pro	Gly	Phe	His	Pro	Gln	Glu	Asp	Ile	Leu	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Ile	
			435					440						445			
	ggt	aaa	aat	cga	aaa	ggt	tat	aga	acc	tac	ggt	ctt	tta	cca	att	caa	1392
20	Gly	Lys	Asn	Arg	Lys	Val	Tyr	Arg	Thr	Tyr	Val	Leu	Leu	Pro	Ile	Gln	
		450				455						460					
	gtt	gaa	gaa	ggt	aaa	acg	gaa	gaa	aca	aaa	ata	gaa	caa	ccc	ata	gag	1440
	Val	Glu	Glu	Gly	Lys	Thr	Glu	Glu	Thr	Lys	Ile	Glu	Gln	Pro	Ile	Glu	
		465			470						475				480		
25	aat	caa	aaa	cca	aat	tct	gcc	gcg	ttg	aaa	gtc	atc	gta	gca	gac	gca	1488
	Asn	Gln	Lys	Pro	Asn	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Val	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	
			485						490					495			
	tct	aca	aaa	caa	atc	ata	cca	gac	gct	aaa	ggt	act	ctt	ttt	aca	cct	1536
	Ser	Thr	Lys	Gln	Ile	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Val	Thr	Leu	Phe	Thr	Pro	
			500						505					510			
30	atg	aac	cgc	aaa	gga	gaa	tct	ctt	gtc	caa	gat	gcg	gat	aaa	aaa	tct	1584
	Met	Asn	Arg	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Val	Gln	Asp	Ala	Asp	Lys	Lys	Ser	
			515					520						525			
	ttt	ctt	att	aaa	aaa	tta	cca	gat	aac	gat	ttt	gaa	tta	ttt	gca	aca	1632
35	Phe	Leu	Ile	Lys	Lys	Leu	Pro	Asp	Asn	Asp	Phe	Glu	Leu	Phe	Ala	Thr	
		530				535						540					
	gct	tcg	aaa	tat	att	tct	gaa	agt	atc	aat	att	att	caa	aaa	aat	att	1680
	Ala	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ser	Glu	Ser	Ile	Asn	Ile	Ile	Gln	Lys	Asn	Ile	
		545			550						555				560		
40	tcc	aaa	aat	gga	act	gta	aca	att	tat	ctg	aaa	gca	gaa	agc	gac	gta	1728
	Ser	Lys	Asn	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Tyr	Leu	Lys	Ala	Glu	Ser	Asp	Val	
			565						570						575		
	gat	ccg	ggt	tat	aat	cta	cga	ggt	tat	ttc	gaa	ttt	aat	aaa	aca	aaa	1776
	Asp	Pro	Val	Tyr	Asn	Leu	Arg	Val	Tyr	Phe	Glu	Phe	Asn	Lys	Thr	Lys	
			580						585					590			
45	atc	aca	gaa	gag	aat	aaa	aag	ttg	cta	gat	cct	ctt	gta	ggc	tat	ctt	1824
	Ile	Thr	Glu	Glu	Asn	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Val	Gly	Tyr	Leu	
			595					600					605				
	ttg	aaa	aat	gcg	tcc	gat	aaa	att	gaa	att	ggg	gga	cat	acc	gac	aac	1872
50	Leu	Lys	Asn	Ala	Ser	Asp	Lys	Ile	Glu	Ile	Gly	Gly	His	Thr	Asp	Asn	
		610				615						620					
	gta	gcc	tct	aag	gaa	tat	aac	aca	aga	ttg	agt	gcc	aaa	aga	gcc	cgt	1920
	Val	Ala	Ser	Lys	Glu	Tyr	Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	Ala	Lys	Arg	Ala	Arg	
		625			630						635				640		
55	aac	ggt	tac	gag	tat	ctt	ctt	tca	aaa	gga	att	ccg	gag	aaa	aga	atg	1968
	Asn	Val	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Gly	Ile	Pro	Glu	Lys	Arg	Met	
			645						650						655		
	aga	atc	agg	gct	tat	tgg	tat	tca	caa	ccg	gat	gca	gac	aat	gag	aca	2016
	Arg	Ile	Arg	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ser	Gln	Pro	Asp	Ala	Asp	Asn	Glu	Thr	
			660						665					670			
60	gaa	acc	gga	aga	gca	aaa	aat	aga	aga	ggt	ggt	ttt	aga	aag	ctc	tga	2064

ES 2 395 548 T3

Glu Thr Gly Arg Ala Lys Asn Arg Arg Val Gly Phe Arg Lys Leu  
675 680 685

<210> 53  
5 <211> 687  
<212> PRT  
<213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona

<400> 53  
10

Met Arg Pro Phe Ser Lys Leu Ile Phe Ile Leu Ala Phe Cys Ile Phe  
1 5 10 15  
Leu Pro Val Phe Ser Gln Pro Leu Pro Asp Leu Pro Glu Lys Gln Phe  
20 25 30  
15 Gly Gln Pro Leu Asn Thr Gln Asn Asp Glu Tyr Asn Pro Ile Val Ser  
35 40 45  
Pro Asp Gly Arg Tyr Ile Val Phe Gln Ser Asn Arg Pro Gly Gly Glu  
50 55 60  
20 Gly Gly Met Asp Ile Trp Ile Ser Glu Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys  
65 70 75 80  
Glu Ile Pro Ala Glu Trp Thr Lys Pro Val Asn Met Asn Gln Asn Ile  
85 90 95  
Trp Glu Glu Leu Lys Arg Pro Pro Ala Ala Gly Val Arg Lys Pro Asn  
100 105 110  
25 Leu Phe Asn Ser Asn Ala Phe Glu Gly Gly Ile Ser Ile Leu Phe Asp  
115 120 125  
Ser Asn Asn Ala Pro Ser Glu Ile Tyr Phe Thr Ser Thr Ile Asn Leu  
130 135 140  
30 Ala Val Gly Arg Ser Gly Phe Glu Gly Leu Asn Ile Tyr Arg Thr Ile  
145 150 155 160  
Lys Asp Lys Lys Thr Gly Arg Trp Thr Asp Pro Glu His Leu Ser Glu  
165 170 175  
Ile Asn Ser Asn Phe Asn Asp Lys Met Pro Ala Ile Ser Pro Asp Gly  
180 185 190  
35 Asn Phe Leu Ile Phe Ser Ser Asp Arg Pro Gly Gly Tyr Gly Asp Phe  
195 200 205  
Asp Leu Trp Ile Ser Val Arg Asn Pro Lys Asn Gly Ser Trp Ser Gln  
210 215 220  
40 Pro Lys Asn Leu Gly Ser Pro Leu Asn Ser Ser Glu Ser Glu Ile Leu  
225 230 235 240  
Pro Phe Ile His Gln Asp Gly Glu Gln Leu Tyr Phe Ser Ser Asn Arg  
245 250 255  
Glu Asp Glu Arg Lys Lys Phe Lys Ile Phe Arg Ile Phe Leu Lys Tyr  
260 265 270  
45 Lys Ser Ala Leu Asp Asn Met Leu Glu Asp Glu Glu Glu Thr Glu Glu  
275 280 285  
Thr Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Ile Leu Ile Pro Lys Ile Asp Gln  
290 295 300  
50 Ser Ser Leu Leu Leu Leu Pro Lys Pro Phe Asn Thr Asp Lys Trp Glu  
305 310 315 320  
Gly Phe Asp Asn Glu Gly Ile Ser Phe Asp Lys Asp Gly Ile Trp Ala  
325 330 335  
Tyr Ile Ser Ser Asn Arg Ser Gly Gly Glu Gly Gln Phe Asp Ile Phe  
340 345 350  
55 Arg Phe Gln Val Pro Glu Ser Ile Arg Asn Ser Tyr Thr Leu Asn Phe  
355 360 365  
Lys Gly Leu Val Leu Asp Gly Ser Glu Lys Thr Met Ile Gly Leu Asp  
370 375 380  
60 Ser Thr Leu Lys Ile Tyr Asp Gly Thr Lys Pro Ala Asn Val Ile Thr  
385 390 395 400

ES 2 395 548 T3

Ser Lys Arg Ile Gly Gly Asp Leu Thr Lys Gly Lys Pro Ser Asn Phe  
 405 410 415  
 Ala Thr Thr Leu Gln Thr Gly Lys Val Tyr Lys Ile Glu Ile Ser Ser  
 420 425 430  
 5 Pro Gly Phe His Pro Gln Glu Asp Ile Leu Asp Leu Arg Gly Asn Ile  
 435 440 445  
 Gly Lys Asn Arg Lys Val Tyr Arg Thr Tyr Val Leu Leu Pro Ile Gln  
 450 455 460  
 10 Val Glu Glu Gly Lys Thr Glu Glu Thr Lys Ile Glu Gln Pro Ile Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Gln Lys Pro Asn Ser Ala Ala Leu Lys Val Ile Val Ala Asp Ala  
 485 490 495  
 Ser Thr Lys Gln Ile Ile Pro Asp Ala Lys Val Thr Leu Phe Thr Pro  
 500 505 510  
 15 Met Asn Arg Lys Gly Glu Ser Leu Val Gln Asp Ala Asp Lys Lys Ser  
 515 520 525  
 Phe Leu Ile Lys Lys Leu Pro Asp Asn Asp Phe Glu Leu Phe Ala Thr  
 530 535 540  
 20 Ala Ser Lys Tyr Ile Ser Glu Ser Ile Asn Ile Ile Gln Lys Asn Ile  
 545 550 555 560  
 Ser Lys Asn Gly Thr Val Thr Ile Tyr Leu Lys Ala Glu Ser Asp Val  
 565 570 575  
 Asp Pro Val Tyr Asn Leu Arg Val Tyr Phe Glu Phe Asn Lys Thr Lys  
 580 585 590  
 25 Ile Thr Glu Glu Asn Lys Lys Leu Leu Asp Pro Leu Val Gly Tyr Leu  
 595 600 605  
 Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ile Glu Ile Gly Gly His Thr Asp Asn  
 610 615 620  
 30 Val Ala Ser Lys Glu Tyr Asn Thr Arg Leu Ser Ala Lys Arg Ala Arg  
 625 630 635 640  
 Asn Val Tyr Glu Tyr Leu Leu Ser Lys Gly Ile Pro Glu Lys Arg Met  
 645 650 655  
 Arg Ile Arg Ala Tyr Trp Tyr Ser Gln Pro Asp Ala Asp Asn Glu Thr  
 660 665 670  
 35 Glu Thr Gly Arg Ala Lys Asn Arg Arg Val Gly Phe Arg Lys Leu  
 675 680 685

<210> 54  
 <211> 1983  
 40 <212> ADN  
 <213> Leptospira interrogans serovar Pomona  
 <220>  
 <221> CDS  
 45 <222> (1)..(1983)  
 <400> 54

atg cat acc ctg ctg act ctg atc tta agc ctt ttg ctt ttc tct ggt 48  
 50 Met His Thr Leu Leu Thr Leu Ile Leu Ser Ser Leu Leu Leu Phe Ser Gly  
 1 5 10 15  
 ctt cag tct gag aat aaa aat tct tcc tca aaa aaa cta agc gac tct 96  
 Leu Gln Ser Glu Asn Lys Asn Ser Ser Ser Lys Lys Leu Ser Asp Ser  
 20 25 30  
 55 gct tct tgg att cct aaa gaa aat ttt act caa ctc gca tca caa aga 144  
 Ala Ser Trp Ile Pro Lys Glu Asn Phe Thr Gln Leu Ala Ser Gln Arg  
 35 40 45  
 gaa aaa ttc aaa aac gtt tct cat aac gaa aca tta aaa cta gaa att 192  
 60 Glu Lys Phe Lys Asn Val Ser His Asn Glu Thr Leu Lys Leu Glu Ile  
 50 55 60

ES 2 395 548 T3

	ggc tat aaa tta tta act gga aaa att ctt cag ttt gga aaa tta ctt	240
	Gly Tyr Lys Leu Leu Thr Gly Lys Ile Leu Gln Phe Gly Lys Leu Leu	
	65 70 75 80	
5	agt acc gaa aac gca tac gtc ccc atc gaa tcc aac gaa att act tcc	288
	Ser Thr Glu Asn Ala Tyr Val Pro Ile Glu Ser Asn Glu Ile Thr Ser	
	85 90 95	
	gaa ctt tct caa ctc aac gac aag acc gta aga att tta tgc agt atg	336
	Glu Leu Ser Gln Leu Asn Asp Lys Thr Val Arg Ile Leu Cys Ser Met	
	100 105 110	
10	aaa ggt tcc acc tgc aat cct ata cgt tat gaa att tat ccc ttt tgg	384
	Lys Gly Ser Thr Cys Asn Pro Ile Arg Tyr Glu Ile Tyr Pro Phe Trp	
	115 120 125	
	tat tcg aaa gaa atc aaa cct tgg acg atc aaa aaa att cct gat tac	432
	Tyr Ser Lys Glu Ile Lys Pro Trp Thr Ile Lys Lys Ile Pro Asp Tyr	
15	gta aat cat aat att ttt gca ttc aat cct aca gtt tcc cca gac ggt	480
	Val Asn His Asn Ile Phe Ala Phe Asn Pro Thr Val Ser Pro Asp Gly	
	145 150 155 160	
20	aaa tat ctt ttt tgg acc gct tat gtc aaa cga ggt aaa tcc gga act	528
	Lys Tyr Leu Phe Trp Thr Ala Tyr Val Lys Arg Gly Lys Ser Gly Thr	
	165 170 175	
	caa aag att tgg tat tcc aaa tta gac gaa aaa ggt ttt tgg gaa gat	576
	Gln Lys Ile Trp Tyr Ser Lys Leu Asp Glu Lys Gly Phe Trp Glu Asp	
	180 185 190	
25	ggt aag gaa atg aac gct cct tta aat aat gaa atg cct tcc gct gtt	624
	Gly Lys Glu Met Asn Ala Pro Leu Asn Asn Glu Met Pro Ser Ala Val	
	195 200 205	
	atc tct gca ctt cct ggt ggt aac gaa ctt ttc gtc ttt gga acg ttt	672
	Ile Ser Ala Leu Pro Gly Gly Asn Glu Leu Phe Val Phe Gly Thr Phe	
30	ggc gaa aaa gaa ctt tta gac gaa ctc agt aaa gat ttt gaa acg aag	720
	Gly Glu Lys Glu Leu Leu Asp Glu Leu Ser Lys Asp Phe Glu Thr Lys	
	225 230 235 240	
35	gca gac ttg gcc gct cgt tct tct aaa aat tca aac gta tat aga aaa	768
	Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ser Ser Lys Asn Ser Asn Val Tyr Arg Lys	
	245 250 255	
	aag ata gaa gaa ctt aga gca gaa tat gac gaa aaa acg aaa caa att	816
	Lys Ile Glu Glu Leu Arg Ala Glu Tyr Asp Glu Lys Thr Lys Gln Ile	
	260 265 270	
40	tca agc aga gtt cct ctt tat aaa agt ttt aag gaa aaa gat tcc tgg	864
	Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Lys Ser Phe Lys Glu Lys Asp Ser Trp	
	275 280 285	
	tct aaa cca agc ata tta aac ttt cct aat ttt tat aat ctt tat aga	912
	Ser Lys Pro Ser Ile Leu Asn Phe Pro Asn Phe Tyr Asn Leu Tyr Arg	
45	aag aga aac gat tca agc caa gaa att ttc ggt gga tct act ctt tct	960
	Lys Arg Asn Asp Ser Ser Gln Glu Ile Phe Gly Gly Ser Thr Leu Ser	
	305 310 315 320	
50	tct tca ggg aga att tta atc tat tct tct caa cat aag gat tcc aaa	1008
	Ser Ser Gly Arg Ile Leu Ile Tyr Ser Ser Gln His Lys Asp Ser Lys	
	325 330 335	
	gga aaa ttg gat ctt tat gtt agc aaa atg tta aac gac gga acc ttt	1056
	Gly Lys Leu Asp Leu Tyr Val Ser Lys Met Leu Asn Asp Gly Thr Phe	
	340 345 350	
55	cct tta ggt aca aac tta gga gat gtg atc aac aca act cat gaa gag	1104
	Pro Leu Gly Thr Asn Leu Gly Asp Val Ile Asn Thr Thr His Glu Glu	
	355 360 365	
	atg gct cct ttt tta gca agc gat gat aga acc ctt tat ttt tct agc	1152
	Met Ala Pro Phe Leu Ala Ser Asp Asp Arg Thr Leu Tyr Phe Ser Ser	
60	370 375 380	

ES 2 395 548 T3

	gac ggt cat aaa ggg ctc tct att tat atg aca aaa aga atc gga gaa	1200
	Asp Gly His Lys Gly Leu Ser Ile Tyr Met Thr Lys Arg Ile Gly Glu	
	385 390 395 400	
5	ggt tgg gat caa tgg acc aaa cct gtc gag gtt tcc gaa aat cta aaa	1248
	Gly Trp Asp Gln Trp Thr Lys Pro Val Glu Val Ser Glu Asn Leu Lys	
	405 410 415	
	ggt gta aat ttt ttt tca att ccc gcg aat agc gac tgg gcc tat ata	1296
	Gly Val Asn Phe Phe Ser Ile Pro Ala Asn Ser Asp Trp Ala Tyr Ile	
	420 425 430	
10	agc aaa gac ggc cga ttg ttt atg gct tat ctt cct aaa gaa atg cgc	1344
	Ser Lys Asp Gly Arg Leu Phe Met Ala Tyr Leu Pro Lys Glu Met Arg	
	435 440 445	
	cca gag aag gtc gtg atc ata aac gga aaa gtt tta gat acg gat ggt	1392
15	Pro Glu Lys Val Val Ile Ile Asn Gly Lys Val Leu Asp Thr Asp Gly	
	450 455 460	
	aac cct ctt tct gct gac ata cat tat gaa tct tta aag tct cac gaa	1440
	Asn Pro Leu Ser Ala Asp Ile His Tyr Glu Ser Leu Lys Ser His Glu	
	465 470 475 480	
20	aag atc ggt agc gcc aaa agc gat cct tct aat ggt aat ttt tcg atc	1488
	Lys Ile Gly Ser Ala Lys Ser Asp Pro Ser Asn Gly Asn Phe Ser Ile	
	485 490 495	
	att ctc ccc ttc ggc gaa aac tac ggt ttt tac gcc cag aaa aaa ggt	1536
	Ile Leu Pro Phe Gly Glu Asn Tyr Gly Phe Tyr Ala Gln Lys Lys Gly	
	500 505 510	
25	tat ctt cca gta tca caa aat ttg aat cta agt tct aaa aag aaa ttc	1584
	Tyr Leu Pro Val Ser Gln Asn Leu Asn Leu Ser Ser Lys Lys Lys Phe	
	515 520 525	
	tct gaa aaa gtg gaa gta att tta caa ctt cct ccg atc cga gaa aga	1632
30	Ser Glu Lys Val Glu Val Ile Leu Gln Leu Pro Pro Ile Arg Glu Arg	
	530 535 540	
	ggt tcc att caa atc aat tta ttt ttt gag tcc aag agt ttt caa	1680
	Gly Ser Ile Gln Ile Asn Asn Leu Phe Phe Glu Ser Lys Ser Phe Gln	
	545 550 555 560	
35	atc gct ccg gaa tcc gcc cca gaa ctg gat cgt ctc gcg gaa atc gta	1728
	Ile Ala Pro Glu Ser Ala Pro Glu Leu Asp Arg Leu Ala Glu Ile Val	
	565 570 575	
	aag gaa aat cca gat att gaa att cag att gaa ggt cat acc gac aac	1776
	Lys Glu Asn Pro Asp Ile Glu Ile Gln Ile Glu Gly His Thr Asp Asn	
	580 585 590	
40	att ggc aag aaa aaa gac aat cta att ctt tcc gaa aaa aga gcg gca	1824
	Ile Gly Lys Lys Lys Asp Asn Leu Ile Leu Ser Glu Lys Arg Ala Ala	
	595 600 605	
	gcg gtc gca gaa tat ctt ttt caa aaa cat tct att tct aag act aga	1872
45	Ala Val Ala Glu Tyr Leu Phe Gln Lys His Ser Ile Ser Lys Thr Arg	
	610 615 620	
	atc caa acc aaa ggt ttt ggg gac agt gtt cct ttg agt aaa aat gat	1920
	Ile Gln Thr Lys Gly Phe Gly Asp Ser Val Pro Leu Ser Lys Asn Asp	
	625 630 635 640	
50	tcc gaa gaa gca cgc aaa aaa aac aga agg gtc aat ttt acg att ttg	1968
	Ser Glu Glu Ala Arg Lys Lys Asn Arg Arg Val Asn Phe Thr Ile Leu	
	645 650 655	
	aaa aaa agt aaa taa	1983
	Lys Lys Ser Lys	
	660	
55	<210> 55	
	<211> 660	
	<212> PRT	
	<213> Leptospira interrogans serovar Pomona	
60		

ES 2 395 548 T3

<400> 55

Met His Thr Leu Leu Thr Leu Ile Leu Ser Leu Leu Leu Phe Ser Gly  
 1 5 10 15  
 5 Leu Gln Ser Glu Asn Lys Asn Ser Ser Ser Lys Lys Leu Ser Asp Ser  
 20 25 30  
 Ala Ser Trp Ile Pro Lys Glu Asn Phe Thr Gln Leu Ala Ser Gln Arg  
 35 40 45  
 10 Glu Lys Phe Lys Asn Val Ser His Asn Glu Thr Leu Lys Leu Glu Ile  
 50 55 60  
 Gly Tyr Lys Leu Leu Thr Gly Lys Ile Leu Gln Phe Gly Lys Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Glu Asn Ala Tyr Val Pro Ile Glu Ser Asn Glu Ile Thr Ser  
 85 90 95  
 15 Glu Leu Ser Gln Leu Asn Asp Lys Thr Val Arg Ile Leu Cys Ser Met  
 100 105 110  
 Lys Gly Ser Thr Cys Asn Pro Ile Arg Tyr Glu Ile Tyr Pro Phe Trp  
 115 120 125  
 20 Tyr Ser Lys Glu Ile Lys Pro Trp Thr Ile Lys Lys Ile Pro Asp Tyr  
 130 135 140  
 Val Asn His Asn Ile Phe Ala Phe Asn Pro Thr Val Ser Pro Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Tyr Leu Phe Trp Thr Ala Tyr Val Lys Arg Gly Lys Ser Gly Thr  
 165 170 175  
 25 Gln Lys Ile Trp Tyr Ser Lys Leu Asp Glu Lys Gly Phe Trp Glu Asp  
 180 185 190  
 Gly Lys Glu Met Asn Ala Pro Leu Asn Asn Glu Met Pro Ser Ala Val  
 195 200 205  
 30 Ile Ser Ala Leu Pro Gly Gly Asn Glu Leu Phe Val Phe Gly Thr Phe  
 210 215 220  
 Gly Glu Lys Glu Leu Leu Asp Glu Leu Ser Lys Asp Phe Glu Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Ala Asp Leu Ala Ala Arg Ser Ser Lys Asn Ser Asn Val Tyr Arg Lys  
 245 250 255  
 35 Lys Ile Glu Glu Leu Arg Ala Glu Tyr Asp Glu Lys Thr Lys Gln Ile  
 260 265 270  
 Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Lys Ser Phe Lys Glu Lys Asp Ser Trp  
 275 280 285  
 40 Ser Lys Pro Ser Ile Leu Asn Phe Pro Asn Phe Tyr Asn Leu Tyr Arg  
 290 295 300  
 Lys Arg Asn Asp Ser Ser Gln Glu Ile Phe Gly Gly Ser Thr Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Ser Ser Gly Arg Ile Leu Ile Tyr Ser Ser Gln His Lys Asp Ser Lys  
 325 330 335  
 45 Gly Lys Leu Asp Leu Tyr Val Ser Lys Met Leu Asn Asp Gly Thr Phe  
 340 345 350  
 Pro Leu Gly Thr Asn Leu Gly Asp Val Ile Asn Thr Thr His Glu Glu  
 355 360 365  
 50 Met Ala Pro Phe Leu Ala Ser Asp Asp Arg Thr Leu Tyr Phe Ser Ser  
 370 375 380  
 Asp Gly His Lys Gly Leu Ser Ile Tyr Met Thr Lys Arg Ile Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Trp Asp Gln Trp Thr Lys Pro Val Glu Val Ser Glu Asn Leu Lys  
 405 410 415  
 55 Gly Val Asn Phe Phe Ser Ile Pro Ala Asn Ser Asp Trp Ala Tyr Ile  
 420 425 430  
 Ser Lys Asp Gly Arg Leu Phe Met Ala Tyr Leu Pro Lys Glu Met Arg  
 435 440 445  
 60 Pro Glu Lys Val Val Ile Ile Asn Gly Lys Val Leu Asp Thr Asp Gly  
 450 455 460

ES 2 395 548 T3

Asn Pro Leu Ser Ala Asp Ile His Tyr Glu Ser Leu Lys Ser His Glu  
 465 470 475 480  
 Lys Ile Gly Ser Ala Lys Ser Asp Pro Ser Asn Gly Asn Phe Ser Ile  
 485 490 495  
 5 Ile Leu Pro Phe Gly Glu Asn Tyr Gly Phe Tyr Ala Gln Lys Lys Gly  
 500 505 510  
 Tyr Leu Pro Val Ser Gln Asn Leu Asn Leu Ser Ser Lys Lys Lys Phe  
 515 520 525  
 10 Ser Glu Lys Val Glu Val Ile Leu Gln Leu Pro Pro Ile Arg Glu Arg  
 530 535 540  
 Gly Ser Ile Gln Ile Asn Asn Leu Phe Phe Glu Ser Lys Ser Phe Gln  
 545 550 555 560  
 Ile Ala Pro Glu Ser Ala Pro Glu Leu Asp Arg Leu Ala Glu Ile Val  
 565 570 575  
 15 Lys Glu Asn Pro Asp Ile Glu Ile Gln Ile Glu Gly His Thr Asp Asn  
 580 585 590  
 Ile Gly Lys Lys Lys Asp Asn Leu Ile Leu Ser Glu Lys Arg Ala Ala  
 595 600 605  
 20 Ala Val Ala Glu Tyr Leu Phe Gln Lys His Ser Ile Ser Lys Thr Arg  
 610 615 620  
 Ile Gln Thr Lys Gly Phe Gly Asp Ser Val Pro Leu Ser Lys Asn Asp  
 625 630 635 640  
 Ser Glu Glu Ala Arg Lys Lys Asn Arg Arg Val Asn Phe Thr Ile Leu  
 645 650 655  
 25 Lys Lys Ser Lys  
 660

<210> 56  
 <211> 1428  
 30 <212> ADN  
 <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona  
 <220>  
 <221> CDS  
 35 <222> (1)..(1428)  
 <400> 56

ttg gaa agt ttt tta cac ttt cct tat gtt tta aag gaa tct tac gaa 48  
 40 Met Glu Ser Phe Leu His Phe Pro Tyr Val Leu Lys Glu Ser Tyr Glu  
 1 5 10 15  
 act aaa act atg ggg aaa ttt tcc aat caa cct tca aaa tcc aaa atc 96  
 Thr Lys Thr Met Gly Lys Phe Ser Asn Gln Pro Ser Lys Ser Lys Ile  
 20 25 30  
 45 ata aac aga cgt tta cga aga att gta tca tac gtt ttt att att tct 144  
 Ile Asn Arg Arg Leu Arg Arg Ile Val Ser Tyr Val Phe Ile Ile Ser  
 35 40 45  
 aca ttg atc ggt ttt act tct act ttt cca gaa gaa tcg gac aaa gtt 192  
 Thr Leu Ile Gly Phe Thr Ser Thr Phe Pro Glu Glu Ser Asp Lys Val  
 50 55 60  
 ctc ttt cgt tgg aaa cta aaa cca gga gag aat gta gaa tta aac gaa 240  
 Leu Phe Arg Trp Lys Leu Lys Pro Gly Glu Asn Val Glu Leu Asn Glu  
 65 70 75 80  
 tat cat cga gta caa tta gta agt atg gga aag aaa att aga aga gaa 288  
 55 Tyr His Arg Val Gln Leu Val Ser Met Gly Lys Lys Ile Arg Arg Glu  
 85 90 95  
 gat aaa aat cga atc cta tta caa acc ctt tcc tgc gaa aat aaa gaa 336  
 Asp Lys Asn Arg Ile Leu Leu Gln Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Glu  
 100 105 110  
 60 tgt acg tta gaa gga ttt ttt gat act tac act cgt ttt ccc gaa gtt 384



ES 2 395 548 T3

	Cys	Thr	Leu	Glu	Gly	Phe	Phe	Asp	Thr	Tyr	Thr	Arg	Phe	Pro	Glu	Val	
			115					120					125				
	gat	cct	gcg	ttt	cgt	aaa	gat	aaa	acg	ttt	aag	agc	aga	ttt	caa	ata	432
5	Asp	Pro	Ala	Phe	Arg	Lys	Asp	Lys	Thr	Phe	Lys	Ser	Arg	Phe	Gln	Ile	
		130				135					140						
	aca	gat	tta	ggt	caa	tat	aaa	gtg	cca	cag	gaa	tac	agt	atg	cct	aat	480
	Thr	Asp	Leu	Gly	Gln	Tyr	Lys	Val	Pro	Gln	Glu	Tyr	Ser	Met	Pro	Asn	
		145				150					155				160		
10	ctc	cgc	tct	ctt	cct	agt	ttt	tcc	gaa	aaa	cca	att	tcc	att	gga	gaa	528
	Leu	Arg	Ser	Leu	Pro	Ser	Phe	Ser	Glu	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Gly	Glu	
					165					170					175		
	gaa	tgg	aca	caa	ccc	gct	acg	gaa	agt	ttt	caa	ttt	cca	gga	gga	agg	576
	Glu	Trp	Thr	Gln	Pro	Ala	Thr	Glu	Ser	Phe	Gln	Phe	Pro	Gly	Gly	Arg	
			180						185				190				
15	gtt	atg	atc	acg	ggt	ttt	gcg	aaa	tat	aag	tat	cac	ggt	gta	gac	gaa	624
	Val	Met	Ile	Thr	Val	Phe	Ala	Lys	Tyr	Lys	Tyr	His	Gly	Val	Asp	Glu	
			195					200					205				
	tgg	gaa	tat	caa	aag	ttg	tcc	ggt	aaa	gga	gat	cgt	atc	gaa	tac	aat	672
20	Trp	Glu	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	Gly	Lys	Gly	Asp	Arg	Ile	Glu	Tyr	Asn	
		210					215					220					
	tat	aat	tta	tat	tat	gat	tct	caa	atg	aac	aga	acc	ggg	ggt	cca	ttt	720
	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Gln	Met	Asn	Arg	Thr	Gly	Val	Pro	Phe	
		225				230					235				240		
25	aag	atc	tac	gga	ttt	gcg	cga	gga	atg	gta	ttt	ttt	gat	cgc	gaa	ctt	768
	Lys	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Arg	Gly	Met	Val	Phe	Phe	Asp	Arg	Glu	Leu	
					245					250					255		
	gga	att	cca	caa	tat	aaa	agg	ggt	cag	ttg	tcg	tac	act	ttt	gtc	tat	816
	Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Ser	Tyr	Thr	Phe	Val	Tyr	
					260				265					270			
30	gaa	aat	gga	atg	gcg	caa	gag	atg	tcg	ttc	gac	att	cac	gga	gta	tat	864
	Glu	Asn	Gly	Met	Ala	Gln	Glu	Met	Ser	Phe	Asp	Ile	His	Gly	Val	Tyr	
			275					280					285				
	aat	aaa	aac	gta	aaa	ctt	acg	gat	caa	gac	aag	gac	aag	ttt	gcg	gaa	912
35	Asn	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	Thr	Asp	Gln	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Ala	Glu	
		290					295					300					
	gaa	atc	cgt	aaa	att	tta	gga	gga	gaa	ctt	cca	act	gga	att	gaa	cca	960
	Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Leu	Gly	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Gly	Ile	Glu	Pro	
					310						315				320		
40	gat	tcc	gat	tca	aaa	aag	aat	tta	aaa	aaa	ccg	aaa	aag	gaa	acc	att	1008
	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Pro	Lys	Lys	Glu	Thr	Ile	
					325						330				335		
	tca	tgg	ccg	gaa	gaa	gag	gat	aat	caa	gcc	gca	cca	gaa	agt	tcg	ccg	1056
	Ser	Trp	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Asn	Gln	Ala	Ala	Pro	Glu	Ser	Ser	Pro	
					340				345						350		
45	gta	gaa	att	aga	aga	aca	gaa	gaa	gga	atc	gct	att	tct	tta	aat	tca	1104
	Val	Glu	Ile	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Gly	Ile	Ala	Ile	Ser	Leu	Asn	Ser	
			355					360					365				
	gtg	ttg	ttt	gat	cac	aac	agc	tca	gaa	ctt	aaa	caa	gaa	gca	aaa	tta	1152
50	Val	Leu	Phe	Asp	His	Asn	Ser	Ser	Glu	Leu	Lys	Gln	Glu	Ala	Lys	Leu	
			370				375					380					
	gaa	tta	aaa	aga	atc	gca	tcc	gta	ttg	aaa	aaa	tat	gca	gat	aga	gaa	1200
	Glu	Leu	Lys	Arg	Ile	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Arg	Glu	
					385		390				395				400		
55	atc	aga	att	agc	ggg	cat	act	gac	aat	tca	ggc	ggg	gaa	gaa	tat	aat	1248
	Ile	Arg	Ile	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Asn	Ser	Gly	Gly	Glu	Glu	Tyr	Asn	
					405				410						415		
	cga	aaa	ctt	tcc	aga	gaa	aga	gca	ctt	tcc	ggt	ttg	aag	gaa	ctc	aga	1296
	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Lys	Glu	Leu	Arg	
					420				425					430			
60	gat	gaa	caa	ggt	ttg	gaa	gaa	aaa	aga	atg	tct	tac	gaa	gga	tat	ggg	1344

ES 2 395 548 T3

Asp Glu Gln Gly Leu Glu Glu Lys Arg Met Ser Tyr Glu Gly Tyr Gly  
                   435                                  440                                  445  
 aaa tca aaa ccg att gca gat aac tct acg att caa ggt agg caa aaa           1392  
 Lys Ser Lys Pro Ile Ala Asp Asn Ser Thr Ile Gln Gly Arg Gln Lys  
 5           450                                  455                                  460  
 aat cgt agg gta gat att act att gta atg gaa taa                           1428  
 Asn Arg Arg Val Asp Ile Thr Ile Val Met Glu  
           465                                  470                                  475  
  
 10 <210> 57  
     <211> 475  
     <212> PRT  
     <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona  
  
 15 <400> 57  
  
 Met Glu Ser Phe Leu His Phe Pro Tyr Val Leu Lys Glu Ser Tyr Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Lys Thr Met Gly Lys Phe Ser Asn Gln Pro Ser Lys Ser Lys Ile  
 20                   20                   25                   30  
 Ile Asn Arg Arg Leu Arg Arg Ile Val Ser Tyr Val Phe Ile Ile Ser  
           35                   40                   45  
 Thr Leu Ile Gly Phe Thr Ser Thr Phe Pro Glu Glu Ser Asp Lys Val  
           50                   55                   60  
 25 Leu Phe Arg Trp Lys Leu Lys Pro Gly Glu Asn Val Glu Leu Asn Glu  
       65                   70                   75                   80  
 Tyr His Arg Val Gln Leu Val Ser Met Gly Lys Lys Ile Arg Arg Glu  
           85                   90                   95  
 30 Asp Lys Asn Arg Ile Leu Leu Gln Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Glu  
           100                   105  
 Cys Thr Leu Glu Gly Phe Phe Asp Thr Tyr Thr Arg Phe Pro Glu Val  
           115                   120                   125  
 Asp Pro Ala Phe Arg Lys Asp Lys Thr Phe Lys Ser Arg Phe Gln Ile  
           130                   135                   140  
 35 Thr Asp Leu Gly Gln Tyr Lys Val Pro Gln Glu Tyr Ser Met Pro Asn  
       145                   150                   155                   160  
 Leu Arg Ser Leu Pro Ser Phe Ser Glu Lys Pro Ile Ser Ile Gly Glu  
           165                   170                   175  
 40 Glu Trp Thr Gln Pro Ala Thr Glu Ser Phe Gln Phe Pro Gly Gly Arg  
           180                   185                   190  
 Val Met Ile Thr Val Phe Ala Lys Tyr Lys Tyr His Gly Val Asp Glu  
           195                   200                   205  
 Trp Glu Tyr Gln Lys Leu Ser Gly Lys Gly Asp Arg Ile Glu Tyr Asn  
           210                   215                   220  
 45 Tyr Asn Leu Tyr Tyr Asp Ser Gln Met Asn Arg Thr Gly Val Pro Phe  
       225                   230                   235  
 Lys Ile Tyr Gly Phe Ala Arg Gly Met Val Phe Phe Asp Arg Glu Leu  
           245                   250                   255  
 50 Gly Ile Pro Gln Tyr Lys Arg Val Gln Leu Ser Tyr Thr Phe Val Tyr  
           260                   265                   270  
 Glu Asn Gly Met Ala Gln Glu Met Ser Phe Asp Ile His Gly Val Tyr  
           275                   280                   285  
 Asn Lys Asn Val Lys Leu Thr Asp Gln Asp Lys Asp Lys Phe Ala Glu  
           290                   295                   300  
 55 Glu Ile Arg Lys Ile Leu Gly Gly Glu Leu Pro Thr Gly Ile Glu Pro  
       305                   310                   315                   320  
 Asp Ser Asp Ser Lys Lys Asn Leu Lys Lys Pro Lys Lys Glu Thr Ile  
           325                   330                   335  
 60 Ser Trp Pro Glu Glu Glu Asp Asn Gln Ala Ala Pro Glu Ser Ser Pro  
           340                   345                   350

ES 2 395 548 T3

Val Glu Ile Arg Arg Thr Glu Glu Gly Ile Ala Ile Ser Leu Asn Ser  
 355 360 365  
 Val Leu Phe Asp His Asn Ser Ser Glu Leu Lys Gln Glu Ala Lys Leu  
 370 375 380  
 5 Glu Leu Lys Arg Ile Ala Ser Val Leu Lys Lys Tyr Ala Asp Arg Glu  
 385 390 395 400  
 Ile Arg Ile Ser Gly His Thr Asp Asn Ser Gly Gly Glu Glu Tyr Asn  
 405 410 415  
 10 Arg Lys Leu Ser Arg Glu Arg Ala Leu Ser Val Leu Lys Glu Leu Arg  
 420 425 430  
 Asp Glu Gln Gly Leu Glu Glu Lys Arg Met Ser Tyr Glu Gly Tyr Gly  
 435 440 445  
 Lys Ser Lys Pro Ile Ala Asp Asn Ser Thr Ile Gln Gly Arg Gln Lys  
 450 455 460  
 15 Asn Arg Arg Val Asp Ile Thr Ile Val Met Glu  
 465 470 475  
  
 <210> 58  
 <211> 1683  
 20 <212> ADN  
 <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 25 <222> (1)..(1683)  
  
 <400> 58  
  
 30 atg aaa caa ttt tta ttt tta ctg tgt gta ttt cta ctc ttt caa aat 48  
 Met Lys Gln Phe Leu Phe Leu Leu Cys Val Phe Leu Leu Phe Gln Asn  
 1 5 10 15  
 tgt tct gtc aag ccc acg gaa aat ccg tgc gat acg agt act tct ctt 96  
 Cys Ser Val Lys Pro Thr Glu Asn Pro Cys Asp Thr Ser Thr Ser Leu  
 20 25 30  
 35 ttt tat aaa tct ttg ttc tta aat ttt att tta act tcc ggc aaa acg 144  
 Phe Tyr Lys Ser Leu Phe Leu Asn Phe Ile Leu Thr Ser Gly Lys Thr  
 35 40 45  
 agt att tgc ggt atg cac acg tcg gtt cag ttg cct ccc cct acg att 192  
 Ser Ile Cys Gly Met His Thr Ser Val Gln Leu Pro Pro Pro Thr Ile  
 40 50 55 60  
 ctc aac ata aaa tca aaa agt act ttg aat aca gga ttt tta att ggt 240  
 Leu Asn Ile Lys Ser Lys Ser Thr Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ile Gly  
 65 70 75 80  
 45 gaa atg gat gag tct gct tcc gga gtt caa att tct tta gat tcg ggt 288  
 Glu Met Asp Glu Ser Ala Ser Gly Val Gln Ile Ser Leu Asp Ser Gly  
 85 90 95  
 cca ttt atg gac gct caa act tct ggc aat cag tgg aaa ttt caa ctt 336  
 Pro Phe Met Asp Ala Gln Thr Ser Gly Asn Gln Trp Lys Phe Gln Leu  
 100 105 110  
 50 cct gcc gca ggt gtt tct act aca att cct tca agt gga att tgg aga 384  
 Pro Ala Ala Gly Val Ser Thr Thr Ile Pro Ser Ser Gly Ile Trp Arg  
 115 120 125  
 gac tgg agt tta cat aca att tcg gtt cga tct act tct aag gaa tca 432  
 Asp Trp Ser Leu His Thr Ile Ser Val Arg Ser Thr Ser Lys Glu Ser  
 55 130 135 140  
 aat tct att ccg att aca atc act gtt caa aaa ggt tca aac aag gat 480  
 Asn Ser Ile Pro Ile Thr Ile Thr Val Gln Lys Gly Ser Asn Lys Asp  
 145 150 155 160  
 60 att aac ggc gac ggt tat cca gat gca ttg att ggt tct caa gct gca 528  
 Ile Asn Gly Asp Gly Tyr Pro Asp Ala Leu Ile Gly Ser Gln Ala Ala

# ES 2 395 548 T3

			165					170				175											
			aat	cga	gtt	agg	gct	tat	ctt	tct	ctt	ggg	aaa	gca	aag	ggt	tta	gat					576
			Asn	Arg	Val	Arg	Ala	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Ala	Lys	Gly	Leu	Asp					
						180						185				190							
5			ttg	gtt	ccg	gtc	act	tta	cta	aat	ggg	gca	ggt	gga	ttt	ggt	tat	tcc					624
			Leu	Val	Pro	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Tyr	Ser					
						195					200					205							
			gtc	aag	tta	ggc	gac	atc	gat	gga	gat	gga	tac	gcc	gat	gca	ggt	gta					672
10			Val	Lys	Leu	Gly	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ala	Val	Val					
						210					215					220							
			gga	agt	gca	aca	aat	aca	ttc	gct	att	tat	tta	gga	tca	atc	ggt	ggg					720
			Gly	Ser	Ala	Thr	Asn	Thr	Phe	Ala	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Ile	Gly	Gly					
						225					230					235							240
15			ctt	tcg	aca	acg	gcg	att	aat	tat	atc	cct	att	ggt	ggt	ggt	ggt	tta					768
			Leu	Ser	Thr	Thr	Ala	Ile	Asn	Tyr	Ile	Pro	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Leu					
							245									250							255
			ttg	aat	gtg	gat	gta	gga	gat	ata	aac	gga	gac	gga	ttt	tca	gac	gtt					816
			Leu	Asn	Val	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Phe	Ser	Asp	Val					
						260										270							
20			ttg	att	ggt	gta	cct	tat	gac	gta	gga	aat	att	ggg	cgt	ggt	tat	tct					864
			Leu	Ile	Gly	Val	Pro	Tyr	Asp	Val	Gly	Asn	Ile	Gly	Arg	Val	Tyr	Ser					
						275										280							
			tat	ttt	tca	aat	gga	ggt	atg	ggg	caa	ggt	ggt	acg	ttt	ggt	caa	caa					912
25			Tyr	Phe	Ser	Asn	Gly	Val	Met	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Phe	Gly	Gln	Gln					
						290										300							
			ttg	aac	aat	cct	gga	aat	gca	ggt	agt	gct	gca	ttt	tac	gga	tat	gcc					960
			Leu	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Ala					
						305										310							320
30			att	acg	tta	ggt	gat	att	aat	gga	gat	ggt	aaa	tcg	gat	gcg	att	ata					1008
			Ile	Thr	Leu	Gly	Asp	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Ser	Asp	Ala	Ile	Ile					
							325									330							
			gga	gcg	gtc	ggt	tct	gga	cag	gtc	ggc	gct	tct	ttt	att	tat	ctt	gcg					1056
			Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Gly	Gln	Val	Gly	Ala	Ser	Phe	Ile	Tyr	Leu	Ala					
						340										345							
35			caa	gca	gca	ggg	gct	ttt	gct	gct	tat	tct	caa	aca	att	acg	gga	tcg					1104
			Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Phe	Ala	Ala	Tyr	Ser	Gln	Thr	Ile	Thr	Gly	Ser					
						355										360							
			gct	gca	aat	gaa	tgg	tat	gca	aat	tca	gca	att	gct	acc	gat	ata	aac					1152
40			Ala	Ala	Asn	Glu	Trp	Tyr	Ala	Asn	Ser	Ala	Ile	Ala	Thr	Asp	Ile	Asn					
						370										375							
			cgg	gat	gga	ttt	gcg	gat	tta	ttt	gtg	ggg	gct	tat	caa	gaa	tcg	ggc					1200
			Arg	Asp	Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Phe	Val	Gly	Ala	Tyr	Gln	Glu	Ser	Gly					
																385							400
			ggc	ggt	gga	aga	gta	cat	tta	tat	tta	tct	aat	tta	gga	att	ctt	gtg					1248
45			Gly	Val	Gly	Arg	Val	His	Leu	Tyr	Leu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Leu	Val					
							405									410							
			aat	acc	gcc	aac	ggt	cca	att	tca	gga	ttg	ggt	ggg	tca	caa	act	gga					1296
			Asn	Thr	Ala	Asn	Gly	Pro	Ile	Ser	Gly	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	Thr	Gly					
							420									425							
50			act	tct	gtg	gca	act	gga	gat	gta	aac	ggt	gat	gga	ttt	tta	gat	ctt					1344
			Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	Asp	Gly	Phe	Leu	Asp	Leu					
							435									440							
			ctt	acc	gga	ggt	tat	tct	tac	act	tct	acg	ttt	cca	aat	caa	ggt	tat					1392
55			Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Ser	Thr	Phe	Pro	Asn	Gln	Gly	Tyr					
							450									455							
			gcg	att	act	cat	tta	act	acg	ggt	gat	aca	atg	ggt	tta	act	gtg	aac					1440
			Ala	Ile	Thr	His	Leu	Thr	Thr	Gly	Asp	Thr	Met	Gly	Leu	Thr	Val	Asn					
							465									470							480
			cct	tta	aat	ctt	cta	acg	ggt	cca	gtg	aat	tta	gga	gat	atg	gga	aat					1488
60			Pro	Leu	Asn	Leu	Leu	Thr	Val	Pro	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Met	Gly	Asn					

# ES 2 395 548 T3

		485		490		495		
	tca att gct tcg gta gat att aac ggt gac ggt tta agt gac gtt ctt							1536
	Ser Ile Ala Ser Val Asp Ile Asn Gly Asp Gly Leu Ser Asp Val Leu							
		500		505		510		
5	gtg gga gct cct agt tcc gta ggt gga aca aat gtt gga aac gtt tac							1584
	Val Gly Ala Pro Ser Ser Val Gly Gly Thr Asn Val Gly Asn Val Tyr							
		515		520		525		
	ctt tat ata tca aac gga ttg gac gga tat act tcg gcc cca caa att							1632
	Leu Tyr Ile Ser Asn Gly Leu Asp Gly Tyr Thr Ser Ala Pro Gln Ile							
10		530		535		540		
	ttc gtc gaa cca gat gta aac gga acg ttt ggg act tcc gtg gat tta							1680
	Phe Val Glu Pro Asp Val Asn Gly Thr Phe Gly Thr Ser Val Asp Leu							
	545	550		555		560		
	tga							1683
15								
	<210> 59							
	<211> 560							
	<212> PRT							
	<213> Leptospira interrogans serovar Pomona							
20								
	<400> 59							
	Met Lys Gln Phe Leu Phe Leu Leu Cys Val Phe Leu Leu Phe Gln Asn							
	1	5		10		15		
25	Cys Ser Val Lys Pro Thr Glu Asn Pro Cys Asp Thr Ser Thr Ser Leu							
		20		25		30		
	Phe Tyr Lys Ser Leu Phe Leu Asn Phe Ile Leu Thr Ser Gly Lys Thr							
		35		40		45		
	Ser Ile Cys Gly Met His Thr Ser Val Gln Leu Pro Pro Pro Thr Ile							
30		50		55		60		
	Leu Asn Ile Lys Ser Lys Ser Thr Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ile Gly							
	65	70		75		80		
	Glu Met Asp Glu Ser Ala Ser Gly Val Gln Ile Ser Leu Asp Ser Gly							
		85		90		95		
35	Pro Phe Met Asp Ala Gln Thr Ser Gly Asn Gln Trp Lys Phe Gln Leu							
		100		105		110		
	Pro Ala Ala Gly Val Ser Thr Thr Ile Pro Ser Ser Gly Ile Trp Arg							
		115		120		125		
	Asp Trp Ser Leu His Thr Ile Ser Val Arg Ser Thr Ser Lys Glu Ser							
40		130		135		140		
	Asn Ser Ile Pro Ile Thr Ile Thr Val Gln Lys Gly Ser Asn Lys Asp							
	145	150		155		160		
	Ile Asn Gly Asp Gly Tyr Pro Asp Ala Leu Ile Gly Ser Gln Ala Ala							
		165		170		175		
45	Asn Arg Val Arg Ala Tyr Leu Ser Leu Gly Lys Ala Lys Gly Leu Asp							
		180		185		190		
	Leu Val Pro Val Thr Leu Leu Asn Gly Ala Gly Gly Phe Gly Tyr Ser							
		195		200		205		
	Val Lys Leu Gly Asp Ile Asp Gly Asp Gly Tyr Ala Asp Ala Val Val							
50		210		215		220		
	Gly Ser Ala Thr Asn Thr Phe Ala Ile Tyr Leu Gly Ser Ile Gly Gly							
	225	230		235		240		
	Leu Ser Thr Thr Ala Ile Asn Tyr Ile Pro Ile Gly Val Gly Gly Leu							
		245		250		255		
55	Leu Asn Val Asp Val Gly Asp Ile Asn Gly Asp Gly Phe Ser Asp Val							
		260		265		270		
	Leu Ile Gly Val Pro Tyr Asp Val Gly Asn Ile Gly Arg Val Tyr Ser							
		275		280		285		
	Tyr Phe Ser Asn Gly Val Met Gly Gln Gly Val Thr Phe Gly Gln Gln							
60		290		295		300		

ES 2 395 548 T3

Leu Asn Asn Pro Gly Asn Ala Gly Ser Ala Ala Phe Tyr Gly Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Thr Leu Gly Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ser Asp Ala Ile Ile  
 325 330 335  
 5 Gly Ala Val Gly Ser Gly Gln Val Gly Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Ala  
 340 345 350  
 Gln Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Tyr Ser Gln Thr Ile Thr Gly Ser  
 355 360 365  
 10 Ala Ala Asn Glu Trp Tyr Ala Asn Ser Ala Ile Ala Thr Asp Ile Asn  
 370 375 380  
 Arg Asp Gly Phe Ala Asp Leu Phe Val Gly Ala Tyr Gln Glu Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Gly Val Gly Arg Val His Leu Tyr Leu Ser Asn Leu Gly Ile Leu Val  
 405 410 415  
 15 Asn Thr Ala Asn Gly Pro Ile Ser Gly Leu Val Gly Ser Gln Thr Gly  
 420 425 430  
 Thr Ser Val Ala Thr Gly Asp Val Asn Gly Asp Gly Phe Leu Asp Leu  
 435 440 445  
 20 Leu Thr Gly Gly Tyr Ser Tyr Thr Ser Thr Phe Pro Asn Gln Gly Tyr  
 450 455 460  
 Ala Ile Thr His Leu Thr Thr Gly Asp Thr Met Gly Leu Thr Val Asn  
 465 470 475 480  
 Pro Leu Asn Leu Leu Thr Val Pro Val Asn Leu Gly Asp Met Gly Asn  
 485 490 495  
 25 Ser Ile Ala Ser Val Asp Ile Asn Gly Asp Gly Leu Ser Asp Val Leu  
 500 505 510  
 Val Gly Ala Pro Ser Ser Val Gly Gly Thr Asn Val Gly Asn Val Tyr  
 515 520 525  
 30 Leu Tyr Ile Ser Asn Gly Leu Asp Gly Tyr Thr Ser Ala Pro Gln Ile  
 530 535 540  
 Phe Val Glu Pro Asp Val Asn Gly Thr Phe Gly Thr Ser Val Asp Leu  
 545 550 555 560

35 <210> 60  
 <211> 3492  
 <212> ADN  
 <213> Leptospira interrogans serovar Pomona

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(3492)

<400> 60

45 ttg aac aca tcc atc caa gtt ggt ttt agt caa aaa ttg gat tct tct 48  
 Met Asn Thr Ser Ile Gln Val Gly Phe Ser Gln Lys Leu Asp Ser Ser  
 1 5 10 15  
 agt atc caa tct caa tcg atc caa cta aca caa gga aat acg atc att 96  
 Ser Ile Gln Ser Gln Ser Ile Gln Leu Thr Gln Gly Asn Thr Ile Ile  
 50 20 25 30  
 ccg gga aat ttc act tct aca gaa aaa act ctt tta ttc aat cca acg 144  
 Pro Gly Asn Phe Thr Ser Thr Glu Lys Thr Leu Leu Phe Asn Pro Thr  
 35 40 45  
 tct tcc ttg gct gca tca act gta tat tcc gtt agc att tcc aaa gac 192  
 55 Ser Ser Leu Ala Ala Ser Thr Val Tyr Ser Val Ser Ile Ser Lys Asp  
 50 55 60  
 ata aaa tca atg gac ggc tcc tct ctt tca gaa gac tat act tgg agc 240  
 Ile Lys Ser Met Asp Gly Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Thr Trp Ser  
 65 70 75 80  
 60 ttt acc acc aac acg att gtt gat tta gtc gcg cca gac gta tct tta 288

ES 2 395 548 T3

	Phe Thr Thr Asn Thr Ile Val Asp Leu Val Ala Pro Asp Val Ser Leu	
	85 90 95	
	aga acc cct acc ata ggt gcc aat tta gtt cct aat aat act tcc gtt	336
5	Arg Thr Pro Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Pro Asn Asn Thr Ser Val	
	100 105 110	
	caa att gcg ttt act gaa aca atg aat tgc act tcc atc aac att gta	384
	Gln Ile Ala Phe Thr Glu Thr Met Asn Cys Thr Ser Ile Asn Ile Val	
	115 120 125	
10	aat ttt aca tta aaa aat aat gtt acc aat gta tta gaa cct agt aat	432
	Asn Phe Thr Leu Lys Asn Asn Val Thr Asn Val Leu Glu Pro Ser Asn	
	130 135 140	
	gta gtt tgt tta gga tcc gtt gcc acc ctt acc cct aat aat cct ctt	480
	Val Val Cys Leu Gly Ser Val Ala Thr Leu Thr Pro Asn Asn Pro Leu	
	145 150 155 160	
15	gct ttt aat act gtt tat cgt gtg gat att ctt tct aca gca aaa gat	528
	Ala Phe Asn Thr Val Tyr Arg Val Asp Ile Leu Ser Thr Ala Lys Asp	
	165 170 175	
20	ctt gct aat aat cct ctt gta aac gca tat aac tgg act ttt aca acc	576
	Leu Ala Asn Asn Pro Leu Val Asn Ala Tyr Asn Trp Thr Phe Thr Thr	
	180 185 190	
	gga gtt gcc ccc gat tta acg gtt cca acc gtc tcc ttt gta aat ccc	624
	Gly Val Ala Pro Asp Leu Thr Val Pro Thr Val Ser Phe Val Asn Pro	
	195 200 205	
25	act ccc aat gca caa aac gtt cct atc aac gaa aca atc agt att gcc	672
	Thr Pro Asn Ala Gln Asn Val Pro Ile Asn Glu Thr Ile Ser Ile Ala	
	210 215 220	
	ttt agt gaa cct atc aat tgt gct acg atc atc gga agt att gtc tta	720
	Phe Ser Glu Pro Ile Asn Cys Ala Thr Ile Ile Gly Ser Ile Val Leu	
	225 230 235 240	
30	gat gat aat ata ctt att cct gga agc gta aac ggg aat ccg ggt tgt	768
	Asp Asp Asn Ile Leu Ile Pro Gly Ser Val Asn Gly Asn Pro Gly Cys	
	245 250 255	
35	aca ggc aca acc gca tcc ttt act cct tta ggc aat ttg aca cca aat	816
	Thr Gly Thr Thr Ala Ser Phe Thr Pro Leu Gly Asn Leu Thr Pro Asn	
	260 265 270	
	acg aat tat acg gtt acc gtc tca aat gcg att acg gat ttg caa aac	864
	Thr Asn Tyr Thr Val Thr Val Ser Asn Ala Ile Thr Asp Leu Gln Asn	
	275 280 285	
40	aat cca ctt aca cct tct acc tgg agt ttt acg acg gct gct gca gtc	912
	Asn Pro Leu Thr Pro Ser Thr Trp Ser Phe Thr Thr Ala Ala Ala Val	
	290 295 300	
	gat cag act caa ccc acg gtt aca ttt act gta ccc tcc gcc aac gca	960
	Asp Gln Thr Gln Pro Thr Val Thr Phe Thr Val Pro Ser Ala Asn Ala	
	305 310 315 320	
45	aac ggc gta ggg acc aat gtc aac cct atg gta gtt ttt agc gaa cct	1008
	Asn Gly Val Gly Thr Asn Val Asn Pro Met Val Val Phe Ser Glu Pro	
	325 330 335	
50	atg tct tgc gct tcc gtg acc tcc gca tcc ttt cga tta aag agg cag	1056
	Met Ser Cys Ala Ser Val Thr Ser Ala Ser Phe Arg Leu Lys Arg Gln	
	340 345 350	
	gca acc ggg gtt tat ctt ata gga agt gta aat tgt ttt gga act tcc	1104
	Ala Thr Gly Val Tyr Leu Ile Gly Ser Val Asn Cys Phe Gly Thr Ser	
	355 360 365	
55	gct acc tgg acc cca gat cct gta aat ccg ctt gcc ttt aat act act	1152
	Ala Thr Trp Thr Pro Asp Pro Val Asn Pro Leu Ala Phe Asn Thr Thr	
	370 375 380	
	tac acc gta gaa atc gat cag ggt gca tta gat act ttt aat aat cct	1200
	Tyr Thr Val Glu Ile Asp Gln Gly Ala Leu Asp Thr Phe Asn Asn Pro	
	385 390 395 400	
60	ctc att cca ata aat tgg aac ttt act aca ggc cca gga ccc gat cta	1248

## ES 2 395 548 T3

	Leu	Ile	Pro	Ile	Asn	Trp	Asn	Phe	Thr	Thr	Gly	Pro	Gly	Pro	Asp	Leu	
					405					410					415		
	act	cct	ccc	agt	gtt	gcc	gtc	gtt	act	ccc	gca	aac	gct	gcg	ata	ggc	1296
	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Ala	Val	Val	Thr	Pro	Ala	Asn	Ala	Ala	Ile	Gly	
5					420					425					430		
	gtt	ccg	acc	aac	gga	ggt	gta	agt	atc	gct	ttt	agt	gaa	gcc	atg	aat	1344
	Val	Pro	Thr	Asn	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Ala	Phe	Ser	Glu	Ala	Met	Asn	
					435					440					445		
	tgt	gga	agt	att	tta	gga	gga	atc	acc	ctg	gac	gat	gat	cct	aca	act	1392
10	Cys	Gly	Ser	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	Asp	Asp	Pro	Thr	Thr	
					450					455					460		
	ccg	ggt	act	gtg	att	cca	atc	aat	atc	aat	tgt	aac	gga	aat	act	gtc	1440
	Pro	Gly	Thr	Val	Ile	Pro	Ile	Asn	Ile	Asn	Cys	Asn	Gly	Asn	Thr	Val	
					465					470					475		
	tct	ttt	gcc	ccg	aca	atc	cct	cca	ctt	gcc	ttt	aat	aca	acc	tac	aca	1488
15	Ser	Phe	Ala	Pro	Thr	Ile	Pro	Pro	Leu	Ala	Phe	Asn	Thr	Thr	Tyr	Thr	
					485					490					495		
	gta	acg	att	tta	aat	acg	gtt	acg	gac	agt	aat	aat	aat	gca	cta	aac	1536
20	Val	Thr	Ile	Leu	Asn	Thr	Val	Thr	Asp	Ser	Asn	Asn	Asn	Ala	Leu	Asn	
					500					505					510		
	gga	gga	aat	tac	gct	tgg	tct	ttt	aca	aca	gga	gtg	gca	cca	gac	cta	1584
	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ala	Trp	Ser	Phe	Thr	Thr	Gly	Val	Ala	Pro	Asp	Leu	
					515					520					525		
	gtt	cct	cct	caa	gtt	tct	ctt	gta	agc	cct	ctc	tcg	gga	gca	gta	ggt	1632
25	Val	Pro	Pro	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Ala	Val	Gly	
					530					535					540		
	gtc	gca	aca	aat	gca	aac	att	aca	gtt	gca	ttt	aat	gaa	acc	atc	aat	1680
	Val	Ala	Thr	Asn	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Ala	Phe	Asn	Glu	Thr	Ile	Asn	
					545					550					555		
	tgt	tcc	acc	ttg	aat	ttt	acg	gtt	aat	aac	gga	atc	aat	ggt	act	gtg	1728
30	Cys	Ser	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Val	Asn	Asn	Gly	Ile	Asn	Gly	Thr	Val	
					565					570					575		
	aac	tgt	tca	gga	tcc	tct	gct	act	ttt	att	cct	agc	gct	tta	acc	cct	1776
35	Asn	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Thr	Phe	Ile	Pro	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	
					580					585					590		
	cta	aat	gcc	ggt	aca	aat	tat	aca	gca	aca	atc	cta	aca	gta	aat	gat	1824
	Leu	Asn	Ala	Gly	Thr	Asn	Tyr	Thr	Ala	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Asp	
					595					600					605		
	att	gta	gga	aat	cca	atc	ggt	gct	gcg	ttt	ggt	tgg	agt	ttt	aca	acc	1872
40	Ile	Val	Gly	Asn	Pro	Ile	Gly	Ala	Ala	Phe	Gly	Trp	Ser	Phe	Thr	Thr	
					610					615					620		
	gga	gcc	gct	cca	gat	gtg	act	cct	cct	gtc	gtt	acg	atc	caa	aat	ctt	1920
	Gly	Ala	Ala	Pro	Asp	Val	Thr	Pro	Pro	Val	Val	Thr	Ile	Gln	Asn	Leu	
					625					630					635		
	aga	aat	aat	tct	atc	gta	gaa	act	ggt	ttc	gta	att	gga	acg	gca	aca	1968
45	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Glu	Thr	Gly	Phe	Val	Ile	Gly	Thr	Ala	Thr	
					645					650					655		
	gat	gca	ggc	aca	att	act	tct	gta	gaa	gtt	tct	ttg	gac	aat	ggc	gct	2016
50	Asp	Ala	Gly	Thr	Ile	Thr	Ser	Val	Glu	Val	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Ala	
					660					665					670		
	ttt	gtg	ccc	gca	acc	gga	acc	aat	cct	tgg	aaa	ttt	aaa	ctt	cct	tcg	2064
	Phe	Val	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Trp	Lys	Phe	Lys	Leu	Pro	Ser	
					675					680					685		
	gat	ata	aat	act	tgg	aag	caa	aac	tct	caa	cat	acg	atc	att	gca	aga	2112
55	Asp	Ile	Asn	Thr	Trp	Lys	Gln	Asn	Ser	Gln	His	Thr	Ile	Ile	Ala	Arg	
					690					695					700		
	gct	aag	gac	tta	gcc	aat	aac	ctt	aca	act	aca	gca	gcc	att	tcg	gtt	2160
	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Asn	Asn	Leu	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Ile	Ser	Val	
					705					710					715		
60	cga	aaa	gga	aac	aat	aaa	gat	ata	aac	gga	gac	gga	tac	gtt	gat	ctt	2208



ES 2 395 548 T3

	Arg	Lys	Gly	Asn	Asn	Lys	Asp	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Tyr	Val	Asp	Leu	
				725					730					735			
	gta	tct	gca	gaa	tac	gga	cag	ggg	tta	ctt	tat	att	ttt	cat	tct	tcc	2256
5	Val	Ser	Ala	Glu	Tyr	Gly	Gln	Gly	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	His	Ser	Ser	
			740				745					750					
	ggg	aac	gct	gga	atg	aca	att	aca	aac	gca	caa	tcc	gca	agt	aag	atc	2304
	Gly	Asn	Ala	Gly	Met	Thr	Ile	Thr	Asn	Ala	Gln	Ser	Ala	Ser	Lys	Ile	
			755				760					765					
10	att	gta	gga	gtc	gcg	gcg	gaa	gaa	ttt	gga	aga	act	gtt	tct	atg	gga	2352
	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Ala	Glu	Glu	Phe	Gly	Arg	Thr	Val	Ser	Met	Gly	
			770				775					780					
	gat	tta	aac	gga	gat	gga	ttt	gca	gac	gta	att	tct	ggg	gct	cct	ggg	2400
	Asp	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Phe	Ala	Asp	Val	Ile	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	
			785			790					795					800	
15	tgg	aac	ggg	gcc	caa	ggg	agg	ggt	tat	ata	ttt	cat	tct	tcc	gga	aac	2448
	Trp	Asn	Gly	Ala	Gln	Gly	Arg	Val	Tyr	Ile	Phe	His	Ser	Ser	Gly	Asn	
			805						810							815	
20	gct	gga	gtc	aat	att	tcc	ttt	tcc	ggg	ttt	gcc	act	aaa	acg	atc	agt	2496
	Ala	Gly	Val	Asn	Ile	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ala	Thr	Lys	Thr	Ile	Ser	
			820						825						830		
	gga	gcc	aat	gcg	gga	gct	aga	ttt	gga	gat	agt	att	gtt	aca	ggg	gat	2544
	Gly	Ala	Asn	Ala	Gly	Ala	Arg	Phe	Gly	Asp	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Asp	
			835					840						845			
25	tta	aac	gga	gac	ggc	tac	gca	gac	cta	gca	tca	gga	gaa	ccc	ggt	ttt	2592
	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Tyr	Ala	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Glu	Pro	Val	Phe	
			850				855					860					
	aat	ggg	tct	cag	ggg	aga	gtc	tat	gta	ttt	cat	tcc	gct	gga	gcc	gct	2640
	Asn	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg	Val	Tyr	Val	Phe	His	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	
			865			870					875					880	
30	gga	ggt	aca	caa	ata	aat	tcg	gct	gct	gca	aat	tct	aca	ctc	aca	ggg	2688
	Gly	Val	Thr	Gln	Ile	Asn	Ser	Ala	Ala	Ala	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	
			885							890						895	
35	gaa	aac	gca	act	gat	cgt	ttc	gga	tat	tcg	ttg	agc	act	gga	aat	atg	2736
	Glu	Asn	Ala	Thr	Asp	Arg	Phe	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Met	
			900						905						910		
	aac	gga	gat	aat	ttt	gca	gat	ctt	gca	att	gga	gca	cct	ggg	tat	ggc	2784
	Asn	Gly	Asp	Asn	Phe	Ala	Asp	Leu	Ala	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Tyr	Gly	
			915					920					925				
40	gct	ggc	gta	ggg	gga	gga	ttt	gta	gta	aac	caa	ggg	aaa	ggt	tat	ata	2832
	Ala	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Phe	Val	Val	Asn	Gln	Gly	Lys	Val	Tyr	Ile	
			930				935					940					
	cat	cac	ggg	gcg	gct	ggg	gga	ttg	gga	gga	gta	att	aca	act	ctt	acc	2880
	His	His	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	
			945			950					955					960	
45	aat	gat	agc	gct	gga	aat	gct	ggg	gaa	ttt	ggg	atc	agt	tta	ttt	aca	2928
	Asn	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu	Phe	Gly	Ile	Ser	Leu	Phe	Thr	
			965						970						975		
50	gcc	gat	ttt	aac	gga	gac	ggg	aat	tcc	gat	ctt	gca	att	gga	agt	cca	2976
	Ala	Asp	Phe	Asn	Gly	Asp	Gly	Asn	Ser	Asp	Leu	Ala	Ile	Gly	Ser	Pro	
			980						985						990		
	aat	tta	ggg	ggg	gga	act	gga	aga	ggt	tcc	gta	ttt	acg	tct	gca	gga	3024
	Asn	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Phe	Thr	Ser	Ala	Gly	
			995					1000					1005				
55	ggg	gta	ggg	ata	aat	aca	tct	acg	att	gga	aac	gct	ccg	ctt	atg	3069	
	Gly	Val	Gly	Ile	Asn	Thr	Ser	Thr	Ile	Gly	Asn	Ala	Pro	Leu	Met		
			1010				1015					1020					
	atc	aat	gga	acg	gct	gtg	ggg	aat	gca	ttt	gga	att	tct	tta	acc	3114	
	Ile	Asn	Gly	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Ala	Phe	Gly	Ile	Ser	Leu	Thr		
			1025				1030					1035					
60	gca	cag	gat	tta	aat	tta	gat	gga	aga	ccg	gat	tta	att	tcc	gca	3159	

ES 2 395 548 T3

	Ala Gln Asp Leu Asn Leu Asp Gly Arg Pro Asp Leu Ile Ser Ala	
	1040 1045 1050	
	acc gta att ccc aat agg gta ttc gtt ttc cac atg cca ggt gca	3204
	Thr Val Ile Pro Asn Arg Val Phe Val Phe His Met Pro Gly Ala	
5	1055 1060 1065	
	gga gct atc ggt gga ttt cta acc act ggt aat gca act aca caa	3249
	Gly Ala Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr Gly Asn Ala Thr Thr Gln	
	1070 1075 1080	
10	atc acg agt gca ttt gca gga atc ggg gtt tcc cca aat gca cct	3294
	Ile Thr Ser Ala Phe Ala Gly Ile Gly Val Ser Pro Asn Ala Pro	
	1085 1090 1095	
	aaa act cct att tcc ggc gga gac atc aac gga gac gga ttt cca	3339
	Lys Thr Pro Ile Ser Gly Gly Asp Ile Asn Gly Asp Gly Phe Pro	
	1100 1105 1110	
15	gac tta ttt gtc ggg gga agt tct gat aat att ttt att ttc cat	3384
	Asp Leu Phe Val Gly Gly Ser Ser Asp Asn Ile Phe Ile Phe His	
	1115 1120 1125	
	tct tca acg gtt gga act ggt tta tta aca aat act act gca acc	3429
	Ser Ser Thr Val Gly Thr Gly Leu Leu Thr Asn Thr Thr Ala Thr	
20	1130 1135 1140	
	gct gca ggc gca att acc agt tcc gga ctt gcc aat ggc ttt ttt	3474
	Ala Ala Gly Ala Ile Thr Ser Ser Gly Leu Ala Asn Gly Phe Phe	
	1145 1150 1155	
25	gga tgt agc gtt tat tga	3492
	Gly Cys Ser Val Tyr	
	1160	
	<210> 61	
	<211> 1163	
30	<212> PRT	
	<213> <i>Leptospira interrogans</i> serovar Pomona	
	<400> 61	
35	Met Asn Thr Ser Ile Gln Val Gly Phe Ser Gln Lys Leu Asp Ser Ser	
	1 5 10 15	
	Ser Ile Gln Ser Gln Ser Ile Gln Leu Thr Gln Gly Asn Thr Ile Ile	
	20 25 30	
40	Pro Gly Asn Phe Thr Ser Thr Glu Lys Thr Leu Leu Phe Asn Pro Thr	
	35 40 45	
	Ser Ser Leu Ala Ala Ser Thr Val Tyr Ser Val Ser Ile Ser Lys Asp	
	50 55 60	
	Ile Lys Ser Met Asp Gly Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Thr Trp Ser	
	65 70 75 80	
45	Phe Thr Thr Asn Thr Ile Val Asp Leu Val Ala Pro Asp Val Ser Leu	
	85 90 95	
	Arg Thr Pro Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Pro Asn Asn Thr Ser Val	
	100 105 110	
	Gln Ile Ala Phe Thr Glu Thr Met Asn Cys Thr Ser Ile Asn Ile Val	
50	115 120 125	
	Asn Phe Thr Leu Lys Asn Asn Val Thr Asn Val Leu Glu Pro Ser Asn	
	130 135 140	
	Val Val Cys Leu Gly Ser Val Ala Thr Leu Thr Pro Asn Asn Pro Leu	
	145 150 155 160	
55	Ala Phe Asn Thr Val Tyr Arg Val Asp Ile Leu Ser Thr Ala Lys Asp	
	165 170 175	
	Leu Ala Asn Asn Pro Leu Val Asn Ala Tyr Asn Trp Thr Phe Thr Thr	
	180 185 190	
60	Gly Val Ala Pro Asp Leu Thr Val Pro Thr Val Ser Phe Val Asn Pro	
	195 200 205	

ES 2 395 548 T3

Thr Pro Asn Ala Gln Asn Val Pro Ile Asn Glu Thr Ile Ser Ile Ala  
 210 215 220  
 Phe Ser Glu Pro Ile Asn Cys Ala Thr Ile Ile Gly Ser Ile Val Leu  
 225 230 235 240  
 5 Asp Asp Asn Ile Leu Ile Pro Gly Ser Val Asn Gly Asn Pro Gly Cys  
 245 250 255  
 Thr Gly Thr Thr Ala Ser Phe Thr Pro Leu Gly Asn Leu Thr Pro Asn  
 260 265 270  
 10 Thr Asn Tyr Thr Val Thr Val Ser Asn Ala Ile Thr Asp Leu Gln Asn  
 275 280 285  
 Asn Pro Leu Thr Pro Ser Thr Trp Ser Phe Thr Thr Ala Ala Ala Val  
 290 295 300  
 Asp Gln Thr Gln Pro Thr Val Thr Phe Thr Val Pro Ser Ala Asn Ala  
 305 310 315 320  
 15 Asn Gly Val Gly Thr Asn Val Asn Pro Met Val Val Phe Ser Glu Pro  
 325 330 335  
 Met Ser Cys Ala Ser Val Thr Ser Ala Ser Phe Arg Leu Lys Arg Gln  
 340 345 350  
 20 Ala Thr Gly Val Tyr Leu Ile Gly Ser Val Asn Cys Phe Gly Thr Ser  
 355 360 365  
 Ala Thr Trp Thr Pro Asp Pro Val Asn Pro Leu Ala Phe Asn Thr Thr  
 370 375 380  
 Tyr Thr Val Glu Ile Asp Gln Gly Ala Leu Asp Thr Phe Asn Asn Pro  
 385 390 395 400  
 25 Leu Ile Pro Ile Asn Trp Asn Phe Thr Thr Gly Pro Gly Pro Asp Leu  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Ser Val Ala Val Val Thr Pro Ala Asn Ala Ala Ile Gly  
 420 425 430  
 30 Val Pro Thr Asn Gly Gly Val Ser Ile Ala Phe Ser Glu Ala Met Asn  
 435 440 445  
 Cys Gly Ser Ile Leu Gly Gly Ile Thr Leu Asp Asp Pro Thr Thr  
 450 455 460  
 Pro Gly Thr Val Ile Pro Ile Asn Ile Asn Cys Asn Gly Asn Thr Val  
 465 470 475 480  
 35 Ser Phe Ala Pro Thr Ile Pro Pro Leu Ala Phe Asn Thr Thr Tyr Thr  
 485 490 495  
 Val Thr Ile Leu Asn Thr Val Thr Asp Ser Asn Asn Asn Ala Leu Asn  
 500 505 510  
 40 Gly Gly Asn Tyr Ala Trp Ser Phe Thr Thr Gly Val Ala Pro Asp Leu  
 515 520 525  
 Val Pro Pro Gln Val Ser Leu Val Ser Pro Leu Ser Gly Ala Val Gly  
 530 535 540  
 Val Ala Thr Asn Ala Asn Ile Thr Val Ala Phe Asn Glu Thr Ile Asn  
 545 550 555 560  
 45 Cys Ser Thr Leu Asn Phe Thr Val Asn Asn Gly Ile Asn Gly Thr Val  
 565 570 575  
 Asn Cys Ser Gly Ser Ser Ala Thr Phe Ile Pro Ser Ala Leu Thr Pro  
 580 585 590  
 50 Leu Asn Ala Gly Thr Asn Tyr Thr Ala Thr Ile Leu Thr Val Asn Asp  
 595 600 605  
 Ile Val Gly Asn Pro Ile Gly Ala Ala Phe Gly Trp Ser Phe Thr Thr  
 610 615 620  
 Gly Ala Ala Pro Asp Val Thr Pro Pro Val Val Thr Ile Gln Asn Leu  
 625 630 635 640  
 55 Arg Asn Asn Ser Ile Val Glu Thr Gly Phe Val Ile Gly Thr Ala Thr  
 645 650 655  
 Asp Ala Gly Thr Ile Thr Ser Val Glu Val Ser Leu Asp Asn Gly Ala  
 660 665 670  
 60 Phe Val Pro Ala Thr Gly Thr Asn Pro Trp Lys Phe Lys Leu Pro Ser  
 675 680 685

ES 2 395 548 T3

Asp Ile Asn Thr Trp Lys Gln Asn Ser Gln His Thr Ile Ile Ala Arg  
 690 695 700  
 Ala Lys Asp Leu Ala Asn Asn Leu Thr Thr Thr Ala Ala Ile Ser Val  
 705 710 715 720  
 5 Arg Lys Gly Asn Asn Lys Asp Ile Asn Gly Asp Gly Tyr Val Asp Leu  
 725 730 735  
 Val Ser Ala Glu Tyr Gly Gln Gly Leu Leu Tyr Ile Phe His Ser Ser  
 740 745 750  
 10 Gly Asn Ala Gly Met Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ser Ala Ser Lys Ile  
 755 760 765  
 Ile Val Gly Val Ala Ala Glu Glu Phe Gly Arg Thr Val Ser Met Gly  
 770 775 780  
 Asp Leu Asn Gly Asp Gly Phe Ala Asp Val Ile Ser Gly Ala Pro Gly  
 785 790 795 800  
 15 Trp Asn Gly Ala Gln Gly Arg Val Tyr Ile Phe His Ser Ser Gly Asn  
 805 810 815  
 Ala Gly Val Asn Ile Ser Phe Ser Gly Phe Ala Thr Lys Thr Ile Ser  
 820 825 830  
 20 Gly Ala Asn Ala Gly Ala Arg Phe Gly Asp Ser Ile Val Thr Gly Asp  
 835 840 845  
 Leu Asn Gly Asp Gly Tyr Ala Asp Leu Ala Ser Gly Glu Pro Val Phe  
 850 855 860  
 Asn Gly Ser Gln Gly Arg Val Tyr Val Phe His Ser Ala Gly Ala Ala  
 865 870 875 880  
 25 Gly Val Thr Gln Ile Asn Ser Ala Ala Ala Asn Ser Thr Leu Thr Gly  
 885 890 895  
 Glu Asn Ala Thr Asp Arg Phe Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Gly Asn Met  
 900 905 910  
 30 Asn Gly Asp Asn Phe Ala Asp Leu Ala Ile Gly Ala Pro Gly Tyr Gly  
 915 920 925  
 Ala Gly Val Gly Gly Gly Phe Val Val Asn Gln Gly Lys Val Tyr Ile  
 930 935 940  
 His His Gly Ala Ala Gly Leu Gly Gly Val Ile Thr Thr Leu Thr  
 945 950 955 960  
 35 Asn Asp Ser Ala Gly Asn Ala Gly Glu Phe Gly Ile Ser Leu Phe Thr  
 965 970 975  
 Ala Asp Phe Asn Gly Asp Gly Asn Ser Asp Leu Ala Ile Gly Ser Pro  
 980 985 990  
 40 Asn Leu Gly Gly Gly Thr Gly Arg Val Ser Val Phe Thr Ser Ala Gly  
 995 1000 1005  
 Gly Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Ile Gly Asn Ala Pro Leu Met  
 1010 1015 1020  
 Ile Asn Gly Thr Ala Val Gly Asn Ala Phe Gly Ile Ser Leu Thr  
 1025 1030 1035  
 45 Ala Gln Asp Leu Asn Leu Asp Gly Arg Pro Asp Leu Ile Ser Ala  
 1040 1045 1050  
 Thr Val Ile Pro Asn Arg Val Phe Val Phe His Met Pro Gly Ala  
 1055 1060 1065  
 50 Gly Ala Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr Gly Asn Ala Thr Thr Gln  
 1070 1075 1080  
 Ile Thr Ser Ala Phe Ala Gly Ile Gly Val Ser Pro Asn Ala Pro  
 1085 1090 1095  
 Lys Thr Pro Ile Ser Gly Gly Asp Ile Asn Gly Asp Gly Phe Pro  
 1100 1105 1110  
 55 Asp Leu Phe Val Gly Gly Ser Ser Asp Asn Ile Phe Ile Phe His  
 1115 1120 1125  
 Ser Ser Thr Val Gly Thr Gly Leu Leu Thr Asn Thr Thr Ala Thr  
 1130 1135 1140  
 60 Ala Ala Gly Ala Ile Thr Ser Ser Gly Leu Ala Asn Gly Phe Phe  
 1145 1150 1155

ES 2 395 548 T3

Gly Cys Ser Val Tyr  
1160

<210> 62  
5 <211> 1287  
<212> ADN  
<213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona

<220>  
10 <221> CDS  
<222> (1)..(1287)

<400> 62

15 atg agc cta aaa aat aaa aat tat gtt tta tca aaa aaa acc ata ttg 48  
Met Ser Leu Lys Asn Lys Asn Tyr Val Leu Ser Lys Lys Thr Ile Leu  
1 5 10 15  
att cta ttt tta gta tat ttt gtt ttt ata att tct ttt ttt tct att 96  
Ile Leu Phe Leu Val Tyr Phe Val Phe Ile Ile Ser Phe Phe Ser Ile  
20 20 25 30  
tac tct cag gat tta agt ata aat caa aat cct aaa cca gaa aag tta 144  
Tyr Ser Gln Asp Leu Ser Ile Asn Gln Asn Pro Lys Pro Glu Lys Leu  
35 40 45  
aaa ggt tct atc aat acg agt ctc aat gag ttt gga atc agt ctt act 192  
25 Lys Gly Ser Ile Asn Thr Ser Leu Asn Glu Phe Gly Ile Ser Leu Thr  
50 55 60  
gat gac gga aat att tta tat ttc tat tct aaa aga caa aat tca aat 240  
Asp Asp Gly Asn Ile Leu Tyr Phe Tyr Ser Lys Arg Gln Asn Ser Asn  
65 70 75 80  
30 tat aca gac att tat aag tca act cga acg aaa gat gaa tgg aca caa 288  
Tyr Thr Asp Ile Tyr Lys Ser Thr Arg Thr Lys Asp Glu Trp Thr Gln  
85 90 95  
gga gag gaa att gaa gtt cta aat tca aac ttt gac gac caa agt cct 336  
Gly Glu Glu Ile Glu Val Leu Asn Ser Asn Phe Asp Asp Gln Ser Pro  
35 100 105 110  
ttc att tta aac cga gaa gaa gga att ctt ttt tca tct aat aga gat 384  
Phe Ile Leu Asn Arg Glu Glu Gly Ile Leu Phe Ser Ser Asn Arg Asp  
115 120 125  
40 ggt gcg acc gaa ttc caa ttt gca aat gga aaa atc gga gtt tct aga 432  
Gly Ala Thr Glu Phe Gln Phe Ala Asn Gly Lys Ile Gly Val Ser Arg  
130 135 140  
gat att tat ttt tct aaa aaa ata aat tct tct tgg aca gaa ccg gtt 480  
Asp Ile Tyr Phe Ser Lys Lys Ile Asn Ser Ser Trp Thr Glu Pro Val  
145 150 155 160  
45 ctt ctt cct aga gcc gtg aat acg gaa gaa atc gaa gaa aat ccg ttt 528  
Leu Leu Pro Arg Ala Val Asn Thr Glu Glu Ile Glu Glu Asn Pro Phe  
165 170 175  
cta ttt aat aat aga ttg tat ttt acc cgt tat cct ttt ggg caa gtt 576  
Leu Phe Asn Asn Arg Leu Tyr Phe Thr Arg Tyr Pro Phe Gly Gln Val  
50 180 185 190  
tca gaa gcg gac att ttc gtt tct gtt tat aaa aat aac act tgg gaa 624  
Ser Glu Ala Asp Ile Phe Val Ser Val Tyr Lys Asn Asn Thr Trp Glu  
195 200 205  
55 aaa gca atg agc ctc cct gat ccg att aac acc gtt tat tcg gaa att 672  
Lys Ala Met Ser Leu Pro Asp Pro Ile Asn Thr Val Tyr Ser Glu Ile  
210 215 220  
gcg gct aca att agt aaa gat gga aag acg att tat ttt tct tct aac 720  
Ala Ala Thr Ile Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Phe Ser Ser Asn  
225 230 235 240  
60 cgt ccg ggg ggt ttt ggc ggt tat gat ttg tat aag tct act tta ctt 768

ES 2 395 548 T3

Arg Pro Gly Gly Phe Gly Gly Tyr Asp Leu Tyr Lys Ser Thr Leu Leu  
 245 250 255  
 5 gaa aac gga aat tat tcc gaa ccg att aat ctt gga ccc gaa att aac 816  
 Glu Asn Gly Asn Tyr Ser Glu Pro Ile Asn Leu Gly Pro Glu Ile Asn  
 260 265 270  
 act acc gga gat gag gct ttt ttt ctg gaa aca aac gat aga aag aca 864  
 Thr Thr Gly Asp Glu Ala Phe Phe Leu Glu Thr Asn Asp Arg Lys Thr  
 275 280 285  
 10 ttc tat ttt tgt aga agg aaa gaa cgc gat tat gat att tat tct atc 912  
 Phe Tyr Phe Cys Arg Arg Lys Glu Arg Asp Tyr Asp Ile Tyr Ser Ile  
 290 295 300  
 gtt tct aac ccg ttt caa gaa cta gaa aaa gga aaa tct att tct ttg 960  
 Val Ser Asn Pro Phe Gln Glu Leu Glu Lys Gly Lys Ser Ile Ser Leu  
 305 310 315  
 15 gat agt atc cat ttt tct ttg ggc tct tat gaa att ctc gaa aat tct 1008  
 Asp Ser Ile His Phe Ser Leu Gly Ser Tyr Glu Ile Leu Glu Asn Ser  
 325 330 335  
 20 ttt tca att tta gat aat ttg aat tct tat ctt aag gaa aat tta aat 1056  
 Phe Ser Ile Leu Asp Asn Leu Asn Ser Tyr Leu Lys Glu Asn Leu Asn  
 340 345 350  
 ata aaa atc aaa atc acc ggc cat acc gat ctt aat gga gat tcc cag 1104  
 Ile Lys Ile Lys Ile Thr Gly His Thr Asp Leu Asn Gly Asp Ser Gln  
 355 360 365  
 25 gac aac ctt att ctc agc cgt aat cgt gca aat gca gta aag gat tat 1152  
 Asp Asn Leu Ile Leu Ser Arg Asn Arg Ala Asn Ala Val Lys Asp Tyr  
 370 375 380  
 tta gtt aaa agg gga atc gat tct caa aga att atc acg gat ggg aaa 1200  
 Leu Val Lys Arg Gly Ile Asp Ser Gln Arg Ile Ile Thr Asp Gly Lys  
 385 390 395 400  
 30 ggt agt tcg gag cca att gtt cct atg aaa aat cca gag acg gat tat 1248  
 Gly Ser Ser Glu Pro Ile Val Pro Met Lys Asn Pro Glu Thr Asp Tyr  
 405 410 415  
 35 aaa aat aga aga acc gaa ttt cag att atc agt cgt tag 1287  
 Lys Asn Arg Arg Thr Glu Phe Gln Ile Ile Ser Arg  
 420 425  
  
 <210> 63  
 <211> 428  
 <212> PRT  
 40 <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona  
  
 <400> 63  
  
 45 Met Ser Leu Lys Asn Lys Asn Tyr Val Leu Ser Lys Lys Thr Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Ile Leu Phe Leu Val Tyr Phe Val Phe Ile Ile Ser Phe Phe Ser Ile  
 20 25 30  
 Tyr Ser Gln Asp Leu Ser Ile Asn Gln Asn Pro Lys Pro Glu Lys Leu  
 35 40 45  
 50 Lys Gly Ser Ile Asn Thr Ser Leu Asn Glu Phe Gly Ile Ser Leu Thr  
 50 55 60  
 Asp Asp Gly Asn Ile Leu Tyr Phe Tyr Ser Lys Arg Gln Asn Ser Asn  
 65 70 75 80  
 55 Tyr Thr Asp Ile Tyr Lys Ser Thr Arg Thr Lys Asp Glu Trp Thr Gln  
 85 90 95  
 Gly Glu Glu Ile Glu Val Leu Asn Ser Asn Phe Asp Asp Gln Ser Pro  
 100 105 110  
 Phe Ile Leu Asn Arg Glu Glu Gly Ile Leu Phe Ser Ser Asn Arg Asp  
 115 120 125  
 60 Gly Ala Thr Glu Phe Gln Phe Ala Asn Gly Lys Ile Gly Val Ser Arg

ES 2 395 548 T3

```

    130              135              140
Asp Ile Tyr Phe Ser Lys Lys Ile Asn Ser Ser Trp Thr Glu Pro Val
145              150              155              160
Leu Leu Pro Arg Ala Val Asn Thr Glu Glu Ile Glu Glu Asn Pro Phe
5
Leu Phe Asn Asn Arg Leu Tyr Phe Thr Arg Tyr Pro Phe Gly Gln Val
    165              170              185              190
Ser Glu Ala Asp Ile Phe Val Ser Val Tyr Lys Asn Asn Thr Trp Glu
    195              200              205
10 Lys Ala Met Ser Leu Pro Asp Pro Ile Asn Thr Val Tyr Ser Glu Ile
    210              215              220
Ala Ala Thr Ile Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Phe Ser Ser Asn
225              230              235
Arg Pro Gly Gly Phe Gly Gly Tyr Asp Leu Tyr Lys Ser Thr Leu Leu
15
Glu Asn Gly Asn Tyr Ser Glu Pro Ile Asn Leu Gly Pro Glu Ile Asn
    245              250              265              270
Thr Thr Gly Asp Glu Ala Phe Phe Leu Glu Thr Asn Asp Arg Lys Thr
    275              280              285
20 Phe Tyr Phe Cys Arg Arg Lys Glu Arg Asp Tyr Asp Ile Tyr Ser Ile
    290              295              300
Val Ser Asn Pro Phe Gln Glu Leu Glu Lys Gly Lys Ser Ile Ser Leu
305              310              315
Asp Ser Ile His Phe Ser Leu Gly Ser Tyr Glu Ile Leu Glu Asn Ser
25
Phe Ser Ile Leu Asp Asn Leu Asn Ser Tyr Leu Lys Glu Asn Leu Asn
    325              330              345              350
Ile Lys Ile Lys Ile Thr Gly His Thr Asp Leu Asn Gly Asp Ser Gln
    355              360              365
30 Asp Asn Leu Ile Leu Ser Arg Asn Arg Ala Asn Ala Val Lys Asp Tyr
    370              375              380
Leu Val Lys Arg Gly Ile Asp Ser Gln Arg Ile Ile Thr Asp Gly Lys
385              390              395
Gly Ser Ser Glu Pro Ile Val Pro Met Lys Asn Pro Glu Thr Asp Tyr
35
Lys Asn Arg Arg Thr Glu Phe Gln Ile Ile Ser Arg
    405              410              415
    420              425

<210> 64
40 <211> 1152
    <212> ADN
    <213> Leptospira interrogans serovar Pomona

<220>
45 <221> CDS
    <222> (1)..(1152)

<400> 64

50 atg gcg aag aaa gaa aac tac tat att act atc aaa ggt aga aaa tat      48
Met Ala Lys Lys Glu Asn Tyr Tyr Ile Thr Ile Lys Gly Arg Lys Tyr
1
    5              10              15
gat cgt aag ttg atc cag ctc gcg gaa gag ttc act tcc ggt aaa cgg      96
Asp Arg Lys Leu Ile Gln Leu Ala Glu Glu Phe Thr Ser Gly Lys Arg
55
    20              25              30
gac ggt aag att tcg atc aac gac gca aaa cgt ctt tta aaa att gtc      144
Asp Gly Lys Ile Ser Ile Asn Asp Ala Lys Arg Leu Leu Lys Ile Val
    35              40              45
aag gat aac aac gct tat acg gat ata gaa aaa cat acg atc gaa tac      192
60 Lys Asp Asn Asn Ala Tyr Thr Asp Ile Glu Lys His Thr Ile Glu Tyr

```





ES 2 395 548 T3

370 375 380

<210> 65  
 <211> 383  
 5 <212> PRT  
 <213> *Leptospira interrogans* serovar Pomona

<400> 65

10 Met Ala Lys Lys Glu Asn Tyr Tyr Ile Thr Ile Lys Gly Arg Lys Tyr  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Lys Leu Ile Gln Leu Ala Glu Glu Phe Thr Ser Gly Lys Arg  
 20 25 30  
 Asp Gly Lys Ile Ser Ile Asn Asp Ala Lys Arg Leu Leu Lys Ile Val  
 15 35 40 45  
 Lys Asp Asn Asn Ala Tyr Thr Asp Ile Glu Lys His Thr Ile Glu Tyr  
 50 55 60  
 Ile Arg Glu Asn Tyr Lys Phe Thr Glu Lys Ser Asp Glu Trp Phe Arg  
 65 70 75 80  
 20 Ser Glu Ile Arg Lys Trp Ala Ala Lys Lys Val Gln Glu Ala Lys Lys  
 85 90 95  
 Lys Ser Asp Val Glu Ser Ile Leu Val Asp Asp Ser Glu Ala Pro Glu  
 100 105 110  
 Ile Asn Phe Pro Ser Ser Trp Gly Glu Asp Lys Thr Glu Val Val Glu  
 115 120 125  
 25 Ile Thr Gln Thr Ser Lys Ile Asp Trp Arg Glu Asn Ser Asn Phe Ser  
 130 135 140  
 Ser Ala Thr Ser His Ser Lys Lys Asn Lys Lys Ile Ile Pro Thr Leu  
 145 150 155 160  
 30 Ile Phe Leu Ser Gly Phe Leu Ile Leu Val Gly Leu Val Tyr Phe Phe  
 165 170 175  
 Arg Thr Leu Phe Tyr Lys Glu Asp Leu Glu Gln Val Val Lys Thr Asn  
 180 185 190  
 Ser Glu Ile Val Ser Asn Ser Lys Glu Lys Gln Ser Asp Val Ser Ile  
 195 200 205  
 35 Glu Lys Ala Glu Ser Thr Lys Glu Val Arg Lys Lys Asn Val Arg Ser  
 210 215 220  
 Lys Lys Glu Glu Ser Glu Ile Pro Lys Asn Ala Leu Thr Ile Leu Lys  
 225 230 235 240  
 40 Pro Gln Thr Gly Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ser Leu Phe Ser Ser Leu  
 245 250 255  
 Thr Asn Gln Asn Ser Thr Glu Glu Phe Ser Ser Asn Pro Gln Phe Arg  
 260 265 270  
 Glu Ile Glu Ser Asn Val Ile Arg Phe Glu Lys Asn Ser Ile Gln Ile  
 275 280 285  
 45 His Lys Glu Ser Arg Pro Ser Leu Asn Arg Leu Ala Arg Trp Met Lys  
 290 295 300  
 Gln Asp Ser Ser Ile Arg Val Lys Val Ile Gly His Thr Ser Leu Glu  
 305 310 315 320  
 50 Gly Ser Glu Asp Ala Asn Gln Lys Val Ser Leu Leu Arg Ala Gln Thr  
 325 330 335  
 Val Arg Asn Tyr Ile Ala Gly Asn Gly Ile Ser Lys Asp Arg Phe Glu  
 340 345 350  
 Ile Ile Pro Lys Gly Ala Ser Val Pro Ile Gly Asp Asn Ser Lys Glu  
 355 360 365  
 55 Glu Gly Lys Glu Met Asn Arg Arg Val Glu Leu Arg Ile Tyr Asn  
 370 375 380

<210> 66  
 60 <211> 549

ES 2 395 548 T3

```

<212>  ADN
<213>  Leptospira interrogans serovar Pomona

<220>
5  <221>  CDS
   <222>  (1)..(549)

<400>  66

10  atg aaa tat aaa ata att tta att tta tca cta atg tta ttt ctt ttc           48
    Met Lys Tyr Lys Ile Ile Leu Ile Leu Ser Leu Met Leu Phe Leu Phe
    1      5      10      15
    gtt tcc tgt ccg gat gaa aaa aaa gaa aat gaa ttg agt act tat att           96
    Val Ser Cys Pro Asp Glu Lys Lys Glu Asn Glu Leu Ser Thr Tyr Ile
    15      20      25      30
    tta tat agt gtt ctc ata aac gca act act caa tac gat tgt gtt act           144
    Leu Tyr Ser Val Leu Ile Asn Ala Thr Thr Gln Tyr Asp Cys Val Thr
    35      40      45
    agt tcg gaa gta gta tca gac tct tat aac aaa aca aca ata acc ttc           192
    Ser Ser Glu Val Val Ser Asp Ser Tyr Asn Lys Thr Thr Ile Thr Phe
    50      55      60
    gaa aat aaa cct caa tat tac aat tca ccc agt gga aat gta gtt cca           240
    Glu Asn Lys Pro Gln Tyr Tyr Asn Ser Pro Ser Gly Asn Val Val Pro
    65      70      75      80
    25  aaa gca att atg ccg att ttg att aaa aag ggg cag aca att caa gta           288
        Lys Ala Ile Met Pro Ile Leu Ile Lys Lys Gly Gln Thr Ile Gln Val
        85      90      95
        tcc agt ata acg act aac gtt aag tat gaa gcg aca aac caa gac tta           336
        Ser Ser Ile Thr Thr Asn Val Lys Tyr Glu Ala Thr Asn Gln Asp Leu
        100     105     110
    30  act ttt ctt ttt aga aaa gat ggt tgt cac ggt aca aac tcc gaa att           384
        Thr Phe Leu Phe Arg Lys Asp Gly Cys His Gly Thr Asn Ser Glu Ile
        115     120     125
        gca acc tat gca gga gct act aat aca aat gtt ttt tta gga aac aca           432
    35  Ala Thr Tyr Ala Gly Ala Thr Asn Thr Asn Val Phe Leu Gly Asn Thr
        130     135     140
        aat act gtt agc tta act caa ttt aaa ttt acc gcc gac tat aat ggg           480
        Asn Thr Val Ser Leu Thr Gln Phe Lys Phe Thr Ala Asp Tyr Asn Gly
        145     150     155     160
    40  att ata cta atc gtt ggg aaa aac cta ggt gca agt tta cct gga gat           528
        Ile Ile Leu Ile Val Gly Lys Asn Leu Gly Ala Ser Leu Pro Gly Asp
        165     170     175
        att cgt gtg aat gta ttt taa
    45  Ile Arg Val Asn Val Phe
        180

<210>  67
<211>  182
<212>  PRT
50  <213>  Leptospira interrogans serovar Pomona

<400>  67

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

```

ES 2 395 548 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un vector capaz de expresar ADN recombinante, en el que el ADN recombinante se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (i) un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP 1454),
- (ii) un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y
- 10 (iii) un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior; y

en el que el ADN recombinante se inserta en el vector de manera que se expresa una proteína recombinante cuando el vector se proporciona en un huésped apropiado, para uso como una vacuna de ADN recombinante en un método de vacunación.

2. Un método para producir una vacuna frente a un trastorno relacionado con *Leptospira* que comprende:

- 15 a) proporcionar un ADN recombinante, en el que el ADN recombinante se selecciona del grupo que consiste en:
  - (i) un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP 1454), (ii) un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y
  - 20 (iii) un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior;
- b) proporcionar un vector capaz de expresar el ADN recombinante cuando el ADN recombinante se inserta en el vector, e
- 25 c) insertar el ADN recombinante en el vector, en el que el ADN recombinante se inserta en el vector de manera que se expresa una proteína recombinante cuando el vector se proporciona en un huésped apropiado.

3. Un método para producir una vacuna frente a un trastorno relacionado con *Leptospira* que comprende:

- a) proporcionar un ADN recombinante, en el que el ADN recombinante se selecciona del grupo que consiste en:
  - 30 (i) un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP 1454), (ii) un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y
  - (iii) un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior;
  - 35
- b) construir un vector de expresión que comprende un plásmido, en el que el plásmido comprende el ADN recombinante; e
- c) inocular un huésped con el vector de expresión, en el que el ADN recombinante se expresa en el huésped para producir una proteína recombinante y en el que la proteína expresada incita una respuesta inmune en el huésped.
- 40

4. Una vacuna que comprende una proteína recombinante, en la que la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP 1454),
- (ii) un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína anterior, y
- 45 (iii) un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de anteriormente, para uso como una vacuna recombinante en un método de vacunación.

5. Un método para producir una vacuna frente a un trastorno relacionado con *Leptospira* que comprende:
- a) proporcionar un ADN recombinante, en el que el ADN recombinante se selecciona del grupo que consiste en:
    - 5 (i) un ADN recombinante que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP 1454), (ii) un ADN recombinante que codifica un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y
    - (iii) un ADN recombinante que codifica un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior;
  - 10 b) proporcionar un vector capaz de expresar el ADN recombinante cuando el ADN recombinante se inserta en el vector;
  - c) insertar el ADN recombinante en el vector,
  - d) proporcionar una cepa bacteriana;
  - 15 e) transformar el vector en la cepa bacteriana de manera que se expresa una proteína recombinante cuando el vector se transforma en la cepa bacteriana; y
  - f) recoger la proteína recombinante de la cepa bacteriana.
6. Una vacuna de epítipo de célula T que comprende una proteína recombinante, en la que la proteína recombinante comprende un epítipo de célula T, y en la que el epítipo de célula T comprende un fragmento peptídico de aminoácidos de una proteína seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 (i) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),
  - (ii) un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y
  - (iii) un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior.
- 25 7. La vacuna de la reivindicación 6, caracterizada porque el fragmento peptídico de aminoácidos comprende nueve a veinte aminoácidos.
8. Un método para producir una vacuna de epítipo de célula T que comprende:
- 30 a) proporcionar una proteína recombinante que comprende un epítipo de célula T, en el que el epítipo de célula T comprende un fragmento peptídico de aminoácidos de una proteína seleccionada del grupo que consiste en:
    - (i) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),
    - (ii) un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y
    - 35 (iii) un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior;
  - b) identificar el epítipo de célula T de la proteína;
  - c) insertar el ADN que codifica el epítipo de célula T en una construcción capaz de expresar el epítipo de célula T como una proteína; y
  - d) recoger la proteína.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, caracterizado porque el fragmento peptídico de aminoácidos comprende nueve a veinte aminoácidos.
10. Una vacuna según la reivindicación 6 para uso en la prevención de un trastorno relacionado con *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo necesita.
11. Una composición farmacéutica que comprende:
- 45 a) una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna de la reivindicación 2, 5 ó 7; y

b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un anticuerpo aislado y purificado dirigido contra una proteína de la membrana externa de *Leptospira*, en el que la proteína de la membrana externa de *Leptospira* se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

5 (ii) un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y

(iii) un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior.

10 13. El anticuerpo de la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo está dirigido contra al menos un epítipo de célula T de la proteína de la membrana externa de *Leptospira*.

14. Un método para producir un anticuerpo dirigido contra una proteína de la membrana externa de *Leptospira*, comprendiendo el método:

a) proporcionar un animal huésped; e

15 b) inmunizar el animal huésped por inyección con la proteína de la membrana externa de *Leptospira*, en el que la proteína de la membrana externa de *Leptospira* se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

(ii) un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y

20 (iii) un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior,

y en el que el anticuerpo reconoce específicamente al menos un epítipo de célula T de la proteína de la membrana externa de *Leptospira*.

25 15. Un anticuerpo dirigido contra una proteína de la membrana externa de *Leptospira* para uso en un método para diagnosticar un trastorno relacionado con *Leptospira* en un sujeto, en el que la proteína de la membrana externa de *Leptospira* se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (LP1454),

(ii) un epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de la proteína de (i) anterior, y

30 (iii) un fragmento de proteína que tiene una longitud de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la secuencia de aminoácidos de la proteína de (i) o el epítipo inmunogénico o fragmento inmunológicamente activo de (ii) anterior.

16. El vector según la reivindicación 1 para uso en la prevención de un trastorno relacionado con *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo necesita.

17. Una proteína recombinante según la reivindicación 4 para uso en la prevención de un trastorno relacionado con *Leptospira* en un sujeto animal o humano que lo necesita.

ES 2 395 548 T3

```

MceII : MNLKHTAVLTGIVEFLAFSLSMYVSVIEKACTKDEYPYTMKIYPRLEGIHFCAPVRLIGVEKCIIVRSIDVVPIDEVEDORFLNKKD : 87
MceI  : MNMNSLRVLLVGLLETAATVVGVEFIIITEGEPKIKKGFEMKVTFRNABGKIKVENKYTWQVPFYVSAURLIQIDENGTVEVQSGEM : 87
Rv1968 : MKSEAEENRLAIGTVGLVVAANALAAALQYQRLPFENQGRVSAKPADACGLRGTNTVEVSGYPVGKVSISIDGPGVLVPEFKVDTF : 87

MceII : QTKALEIVRLKEPITLWDNYKITFQNTIISGRTHIDDPGSEFDKSETSFQPTYLEEEQKSPDFPESADYFEDFFAASLTVGVIENR : 174
MceI  : GIGTRVEITMLLREKISLYDNYDIIIKNESLITGRVIAIDPGHADLEBKQKTRTTPITMIDYKKTGSLKGRVLDPLVSLSELI SE : 174
Rv1968 : VRLGNRTEVATIKTKGLIGSKRLDVTFRGDGRIDSPHPIERTTSPYQLDAILGDLAATISGLHTERISESLATLAQTFADTPAHRFA : 174

MceII : EDIRTSFNNFYEISEKLSNRRTI PQIINSPEYDNIIELLTDARIFGNDARRYLEGNRKLERSAPLPLTINMYRRTTLIGNVSNRY : 261
MceI  : NRCDIRKTFSNLADITTKINTEDGSLGRLLNDDVHKNNVTITDAQIVLRDLREGLEDTRQTPVTSPTRAALSAR----- : 251
Rv1968 : IHGVARLAQTLDERDNQLRSLLANAAKATGVLANRTDQVGLVRRDINVVLAQLRTSAALDRIWANISAVAEQLRCEIAENRQQLRP : 261

MceII : YFGKL : 266
MceI  : ----- :
Rv1968 : ALDKL : 266

```

FIG. 1

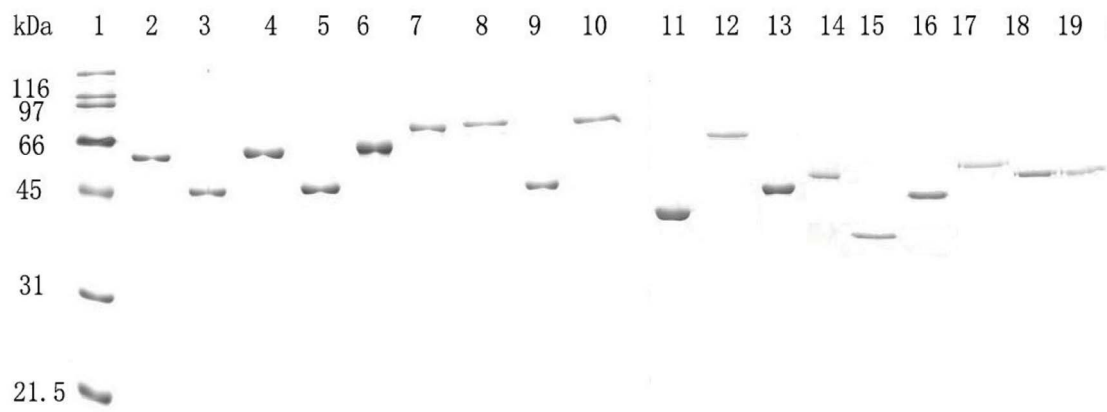


FIG. 2A



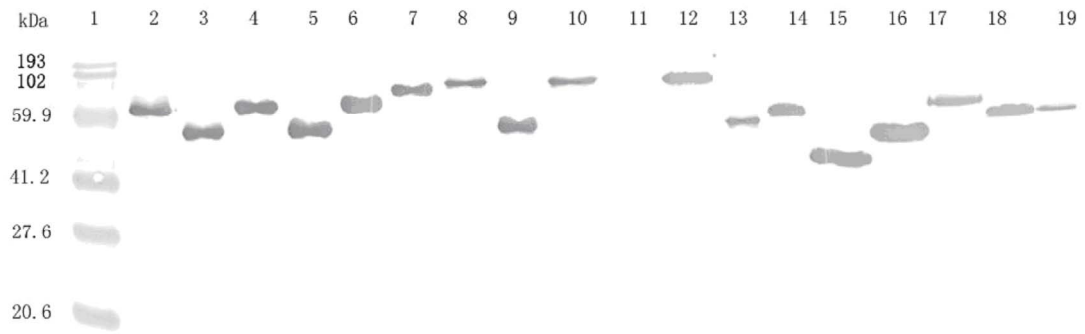


FIG. 2B

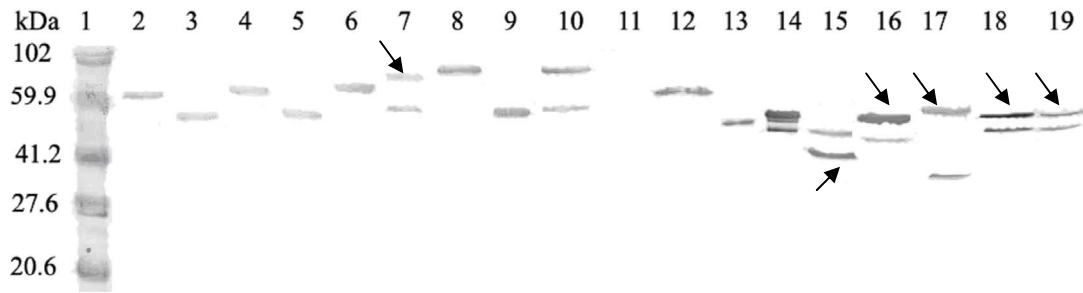


FIG. 2C

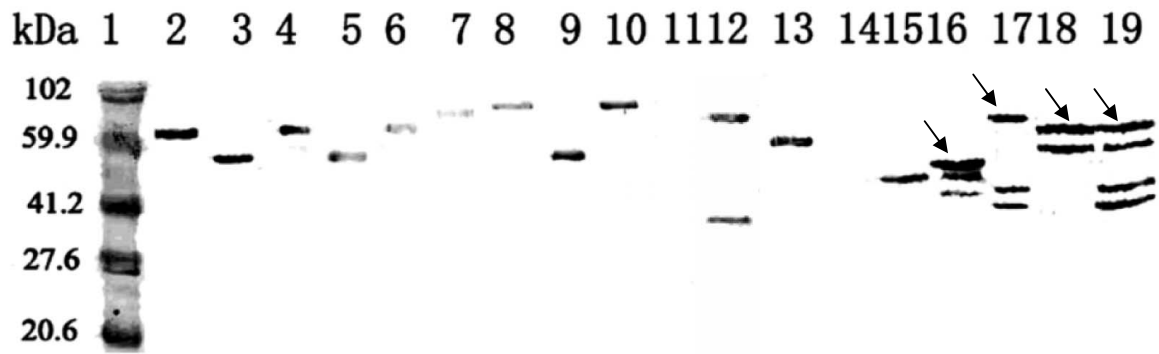


FIG. 2D

ExptID	Estado del animal	*Título- ción MAT	Dilución de la suera	LA	LA	LA	LA	LA	Lig	LIPL	LA	LA	LA	MCE	LA	LA	LA	LA						
				1118	1228	1404	1	MCE	LA	2268	BVT	1332	1965	1192	1947	Com	32	1495	1939	II	2471	1931	1454	
5059	*Exp.infect.		1:100	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	2	2	2	1	2	2	0	2	2
5049	*Exp.infect.		1:100	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	2	2	1	1	2	2	1	2	2
5053	*Exp.infect.		1:100	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	1
38	*Exp.infect.		1:100	0	2	2	1	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	1	2	2	1	2	1
95571-3	Clin. infect.	G 1:6400	1:50	0	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	2	2	0	0	2	2	0	2	1
116278-1	Clin. infect.	G/P 1:3200	1:50	1	0	2	0	1	2	1	1	1	1	2	0	2	2	2	0	2	2	1	2	1
116278-2	Clin. infect.	G 1:6400	1:50	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	2	2	2	1	2	2	1	2	1
116278-8	Clin. infect.	P 1:6400	1:50	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	2	1	0	2	2	2	0	2	1
116278-9	Clin. infect.	P 1:3200	1:50	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2
Bovino 1	Vaca sana		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bovino 2	Vaca		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FIG. 3A

Expt ID	Estado del animal	*Título- ción MAT	Dilución de la suera	LA 1118	LA 1228	LA 1404	MCE 1	LA 2268	Lig BVT	LA 1332	LA 1965	LA 1192	LA 1947	Lig Com	LIPL 32	LA 1495	LA 1939	MCE II	LA 2471	LA 1931	LA 1454	
	sana																					
046	Vaca sana		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
593	Vaca sana		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bo1	(D0)		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bo2	(D0)		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bo1	(D28)		1:500	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
Bo2	(D28)		1:500	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
Bo1	(D50)		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
Bo2	(D50)		1:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0

FIG. 3B

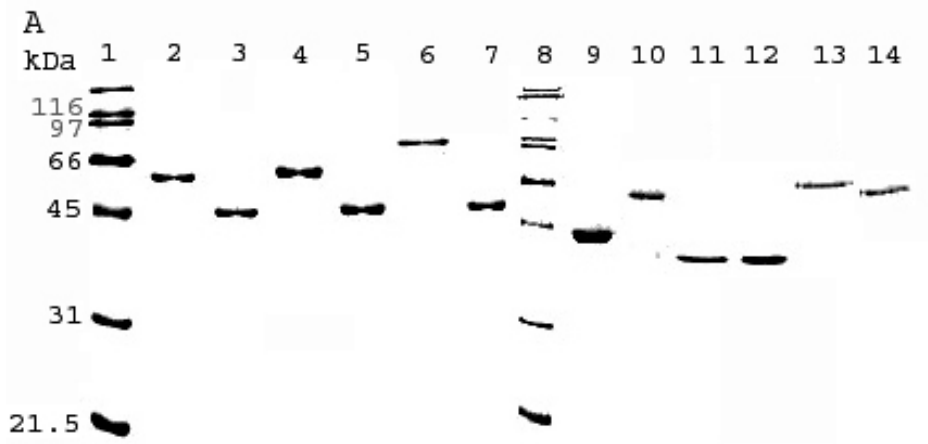


FIG. 4

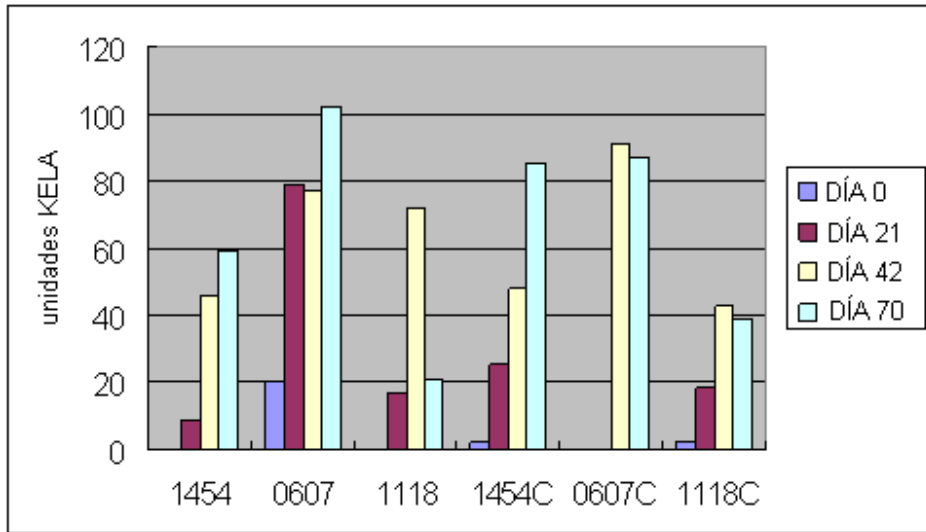


FIG. 5

Semejante a CADF 1:

atgctccttttctaaattaatfttttattctggccttttgtatfttttggccgttttctcaacctctaccggaccttccggaaaaacaatttggtcaa  
 cctcttaatacacaaaacgacgaatacaatcctatagtaagccagatggaagatacatcgattccagtccaaccgtccaggcggagaag  
 gaggaatggacatttgatttccgagaacattcgttttagataaggagataaccagcagaatggactaaaccgtaaatgaaatcaaaaata  
 ttgggaagaatfaaacgtccaccagctgctggagtctgtaaaccataatctattcaacttaacgcgttgaaggtggaattcaattcttttcg  
 atttaacaacgcgccttcggaaatfttttactctacaattaacctgctgttggggcgttccggtttgaaggttgaatattatagaacaatta  
 aagataaaaaaacaggaagatggacagaccagaacatctcagtgaatfaattccaactcaatgataagatgcccgaatttctccgat  
 ggaaatftttgatcttcttccggaccgtccgggggttaccggtgatttcgatcttggatctcggttcgtaatccaaaaaacggaagttggtcc  
 caactaaaaatftaggttctcccctcaactctccgaaagtgaattcttcttccattcatcaagacggagaacaactftattcagttcaatcg  
 agaagacgaaagaaaaaattfaagatftttagaatattcttaaaatataaatctgctctagacaacatgtagaagacgaagaagaaccga  
 agaaactctacaaccaaacgactgaaatfttaattcctaaaatgatcaatcttcttttattacttctccaaaccgttaactgataagtgg  
 gaaggtttgataacgaaggaaatcagttttgacaagacggtatctgggcttatatttctccaatcgttctggggagaaggtcaatttgacatt  
 tccgctttcaagttccggaatctattcgcaactctatactftaaactcaaaaggtctagttttggatggttccgaaaagacgatgattgattag  
 attctactftaaaaatftatgatggaactaaaccggctaactcacttcgaaaagaatcggaggagatcttaccaaaggaaaacttctaa  
 ttttgaacaactctcaaccggaaggtttataaaatagaaatfttctctctggcttctcctcaagaggatattttggatttaagaggaaa  
 cataggtaaaaatcgaaggtttatagaacctacgttctttaccatftcaagttgaagaaggtaaaacggaagaacaaaaatagaacaacc  
 catagagaatcaaaaaccaatftctcccggtgaaagtcacgtagcagacgcactcaaaaacaaatcataccagacgctaaagtactc  
 ttttacacctatgaaccgaaaggagaatctctgtccaagatgcggataaaaaatcttttattataaaaaattaccagataacgattttgaatt  
 atttgaacagcttcgaaatatafttctgaaagtatcaatatttcaaaaaatattccaaaaatggaactgaacaattatctgaaagcagaa  
 agcgacgtagatccggtttataatctacgagtttattcgaatttaataaaacaaaaatcacagaagagaataaaaagtgtgtagatccttctgt  
 aggctatctttgaaaaatgctccgataaaatgaaattgggggacataccgacaacgtagcctctaaaggaatataacacaagattgagtgc  
 caaaagagcccgtaacgtttacgagatcttcttcaaaaggaattccggagaaaagaatgagaatcagggcttattggtattcacaaccgga  
 tgcagacaatgagacagaaccggaagagcaaaaaatagaagagttggttttagaaagctctga

FIG. 6A



Semejante a CADF 2:

atgcataccctgctgactctgatcttaagcctttgcttttctctggctctcagctcgagaataaaaattcttctcaaaaaactaagcactctgc  
 ttcttggattcctaaagaaaatttactcaactcgcatacacaagagaaaaattcaaaacgttctcataacgaaacattaaaactagaattg  
 gctataaattattaactggaaaaattctcagtttgaaaacttagtaccgaaaacgcatacgtccccatcgaatccaacgaaactctcc  
 gaactttctcaactcaacgacaagaccgtaagaatttatgcagtatgaaaggtccacctgcaatcctatacgttatgaaatttatcccttttgg  
 attcgaagaagaatcaaaccttgacgatcaaaaaattctgattacgtaaatcataatattttgattcaatcctacagttccccagacggta  
 aatatctttttggaccgcttatgtcaaacgaggtaaatccggaactcaaaagatttggattccaaattagacgaaaaaggttttgggaagat  
 ggtaaggaaatgaacgctccttaataatgaaatgcctccgctgttatctctgcacttctggtggtaacgaactttcgtcttggaacgttg  
 gcgaaaaagaacttttagacgaactcagtaaagatttgaacgaaggcagacttggccgctcgttcttaaaaaattcaaacgtatatagaa  
 aaaagatagaagaacttagagcagaatatgacgaaaaaacgaaacaaattcaagcagagttcctcttataaaaagttaaggaaaaagatt  
 cctggtctaaaccaagcatattaactttcctaattttataatctttatagaagagaaacgattcaagccaagaaatttcggtggatctactctt  
 tcttctcagggagaatttaactatttctcaacataaggattccaaaggaaaattggatctttatgtagcaaaatgtaaacgacggaaact  
 ttcttttaggtacaaacttaggatgtgatcaacacaactcatgaagagatggctccttttttagcaagcagatagaaacctttttttctag  
 cgacggtcataaaagggtctctatttatgacaaaaagaatcggaaggttgggatcaatggaccaaacctgtcaggtttccgaaaaatc  
 taaaaggtgtaaattttttcaattcccgcgaatagcactggcctatataagcaaaagacggccgattgtttatggcttatctcctaagaaa  
 tgcgccagagaaggtcgtgatcataaacggaaaagtttagatagcggatgtaacctctttctgctgacatacattatgaatctttaaagtct  
 cacgaaaagatcggtagcgcaaaagcgtccttctaatgtaatttttgatcattctccccttggcgaaaactacggtttttacgccaga  
 aaaaaggtattcttcagtatcaciaaattgaaactaagtcttaaaaaaagaaattctctgaaaaagtggaagtaattttacaacttctccgatcc  
 gagaagaggttccattcaaatcaataattttttgagtcgaaggtttcaaatcgtccggaatccgcccagaactggatcgtctcgcg  
 gaaatcgtaaaggaaaaatccagatattgaaattcagattgaaggtcataccgacaacattggcaagaaaaagacaatctaattcttccgaa  
 aaaagagcggcagcggctgcagaatatcttttcaaaaacattctatttctaagactagaatccaaaccaaagggttttggggacagtgtcctt  
 gagtaaaaatgattccgaagaagcacgcaaaaaaacagaagggtcaattttacgattttgaaaaaaagtaataa

Semejante a CADF 3:

ttgaaagtttttacactttcttatgttttaaggaatcttacgaaactaaaactatggggaattttccaatcaacttcaaaatccaaaatcat  
 aaacagacgtttacgaagaattgtatcagctttttattttctacattgatcggttttacttctacttttccagaagaatcggacaaagtctctt  
 cgttgaaactaaaaccaggagagaatgtagaattaaacgaatatcatcgagtacaattagtaagtatgggaaagaaaattagaagagaag  
 ataaaaatcgaatcctattacaacccttctcgcgaaaataaagaatgtacgttagaaggatttttgatacttactcgttttcccgaagtga  
 tctcgtttcgtaaagataaaacgtttaagagcagatttcaataacagatttaggtcaatataaagtgccacaggaatacagtatgcctaac  
 tccgctctctcagttttccgaaaaaccaatttccattggagaagaatggacacaaccgctacgaaagtttcaatttccaggaggaag  
 ggttatgatcaggttttgcgaaatataagtatcacggttagacgaatgggaatatcaaaagttgcccgtaaaggagatcgtatcgaatac  
 aattataatttatattgattcctcaatgaacagaaccgggttccatttaagatctacggatttgcgcgaggaatggtatttttggatcgcgaa  
 ttggaattccacaatataaaagggttcagttgtcgtacattttgtctatgaaaatggaatggcgaagagatgctgttcgacattcacggagta  
 tataataaaaacgtaaaacttacggatcaagacaaggacaagtttgcggaagaaatccgtaaaatttaggaggagaacttcaactggaat  
 tgaaccagattccgattcaaaaaagaatttaaaaaaacgaaaaaggaaaccatttcatggccggaagaaggagataatcaagccgacc  
 agaaaagttcggcgtagaatagaagaacagaagaaggaatcgtatttctttaaattcagtggtttgatcacaacagctcagaacttaaa  
 caagaagcaaaatagaattaaaaagaatcgcacccgtattgaaaaaatatgcagatagagaatcagaattagcgggcatactgacaattc  
 aggcggggaagaatataatcgaaaacttccagagaagagcacttccggtttgaaggaaactcagagatgaacaaggtttggaagaaaa  
 agaatgtcttacgaaggatagggaaatcaaaaccgattgcagataactctacgattcaaggtaggcaaaaaaacgtagggtgatattact  
 attgtaatggaataa

FIG. 6B

Lp0022:

atgaaacaatttttattttactgtgtgtatttctactctttcaaaattgttctgtcaagcccacggaaaatccgtgcgatacagacttctcttttta  
 taaatctttgttcttaaattttatttaactccggcaaacgagtatttgcggatgcacacgtcgggtcagttgcctcccctacgattctcaacat  
 aaaatcaaaaagtactttgaatacaggatttttaattgggtaaattggatgagctctcgggagttcaaattcttttagattcgggtccattatg  
 gacgctcaaactctggcaatcagtggaattcaacttctccgcaggtgttctactacaattcctcaagtggaaattggagagactgga  
 gttacatacaattcgggtcagatctacttctaaggaatcaaatctattccgattacaatcactgtcaaaaagggtcaacaaggatattaacgg  
 cgacggttatccagatgcattgattggttctcaagctgcaaatcgagttagggcttatcttctcttgggaaagcaagggttagatttggtcc  
 ggtcactttactaaatggggcaggtggattggttattccgtaagtaggcgacatc gatggagatggatacggcagtcagttgtaggaa  
 gtgcaacaatacattcgtatttttaggatcaatcgggtgggttcgacaacggcgattaattatccctattggtgtggtggtttattgaat  
 gtggatgtaggagatataaacggagacggattttcagacgttttgattggtgtaccttatgacgtaggaaatattggcgtgtttattctattttt  
 caaatggagttatggggcaagggtttacgtttggcaacaattgaacaatcctggaaatgcaggtagtctgcattttacgggatgccattac  
 gttaggtgataatggagatggtaaatcggatgcgattataggagcggtcggtctggacaggtcggcgttctttattatcttgcgcaag  
 cagcaggggcttttctgcttattctcaacaattacgggatcggctgcaaatgaatggtatgcaattcagcaattgctaccgatataaacg  
 ggatggatttgcggattttattgtggggcttatcaagaatcggggcggcgttgaagagtagatttatattatcaatttaggaattcttgtgaat  
 accccaacggccaattcaggattggttgggtcacaactggaacttctgtggcaactggagatgtaaacgggtgatggatttttagatctc  
 ttaccggaggtattcttacttctactgttccaatcaaggttatgcgattactcatttaactacgggtgatacaatgggttaactgtgaacc  
 ttaaatcttcaacgggtccagtgaaattaggagatagggaattcaattgctcggtagatattaacggtgacgggttaagtacgttctgtg  
 ggagctcctagtccgtaggtggaacaaatgttgaaacgtttacctttatatacaaacggattggacggatatactcggccccacaatttt  
 cgtcgaaccagatgtaaacggaacgtttgggacttccgtggattatga

FIG. 6C

Lp1499:

ttgaacacatccatccaagtgggttttagtcaaaaattggattctctagtatccaatctcaatcgatccaactaacacaaggaaatcagatcatt  
 ccgggaaattcacttctacagaaaaactcttttattcaatccaacgtcttccttggctgcatcaactgtatattccggttagcatttccaaagaca  
 taaaatcaatggacggctcctctcttcagaagactatacttgagctttaccaccaacacgattgttgatttagtcgcgccagacgtatctttaa  
 gaaccctaccataggtgccaatttagttcctaataacttccgttcaaatggcttactgaaacaatgaattgcacttccatcaacattgtaaa  
 ttttaccattaaaaataatgttaccatgtattagaacctagtaatgtagttgttttaggatccgttgccaccctacccttaataatcctcttgctttt  
 aactgtttatcgtgtggatattcttctacagaaaagatcttgtaataatcctcttgtaaacgcataatactggacttttacaaccggaggtgc  
 ccccgatttaacgggtccaaccgtctcttggtaaatcccactcccaatgcacaaaacgttctatcaacgaaacaatcagattgccttttagtg  
 aacctataatgtgtctacgatcgcggaagtattgtcttagatgataatatacttattcctggaagcgtaaacgggaatccgggtgtacaggc  
 acaaccgcactcttactccttaggcaattgacaccaaatacgaattatacggttaccgtctcaaatgcgattaccgatttgcaaaacaatcc  
 acttacaccttctactggagtttacgacggctgctgcagtcgatcagactcaaccacgggttacattactgtaccctccgccaacgcaaac  
 ggctgtagggaccaatgtcaaccctatggtagtttttagcgaacctatgtcttgcctccgtgacctccgcactcttccgattaaagaggcagg  
 caaccggggttattctataggaagtgtaaattgtttggaacttccgctacctggacccagatcctgtaaatccgcttgccttaataactactta  
 caccgtagaaatcgatcagggtgcattagatactttaaataatcctctcattccaataaattggaactttactacaggcccaggaccgatctaa  
 ctctcccagtggtgctgcttactcccgcaaacgctgcgatagggctccgaccaacggaggtgtaagtatcgcttttagtgaagccatga  
 attgtggaagtatttttaggaggaatcacctggacgatgatcctacaactccgggtactgtgattccaatcaatcaattgtaacggaaatact  
 gtctcttttccccgacaatccctcacttgcctttaaatacaacctacacagtaaacgattttaaatacgggttacggacagtaataataatgacta  
 aacggaggaattacgcttggcttttacaacaggagtgaccagacctaacttctcaagtttcttgaagccctctcctgggagcag  
 taggtgctgcaacaaatgcaaacattacagttgcatftaatgaaacctcaattgtccacctgaatttaccggttaataacggaaatcaatggta  
 ctgtaactgttcaggatcctctgctacttttattcctagcgtttaaaccctctaaatgccggtacaaattatacagcaacaatcctaacagtaa  
 atgatattgtaggaaatccaatcgggtgctgctgttgggtggagttttacaaccggagccgctccagatgtgactcctcctgctgttacgatcca  
 aaatcttagaaataattctatcgtagaactggttcgtaattggaacggcaacagatgcaggcacaattactctgtagaagttctttggaca  
 atggcgttttggcccgaaccggaaccaatccttgaaatttaaacctcctcggatataaataacttggaaagcaaaactctcaacatacgat  
 cattgcaagagctaaggacttagccaataaccttacaactacagcagccatttccggttcgaaaaggaaacaataaagatataaacggagac  
 ggatacgtgatctgtatctgcagaatacggacaggggttactttatatttctcctccgggaaacgctggaatgacaattacaacgcacaa  
 tccgcaagtaagatcattgtaggagtcgctggcgggaagaatttggagaactgttctatgggagattttaaaccggagatggatttcagacgt  
 aatttctggtgctcctggttgaacgggtgcccaggtagggttatataatttctcctccgaaacgctggagtaaatatttctttccggtttg  
 ccactaaaacgatcagtgagccaatcgggagctagatttgagatagattgttacaggtgattttaaaccggagacggctacgcagacct  
 agcatcaggagaaccggttttaattggttctcagggtagagtctatgtattcattccgctggagccgctggagttacacaaataaattcggct  
 gctgcaaatctacactcacaggtgaaaacgcaactgacgttccgatattcgttgagcactggaaatgaaacggagataattttgcagatc  
 ttgcaattggagcacctggtatggcgtggcgtaggtggaggattttagtaaaacaggtaaagttatatacatcacggggcggctggt  
 ggattgggaggagtaattacaactcttaccatgatagcgtggaaatgctggggaatttggatcagtttatttacagccgattttaaaccggag  
 acggtaatccgatcttgaattggaagtccaatttaggggggtggaactggaagagttccgtatttacgtctgcaggaggtgtaggtataaa  
 tacatctacgattggaacgctccgcttatgatcaatggaacggctgtgggtaatgcattggaatttcttaaccgcacaggattttaaattaga  
 tggaaagaccgatttattccgcaaccgtaattcccaatagggtattcgtttccacatgccaggtgcaggagctatcgggtgatttcaacc  
 actggtaatgcaactacacaaatcacagtgcatcttcaggaatccgggtttcccaaatgcacctaaaactcctatttccggcggagacat  
 caacggagacggatttccagacttatttgcgggggaagttctgataatatttttccattctcaacggttggaaactggtttattaacaata  
 ctactgcaaccgctgcaggcgaattaccagttccggacttccaatggctttttggatgtagcgtttattga

FIG. 6D

Lp4337:

atgagcctaaaaataaaaattatgtttatcaaaaaaacatattgattctatTTTTtagtatTTTTgttttataattctTTTTtctattfactctcag  
gatttaagtataaatcaaaatcctaaaccagaaaagttaaagggtctatcaatacgaagtcaatgagttggaatcagcttactgatgacgg  
aaatTTTTtatttctattctaaaagacaaaattcaattatacagacatttataagtcaactgaacgaaagatgaatggacacaaggagagg  
aaattgaagttctaaattcaactttgacgaccaaaagtcctttcatTTTaaaccgagaagaaggaattctTTTTcatctaatagagatggtgcgac  
cgaattccaatttgcaaatggaaaaatcggagttctagagatattTTTTtcaaaaaataaattctcttggacagaaccggtctcttctcta  
gagccgtgaatacggagaatcgaagaaaatccgttctattaataatagattgattttaccggtatccttttgggcaagttcagaagcgg  
acatttctgttctgtttataaaaataacactgggaaaaagcaatgagcctcctgatccgattaacaccggttattcggaaattgcggctaca  
ttagtaaaagatggaaagacgattTTTTtcttaaccgtccggggggtttggcggttatgattgtataagtctactttacttgaanaacggaaat  
tattccgaaccgattaatcttggaccgaaattaacactaccggagatgaggctTTTTtctggaacaaacgatagaaagacattctTTTTgt  
agaaggaaagaacgcgattatgatatttctatcgttctaacccgttcaagaactagaaaaaggaaaatctattcttggatagatccatt  
ttcttgggctctatgaaattctgaaaattcttttcaatttagataattgaattcttatcttaaggaaaatttaataaaaaatcaaaatcacc  
ggcataccgatctaatggagattccaggacaacctattctcagccgtaatcgtgcaaatgcagtaaaggattatttagttaaaggggga  
atcgattctcaagaattatcacggatgggaaaggtagtccggagccaattgtctctatgaaaaatccagagacggattataaaaaatagaaga  
accgaattcagattatcagtcgtag

Lp328:

atggcgaagaaagaaaactactatattactatcaaaagtagaaaatgatcgtgaagttgatccagctcgggaagagttcacttccggtaa  
acgggacggtaagattcgaacacgacgcaaaacgtctttaaanaattgcaaggataacaacgcttatacggatagaaaaacatacga  
cgaatacattcgtgaaaactataagttaccgaaaaatcggacgaatggtccgttcagaaatccgtaaatgggccgctaaaaaagtgaag  
aagcaaaaaagaaaagtgatgtggaatccatcctagtcgatattctgaagcgcggaaataaatttcttccagttggggagaagacaaa  
accgaagttgtgaaattacacaacctctaaaatagattggagagaaaattcaatttttcatccgcaacgtctactctaaaaaaaataaaaa  
gatcattccaacttaatttttcttctggtttttgattctttaggttttagtttttttgaacctattttataaggaaagacttgaacaagtagtaa  
aacgaattctgagattgtcttaattcaaaagaaaaacaatccgacgttctgatagaaaagcagaatctacaaggaagttcgaagaaa  
aacgtaagatcaaaaaagaagaatcggaaattcaaaaaatgctcttacaattctaaaacctcaaacggaaagaagttagaatctaatcc  
ttattctctcgttgacaaatcaaaattccacagaagaattttctccaatctcaatttagagaaattgaatccaatgtaattcgtttgaaaaaa  
cagcattcaaaatcataaagaatcgagaccaagtctcaaccgttggctcgtggtgaaacaggattctcagatccgagtcgaagttatcgg  
tcatacttcttagaggtagcgaagacgccaatcaaaaagtctcttctcgtgcacaaacgggtcgaattatcgcgggaatggcattt  
ccaaagatcgtttgagattattccaaaggcgaagcgttctattggcgataattctaaagaagagggaaggaatgaatcgtagagtg  
gaacttagaatctataattga

L21:

atgaaatataaaataattttaatttatcactaatgttatttctttcgttccgtccgatgaaaaaaagaaaatgaattgagtacttatatttata  
tagtgttctcataaacgcaactactcaatacgaattgtgttactagttcggaaagtagtatcagactcttatacaaaaacaacaataacctcga  
ataaacctcaatattacaattcaccagtggaatgtagttccaaaagcaattatgccgattttgattaaaaaggggagacaattcaagtatc  
cagtataacgactaacgttaagtatgaagcgacaaaccaagacttaacttttcttttagaaaagatggtgtcacggtacaaactccgaaattg  
caacctatgcaggagctactaatacaaatgttttttaggaaacacaatactgttagcttaactcaatttaatttaccgactataatggga  
ttataactatcgttgggaaaaacctaggtgcaagtttaccctggagatattcgtgtaattgtattttaa

FIG. 6E