



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

00234568

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO** Novedoso Gen de Lawsonia SSP. y sus usos TI

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** CO7K 4/195, C12N 15/31, A61K 39/02

1. Agriculture Victoria Services Pty Ltd.
2. Pig Research Development Corporation

71. **SOLICITANTE**

DOMICILIO

1. Victoria, Australia, 2. Burton, Australia, 3. Connecticut, USA

74. **APODERADO**

Dilia Maria Rodriguez D'Alencan

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.**

Mayo 12, 2000

202099

REPUBLICA DE COLOMBIA

SIC

SUPERINTENDENCIA

DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



00 34568

**CITU
ENI**

INVENCION

GOBERNACION DE COLOMBIA

Radicación : 00034568 0000000

Folios: 08

Fecha (AMD): 2003-05-12 16:42:49

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO A1 PRESENTA

Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombre y Apellidos o Razón Social

1) AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD.
2) PIG RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION

Nº de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

1) AUSTRALIA
2) AUSTRALIA

Departamento o Estado

Ciudad

1) VICTORIA
2) BURTON, TERRITORIO DE CAPITAL AUSTRALIANO

Dirección

1) 475 Mickleham road, Attwood, Victoria, 3049 Australia
2) 3rd Floor, Industry House, 10 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory, 2600, Australia

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

Dirección

Carrera 11 numero 93-43 oficina 404, Santafe de Bogotá, S.A.

DATOS DEL INVENTOR Son (3) Inventores Nacionalidad

(72) Nombre del Inventor (es)

1) Michael PANACCIO - Australiano
2) Detlef HASSE - Australiano
3) Meri SINISTAJ - Australiano

Dirección y Domicilio

1) VER AL RESPALDO

Identificación

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención NOVEDOSO GEN DE LAWSONIA SSP. Y SUS USOS II

PRIORIDAD REIVINDICADA

Sí ☒

No ☐

(33) ESTADOS UNIDOS

(32) MAYO 13, 1999

(31) Nº Solicitud 60/133.986
Provisional

Fuente Normativa: Convenio de París Art.4º

CLASIFICACION INTERNACIONAL

SOLPA 337

SRR

INVENTORES:

1) Michael PANACCIO - Australiano
122 Hill Road, North Balwyn
Victoria 3104 Australia

2) Detlef HASSE - Australiano
4 Scullin Court, Sunbury,
Victoria 3429, Australia

3) Meri SINISTAJ - Australiano
3/60 Gourlay Street, East St. Kilda, Victoria 3183



2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 30,105
FECHA : MAYO 12 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00034568 00000000 Folios: 03
Fecha (AMD): 2000-05-12 16:49:49
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTADO
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	VF. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	999472	2,432,000.00

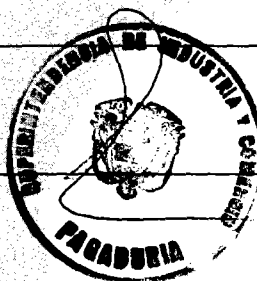
***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	600,000.00
		TOTAL :	600,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°.



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

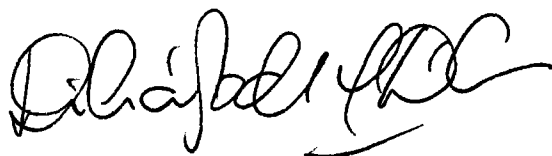
RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de condiciones de enfermedad intestinal en animales y pájaros causadas o exacerbadas por *Lawsonia intracellularis* o similar, u otros microorganismos relacionados. En particular, la presente invención suministra un gen nuevo derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido, polipéptico o proteína OmpH inmunógeno que es particularmente útil como antígeno en una preparación para vacuna para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en huéspedes animales. La presente invención también está orientada a métodos para el tratamiento y/o profilaxis de dichas condiciones de enfermedad intestinal y a agentes de diagnóstico y procedimientos para detectar *Lawsonia intracellularis* o similar, u otros microorganismos relacionados.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☐ |
| Poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C. | ☐ |
| Recibo de la tasa respectiva | ☒ |
| Si se reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada) | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietario según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para resumen o para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD



FIRMA DEL APODERADO

C.C. 41.654.882

TP N° 20824 CSJ

NUEVO GEN *LAWSONIA SPP.* Y SUS USOS II

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de condiciones de enfermedad intestinal en animales y aves causadas o exacerbadas por *Lawsonia intracellularis* o similar u otro microorganismo relacionado. En particular, la presente invención suministra un gen novedoso derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido, polipéptido o proteína inmunológicos. El polipéptido que se describe aquí, mencionado como OmpH, o un péptido homólogo, análogo o derivado del mismo es particularmente útil como un antígeno en la preparación de la vacuna para otorgar inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en anfitriones animales huéspedes. La presente invención también está dirigida a métodos para el tratamiento y/o la profilaxis de las mencionadas condiciones de enfermedad intestinal y agentes y procedimientos de diagnóstico para detectar *Lawsonia intracellularis* o similar, u otros microorganismos relacionados.

GENERAL

Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas en forma numérica en esta memoria descriptiva se agrupan en el final de la memoria descriptiva. Todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones que se mencionan aquí se incorporan en su totalidad a modo de referencia.

La referencia de aquí en adelante a "*Lawsonia intracellularis*" o su abreviatura "*L. intracellularis*" incluye todos los microorganismos similares a o relacionados de otro modo a este microorganismo, según se describe en Stills (1991) o Jones et al (1997) o Lawson et al. (1993) o McOrist et al. (1995).

Según se la utiliza aquí, la palabra "ompH", o el término "gen ompH", se

utilizará como referencia al gen que codifica el polipéptido OmpH de la presente invención.

Según se lo utiliza aquí, el término "que deriva de" se tomará para indicar que un producto específico, en particular una macromolécula como un péptido, polipéptido, proteína, gen o molécula de ácido nucleico, molécula de anticuerpo, fracción de Ig, u otra macromolécula, o una muestra biológica que comprende dicha macromolécula, puede ser obtenida de una fuente, organismo, tejido, órgano o célula particular, aunque no necesariamente en forma directa de esa fuente, organismo, tejido, órgano o célula.

En el transcurso de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprende", o variaciones como "que comprende", se entenderá como la inclusión de un paso o elemento, o entero o grupo de pasos o elementos o enteros detallados pero no la exclusión de ningún paso o elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

Aquellos que tienen experiencia en el arte apreciarán que la invención que se describe aquí es susceptible de variaciones y modificaciones diferentes a las que se describen específicamente. También se comprenderá que la invención incluye todas esas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todos los pasos, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, en forma individual o colectiva, y cualquiera y todas esas combinaciones y dos más de los mencionados pasos, características, composiciones y compuestos.

La presente invención no tiene que ser limitada en su alcance por las realizaciones específicas que se describen aquí, que son solamente para propósitos de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes se encuentran claramente dentro del alcance de la invención, del modo que se describe aquí.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sector productor de carne de la industria agrícola depende de la salud de su ganado y existe una necesidad de mantener ganado libre de enfermedades para el consumo humano. La industria está sujeta a una rápida depresión en respuesta a las condiciones de enfermedades que afectan en forma adversa al ganado y la calidad de los productos de carne derivados de ellos, incluyendo aquellas enfermedades que pueden ser transmitidas potencialmente a los humanos. Es importante, por lo tanto, tener tratamientos muy definidos y procedimientos profilácticos y de diagnóstico disponibles para tratar las infecciones o infecciones potenciales en los animales de ganado y los humanos.

Los productos de carne derivados de las especies porcinas y aves son productos significativamente comerciales en la industria agrícola. En particular, los porcinos son un componente importante de la industria de la carne. Sin embargo, los porcinos son sensibles a un amplio espectro de enfermedades intestinales mencionadas en forma colectiva como enteropatía proliferativa porcina (PPE). Estas enfermedades han sido conocidas con anterioridad como complejo de adenomatosis intestinal (Barker y van Drumel, 1985), adenomatosis intestinal porcina (PIA), enteritis necrótica (Rowland y Lawson, 1976), enteropatía hemorrágica proliferativa (Love y Love, 1977), ileítis regional (Jonsson y Martinsson, 1976), síndrome del intestino hemorrágico (O'Neil, 1970), enteritis proliferativa porcina y *Campylobacter spp* - enteritis inducida (Straw, 1990).

Existen dos formas principales de PPE: una forma no hemorrágica representada por la adenomatosis intestinal que provoca con frecuencia retardo del crecimiento y diarrea leve; y una forma hemorrágica, que es con frecuencia fatal, representada por una enteropatía hemorrágica proliferativa (PHE) en la cual el lumen del intestino delgado distal se llena con sangre. El PPE ha sido

informado en un número de especies animales incluyendo los cerdos (McOrist et al. 1993), hamsters (Stills, 1991), hurones (Fox et al, 1989), conejillos de indias (Elwell et al. 1981), conejos (Schodeb y Fox, 1990) como también en especies avícolas (Mason et al, 1998).

El organismo que causa PPE es un organismo similar al *Campylobacter* mencionado aquí como "*Lawsonia intracellularis*" (McOrist et al, 1995). El organismo también ha sido mencionado con anterioridad como *Ileal symbiont intracellularis* (Stills, 1991). Las enfermedades similares a PPE en los cerdos también pueden ser causadas por otros patógenos como las numerosas especies de *Campylobacter* (Gebhart et al, 1983).

Lawsonia intracellularis es una bacteria intracelular, posiblemente intracelular obligada. Puede ser cultivada solamente *in vitro* con células de cultivo de tejidos (Jones et al., 1997; Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US96/09576). *L. intracellularis* está ubicado en el citoplasma de las células vellosas y las células crípticas intestinales de los animales infectados. Los cerdos que sufren de PPE están caracterizados por irregularidades en las células vellosas y la estructura críptica intestinal con displasia de las células epiteliales, donde las formas de abscesos crípticos como las criptas intestinales y vellosas se ramifican y se llenan con células inflamatorias.

La PPE es un componente de costos significativo asociado con la industria porcina, especialmente en lo que se refiere a pérdidas de ganado, costos de medicación, índices reducidos de crecimiento de los cerdos y costos incrementados de alimentación. La PPE también contribuye a aumentar los costos indirectos en, por ejemplo, los costos de trabajo adicional y costos ambientales en el tratamiento de la contaminación con residuo antibiótico, y en las medidas de control para prevenir que el organismo pase o se transporte a otros

animales o humanos.

Las estrategias de control actuales de PPE yacen en el uso de antibacterianos. Sin embargo, dicha estrategia se considera solamente como a corto o mediano plazo, especialmente dado que las presiones reguladoras gubernamentales tienden a desalentar las prácticas de granjería animal que incluyen el uso de antibióticos profilácticos. Existe una necesidad, por lo tanto, de desarrollar alternativas efectivas, seguras, y de costo reducido para el uso de antibióticos y, en particular, de desarrollar preparaciones de vacuna capaces de otorgar inmunidad protectora contra la infección con *Lawsonia intracellularis* en animales de ganado.

Las preparaciones de vacuna más efectivas están generalmente formadas por un componente altamente antigénico, como un péptido, polipéptido, proteína u otra macromolécula que deriva del organismo patogénico contra el cual se dirige la vacuna, donde dicho componente antigénico produce pocas contraindicaciones, o ninguna, cuando se administra a un animal huésped susceptible, y produce poca reactividad antigénica, o ninguna, con los organismos deseables, como los organismos no patogénicos que son una parte de la flora normal del tracto intestinal u otros tejidos de dicho animal huésped. En resumen, una preparación de vacuna efectiva debe ser inmunogénica, específica y segura.

De acuerdo con lo expuesto, hay una necesidad de identificar los antígenos altamente inmunogénicos producidos por la bacteria *Lawsonia intracellularis*.

La Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU96/00767 describe varias secuencias genéticas parciales de *L. intracellularis*, y los polipéptidos parciales codificados por ellas. Sin embargo, existe la necesidad de además identificar los inmunógenos de polipéptidos producidos por la *L-intracellularis* bacteriana y los péptidos inmunológicos derivados de ellos, incluyendo aquellos inmunógenos que

son específicos del gen o de la especie, para usar en las composiciones de vacuna mejoradas. La presente invención suministra dichos inmunogenes.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención se dirige a un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante que comprende imitaciones o reacciones con un epítipo de célula B o célula T del polipéptido OmpH derivado de *Lawsonia spp.* Preferiblemente, el polipéptido inmunogénico aislado o recombinante se selecciona del grupo que consiste en los siguientes:

- (i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos aproximadamente un 60% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se establece en la SEC ID NO: 1;
- (ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1; o
- (iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii), que imita un epítipo de célula B o célula T de *Lawsonia spp.*

En una realización preferida, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1.

Un aspecto adicional de la presente invención suministra una composición de vacuna para la profilaxis o el tratamiento de infección en un animal, como un cerdo o un pájaro, por *L. intracellularis* o un microorganismo similar o relacionado de algún modo, dicha composición de vacuna comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de un componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente un 60% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido de la

SEC ID NO: 1 o que comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos derivados de la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado inmunogénico de ellos que es reactivo inmunológicamente con *Lawsonia intracellularis*; y uno o más portadores, diluyentes y/o adyuvantes apropiados para uso veterinario o farmacéutico.

En una realización preferida, el polipéptido de la composición de vacuna comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1.

Un aspecto adicional de la invención se extiende a una molécula inmunológicamente reactiva, como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que es capaz de unirse al polipéptido inmunogénico de la invención.

Un aspecto adicional de la invención suministra un método para diagnosticar una infección de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado en un animal, dicho método comprende los pasos de contactar una muestra biológica derivada de un animal con una molécula inmunológicamente reactiva de la presente invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo, como un complejo antígeno:anticuerpo, y luego detectar la formación de dicho complejo.

Un aspecto adicional de la presente invención contempla un método de determinar si un animal ha sufrido o no de una infección anterior, o si se encuentra actualmente infectado, por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado, dicho método comprende contactar una muestra de tejido o fluido, como la sangre o el suero derivado de dicho animal, con el polipéptido inmunogénico de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo, como el complejo antígeno:anticuerpo, y luego detectar la formación de dicho complejo.

Un aspecto adicional de la presente invención suministra una molécula

aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica. un péptido, oligopéptido o polipéptido seleccionado de los siguientes:

- (i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos aproximadamente un 60% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se establece en la SEC ID NO: 1;
- (ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1; o
- (iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii). que imita un epítope de célula B o célula T de *Lawsonia spp.*

En una realización preferida, la molécula aislada de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido de SEC ID NO: 2, o una variante degenerada de ella, o tiene por lo menos aproximadamente un 60% de identidad de secuencia con toda o una parte de ella.

Aún otro aspecto adicional de la invención suministra un método de diagnóstico para detectar *Lawsonia intracelularis* o un microorganismo relacionado en una muestra biológica derivada de un sujeto animal, dicho método comprende los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores de polinucleótido u oligonucleótido derivadas de la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria de ella o un homólogo, análogo o derivado de ella, con dicha muestra y luego detectar dicha hibridación usando un medio de detección. El medio de detección de acuerdo con este aspecto de la invención es cualquier reacción de amplificación o hibridación basada en ácido nucleico.

Un aspecto adicional de la invención suministra una sonda o cebador

aislado derivado de la SEC ID NO: 2 o una secuencia complementaria de nucleótido de ella.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

La **Figura 1** es una copia de una representación fotográfica que muestra la expresión del polipéptido de OmpH *L. intracellularis* recombinante a partir del clon p97LI17. Las alícuotas inducidas y no inducidas de la proteína derivada de las cepas *E. coli* BL21 (pLysS) y BL21 (DE3) se separaron en geles duplicados usando SDS/PAGE. Los geles fueron manchados con Azul de Coomassie (parte superior, gel 1) o transferidos a nitrocelulosa y sondeados usando suero Y12 (gel, 2). El polipéptido OmpH inmunogénico expresado está indicado por la flecha. Las rutas A-C son p97LI17 que crecieron en BL21 (pLysS) luego de inducción durante 2 horas (ruta A) o 1 hora (ruta B) o sin inducción (ruta C), las rutas D-F son p97LI17 que crecieron en BL21 (DE3) luego de inducción durante 2 horas (ruta D) o 1 hora (ruta E) o sin inducción (ruta F). La ruta M comprende los estándares de peso molecular, que se indican en Kda a la derecha del gel 1.

La **Figura 2A** es una copia de un micrográfico de contraste de fase de un corte de tejido íleo porcino que ha sido infectado con *Lawsonia intracellularis*. La característica oval central representa el lumen rodeado por células mucosas inmaduras.

La **Figura 2B** es una copia de un micrográfico de fluorescencia de un corte de tejido íleo porcino que ha sido infectado con *Lawsonia intracellularis* que muestra la ubicación de OmpH usando suero anti-OmpH y la detección usando FITC luego de la excitación con luz ultravioleta. La fluorescencia se localiza en la *L. intracellularis* dentro del citoplasma apical de las células mucosas. No hay unión detectable del anticuerpo principal con otro material en esta sección.

La **Figura 3** es una representación en forma de esquema de una alineación de la secuencia de aminoácido de varias proteínas H de la membrana bacteriana externa. Las secuencias de aminoácido de OmpH de *Lawsonia intracellularis* (L. int), *Yersinia pseudotuberculosis* (Y. pseud), *Yersinia enterocolitica* (Y. enter), *Haemophilus influenzae* (H. influ), *Aquifex aeolicus* (A. aeoli), *Escherichia coli* (E. coli), *Salmonella typhimurium* (S. typhi), *Chlamidia trachomatis* (C. trach), *Streptococcus pyogenes* (S. pyoge) y la Secuencia 1 de la Publicación de Patente Internacional No. WO97/01638 (9701638) se muestran alineados entre sí; las brechas han sido introducidas para optimizar la alineación. Las posiciones que contienen aminoácido idéntico con respecto a la secuencia de OmpH (SEC ID NO: 1) de *L. intracellularis* están sombreadas. Los residuos idénticos en todas las 10 secuencias aparecen en negrita.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores buscaron identificar las proteínas inmunológicas de *Lawsonia intracellularis* para usarlas en vacunas para la profilaxis y el tratamiento de PPE en animales, incluyendo cerdos y pájaros.

De acuerdo con esto, un aspecto de la presente invención está dirigido a un polipéptido inmunológico recombinante o aislado que comprende, imita o reacciona con un epítipo de célula B o de célula T del polipéptido OmpH derivado de *Lawsonia spp.*

Los epítopes de *Lawsonia spp* pueden ser epítopes de célula B o epítopes de célula T. Se sabe que los sitios de unión con el anticuerpo (epítopes de célula B) incluyen epítopes lineales, como también conformacionales (van Regenmortel, 1992). Los epítopes de célula B son predominantemente conformacionales. En contraste, las células T reconocen las secuencias de epítipo predominantemente

lineales en combinación con las moléculas de MHC de clase II.

Una identificación precisa y una selección cuidadosa de epítopes de *Lawsonia spp.* facilita el desarrollo de reactivos diagnósticos y composiciones de vacuna para el tratamiento o profilaxis efectivos de las infecciones de *Lawsonia*. La identificación y caracterización del epítipo (es decir, la determinación del peso molecular, la secuencia de aminoácido, y la estructura de epítpoes de *Lawsonia spp.*) pueden ser formadas previamente por medio del uso de técnicas reconocidas en el arte. Para la detección de epítopes conformacionales, la degradación y la desnaturalización de la molécula del epítipo deben ser evitadas con el fin de conservar la estructura tridimensional, porque la reacción del antígeno-anticuerpo será disminuida si la estructura secundaria del epítipo es alterada en forma significativa. En la práctica, la caracterización y aislamiento de los epítopes lineales no conformacionales es fácil, porque cualquier región inmunoreactiva está contenida dentro de un solo fragmento de péptido o una sola secuencia de aminoácido que es capaz de ser purificada bajo un rango de condiciones.

Tanto los epítopes conformacionales como no conformacionales pueden ser identificados en virtud de su capacidad de unir cantidades detectables de anticuerpos (como IgM o IgG) a partir del suero de animales inmunizados contra o infectados con *Lawsonia spp.* y, en particular *L. intracellularis*, o un polipéptido aislado derivado de ellos, o en forma alternativa, en virtud de su capacidad de unir cantidades detectables de anticuerpos en una fracción de Ig purificada derivada de dicho suero. Los anticuerpos pueden ser derivados de o estar contenidos dentro de grupos de suero policlonal, o pueden ser anticuerpos monoclonales. Se pueden emplear fragmentos de anticuerpo o anticuerpos recombinantes, como aquellos expresados sobre la superficie de un bacteriofago o partícula de virus, como en una librería de muestras de fagos.

La determinación de los epítopes de células T se realiza por medio del análisis de la habilidad de los péptidos del epítope para inducir la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos o clones de células T. La identificación de los epítopes de células T se logra usando una variedad de métodos como los que se conocen en el arte, incluyendo el uso de proteína antigénica completa y fragmentada, nativa o recombinante, como también el método más comúnmente empleado de "péptido superpuesto". En el último método, los péptidos superpuestos que abarcan la totalidad de la secuencia de un polipéptido derivado de *Lawsonia spp.* se sintetizan y se prueba su capacidad de estimular las respuestas citotóxicas o proliferativas de las células T *in vitro*.

La determinación de la estructura de los epítopes tanto conformacionales no lineales y no conformacionales lineales puede ser realizada por medio de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y el análisis cristalográfico de rayos X. La determinación de los epítopes utilizando técnicas de rayos X requiere que el complejo proteína-anticuerpo sea cristalizado, mientras que la MNR permite el análisis del complejo en estado líquido. La MNR mide la cantidad de aminoácidos como también la cercanía de protones de diferentes residuos de aminoácido, donde el efecto alternativo de dos protones a lo largo de la cadena principal de carbono es característico de un epítope en particular.

Un método exitoso para reconocer los epítopes no conformacionales lineales es el manchado inmunológico y en particular, el manchado Occidental. Los péptidos pueden ser generados a partir de un polipéptidos de *Lawsonia spp.* completo por medio de la digestión con proteasas de un sitio específico, como la tripsina o quimotripsina, y los péptidos generados por ellos pueden ser separados utilizando procedimientos estándar de electroforesis y cromatografía. Por ejemplo, después de la electroforesis de acuerdo con el peso molecular utilizando SDS/PAGE (electroforesis de SDS/gel de poliacrilamida) y/o de acuerdo

con el punto isoelectrico usando IEF (foco isoelectrico) o en forma alternativa, por medio de electroforesis de dos dimensiones, los péptidos pueden ser transferidos a membranas de nitrocelulosa o nylon inmovilizante e incubados con suero levantado contra los polipéptidos intactos. Los péptidos que comprenden regiones inmunológicas (es decir, epítopes de célula B o célula T) son unidos por los anticuerpos en el suero y los anticuerpos unidos pueden ser detectados usando anticuerpos secundarios, como los anticuerpos anti-IgG, que han sido etiquetados en forma radioactiva o enzimática. Los epítopes pueden entonces ser caracterizados por la purificación basada en su tamaño, carga o la habilidad de unirse específicamente a los anticuerpos contra el polipéptido intacto, usando una o más técnicas, como la cromatografía de exclusión de tamaño, la cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía por afinidad o ELISA entre otros. Luego de la purificación del epítipo, solamente la banda o mancha debe ser detectable con electroforesis de gel. La terminal N o secuenciamiento total del péptido ofrece la posibilidad de comparar el péptido con las proteínas conocidas en las bases de datos.

Actualmente se han inventado muchos algoritmos manejados por computadora para buscar los epítopes de la célula T en las proteínas (Margalit et al, 1987; Vajda y C. DeLisi, 1990; Altuvia et al., 1995; Parker et al 1994; De Groot et al, 1995; Gabriel et al, 1995; Meister et al., 1995). Estos algoritmos investigan la secuencia de aminoácido de una proteína determinada en busca de características que se consideran comunes a los péptidos inmunogénicos. regiones de ubicación que son propensas a inducir una respuesta inmune celular *in vitro*. Los algoritmos manejados por computadora pueden identificar regiones de un polipéptido de *Lawsonia spp.* que contienen epítopes y son menos variables entre los aislados diferentes. Alternativamente, los algoritmos manejados por computadora pueden identificar rápidamente las regiones de las proteínas más

variables del aislado que deben ser incluidas en una vacuna multivalente.

El algoritmo AMPHI (Margalit et al., 1987), que se basa en la periodicidad de los epítopes de las células T, ha sido utilizado ampliamente para la predicción de los sitios antigénicos de la célula T a partir solamente de la información de la secuencia. Esencialmente, el AMPHI describe un modelo estructural común de motivos de unión de MHC, dado que los motivos de unión de MHC (es decir, modelos de aminoácidos que son comunes para la mayoría de los péptidos que se unen a una molécula específica de MHC) muestran la misma periodicidad que una hélix alfa. La identificación de los epítopes de las células T por medio de la ubicación de los motivos de unión de MHC en una secuencia de aminoácido suministra un medio efectivo para identificar los epítopes inmunogénicos en los ensayos de diagnóstico.

El algoritmo EpiMer (Meister et al., 1995; Gabriel et al., 1995; DeGroot et al., 1995) ubica los motivos de unión de MHC agrupados en las secuencias de aminoácido de proteínas, basado en la correlación entre las regiones de motivo denso de unión de MHC y los péptidos que pueden tener la capacidad de unirse a una variedad de moléculas de MHC (ligantes promiscuos o multi-determinantes) y para estimular una respuesta inmune también en estos varios contextos de MHC (epítopes promiscuos o multi-determinantes). El algoritmo EpiMer usa una librería de motivos de unión de MHC para múltiples alelos de HLA de clase I y clase II para predecir los sitios antigénicos dentro de una proteína que tienen el potencial de inducir una respuesta inmune en sujetos con una variedad de antecedentes genéticos. EpiMer ubica relaciones para cada motivo de unión de MHC dentro de la secuencia primaria de un antígeno de proteína determinado. La densidad relativa de estas relaciones de motivo se determina junto con el antígeno, dando como resultado la generación de un histograma de densidad de motivo. Finalmente, el algoritmo identifica las regiones de proteína en este histograma con

una densidad de relación de motivo superior a un valor de densidad límite definido por el algoritmo, y produce una lista de subsecuencias que representan estas regiones agrupadas, ricas en motivo. Es más probable que las regiones seleccionadas por EpiMer actúen como péptidos de unión multi-determinante que los péptidos elegidos en forma aleatoria del mismo antígeno, debido a su concentración de relaciones de motivo que unen el MHC. La selección de regiones que son de unión a un MHC de motivo denso aumenta la probabilidad de que el péptido pronosticado contenga un motivo "válido", y además, que la reiteración de motivos idénticos pueda contribuir a la unión del péptido.

Los algoritmos adicionales basados en el motivo de unión de MHC han sido descritos por Parker et al (1994) y Altuvia et al (1995). En estos algoritmos, la unión a una molécula determinada e MHC está pronosticada por una función lineal de los residuos en cada posición, basados en parámetros definidos en forma empírica, y en el caso del algoritmo de Altuvia et al. (1995), también se pueden tomar en consideración estructuras cristalográficas conocidas.

Los métodos recombinantes ofrecen la oportunidad de obtener epítopes muy caracterizados de pureza elevada para la producción de reactivos diagnósticos y formulaciones de vacuna específicas de epítope (Mohapatra et al., 1995). Sobre la base de una secuencia de aminoácido de un epítope lineal y la identificación de la correspondiente secuencia de nucleótido que la codifica, la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) puede ser realizada para ampliar la región de codificación del epítope a partir del cADN. Luego de la clonación y la expresión en un sistema vector/huésped apropiado, se puede extraer una gran cantidad de epítopes de pureza elevada. De acuerdo con lo expuesto, la presente invención claramente se extiende tanto a los polipéptidos no recombinantes aislados y a los polipéptidos recombinantes en una forma impura y aislada.

El término polipéptido, según se lo utiliza aquí, se tomará como referencia a

cualquier polímero que consiste en aminoácidos unidos por medio de uniones covalentes e incluye dentro de su alcance las proteínas de longitud completa y partes o fragmentos de ellas como, por ejemplo, oligopéptidos y secuencias cortas de péptidos que consisten en por lo menos aproximadamente 5 residuos de aminoácido, preferiblemente por lo menos aproximadamente 10 residuos de aminoácido, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 12 residuos de aminoácido, y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 15 residuos de aminoácido.

También se incluyen dentro del alcance de la definición de un "polipéptido" las variantes de la secuencia de aminoácido, que contienen una o más sustituciones, eliminaciones, o inserciones de aminoácido preferiblemente conservadoras, que no alteran por lo menos una propiedad esencial de dicho polipéptido como, por ejemplo, su inmunogenicidad, el uso como reactivo de diagnóstico, o su efectividad como vacuna que contiene péptido contra *Lawsonia spp*, entre otros. De acuerdo con esto, un polipéptido puede ser aislado de una fuente en la naturaleza, o sintetizado en forma química. Además, un polipéptido puede ser derivado de una proteína de longitud completa por medio de disociación química o enzimática, usando reactivos como CNBr, tripsina o quimotripsina, entre otros.

Las sustituciones de aminoácido conservadoras son muy conocidas en el arte. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido OmpH de la invención pueden ser sustituidos en forma conservadora con un residuo de aminoácido de carga, tamaño o polaridad similares donde el polipéptido resultante retiene una habilidad de funcionar en una vacuna o como un reactivo de diagnóstico según se describe aquí. Las reglas para hacer dichas sustituciones incluyen aquellas descritas por Dayhof (1978). Más específicamente, las sustituciones de aminoácido conservadoras son aquellas que generalmente

tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente están generalmente divididos en cuatro grupos: (1) ácido= aspartato, glutamato; (2) básico= lisina, arginina, e histidina; (3) no polar= alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptofano; y (4) polar no cargado= glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, y tirosina. La fenilalanina, tirosina y triptofano también están clasificados en forma conjunta como aminoácidos aromáticos. Uno o más reemplazos dentro de cualquier grupo en particular, como, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina o valina, o en forma alternativa, la sustitución de aspartato por glutamato o treonina por serina, o de cualquier otro residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido estructuralmente relacionado, generalmente tendrá un efecto insignificante en la función del polipéptido resultante.

La presente invención no está limitada por la fuente del inmunogen sujeto y claramente se extiende hacia los polipéptidos aislados y recombinantes que derivan de una fuente que ocurre en forma natural o no natural.

El término "polipéptido recombinante" según se lo utiliza aquí se tomará como referencia a un polipéptido que se produce *in vitro* o en una célula huésped por medio de la expresión de una secuencia genética que codifica dicho polipéptido, cuya secuencia genética se encuentra bajo el control de un promotor apropiado, donde se ha realizado una manipulación genética con el fin de lograr dicha expresión. De acuerdo con esto, el término "polipéptido recombinante" claramente abarca los polipéptidos producidos por la expresión de secuencias genéticas contenidas en vectores, plásmidos o cosmidos virales que han sido introducidos en las células, tejidos u órganos procarióticos o eucarióticos. Las manipulaciones genéticas que pueden ser utilizadas en este contexto serán conocidas por aquellos que tienen experiencia en el arte e incluyen, aunque no

están limitadas a, aislamiento de ácido nucleico, digestión de endonucleasa de restricción, digestión de exonucleasa, rellenado de terminación utilizando el fragmento Klenow de la polimerasa I de ADN de *E. coli* o enzimas de polimerasa de ADN T4, terminación truncada de moléculas de ADN que utilizan la polimerasa de ADN T4 o enzimas ExoIII, reacciones de mutagénesis, ligación y amplificación dirigidas a un sitio. Como resultará conocido para aquellas personas que tienen experiencia en el arte, las técnicas adicionales como hibridaciones de ácido nucleico y análisis de la secuencia del nucleótido también pueden ser utilizadas en la preparación de polipéptidos recombinantes, al confirmar la identidad de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante deseado y una construcción genética que comprende la molécula de ácido nucleico.

En el caso que el polipéptido de la presente invención es un polipéptido recombinante, el mismo puede ser producido en, y si se desea, aislado de un vector viral recombinante o un sistema de expresión de la célula huésped. Como resultará conocido por aquellas personas con experiencia en el arte relevante, una célula para la producción de un polipéptido recombinante se selecciona sobre la base de muchos parámetros que incluyen construcciones genéticas utilizadas para expresar el polipéptido bajo consideración, como también la estabilidad y la actividad de dicho polipéptido. También resultará conocido por aquellas personas con experiencia en el arte, que la estabilidad o la actividad de un polipéptido recombinante puede ser determinado, por lo menos en parte, por modificaciones post-translacionales al polipéptido, como por ejemplo, reacciones de glicosilación, acilación o alquilación, entre otras, que pueden variar entre las líneas celulares utilizadas para producir el polipéptido recombinante.

De acuerdo con esto, en una realización preferida más particularmente, la presente invención se extiende a un polipéptido recombinante o un derivado, homólogo o análogo del mismo que se encuentre presente en una partícula de

virus, o producido en una célula huésped procariótica o eucariótica, o en un virus o un cultivo de célula de ella.

La presente invención también se extiende a un polipéptido recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que anteceden, que es producido en una célula bacteriana perteneciente al gen *Lawsonia*, en particular una célula de *L. intracellularis* o un cultivo del mismo.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la presente invención que ha sido purificado hasta cierto punto, preferiblemente por lo menos hasta aproximadamente un 20% en peso de proteína, preferiblemente por lo menos hasta aproximadamente un 50% en peso de proteína, más preferiblemente por lo menos hasta aproximadamente un 60% en peso de proteína, aún más preferiblemente hasta por lo menos aproximadamente 70% en peso de proteína, y aún más preferiblemente hasta aproximadamente un 80% en peso de proteína o más, a partir de su fuente natural o, en el caso de los polipéptidos que no se forman naturalmente, a partir del medio de cultivo o ambiente celular en el cual fue producido. Dicho aislamiento puede ser realizado para mejorar la inmunogenicidad del polipéptido de la presente invención, o para mejorar la especificidad de la respuesta inmune contra ese polipéptido, o para eliminar contaminantes tóxicos o no deseables del mismo. El grado necesario o requerido de pureza de un polipéptido aislado variará dependiendo del propósito para el cual se destina el polipéptido, y para muchas aplicaciones será suficiente que la preparación del polipéptido no contenga contaminantes que reducirían la inmunogenicidad del polipéptido cuando se administra a un animal huésped, en particular un porcino o ave que es inmunizado contra la PPE o, en forma alternativa, que inhibiría la unión inmuno-específica en un inmunoensayo para el diagnóstico de PPE o un agente causativo del mismo.

La pureza de un polipéptido aislado de la presente invención puede ser

determinada por cualquier medio conocido por aquellos que tienen experiencia en el arte, incluyendo el grado de homogeneidad de una preparación de proteína según la valoración de la electroforesis con SDS/gel de poliacrilamida, electroforesis de dos dimensiones, o análisis de composición de aminoácido o análisis de secuencia.

Preferiblemente, el polipéptido de la presente invención será sustancialmente homogéneo o sustancialmente libre de proteínas específicas, según la valoración de la electroforesis con SDS/gel de poliacrilamida, electroforesis de dos dimensiones, o análisis de composición de aminoácido o análisis de secuencia.

El polipéptido de la presente invención puede ser purificado para usar como componente de una composición de vacuna por medio de uno o una combinación de cualquier método conocido por aquellos que tienen experiencia común en el arte, incluyendo, por ejemplo, la cromatografía de fase inversa, HPLC, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía por afinidad, entre otros.

En una realización preferida, el polipéptido aislado o recombinante de la invención es inmunológicamente reactivo con el polipéptido OmpH *L. intracellularis* que se ejemplifica aquí.

En aún otra realización preferida, el polipéptido recombinante o aislado de la invención deriva de *Lawsonia spp.* y más preferiblemente, el polipéptido a que nos referimos deriva de *Lawsonia intracellularis*.

Un epítipo de célula B o de célula T de un polipéptido o un derivado, homólogo o análogo de ellos puede comprender una combinación de lo siguiente:

- (i) la secuencia de aminoácido primaria de dicha región, conocida en el arte como un epítipo continuo no conformacional;
- (ii) la estructura secundaria que adopta dicha región, conocida en el

arte como un epítoto conformacional continuo;

- (iii) la estructura terciaria que adopta dicha región en contacto con otra región de la misma molécula de polipéptido, conocida en el arte como un epítoto conformacional discontinuo;
- (iv) la estructura cuaternaria que adopta dicha región en contacto con una región de otra molécula de polipéptido, conocida en el arte como epítoto conformacional discontinuo.

De acuerdo con esto, los polipéptidos inmunogénicos o sus derivados, homólogos o análogos que comprenden los mismos, o sustancialmente la misma secuencia primaria de aminoácido se denominan de aquí en adelante como "inmunogenes que comprenden un epítoto de célula B o de célula T", o un término similar.

Los polipéptidos inmunogénicos o derivado, homólogos o análogos de ellos que comprenden diferentes secuencias primarias de aminoácido pueden comprender inmunogenes inmunológicamente idénticos porque poseen epítopes conformacionales de célula B o de célula T que están reconocidos por el sistema inmune de una especie huésped como idénticos. Dichos polipéptidos inmunogénicos o sus derivados, homólogos o análogos, se definen de aquí en adelante como "inmunogenes que imitan o reaccionan con un epítoto de célula B o de célula T", o un término similar.

De acuerdo con esto, la presente invención se extiende a un inmunogen que comprende, imita o reacciona con un epítoto de célula B o de célula T de un polipéptido aislado o recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, o un derivado, homólogo o análogo del mismo. En una realización particularmente preferida, la presente invención suministra un inmunogen que comprende, imita o reacciona con un epítoto de célula B o de célula T de un polipéptido aislado o recombinante que en su forma nativa se obtiene a partir de

una especie de *Lawsonia* como, aunque sin limitarse a, *L. intracellularis* y cuyo polipéptido preferiblemente posee actividad de OmpH.

Preferiblemente, dichos polipéptidos inmunogénicos no comprenderán una secuencia de aminoácido primaria que es altamente conservada entre *L. intracellularis* y otro microorganismo no patogénico que es normalmente residente en el intestino u otro órgano de un animal, en particular de un porcino o un ave. El significado de esta exclusión de las realizaciones de la invención donde la especificidad es esencial para el rendimiento (por ejemplo, aplicaciones en vacunas y diagnóstico) resultará aparente para aquellos que tienen experiencia en el arte.

Para mejorar la inmunogenicidad de un polipéptido sujeto de la presente invención uno o más aminoácidos que no corresponden a la secuencia de la proteína original puede ser incorporado al término amino o carboxilo del polipéptido. Dichos aminoácidos extra son útiles para acoplar el polipéptido a otro péptido o polipéptido, a una proteína portadora grande o a un soporte sólido. Los aminoácidos que son útiles para estos propósitos incluyen aunque no están limitados a, tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y derivados de ellos. Se pueden usar técnicas adicionales de modificación de proteínas como, por ejemplo, acetilación con NH_2 o amidación de terminal COOH , para suministrar medios adicionales para el acoplamiento del polipéptido con otro polipéptido, proteína o molécula péptida, o a un soporte sólido. Los procedimientos para acoplar los polipéptidos entre sí, o a proteínas portadoras o soportes sólidos, son muy conocidos en el arte. Los polipéptidos que contienen los residuos de aminoácido extra antes mencionados en sus términos carboxi o amino y acoplados o no acoplados a su portador o soporte sólido, se encuentran en consecuencia dentro del alcance de la presente invención.

Además, el polipéptido puede ser inmovilizado a un portador polimérico o

material de soporte.

En una realización preferida, la inmunogenicidad de un polipéptido de la presente invención puede ser mejorada usando técnicas de biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene uno o más polipéptidos de la presente invención fusionados con moléculas portadoras como una proteína altamente inmunogénica.

Por ejemplo, una proteína de fusión que contiene un polipéptido de la presente invención fusionada a una sub-unidad B altamente inmunogénica de toxina de cólera puede ser utilizada para aumentar la respuesta inmune al polipéptido. La presente invención también contempla las proteínas de fusión que comprenden una citocina, como una interleucina, fusionada con el polipéptido sujeto de la presente invención y con los genes que lo codifican.

Preferiblemente, el polipéptido de la presente invención, o un derivado, homólogo o análogo del mismo, cuando se administra a un mamífero, induce una respuesta inmune en dicho mamífero. Más preferiblemente, el polipéptido de la presente invención, cuando se administra a un mamífero, en particular un animal porcino (por ejemplo, un cerdo) induce una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia spp.*, y preferiblemente contra *L. intracellularis*, en el mismo. Como se lo utiliza aquí, la frase "inducción de una respuesta inmune protectora" y similares, se refiere a la habilidad del polipéptido administrado de la presente invención para prevenir o notablemente hacer más lenta la aparición, el desarrollo o la progresión de síntomas asociados con la infección de *Lawsonia*, y preferiblemente, para prevenir o notablemente reducir la aparición, desarrollo o progresión de síntomas asociados con la PPE en los cerdos.

Preferiblemente, el polipéptido inmunogénico de la presente invención comprende una secuencia de aminoácido que es sustancialmente la misma que la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o es por lo menos

aproximadamente un 60% idéntico en la totalidad de la SEC ID NO: 1, o es por lo menos aproximadamente un 75% idéntico a por lo menos 8 aminoácidos contiguos de la SEC ID NO: 1. En una realización preferida, el péptido inmunogénico de la presente invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 o en la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica el OmpH presente en pALK13 (ATCC 207196).

Para fines de nomenclatura, la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácido del polipéptido de OmpH codificado por el gen *Lawsonia intracelularis ompH*. La secuencia nucleótida del gen *L. intracelularis ompH* se observa en la SEC ID NO: 2.

Preferiblemente, la identidad porcentual de secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 es por lo menos de aproximadamente un 70%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, y aún más preferiblemente por lo menos 95%.

Al determinar si dos secuencias de aminoácido caerán dentro de estos límites de porcentaje o no, aquellas personas con experiencia en el arte sabrán que es necesario realizar una comparación paralela o una alineación múltiple de secuencias. En dichas comparaciones o alineaciones, surgirán diferencias en el posicionamiento de los residuos no idénticos, dependiendo del algoritmos usados para realizar la alineación. En el contexto de esta invención, la referencia a una identidad o similitud porcentual de secuencia entre dos o más secuencias de aminoácido será tomada con referencia al número de residuos idénticos y similares respectivamente, entre dichas secuencias, según se determina con el uso de cualquier algoritmo estándar conocido por aquellos que tienen experiencia en el arte. Por ejemplo, las identidades o similitudes de la secuencia de

aminoácido pueden calcularse utilizando un programa GAP de Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de Norteamérica (Devereaux et al, 1984). El programa GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) para aumentar el número de residuos idénticos/similares y para reducir el número y/o tamaño de separaciones de secuencia en la alineación. En forma alternativa, o además de esto, donde se comparan más de dos secuencias de aminoácido, se puede utilizar el programa ClustalW de Thompson et al (1994).

En una realización alternativa, la presente invención suministra un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante que comprende, imita o reacciona con el epítipo de célula B o de célula T del polipéptido OmpH que deriva de *Lawsonia spp.* cuando dicho polipéptido inmunogénico aislado o recombinante comprende una secuencia de aminoácido que comprende por lo menos 5 residuos de aminoácido contiguos de la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ellos.

Preferiblemente, el polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la invención comprende por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos derivados de la SEC ID NO: 1, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos derivados de la SEC ID NO: 1, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos derivados de la SEC ID NO: 1, y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos contiguos derivados de la SEC ID NO: 1.

La presente invención además abarca homólogos, análogos y derivados de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1.

"Homólogos" de un polipéptido son aquellos polipéptidos que contienen sustituciones, eliminaciones y/o incorporaciones de aminoácido relativas al

polipéptido sin alterar una o más de sus propiedades, como su inmunogenicidad, actividad biológica o actividad catalítica. En dichas moléculas, los aminoácidos pueden ser reemplazados por otros aminoácidos que tienen propiedades similares como, por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, momento hidrófobo, antigenicidad, inclinación a formar o romper estructuras en hélice α o estructuras de lámina β , y demás.

Las variantes sustitutivas son aquellas en las cuales por lo menos un residuo en la secuencia ha sido eliminado y un residuo diferente fue insertado en su lugar. Las sustituciones de aminoácido son normalmente de residuos simples, pero pueden ser agrupados dependiendo de las restricciones colocadas en el polipéptido; las inserciones usualmente serán en el orden de aproximadamente 1-10 residuos de aminoácido y las eliminaciones variarán desde aproximadamente 1-20 residuos. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido comprenderán sustituciones de aminoácido conservador, como aquellas que se describieron anteriormente.

Las variantes de secuencia de aminoácido de inserción son aquellas en las cuales se introduce uno o más residuos de aminoácido en un sitio predeterminado de la proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones de terminal amino y/o terminal carboxilo como también inserciones intra-secuencia de aminoácidos simples o múltiples. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácido serán menores que las fusiones terminales de amino o carboxilo, en el orden de aproximadamente 1 a 4 residuos.

Las variantes de eliminación están caracterizadas por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia.

Las variantes de aminoácido del polipéptido de la presente invención se pueden realizar fácilmente usando técnicas sintéticas de péptido conocidas en el arte, como una síntesis de péptido en fase sólida y similares, o por medio de

manipulaciones de ADN recombinantes. La manipulación de las secuencias de ADN para producir proteínas variantes que se manifiestan como variantes de sustitución, de inserción o de eliminación son muy conocidas en el arte. Por ejemplo, las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene secuencia conocida son muy conocidas por aquellas personas que tienen experiencia en el arte, como por medio de mutagénesis M13 u otro protocolo de mutagénesis dirigido al sitio.

“Análogos” se definen como péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a los péptidos de la presente invención pero que contienen ciertos residuos de aminoácido modificados o que no ocurren naturalmente como resultará conocido para aquellos con experiencia en el arte. De acuerdo con esto, un “análogo” como se define aquí no necesita comprender una secuencia de aminoácido que es similar a la secuencia de aminoácido que se observa aquí como, por ejemplo, péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que derivan de predicciones de computadora o datos empíricos que revelan la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del polipéptido de la presente invención, y que por lo tanto no comprenden la secuencia primaria de aminoácido de dicho polipéptido, que no obstante imita o reacciona con el epítipo de la célula B o de la célula T de *Lawsonia spp.* y preferiblemente, imita o reacciona con el epítipo de célula B o de célula T de *Lawsonia intracellularis*.

Por ejemplo, los mimotopos (análogos de polipéptido que reaccionan con el epítipo de célula B o de célula T del polipéptido de *Lawsonia* de la invención, pero, sin embargo, comprenden una secuencia de aminoácido diferente de dicho epítipo) pueden ser identificados por medio de la selección aleatorizada de secuencias de aminoácido en las librerías de péptidos con anticuerpos que se unen a un epítipo de célula B o de célula T deseado. Del mismo modo que con las técnicas para la identificación de los epítopos de célula B o célula T, según se

describe anteriormente, los anticuerpos utilizados para identificar dichos mimotopos pueden ser policlonales o monoclonales o anticuerpos recombinantes. en su forma bruta o purificada. Los momotopos de un epítope de célula T puede ser sometido a prueba además para observar su habilidad de estimular las respuestas citotóxicas o proliferativas de célula T *in vitro*. Los mimotopos son particularmente útiles como análogos de epítopes no lineales (es decir, conformacionales) del polipéptido de la presente invención, en un polipéptido, y los mimotopos suministran equivalentes inmunogénicos de ellos en forma de una sola molécula de péptido.

Adicionalmente, el uso de análogos de polipéptido puede dar como resultado polipéptidos con actividad inmunogénica y/o antigénica aumentada, y que son menos sensibles a la degradación enzimática, y que son más selectivos. Un análogo de prolina apropiado es el ácido carboxílico 2-aminociclopentano (β AC^{5c}) que ha demostrado aumentar la actividad inmunogénica de un polipéptido nativo más de 20 veces (Mierke et al., 1990; Portoghese et al, 1990; Goodman et al, 1987).

"Derivados" de un polipéptido que se describe aquí son aquellos péptidos oligopéptidos y polipéptidos que comprenden por lo menos cinco residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1. Un "derivado" puede además comprender residuos de aminoácido que ocurren naturalmente, glicosilados alterados, acilados o que no ocurren naturalmente, comparados con la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1. En forma alternativa o además de esto, un derivado puede comprende uno o más sustituyentes que no es aminoácido como, por ejemplo, una molécula reportera u otro ligando, unida en forma covalente o no covalente con la secuencia de aminoácido, como, por ejemplo, una molécula reportera que está unida a ella para facilitar su detección.

Otros ejemplos de mutantes recombinantes o sintéticos y derivados de los inmunogenes péptidos de la presente invención incluyen aquellos que incorporan sustituciones, eliminaciones y/o adiciones simples o múltiples a ellos, como los carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos. Las formas que ocurren naturalmente o alteradas, glicosiladas o aciladas de los péptidos de la presente se contemplan en particular en la presente invención. Adicionalmente, los homopolímeros o heteropolímeros que comprenden una o más copias del péptido de la presente que aparece en la SEC ID NO: 1, o uno o más derivados, homólogos o análogos de ellos, se encuentran dentro del alcance de la invención.

Preferiblemente, los homólogos, análogos y derivados de los polipéptidos de la invención son "inmunogénicos", definidos de aquí en adelante como la habilidad de dicho polipéptido o un derivado, homólogo o análogo del mismo, de obtener respuestas de célula B o de célula T en el huésped, en respuesta a la inmunización.

Los homólogos, análogos y derivados preferidos de la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 incluye aquellas variantes de aminoácido que funcionan como epítopes de célula B o de célula T de dicha secuencia de aminoácido que son capaces de mediar una respuesta inmune como, por ejemplo, mimotopos del polipéptido inmunogénico que se describe aquí, que han sido producidos por medios sintéticos, como por medio de química Fmoc. El único requerimiento de dichas moléculas es que reaccionan inmunológicamente con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un derivado de ella que comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos en longitud de la SEC ID NO: 1.

Como resultará aparente para aquellos que tienen experiencia en el arte, dichos homólogos, análogos y derivados del polipéptido de las moléculas de la

invención serán útiles para preparar anticuerpos que reaccionan con los anticuerpos contra dicho polipéptido y/u obtienen una respuesta inmune protectora o especificidad similar a la obtenida por dicho polipéptido. Dichas moléculas también serán útiles en el diagnóstico y otras aplicaciones que son inmunológicas en naturaleza como, por ejemplo, los diagnósticos que utilizan uno o más formatos de inmunoensayo (por ejemplo, ELISA, RIA y similares).

De acuerdo con esto, el inmunogen de la presente invención o un derivado, homólogo o análogo del mismo es útil en las composiciones de la vacuna que protegen a un individuo contra la infección de *L. intracellularis* y/o como un antígeno que obtiene producción policlonal o monoclonal de anticuerpos y/o en la detección de anticuerpos contra la *L. intracellularis* en los animales infectados, particularmente en los animales porcinos y aves.

Los inventores de la presente también han demostrado que la región terminal N de la SEC ID NO: 1 y los 15-20 residuos de aminoácido de terminal C de la SEC ID NO: 1 son particularmente únicos, comparados con otras secuencias de aminoácido inmunogénicas, incluyendo aquellas de los polipéptidos OmpH de otros patógenos animales (Figura 3). De acuerdo con esto, los péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que comprenden dichas regiones únicas de epítipo de la SEC ID NO: 1, tendrán una especificidad mejorada en comparación con otras regiones de la molécula *Lawsonia spp. OmpH*. Las ventajas particulares de dichos péptidos serán inmediatamente aparentes para aquellos que tienen experiencia en la producción de composiciones de vacuna, donde la especificidad contra un patógeno de interés es una consideración de importancia.

Los inventores de la presente han demostrado que el polipéptido de *Lawsonia intracellularis* OmpH que se observa en la SEC ID NO: 1 y, en particular, los 15 residuos de aminoácido de terminal C de la SEC ID NO: 1, no

altamente conservado, si se compara con la correspondiente región de los polipéptidos OmpH derivados de *Yersinia spp* y *Haemophilus influenzae*. De acuerdo con esto, el polipéptido OmpH de *L. intracellularis* y/o los 15 residuos de aminoácido con terminal C del mismo, es un péptido antigénico promisorio para la formulación de vacunas específicas y diagnósticos para la detección específica de *Lawsonia spp*, en muestras biológicas.

Un segundo aspecto de la presente invención suministra una composición de vacuna para la profilaxis o el tratamiento de la infección de *L. intracellularis* o similar o de otro microorganismo relacionado en un mamífero o un ave, dicha composición para vacuna comprende:

- (i) un componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente un 60% de la totalidad de la identidad de la secuencia de aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 y/o que comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos derivados de la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado inmunogénico de ellos que es reactivo inmunológicamente con *Lawsonia intracellularis*; y
- (ii) uno o más portadores, diluyentes y/o adjuvantes apropiados para uso veterinario o farmacéutico.

Como se lo utiliza aquí, el término "componente inmunológico" se refiere a un péptido, polipéptido o una proteína codificada por ADN de, o que deriva de, *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado a ellos que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora en un animal, en particular un porcino o un ave, si dicho péptido, polipéptido o proteína es o no una forma recombinante o aislada. De acuerdo con esto, la composición de vacuna claramente abarca esas composiciones de vacuna que comprenden aislados o formas muertos o no

patogénicos de *L. intracellularis* o microorganismos relacionados con ellos que comprenden o expresan dicho péptido, polipéptido o proteína.

Por “respuesta inmune protectora” se entiende que el componente inmunogénico obtiene una respuesta inmune en el animal al cual se administra la composición de la vacuna en el nivel humoral y/o celular que es suficiente para prevenir la infección de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado y/o que es suficiente para reducir en forma notoria uno o más síntomas o condiciones, o para hacer notoriamente más lenta la aparición de uno o más síntomas o condiciones, asociadas con la infección de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado en un huésped animal, comparado con un animal de control infectado. El término “cantidad efectiva” de un componente inmunogénico presente en la composición de la vacuna se refiere a esa cantidad de dicho componente inmunogénico que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora luego de haber administrado una sola dosis completa, o luego de la administración de varias dosis divididas.

Preferiblemente, el componente polipéptido de la presente composición de vacuna comprende una secuencia de aminoácido que es tanto inmunogénica como específica, en virtud de su reactividad inmunológica con el agente que causa la PPE, *Lawsonia intracellularis*. Con referencia a esto, resultará aparente a partir de la descripción que antecede que dichos componentes de polipéptido pueden comprender una secuencia de aminoácido que deriva de la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1, como, por ejemplo, un mimotopo de dicha secuencia.

El polipéptido inmunogénico o el homólogo, análogo o derivado inmunogénico puede ser un péptido, oligopéptido o polipéptido que se forma naturalmente en forma aislada o recombinante de acuerdo con cualquiera de las

realizaciones que se describieron anteriormente o que se ejemplifican aquí. Preferiblemente, el polipéptido inmunogénico o el homólogo, análogo o derivado inmunogénico deriva de *Lawsonia spp*, en particular *L. intracellularis* o un microorganismo que esté relacionado a ella.

Preferiblemente, el componente inmunogénico ha sido sometido a por lo menos un paso de purificación o por lo menos concentración parcial a partir de un cultivo celular que comprende *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado a ella, o a partir de una preparación lisada de células de *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado, o a partir de otro cultivo en el cual el componente inmunogénico es expresado en forma recombinante. La pureza de dicho componente que tiene las propiedades inmunogénicas necesarias es preferiblemente por lo menos aproximadamente un 20% en peso de proteína en una preparación en particular, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 50%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 60%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 70%, y más preferiblemente aún por lo menos aproximadamente un 80% o más.

El componente inmunogénico de la vacuna de la presente invención puede comprender un solo péptido, polipéptido o proteína, o una variedad o combinación de diferentes péptidos, polipéptidos o proteínas que cubren epítopes diferentes o similares. Además, o en forma alternativa, se puede suministrar un solo polipéptido con múltiples epítopes. El último tipo de vacuna se menciona como vacuna polivalente. Un epítope múltiple incluye dos o más epítopes ubicados dentro de una molécula de péptido o polipéptido.

La formulación de vacunas es generalmente conocida en el arte y se puede hacer referencia en forma conveniente a Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing CO., Easton, Pennsylvania, Estados Unidos de

Norteamérica.

Una forma particularmente útil de vacuna es una vacuna recombinante producida, por ejemplo, en un vector de vacuna, como, aunque sin estar limitados a, todos los transfectados con un vector de virus de vacunas o una célula bacteriana capaz de expresar el componente inmunogénico.

La presente invención claramente se extiende a las composiciones de vacuna recombinantes en las cuales el componente inmunogénico por lo menos está contenido dentro de los vectores de vacuna muertos preparados, por ejemplo, por calor, formalina, u otro tratamiento químico, shock eléctrico o fuerzas de presión elevada o baja. De acuerdo con esta realización, el componente inmunogénico de la vacuna está generalmente sintetizado en un vector de vacuna vivo que se mata antes de la administración a un mamífero.

Además, el vector de vacuna que expresa el componente inmunogénico puede ser no patogénico o atenuado. Dentro del alcance de esta realización se encuentran las células que han sido transfectadas con virus no patogénicos o atenuados que codifican el componente inmunogénico de la vacuna y las células no patogénicas o atenuadas que expresan en forma directa el componente inmunogénico.

Las células huésped no patogénicas o atenuadas incluyen esas células que no son perjudiciales para un animal al cual se administra la vacuna de la invención. Como resultará conocido por aquellos que tienen experiencia en el arte, "vacunas vivas" puede comprender un vector de virus atenuado que codifica el componente inmunogénico o una célula huésped que lo comprende, que es capaz de replicar en un animal al cual se administra y usar la maquinaria de la célula huésped para expresar el componente inmunogénico, aunque sin producir ningún efecto colateral en ella. Dichos vectores de vacuna pueden colonizar el intestino o el órgano del animal vacunado. Dichos vectores de vacuna viva son

eficaces en virtud de su habilidad de expresar en forma continua el componente inmunogénico en el animal huésped durante un tiempo y a un nivel suficiente para conferir inmunidad protectora contra un patógeno que expresa un equivalente inmunogénico de dicho componente inmunogénico. La presente invención claramente abarca el uso de dichos vectores atenuados o no patogénicos y las preparaciones de vacuna viva.

El vector de vacuna puede ser un virus, célula bacteriana o una célula eucariótica como una célula de ave, porcino u otro mamífero o una célula de levadura o una línea celular como COS, VERO, HeLa, ratón C127, ovario de hámster chino (CHO), WI-38, riñón de hámster bebé (BHK) o líneas celulares de MDCK. Las células procarióticas apropiadas incluyen *Mycobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* entre otras. Las cepas bacterianas que son apropiadas para usar en el propósito de la presente son muy conocidas en el arte relevante (Ausubel et al, 1987; Sambrook et al, 1989).

Dichas células y líneas de célula son capaces de expresión de una secuencia genética que codifica un péptido, polipéptido o proteína OmpH, de la presente invención a partir de *L. intracellularis* de un modo que es efectivo para inducir una respuesta inmune protectora en el animal. Por ejemplo, podría ser preparada una bacteria no patogénica que contiene una secuencia recombinante capaz de codificar un péptido, polipéptido o proteína a partir de *L. intracellularis*. La secuencia recombinante estaría en la forma de un vector de expresión bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Luego se permitiría que las bacterias colonicen las ubicaciones apropiadas en el intestino de un cerdo y que crezcan y produzcan el péptido, polipéptido o proteína recombinante en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune protectora contra *L. intracellularis*.

En aún otra realización preferida, la vacuna puede ser una vacuna de ADN o ARN que comprende una molécula de ADN o ARN que codifica un péptido, polipéptido o proteína de la presente invención que se inyecta en el tejido muscular u otro tejido apropiado en un cerdo bajo condiciones suficientes que permitan la expresión transitoria de dicho ADN o ARN para producir una cantidad de péptido, polipéptido o proteína efectiva para inducir una respuesta inmune protectora. En una realización preferida, la vacuna de ADN está en la forma de un plásmido, en el cual el ADN está conectado en forma operable con una región promotora capaz de expresar la secuencia de nucleótido que codifica el inmunogen en las células del animal inmunizado.

En la producción de una vacuna recombinante, excepto la vacuna de ADN que se describe aquí, es necesario, por lo tanto expresar el componente inmunogénico en un sistema de vector apropiado. Para el propósito de la presente, el componente inmunogénico puede ser expresado por:

- (i) la ubicación de una molécula aislada de ácido nucleico en un formato expresable, dicha molécula de ácido nucleico comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o un homólogo, análogo o derivado que codifica la proteína de la SEC ID NO: 2 seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) secuencias de nucleótido que tienen por lo menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2;
 - (b) secuencias de nucleótido que hibridan bajo por lo menos hibridación de baja rigurosidad, preferiblemente por lo menos condiciones de rigurosidad moderada, y aún más preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad elevada, al

complemento de la SEC ID NO: 2; y

- (c) secuencias de nucleótido que codifican la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ellos, incluyendo, por ejemplo, un mimotopo del aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1;
- (ii) la introducción de la molécula de ácido nucleico aislada de (i) en un formato que puede expresarse en un vector de vacuna apropiado; y
- (iii) la incubación o crecimiento del vector de vacuna durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la expresión del componente inmunogénico codificado para que ocurra dicha molécula de ácido nucleico.

Para los propósitos de definir el nivel de rigurosidad, una rigurosidad baja se define aquí como una hibridación y/o lavado realizado en una solución tampón de 6xSSC, 0,1% (p/v) SDS a 28°C. Una rigurosidad moderada se define aquí como una hibridación y/o lavado realizado en una solución tampón de 2xSSC, 0,1% (p/v) SDS una temperatura en el orden de 45° C a 65°C. Una rigurosidad elevada se define aquí como una hibridación y/o lavado realizado en una solución tampón de 0,1xSSC, 0,1% (p/v) SDS a una temperatura de por lo menos 65°C.

Generalmente, la rigurosidad aumenta por medio de la reducción de la concentración del tampón de SSC, y/o el aumento de la concentración de SDS y/o aumento de la temperatura de la hibridación y/o el lavado. Aquellas personas con experiencia en el arte sabrán que las condiciones para la hibridación y/o el lavado pueden variar dependiendo de la naturaleza de la membrana de hibridación o el tipo de sonda de hibridación que se utilice. Las condiciones para las hibridaciones y lavados son conocidas para una persona que tenga experiencia normal en el arte. Para los propósitos de clarificación de los parámetros que afectan a la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico, se puede obtener

referencia en las páginas 2.10.8 hasta 2.10.16 de Ausubel et al (1987), que se incorpora aquí a modo de referencia.

Como se utiliza aquí, una "molécula de ácido nucleico en un formato expresable" es una región que codifica una proteína de una molécula de ácido nucleico en conexión operable con un promotor u otra secuencia reguladora capaz de regular la expresión en el sistema del vector de vacuna.

Aquí se hace referencia a "promotor" en su contexto más amplio e incluye las secuencias de transcripción reguladora de un gen genómico clásico, incluyendo la caja TATA que es necesaria para una iniciación precisa de transcripción, con o sin la secuencia de la caja CCAAT y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias que se activan hacia arriba, mejoradores y silenciadores) que alteran la expresión de los genes en respuesta a los estímulos de desarrollo y/o externos, o en un modo específico del tejido. En el presente contexto, el término "promotor" también se utiliza para describir una molécula recombinante, sintética o de fusión, o un derivado que confiere, activa o permite la expresión de una molécula de ácido nucleico a la cual está operablemente conectada, y que codifica el polipéptido inmunogénico. Los promotores preferidos pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores para mejorar aún más la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de dicha molécula de ácido nucleico.

La colocación de una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de, es decir, "en conexión operable con" una secuencia promotora significa la ubicación de dicha molécula de modo tal que la expresión está controlada por la secuencia promotora. Los promotores están genéricamente, aunque no necesariamente, ubicados 5' (hacia arriba) de los genes que controlan. En la construcción de combinaciones heterólogas de gen promotor/estructural se prefiere en general ubicar el promotor a una distancia del sitio de comienzo de la

transcripción genética que es aproximadamente la misma que la distancia entre el promotor y el gen que controla en su marco natural, es decir, el gen del cual deriva el promotor. Además, los elementos reguladores que comprenden un promotor están ubicados normalmente dentro de 2kb del sitio de comienzo de la transcripción del gen. Como se sabe en el arte, se puede realizar alguna variación sin perder la función del promotor. De un modo similar, la ubicación preferida de un elemento de secuencia reguladora con respecto al gen heterólogo que se debe ubicar bajo su control, está definida por la ubicación del elemento en su marco natural, es decir, los genes de los cuales derivan. Nuevamente, como se conoce en el arte, también puede ocurrir alguna variación en esta distancia.

El requisito previo para producir polipéptidos intactos en bacterias como *E. coli* es el uso de un promotor resistente con un sitio de unión al ribosoma efectivo. Los promotores típicos apropiados para la expresión en las células bacterianas como *E. coli* incluyen, aunque no están limitados a, el promotor *lacZ*, promotores λ_L o λ_R sensibles a la temperatura, promotor T7 o el promotor *tac* inducible por IPTG. Un número de sistemas de vector para expresar la molécula de ácido nucleico de la invención en *E. coli* son conocidos en el arte y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al (1987) o Sambrook et al (1989). Se han descrito numerosos plásmidos con secuencias apropiadas de promotor para la expresión en la bacteria y sitios eficientes de unión al ribosoma, como por ejemplo, pKC30 (λ_L : Shimatake y Rosenbert, 1981), pKK173-3 (*tac*: Amann y Brosius, 1985), pET-3 (T7: Studier y Moffat, 1986), la serie pFLEX de vectores de expresión (Pfizer Inc., CT, Estados Unidos de Norteamérica) o la serie pQE de vectores de expresión (Qiagen, CA) entre otros. Los promotores apropiados típicos para la expresión de los virus de las células eucarióticas y las células eucarióticas incluyen el último promotor SV40, el primero promotor SV40 y el promotor de

citomegalovirus (CMV), promotor CMV IE (citomegalovirus inmediato temprano), entre otros.

Los medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislado o una construcción genética que la comprende en una célula para la expresión del componente inmunogénico de la composición de la vacuna son muy conocidos por aquellos que tienen experiencia en el arte. La técnica utilizada para un organismo determinado depende de las técnicas conocidas que han tenido éxito. Los medios para introducir el ADN recombinante en las células animales incluyen microinyección, transfección mediada por dextran DEAE, transfección mediada por liposomas como por medio del uso de lipofectamina (Gibco, MD, Estados Unidos de Norteamérica) y/o celfectina (Gibco, MD, Estados Unidos de Norteamérica), toma de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo con micropartículas como por medio del uso de tungsteno recubierto con ADN o partículas doradas (Agregetus, Inc., WI; Estados Unidos de Norteamérica), entre otros.

El componente inmunogénico de una composición de vacuna como se contempla aquí muestra una excelente actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento y/o profilaxis de PPE cuando se administra en una cantidad que depende del caso en particular. Por ejemplo, para las moléculas de péptido recombinante, se puede administrar desde aproximadamente 0,5 μg hasta aproximadamente 20 mg, preferiblemente desde aproximadamente 1 μg hasta aproximadamente 10 mg, más preferiblemente desde aproximadamente 10 μg hasta aproximadamente 5 mg, y más preferiblemente desde aproximadamente 50 μg hasta aproximadamente 1 mg, equivalentes al componente inmunológico en un volumen de aproximadamente 1 ml hasta aproximadamente 5 ml. Para las vacunas de ADN, una cantidad preferida es desde aproximadamente 1 μg hasta aproximadamente 10 mg en un volumen de aproximadamente 1 hasta 5 ml. El

ADN puede estar presente en forma "desnuda" o puede ser administrado junto con un agente que facilita la toma celular (por ejemplo, en liposomas o lípidos catiónicos). La característica importante es administrar cantidad suficiente de inmunogen para inducir una respuesta inmune protectora. Las cantidades anteriores pueden ser administradas como se mencionó o pueden ser calculadas por kilogramo de peso corporal. El régimen de la dosis puede ser ajustado para suministrar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas o la dosis puede ser reducida en forma proporcional como lo indican las exigencias de la situación terapéutica. La administración de un refuerzo también puede ser necesaria.

La vacuna de la presente invención también puede comprender uno o más componentes inmunomoduladores adicionales como, por ejemplo, una molécula adyuvante o citocina, entre otras, que es capaz de aumentar la respuesta inmunológica contra el componente inmunogénico. Ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden utilizarse en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi, Inc., Hamilton, MT, Estados Unidos de Norteamérica), alumbre, geles minerales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, como, por ejemplo, copolímero Block (CytRx, Atlanta, GA, Estados Unidos de Norteamérica) QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge, MA, Estados Unidos de Norteamérica) SAF-M (Chiron, Emeryville, CA, Estados Unidos de Norteamérica), adyuvante AMPHIGEN®, adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; y Saponin, QuilA y otra fracción de saponin, lípido monofosforilo A, y adyuvante Avridine lípido-amina. Otros agentes inmunomoduladores que pueden incluirse en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más citocinas, como interferon e interleucina, u otras citocinas conocidas. Los agentes tensoactivos no iónicos, como, por ejemplo, oleiléter de polioxietileno y éter de n-hexadecil polietileno

también pueden ser incluidos en las vacunas de la presente invención.

La composición de la vacuna puede ser administrada en un modo conveniente, como por vía oral, intravenosa (donde es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradermal, o supositoria, o por medio de implante (por ejemplo, usando tecnología de liberación lenta). Dependiendo de la vía de administración, puede ser necesario recubrir el componente inmunogénico en un material para protegerlo de la acción de las enzimas, los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivarlo, como aquellas que se encuentran en el tracto digestivo.

La composición de la vacuna también puede ser administrada en forma parenteral o intraperitoneana. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de ellos, o en aceites. Bajo condiciones comunes de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. En forma alternativa, la composición de la vacuna puede ser almacenada en forma liofilizada para ser rehidratada con un vehículo o portador apropiado antes del uso.

Las formas farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación espontánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. En todos los casos la forma debe ser fluida a tal punto que exista una colocación fácil en la jeringa, salvo que la forma farmacéutica sea un sólido o un semi-sólido como cuando se utiliza la tecnología de liberación lenta. En cualquier caso, debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser conservada contra la acción contaminadora de los microorganismos.

El portador puede ser un medio solvente o de dispersión que contiene, por

ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), mezclas apropiadas de ellos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento, como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de la dispersión y por medio del uso de agentes tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser lograda por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos como, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse por medio del uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción como, por ejemplo, monoestearato de alúmina y gelatina.

Las soluciones estériles inyectables se preparan por medio de la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes que se mencionaron anteriormente, según sea necesario, seguido de la esterilización por filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan por medio de la incorporación del ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios seleccionados de los que se mencionaron anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de secado por congelamiento que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución de ellos previamente estéril-filtrada. La presente invención se extiende a composiciones de vacuna que confieren protección contra la infección por medio de uno o más aislados o sub-tipos de *L. intracellularis* incluyendo aquellos que

pertenecen al mismo sueroar o suerogrupo como la *Lawsonia intracellularis*. La composición de la vacuna preferiblemente también confiere protección contra la infección por otras especies de genes de *Lawsonia* u otros microorganismos relacionados con ella; como se determina en el nivel de nucleótido, bioquímico, estructural, fisiológico y/o inmunointeractivo; el único requerimiento es que dichas otras especies u otro microorganismo exprese un polipéptido que es reactivo inmunológicamente al polipéptido de la invención que se describe aquí. Por ejemplo, dichos microorganismos relacionados pueden comprender ADN genómico que es por lo menos en un 70% idéntico en general al ADN genómico de *Lawsonia intracellularis* según lo determina el uso de las técnicas estándar de análisis e hibridación de ADN genómico.

Los términos “suerogrupo” y “suerovar” se refieren a la clasificación de los microorganismos que se basa en datos de tipo serológico, en particular datos obtenidos utilizando ensayos de aglutinamiento como la prueba de aglutinamiento microscópico (MAT). Aquellos que tienen experiencia en el arte sabrán que los antígenos de sueroar y suerogrupo son un mosaico sobre la superficie de la célula, y como consecuencia no habrá un delineado estricto entre las bacterias que pertenecen a un sueroar y/o suerogrupo. Más aún, los organismos que pertenecen a especies diferentes pueden ser clasificados en el mismo sueroar o suerogrupo porque no se pueden distinguir por determinación antigénica. Como se lo utiliza aquí, el término “suerovar” significa una o más cepas de *Lawsonia* que son antigénicamente idénticas con respecto a los determinantes antigénicos producidos por uno o más lugares. Cuantitativamente, los suerovars pueden ser diferenciados entre sí por medio de técnicas de absorción por aglutinación. Como se utiliza aquí, el término “suerogrupo” se refiere a un grupo de *Lawsonia spp* cuyos miembros se aglutinan con antígenos del grupo compartido y no se aglutinan con los miembros de otros grupos, y como consecuencia, los miembros

de un suerogrupo tienen más o menos relaciones cercanas antigénicas entre sí por aglutinación simple.

La presente invención se extiende claramente a las composiciones de vacuna para el tratamiento y/o profilaxis de animales, en particular, a composiciones de vacuna para el tratamiento y/o profilaxis de porcinos y/o especies de aves, contra cualquier bacteria que pertenezca al mismo suerovar o suerogrupo que la *Lawsonia intracellularis*. Preferiblemente, dichos organismos expresarán un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácido de por lo menos aproximadamente 60% en general con respecto a la SEC ID NO: 1.

La presente invención se extiende además a las composiciones de vacuna capaces de conferir protección contra una "variante genética" de *Lawsonia intracellularis*, el único requerimiento es que dicha variante expresa un polipéptido que tiene una identidad general de secuencia de aminoácido de por lo menos aproximadamente 60% con respecto a la SEC ID NO: 1 y/o comprende por lo menos aproximadamente 5 residuos de aminoácido contiguos derivados de la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ellos que es inmunológicamente reactivo al mismo. Las variantes genéticas de *L. intracellularis* pueden ser desarrolladas por mutación, recombinación, conjugación o transformación de *L. intracellularis* o pueden formarse naturalmente. Una persona con experiencia en el arte sabrá como producir dichos derivados.

En una realización particularmente preferida, la composición de la vacuna de la invención está destinada o es apropiada para profilaxis y/o tratamiento de infección en un animal porcino o un ave y más preferiblemente, para profilaxis o tratamiento de un animal porcino contra la infección de *L. intracellularis*.

De acuerdo con esto, la presente invención se extiende claramente al uso del polipéptido inmunogénico de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones preferidas o como se ejemplifica aquí en la preparación de un

medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de PPE en animales, en particular porcinos y aves.

La invención además se extiende a un método para el tratamiento y/o profilaxis de PPE en un animal como un ave o un porcino, dicho método comprende la administración de la composición de la vacuna o el polipéptido inmunogénico de la invención como se describe o se ejemplifica aquí a dicho animal durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que ocurra una respuesta inmune. Preferiblemente, en el caso de la administración de una composición de vacuna, la respuesta inmune al inmunogen es una respuesta inmune protectora.

Aquellos que tienen experiencia en el arte reconocerán la aplicabilidad general de la invención en la vacunación de animales que no son porcinos y aves contra la *L. intracellularis* y/o microorganismos relacionados. En la aplicación general de la vacuna de la presente invención, el único requisito previo es que el animal al cual se confiere la protección es capaz de ser infectado con *Lawsonia intracellularis* y/o un microorganismo relacionado con ella y que, en el caso de un microorganismo relacionado con la *L. intracellularis*, dicho microorganismo relacionado expresa un epítipo de célula B o célula T que imita o reacciona con el componente polipéptido de la composición de la vacuna que se describe aquí. Los animales que pueden ser protegidos por la vacuna de la presente invención incluyen, aunque no están limitados a, humanos, monos, animales domésticos (por ejemplo, gatos, perros), ganado (por ejemplo, cerdos, ovejas, caballos, burros, cabras), animales de prueba de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejillos de indias, conejos) y animales salvajes en cautiverio (por ejemplo, canguros, zorros, ciervos). La presente invención también se extiende a la vacunación de pájaros como las aves de corral, aves de caza y pájaros enjaulados.

La presente invención también se extiende a las vacunas de combinación que comprenden una cantidad efectiva de un primero componente inmunogénico que comprende el polipéptido de la presente invención combinado con una cantidad efectiva de un segundo componente inmunogénico que comprende uno o más antígenos distintos capaces de proteger un animal porcino, o un ave, contra la *Lawsonia spp* u otro patógeno que infecta y causa la enfermedad en dicho animal. En una realización preferida, el segundo componente inmunogénico es seleccionado del grupo que consiste en la autolisina *L. intracellularis*, hemolisina, FlgE, y polipéptidos SodC y homólogos, análogos o derivados de ellos, en particular variantes inmunogénicas o derivados de ellas, y moléculas de ácido nucleico que las codifican.

El polipéptido OmpH aislado o recombinante de la invención o un homólogo, análogo o derivado del mismo equivalente a nivel inmunológico también es útil para la preparación de moléculas inmunológicamente interactivas que son útiles en el diagnóstico de la infección de un animal por *Lawsonia spp.*, en particular por *L. intracellularis* o un organismo relacionado de ella.

Según se lo utiliza aquí, el término "molécula interactiva a nivel inmunológico" incluye anticuerpos y derivados de anticuerpo y equivalentes funcionales, como un Fab, o un SCAB (anticuerpo de cadena simple), cualquiera de los cuales puede ser opcionalmente conjugado en una enzima, rótulo radiactivo o fluorescente, entre otros. El único requerimiento de dichas moléculas reactivas a nivel inmunológico es que sean capaces de unirse específicamente al polipéptido inmunogénico de la presente invención como se describió anteriormente en la invención.

De acuerdo con lo expuesto, un aspecto adicional de la presente invención se extiende a una molécula reactiva a nivel inmunológico que sea capaz de unirse a uno o más de los siguientes:

- (i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos aproximadamente un 60% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se establece en la SEC ID NO: 1;
- (ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1; o
- (iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii), que imita un epítope de célula B o célula T de ellos.

En una realización preferida, la molécula interactiva a nivel inmunológico es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en el aminoácido de la SEC ID NO: 1.

Se pueden utilizar métodos convencionales para preparar las moléculas interactivas a nivel inmunológico. Por ejemplo, por medio del uso de un polipéptido de la presente invención, los anticuerpos de antisuero policlonal o monoclonal pueden ser realizados utilizando métodos estándar. Por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un ratón, un hámster o un conejo) puede ser inmunizado con una forma inmunogénica del polipéptido de la presente invención que obtiene una respuesta del anticuerpo en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en un polipéptido incluyen la conjugación a portadores, u otras técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, el polipéptido puede ser administrado en presencia de un adyuvante o puede ser acoplado a una molécula portadora, como se conoce en el arte, que permite la inmunogenicidad del polipéptido. El progreso de la inmunización puede ser monitoreado por medio de la detección de concentraciones de anticuerpo en el plasma o suero. La prueba estándar ELISA u otro inmunoensayo puede ser utilizado con el inmunogen como antígeno para valorar los niveles de anticuerpos. Luego de la inmunización, se puede obtener el

antisuero y, por ejemplo, las moléculas de IgG correspondientes a los anticuerpos policlonales pueden ser aisladas del antisuero.

Para producir anticuerpos monoclonales, las células que producen el anticuerpo (linfocitos) pueden ser obtenidas de un animal inmunizado con un péptido de la presente invención y fusionadas con células de mieloma por medio de procedimientos estándar de fusión somática de células, inmortalizando de este modo esas células y produciendo células de hibridoma. Dichas técnicas son conocidas en el arte, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstin (1975), como también otras técnicas como la técnica de hibridoma de la célula B humana (Kozbor et al. 1983), la técnica de EBV hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985), y la búsqueda de librerías de anticuerpo combinatorias (Huse et al., 1989). Las células de hibridoma pueden ser aisladas y seleccionadas inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos que son reactivos específicamente con el polipéptido y los anticuerpos monoclonales aislados de ellos.

Como con todas las composiciones inmunogénicas para obtener anticuerpos, las cantidades efectivas a nivel inmunogénico de los péptidos de la invención deben ser determinadas en forma empírica. Los factores que deben considerarse incluyen la inmunogenicidad del péptido nativo, si el péptido formará un complejo con o será unido en forma covalente a un adyuvante o proteína portadora u otro portador, o no, la vía de administración para la composición, es decir, intravenosa, intramuscular, subcutánea, etc., y el número de dosis de inmunización que serán administradas. Dichos factores son conocidos en el arte de la vacuna y se encuentra dentro de la habilidad de los inmunólogos la realización de dichas determinaciones sin una experimentación indebida.

El término "anticuerpo", como se lo utiliza aquí, intenta incluir fragmentos

de ellos que son también específicamente reactivos con un péptido que imita o reacciona con un epítipo de célula B o célula T del polipéptido OmpH *Lawsonia intracellularis* que se observa en la SEC ID NO: 1. Los anticuerpos pueden ser fragmentados usando técnicas convencionales y los fragmentos pueden ser seleccionados para la utilidad del mismo modo que se describió anteriormente para todos los anticuerpos. Por ejemplo, los fragmentos de $F(ab')_2$ pueden ser generados por medio del tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento de $F(ab')_2$ resultante puede ser tratado para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos de Fab'.

Se encuentra dentro del alcance de esta invención incluir cualquier anticuerpo secundario (monoclonar, policlonal o fragmentos de anticuerpo), incluyendo anticuerpos anti-idiotípicos, dirigidos a los primeros anticuerpos de los que se mencionaron anteriormente. Se pueden usar tanto los primeros como los segundos anticuerpos en los ensayos de detección o un primer anticuerpo puede ser utilizado con un anticuerpo de anti-inmunoglobulina comercialmente disponible. Un anticuerpo según se lo contempla aquí incluye cualquier anticuerpo específico para cualquier región de un péptido que imita o reacciona con un epítipo de célula B o célula T del polipéptido OmpH de *Lewsonia intracellularis* que se observa en la SEC ID NO: 1 como se mencionó anteriormente.

Los anticuerpos que se describen aquí son útiles para la determinación de epítopes de célula B o célula T de la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 como, por ejemplo, por medio de la prueba de la habilidad de los péptidos sintéticos para reaccionar en forma inmunológica con dicha secuencia de aminoácido o para obtener la producción de anticuerpos que reaccionan con dicha secuencia de aminoácido. Al usar los métodos que se describen aquí, los anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales

quiméricos también pueden resultar en péptidos que imitan o reaccionan con un epítipo de célula B o célula T del polipéptido OmpH de *Lawsonia intracellularis* que se observa en la SEC ID NO: 1.

Más particularmente, los anticuerpos policlonales, monoclonales o monoclonales quiméricos pueden ser utilizados para detectar los péptidos de la invención y/o cualquiera de sus homólogos, análogos o derivados de ellos, en varios materiales biológicos. Por ejemplo, pueden ser utilizados en una prueba de ELISA, un inmunoensayo o prueba histoquímica. En otras palabras, los anticuerpos pueden ser utilizados para probar la unión a un polipéptido de la invención o a un homólogo, análogo o derivado de ellos, en una muestra biológica para diagnosticar la presencia de *Lawsonia intracellularis*.

De acuerdo con esto, otro aspecto adicional de la presente invención suministra un método para diagnosticar la infección de un animal con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con ella, dicho método comprende los pasos de contactar una muestra biológica derivada de dicho animal con una molécula inmunológicamente interactiva que es capaz de unirse a un péptido oligopéptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ella, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forme un complejo antígeno:anticuerpo, y luego detectar dicha formación del complejo. De acuerdo con esta configuración de la presente invención, la molécula inmunológicamente interactiva es preferiblemente una molécula de anticuerpo preparada contra el polipéptido OmpH de *Lawsonia intracellularis* que se observa en la SEC ID NO: 1 o un análogo o derivado del mismo.

La muestra biológica es una que podría contener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ella, en particular una muestra biológica derivada de un

huésped porcino o un ave del patógeno de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con ella, y puede incluir cualquier muestra de tejido o fluido apropiada del animal. Las muestras biológicas preferidas derivan del íleo, ciego, intestino delgado, intestino grueso, nodos del linfo o del suero del huésped porcino o ave que se somete a prueba. En forma alternativa o además de la muestra la prueba biológica puede comprender heces o una muestra rectal del animal.

Para distinguir *L. intracellularis* de otros microorganismos residentes en el intestino u otro órgano del animal, los anticuerpos no deben ser preparados contra los epítopes altamente conservados de OmpH como aquellas regiones de por lo menos 5 aminoácidos de longitud que son conservadas entre *L. intracellularis* y un microorganismo que está presente en el intestino u otro órgano de un animal con respecto al cual se busca un diagnóstico, por ejemplo, *E. coli*.

Los inmunoensayos convencionales pueden ser utilizados para llevar a cabo esta realización de la invención. Una amplia gama de técnicas de inmunoensayo están disponibles y pueden ser observadas como referencia en las Patentes de los Estados Unidos 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estas, por supuesto, incluyen tanto ensayos de un solo sitio como de dos sitios o ensayos "intercalados" de tipos no competitivos, como también los ensayos de unión competitivos. Estos ensayos también incluyen la ligación directa de un anticuerpo rotulado a un objetivo. Resultará aparente para aquellos técnicos con experiencia cómo modificar u optimizar dichos ensayos para llevar a cabo esta realización de la presente invención, y todas las modificaciones y optimizaciones se incluyen en la presente invención.

En una realización alternativa, la presente invención contempla un método de identificar si un animal ha sufrido una infección pasada o no, o si actualmente está infectado con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con

ella, dicho método comprende el contacto de la sangre o suero derivados de dicho animal con el polipéptido inmunogénico de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forme un complejo antígeno:anticuerpo, y la detección de dicha formación del complejo. Esta realización difiere de la realización que se describió anteriormente en el sentido que se basa en la detección de los anticuerpos circulantes contra *Lawsonia intracellularis* o un organismo relacionado en la sangre o suero de los animales que están presentes como consecuencia de una infección pasada o actual provocada por este patógeno. Sin embargo, resultará aparente para aquellos que tienen experiencia en el arte que el principio del formato del ensayo es el mismo. Como con otras realizaciones de la invención que se mencionaron anteriormente, se pueden utilizar los inmunoensayos convencionales. Las personas que tienen experiencia en el arte serán capaces con facilidad de variar formatos conocidos de inmunoensayos para llevar a cabo la presente realización. Esta realización de la invención también puede utilizar derivados de sangre y suero que comprenden moléculas inmunológicamente interactivas como, por ejemplo, fracciones de IgG o IgM parcialmente purificadas y muestras de centrifugación de la sangre, entre otras. La preparación de dichas fracciones también será conocida para aquellos que tienen experiencia en el arte.

Un aspecto adicional de la presente invención suministra una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o es complementaria con una molécula de ácido nucleico que codifica, un péptido, oligopéptido o polipéptido seleccionado de lo siguiente:

- (i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos aproximadamente un 60% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se establece en la SEC ID NO: 1;

- (ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1; o
- (iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii), que imita un epítipo de célula B o célula T de *Lawsonia spp.*

En una realización preferida, la presente invención suministra una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o es complementaria con una molécula de ácido nucleico, un inmunogen polipéptido que comprende, imita o reacciona con un epítipo de célula B o de célula T del polipéptido OmpH de *Lawsonia intracellularis* que se observa en la SEC ID NO: 1.

En una realización particularmente preferida, la presente invención suministra una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido OmpH de *L. intracellularis* que tiene una secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1.

Se abarcan dentro del alcance de la invención las formas poliméricas del polipéptido inmunogénico que se describe aquí, como agregados de la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ellas o, alternativamente, polipéptidos que comprenden repeticiones de la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de ellos. La presente invención se extiende además a las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas formas poliméricas.

En forma alterantiva o además de esto, la molécula aislada de ácido nucleico de la invención además comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente 60% de la identidad general de la secuencia con la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o con un

nucleótido complementario de ella. Más preferiblemente, la identidad porcentual de la secuencia con la SEC ID NO: 2 o con una secuencia de nucleótido complementaria a ella es de por lo menos aproximadamente un 80%. Aún más preferiblemente, la identidad porcentual de la secuencia es de por lo menos un 90%. Aún más preferiblemente, la identidad porcentual de la secuencia es de por lo menos aproximadamente un 95%.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2, o la secuencia de nucleótido que codifica el OmpH presente en pALK13 (ATCC 207196), o una variante degenerada de ella, y complementos de ellos.

En la determinación de si dos secuencias de nucleótido caen dentro de estos límites porcentuales o no, aquellos que tienen experiencia en el arte sabrán que es necesario realizar un cotejo o múltiples alineaciones de secuencia. En dichas comparaciones o alineaciones, surgirán diferencias en el posicionamiento de los residuos no idénticos, dependiendo del algoritmos usados para realizar la alineación. En el contexto de esta invención, la referencia a una identidad o similitud porcentual de secuencia entre dos o más secuencias de aminoácido será tomada con referencia al número de residuos idénticos y similares respectivamente, entre dichas secuencias, según se determina con el uso de cualquier algoritmo estándar conocido por aquellos que tienen experiencia en el arte. Por ejemplo, las secuencias de nucleótido pueden ser alineadas y su identidad puede calcularse utilizando un programa BESTFIT u otro programa apropiado de Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de Norteamérica (Devereaux et al, 1984).

En forma alternativa o además de esto, la molécula aislada de ácido nucleico de la invención es capaz, además, de hibridarse por lo menos con condiciones de baja rigurosidad a la secuencia del nucleótido que se observa en

la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella o un fragmento de ácido nucleótido que comprende por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos en longitud derivados de la secuencia que se observa en la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella.

Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse bajo por lo menos condiciones de rigurosidad moderada, y aún preferiblemente bajo condiciones de rigurosidad elevada.

La presente invención claramente abarca las construcciones genéticas que comprenden la molécula de ácido nucleico en un formato expresable apropiado para la preparación de un polipéptido inmunogénico recombinante de la presente invención, como para usar en vacunas recombinantes polivalentes o recombinantes univalentes.

En dichos casos, la molécula de ácido nucleico estará operablemente conectada a una secuencia promotora, que puede regular la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en una célula procariótica o eucariótica como se describió anteriormente.

La construcción genética comprende además en forma opcional una secuencia de terminación. El término "de terminación" se refiere a una secuencia de ADN en el extremo de la unidad de transcripción que señala la terminación de la transcripción. Una "terminación" es una secuencia nucleótida, generalmente ubicada dentro de la región 3' no trasladada de un gen o mRNA, que comprende una señal de poliadenilación para facilitar la incorporación posterior a la transcripción de una secuencia de poliadenilato al extremo 3' de una transcripción primaria de mRNA. Las secuencias de terminación pueden ser aisladas de las secuencias genéticas de bacteria, hongo, virus, animales y/o plantas. Los activos de terminación en las células animales son conocidas como se las describe en la literatura.

En una realización preferida, la construcción genética puede ser una clonación o un vector de expresión, como se lo conoce en el arte, como un plásmido, cosmido o fago, que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención, y células huésped transformadas o transfectadas con ellos. En una realización no limitante, el vector es un plásmido pALK13 (ATCC Acceso No. 207196).

Las construcciones genéticas de la presente invención son particularmente útiles para producir el componente proteínico inmunogénico de la composición de vacuna que se describe aquí para su uso en una vacuna de ADN.

Se puede emplear una variedad de ensayos de diagnóstico genético para detectar la infección de un animal con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado usando la molécula de ácido nucleico que se describió aquí, como por ejemplo, ensayos basados en la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) y la hibridación de ácido nucleico. Todos estos ensayos están contemplados en la presente invención.

De acuerdo con esto, otro aspecto adicional de la presente invención suministra un método de diagnóstico para detectar *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado en una muestra biológica derivada de un sujeto animal, dicho método comprende los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores derivados de la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella o un homólogo, análogo o derivado de ella, o una molécula de ADN o ARN presente en dicha muestra y luego la detección de dicha hibridación usando medios de detección.

Según se lo utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico que deriva de la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 y que es capaz de ser utilizada en la detección de ella. Las sondas pueden comprender ADN (con una sola torsión o con dos torsiones) o ARN (es

decir, ribosondas) o análogos de ellas.

El término "cebador" se refiere a una sonda como se describió anteriormente que además es capaz de ser utilizada para amplificar la secuencia nucleótida de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con ella en una PCR.

Las sondas y cebadores preferidos pueden incluir fragmentos de la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 y moléculas sintéticas de ADN de una sola torsión o de ARN de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos en longitud derivados de la secuencia que se observa en la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella.

Preferiblemente, las sondas y cebadores de acuerdo con esta realización comprenderán por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos derivados de la SEC ID NO:2 o una secuencia complementaria a ella, aún más preferiblemente aproximadamente 25 nucleótidos contiguos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente aproximadamente 100 nucleótidos contiguos hasta aproximadamente 500 nucleótidos derivados de la secuencia que se observa en la SEC ID NO: 2 o un complemento de ella. Las sondas y cebadores que comprenden la longitud total de la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella también están incluidos en la presente invención.

Para el propósito de la presente, "homólogos" de una secuencia de nucleótido se referirá a una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es funcionalmente equivalente al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la presente invención o a un polipéptido que es un homólogo, análogo o derivado de la SEC ID NO: 1, sin tener en cuenta la ocurrencia dentro de dicha secuencia, de una o más sustituciones, inserciones,

eliminaciones o reacomodamientos de nucleótidos.

Los "análogos" de una secuencia de nucleótido observada aquí se referirán a una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente al polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la presente invención, o un homólogo, análogo o derivado de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, sin importar la ocurrencia de cualquier constituyente que no es nucleótido que normalmente no se encuentra presente en dicha molécula aislada de ácido nucleico como, por ejemplo, carbohidratos, radioquímicos incluyendo radio nucleótidos, moléculas reporteras como, aunque sin limitarse a, biotina, DIG, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano, entre otros.

Los "derivados" de la secuencia nucleótida que se observa aquí se tomarán como referencia a cualquier molécula aislada de ácido nucleico que contiene por lo menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia de nucleótido con 15 o más nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella. Generalmente, la secuencia de nucleótido de la presente invención puede estar sujeta a mutagénesis para producir sustituciones, eliminaciones y/o inserciones simples o múltiples de nucleótido. Los derivados de inserción del nucleótido de la secuencia de nucleótido de la presente invención incluye fusiones terminales de 5' y 3' como también las inserciones intra-secuencia de nucleótidos simples o múltiples o análogos de nucleótido. Las variantes de la secuencia de inserción de nucleótido son aquellas en las cuales se introducen uno o más nucleótidos o análogos de nucleótido en un sitio predeterminado en la secuencia de nucleótido de dicha secuencia, aunque la inserción aleatoria también es posible con el monitoreo apropiado del producto resultante. Las variantes de eliminación de la secuencia de nucleótido están caracterizadas por la eliminación

de uno o más nucleótidos de la secuencia de nucleótido. Las variantes sustitucionales de la secuencia de nucleótido son aquellas en las cuales un nucleótido de la secuencia ha sido eliminado y un nucleótido o análogo de nucleótido diferente ha sido insertado en su lugar. En una realización preferida, dichas sustituciones son seleccionadas sobre la base de la degeneración del código genético, como se conoce en el arte, con la variante sustitucional resultante codificando la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1.

Las sondas o cebadores pueden comprender residuos de inosina, adenina, guanina, timidina, citidina o uracilo o análogos funcionales o derivados de ellos que son capaces de ser incorporados en la molécula de polinucleótido, con la condición de que la sonda o cebador resultante sea capaz de hibridarse bajo por lo menos condiciones de baja rigurosidad a la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria de ella, o es por lo menos un 60% idéntica a la SEC ID NO: 2 o a una secuencia de nucleótido complementaria a ella.

La muestra biológica de acuerdo con este aspecto de la invención incluye cualquier órgano, tejido, célula o exudado que contiene o es probable que contenga *Lawsonia intracellularis* o un derivado de ácido nucleico de ella. Una muestra biológica puede prepararse en una solución apropiada como, por ejemplo, un tampón de extracción o un tampón suspensión. La presente invención se extiende a la prueba de soluciones biológicas preparadas de este modo, donde el único requerimiento es que dicha solución por lo menos comprenda muestras biológicas como se describe aquí.

EL ensayo de diagnóstico de la presente invención es útil para la detección de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado que expresa el polipéptido OmpH de la presente invención o un polipéptido similar a OmpH.

La presente invención contempla claramente los ensayos de diagnóstico que son capaces de detección tanto de genes específicos como de especies

específicas. De acuerdo con esto, en una realización, la sonda o cebador, o un homólogo, análogo o derivado de ellos, comprende ADN capaz de ser utilizado en la detección de *Lawsonia spp* múltiple. En una realización alternativa, la sonda o cebador o un homólogo, análogo o derivado de ellos, comprende ADN capaz de ser utilizado para distinguir *Lawsonia intracellularis* a partir de microorganismos relacionados.

Las regiones conservadas en forma menos elevadas dentro de la SEC ID NO: 2, son particularmente útiles como sondas y/o cebadores de especie específica para la detección de *Lawsonia intracellularis* y especies relacionadas muy cercanas.

Además, los ensayos de diagnóstico específicos que se describen aquí pueden ser adaptados a un ensayo de gen específico o de especie específica por medio de la variación de la rigurosidad del paso de hibridación. De acuerdo con esto, se puede utilizar una hibridación de rigurosidad baja para detectar muchas especies diferentes de *Lawsonia* en una o más muestras biológicas que se someten a ensayo, mientras que la hibridación de rigurosidad elevada se puede utilizar para distinguir *Lawsonia intracellularis* a partir de otras especies.

El medio de detección de acuerdo con este aspecto de la invención puede ser cualquier medio de detección basado en ácido nucleico como, por ejemplo, técnicas de hibridación con ácido nucleico o el ensayo de hibridación por cromatografía de papel (PACHA), o una reacción de amplificación como PCR, o un sistema de amplificación que se basa en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). La invención además abarca el uso de formatos de ensayos diferentes de dicho medio de detección que se basa en ácido nucleico, incluyendo el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP), polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado (AFLP), polimorfismo de la cadena de una sola torsión (SSCP), detección de equivalencia equivocada y amplificación (AMD),

reacción de la cadena de polimerasa de secuencia repetitiva entremezclada (IRS-PCR), reacción de la cadena inversa de polimerasa (iPCR), reacción de la cadena de polimerasa *in situ* y reacción de la cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), entre otros.

Donde el medio de detección es una técnica de hibridación de ácido nucleico, la sonda puede ser rotulada con una molécula reportera capaz de producir una señal identificable (por ejemplo, un radioisotopo como ^{32}P o ^{35}S , o una molécula biotinilada). De acuerdo con esta realización, aquellos que tienen experiencia en el arte sabrán que la detección de dicha molécula reportera suministra la identificación de la sonda y que, luego de la reacción por hibridación, se facilita la detección de las correspondientes secuencias de nucleótido en la muestra biológica. Se pueden utilizar sondas adicionales para confirmar los resultados del ensayo obtenidos con el uso de una sola sonda.

Una variación de la técnica de hibridación del ácido nucleico contemplada por la presente invención es el ensayo de hibridación por cromatografía de papel (PACHA) que se describe en Reinhartz et al (1993) y equivalentes del mismo, donde una molécula de ácido nucleico objeto es rotulada con una molécula reportera como la biotina, aplicada a un extremo de una tira filtro de membrana de nylon o nitrocelulosa y sometida a cromatografía bajo la acción de capilares y otras fuerzas (por ejemplo, un campo eléctrico) durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para promover la migración de dicho ácido nucleico objetivo a lo largo de la longitud de dicha membrana a una zona en la cual la sonda de ADN es inmovilizada, por ejemplo, en la región media. De acuerdo con este formato de detección, el ácido nucleico objetivo rotulado que comprende las secuencias de *Lawsonia spp.* complementarias a la sonda se hibridarán a ella y se inmovilizarán en esa región de la membrana a la cual está unida la sonda. Las secuencias no complementarias a la sonda serán difusas luego de pasar el sitio

en el cual está unida la sonda. El ácido nucleico objetivo puede comprender una extracción cruda o parcialmente pura de ADN o ARN o, en forma alternativa, un ADN ampliado o purificado. Las variaciones adicionales de este medio de detección que utilizan las secuencias de nucleótido que se describen aquí, están claramente abarcadas por la presente invención.

Donde el medio de detección es un RFLP, el ácido nucleico derivado de la muestra biológica, en particular ADN, es digerido con una o más enzimas de endoglucanasa y el ADN digerido es sometido a electroforesis, transferido a un soporte sólido como, por ejemplo, una membrana de nylon o nitrocelulosa, e hibridados a una sonda opcionalmente rotulada con una molécula reportera, como se definió anteriormente. De acuerdo con esta realización, un modelo específico de fragmentos de ADN se muestra en el soporte, donde dicho modelo es preferiblemente específico para una especie de *Lawsonia* en particular para permitir al usuario distinguir entre las especies diferentes de bacteria.

Donde el medio de detección es una reacción de amplificación como, por ejemplo, una reacción de la cadena de polimerasa o un sistema de amplificación que se basa en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) o una variante de ellos, una o más moléculas cebador de ácido nucleico de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de longitud que derivan de la SEC ID NO: 2 o su secuencia de nucleótido complementaria, o un homólogo, análogo o derivado de ellos, es hibridada con el ácido nucleico derivado de una muestra biológica, y las copias de ácido nucleico de las secuencias genéticas que codifican el OmpH en dicha muestra, o una parte o fragmento de ellas, se amplifican en forma enzimática.

Aquellos que tienen experiencia en el arte sabrán que debe haber un porcentaje suficientemente elevado de identidad de secuencia de nucleótido entre los cebadores y las secuencias en la molécula templada de la muestra biológica a la cual se hibridan (es decir, la "molécula templada"). Como se mencionó

anteriormente, las condiciones de rigurosidad pueden ser seleccionadas para promover la hibridación.

Preferiblemente, cada cebador es por lo menos aproximadamente 95% idéntico a una región de la SEC ID NO: 2 o su secuencia de nucleótido complementaria en la molécula templada a la cual se hibrida.

Aquellos que tienen experiencia en el arte sabrán también que, en un formato, la PCR suministra la hibridación de cebadores no complementarios a diferentes cordones de la molécula templada, de modo que los cebadores hibridados están ubicados para facilitar la síntesis 5' - 3' del ácido nucleico en la región interviniente, bajo el control de una enzima de polimerasa de ADN termoestable. Como consecuencia, la PCR suministra una ventaja por encima de los otros medios de detección en la medida que la secuencia de nucleótido en la región entre los cebadores hibridados puede ser desconocida o no relacionada con ninguna secuencia conocida de nucleótido.

En una realización alternativa, donde el medio de detección es AFLP, los cebadores se seleccionan de modo que, cuando el ácido nucleico derivado de la muestra biológica, en particular ADN se amplifica, diferentes productos de amplificación de longitud se producen a partir de diferentes *Lawsonia spp.* Los productos de amplificación pueden ser sometidos a electroforesis, transferidos a un soporte sólido como, por ejemplo, una membrana de nylon o nitrocelulosa, e hibridados a una sonda opcionalmente rotulada con una molécula reportera como se mencionó anteriormente. De acuerdo con esta realización, un modelo específico de fragmentos de ADN amplificados se muestra en el soporte, dicho modelo opcionalmente específico para una *Lawsonia spp.* en particular, para permitir al usuario distinguir entre diferentes especies de bacteria en el mismo modo que para el análisis de RFLP.

La técnica de AMD facilita, no solamente la detección del ADN de *Lawsonia*

spp en una muestra biológica, sino también la determinación de las variantes de la secuencia de nucleótido que difieren de los cebadores y sondas usadas en el formato del ensayo. Donde el medio de detección es AMD, la sonda es rotulada en el extremo con una molécula reportera y mezclada con un exceso de molécula templada amplificada. Las mezclas son subsiguientemente desnaturalizadas y se las deja volver a naturalizarse para formar "sonda:moléculas híbridas templadas" o "híbridos", de modo que cualquier variación de la secuencia de nucleótido entre la sonda y la molécula templada a la cual se hibrida interrumpirá la paridad de la base en los híbridos. Estas regiones de equivalencia equivocada son sensibles a modificación química específica con el uso de hidroxilamina (residuos de citocina con equivalencia equivocada) o tetróxido de osmio (residuos de timidina con equivalencia equivocada), permitiendo la subsiguiente disociación del sitio modificado usando piperidina. El ácido nucleico disociado puede ser analizado usando electroforesis con gel de poliacrilamida desnaturalizante, seguido de la hibridación estándar de ácido nucleico como se describió anteriormente, para detectar las secuencias de nucleótido que derivan de *Lawsonia*. Aquellos que tienen experiencia en el arte conocerán medios de rotulación del extremo de una sonda genética de acuerdo con el rendimiento de la invención que se describe en esta realización.

De acuerdo con esta realización, el uso de una sola sonda rotulada en el extremo permite la localización inequívoca de la variación de la secuencia. La distancia entre los puntos de la variación de la secuencia y el rótulo final está representada por el tamaño del producto de disociación.

En una realización alternativa de AMD, la sonda es rotulada en ambos extremos con una molécula reportera, para facilitar el análisis simultáneo de las cadenas de ADN.

Donde el medio de detección es RT-PCR, la muestra de ácido nucleico

comprende una molécula de ARN que es un producto de transición de ADN derivado de *Lawsonia* o un homólogo, análogo o derivado del mismo. Como consecuencia, este formato de ensayo es particularmente útil cuando es deseable determinar la expresión de uno o más genes de *Lawsonia*. De acuerdo con esta realización, la muestra de ARN se transcribe en forma inversa para producir el ADN complementario de cadena simple que es amplificado en forma subsiguiente usando procedimientos estándar.

Las variaciones de estas realizaciones que se describen aquí se describen en detalle en McPherson et al (1991).

La presente invención se extiende claramente al uso de cualquiera de todos los medios de detección mencionados anteriormente para los propósitos de diagnosticar la infección con *Lawsonia spp* y en particular *Lawsonia intracellularis* en un animal.

El medio de detección por reacción de amplificación que se describió anteriormente además puede ser acoplado al medio de detección por reacción de hibridación clásico para aumentar en forma adicional la sensibilidad y la especificidad del método inventivo, como por medio de la hibridación del ADN amplificado con una sonda que es diferente de cualquiera de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación.

De un modo similar, el medio de detección por reacción de hibridación que se describió anteriormente puede ser acoplado además a un segundo paso de hibridación que emplea una sonda que es diferente de la sonda utilizada en la primera reacción de hibridación.

Un aspecto adicional de la presente invención suministra una sonda o cebador aislados derivados de la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella.

La presente invención se describe en más detalle por medio de los

siguientes ejemplos no limitantes:

EJEMPLO 1

FUNTES DE TEJIDO DE CERDO

Intestinos de Cerdo Infectados.

Se tomaron secciones de ílea muy engrosada de cerdos afectados por PPE en forma natural o experimental. La presencia de bacteria de *L. intracellularis* en la ílea fue confirmada usando un manchado inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales específicos (McOrist et al, 1987). Un ejemplo de anticuerpo apropiado es el anticuerpo monoclonal IG4 disponible de la Universidad de Edimburgo, Reino Unido.

EJEMPLO 2

AISLAMIENTO DE BACTERIA DE *Lawsonia intracellularis* DEL ÍLEO INFECTADO DEL CERDO.

Las bacterias de *Lawsonia intracellularis* se extrajeron directamente de las lesiones de PPE en cerdos por medio de filtración y luego se purificaron con gradiente de Percoll (Farmacia, Uppsala, Suecia) de la siguiente manera. Se obtuvo ílea infectada de los cerdos y se confirmó la presencia de *L. intracellularis* en forma histológica antes del almacenamiento a -80°C. Las secciones de íleo fueron descongeladas y se rasparon aproximadamente 8 g de mucosa infectada de la pared del intestino. La mucosa fue homogeneizada con 40 ml de solución salina tamponada estéril de fosfato (PBS) a velocidad media durante 10 segundos usando un omnimezclador Sorvall. Esta suspensión fue centrifugada a 2000 x g durante 4 minutos. El material flotante fue descartado y el glóbulo celular fue suspendido nuevamente en 40 ml de PBS y se volvió a centrifugar. Este paso de lavado fue repetido dos veces. El glóbulo celular fue suspendido nuevamente en

20 ml de PBS y homogeneizado a velocidad completa durante 1 minuto para liberar la bacteria de *L. intracellularis*.

Este producto homogéneo fue centrifugado a 1000 x g durante 4 minutos produciendo un glóbulo que contiene una mezcla cruda de células epiteliales homogeneizadas y bacteria intestinal. El producto de flotación fue filtrado utilizando filtros con poros de 3 µm, 1,2 µm y 0,8 µm (Millipore Corporation, MA, Estados Unidos de Norteamérica). El filtrado fue centrifugado a 8000 x g durante 30 minutos, dando como resultado un glóbulo pequeño de bacteria de *L. intracellularis*. La bacteria de *L. intracellularis* fue purificada además utilizando un 45% de gradiente de Percoll autoformante de la siguiente manera: Se mezclaron 2 ml de preparación bacteriana por inversión en 30 ml de un gradiente (45% v/v de Percoll, 150 mM de NaCl) de Percoll (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) autoformante. Los gradientes fueron centrifugados en un centrifugo Sorval usando el rotor SS34 a 20.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Usualmente un número de bandas se forman dentro del gradiente. Se obtuvo la banda (usualmente ubicada aproximadamente a 10-20 mm de la base del tubo) que contiene la bacteria de *L. intracellularis* y el volumen fue realizado hasta 16 ml con PBS. Luego se centrifugó la solución durante 15 minutos a 8000 rpm. El globulillo resultante fue lavado con PBS antes de ser suspendido nuevamente en el volumen final de aproximadamente un ml.

EJEMPLO 3

PURIFICACIÓN DE ADN GENOMICO DE *Lawsonia intracellularis*

Se extrajo el ADN genómico de la bacteria de *Lawsonia intracellularis* purificada con gradiente de Percoll obtenida de los raspados de ílea de cerdo infectado (Ejemplo 2) por medio de los métodos descritos por Anderson et al (1984) y Sambrook et al (1989)

En resumen, las células de *L. intracellularis* fueron transformadas en glóbulos por medio de centrifugado a 14.000 x g a 4°C durante 15 minutos. Las células fueron suspendidas nuevamente en 10 ml de tampón de TE (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8,0) y centrifugadas como antes. El globulillo fue suspendido nuevamente en 4 ml de tampón de TE que contiene 4 mg/ml de Lysozyme (Sigma Chemical CO.) y se incubó a 37°C durante 20 min. La SDS y la proteinasa K (Promega, WI, Estados Unidos de Norteamérica) fueron incorporadas a las concentraciones finales de 1% (p/v) y 200 µg/ml, respectivamente y la incubación se continuó a 45°C durante 4 horas. Luego se extrajo el lisato con un volumen igual de fenol, fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo, respectivamente, y se recuperaron los ácidos nucleicos del producto de flotación por medio de precipitación con etanol. El globulillo fue disuelto suavemente en TE, tratado con RnaseA (Promega, WI, Estados Unidos de Norteamérica) a 37°C durante 30 minutos y luego digerido con proteinasa K en presencia de 0,5% (p/v) de SDS durante 1 h a 50°C. Luego de otra ronda de precipitación de fenol:cloroformo (1:1) y etanol, el ADN purificado fue disuelto en TE. El ADN fue almacenado a 4°C.

EJEMPLO 4

MONITOREO INMUNOLÓGICO DE LA LIBRERÍA DE *L. INTRACELLULARIS* USANDO SUERO EXPERIMENTAL DE CERDOS VACUNADOS.

El ADN genómico del Ejemplo 3 fue parcialmente digerido con la endonucleasa de restricción *Sau3A* (Promega) y ligado a Lambda ZAP Express (Stratagene, CA, Estados Unidos de Norteamérica). La librería de lambda fue laminada en un colchón de células de *E. coli* XLI-Blue a una densidad de 1.000 unidades de formación de fago (pfu) por cada lámina de 150 mm de agar L-broth. La librería fue monitoreada usando el método que se describe en Protoblot Technical

Manual (Promega, WI, Estados Unidos de Norteamérica). Los filtros fueron bloqueados en un tampón bloqueante (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% de Tween 20 y 5% de blotto) antes de la selección con suero de los cerdos Y12 y/o 395. Los cerdos Y12 y 395 habían sido inmunizados previamente con *L. intracellularis* matada con formalina y *L. intracellularis* matada por calor, respectivamente, como se describió en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU96/00767. Las placas positivas identificadas en la primera selección fueron obtenidas, laminadas nuevamente a una densidad inferior y seleccionadas nuevamente con cualquiera o con ambos sueros hasta que se identificó una placa individual positiva. El ADN del plásmido del clon de fago lambda positivo fue aislado por excisión *in vitro*, según lo recomienda el fabricante. (Stratagene, CA, Estados Unidos de Norteamérica).

EJEMPLO 5

ANÁLISIS DE CLONES DE FAGO QUE EXPRESAN *L. INTRACELLULARIS*

El ADN fagémico de los clones de fago que expresan λ ZAP fue aislado por excisión *in vivo*, por medio de las condiciones recomendadas por el fabricante (Stratagene).

Se extrajo el ADN plásmido para un análisis de restricción por medio de lisis alcalina, como se describe en Sambrook et al (1989), y para un secuenciamiento automatizado, usando el High Pure Plasmid Kit, como lo recomienda el fabricante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). El secuenciamiento del ADN de las inserciones de clon aisladas fue realizado por medio del método de terminación de colorante de secuenciamiento automatizado (ABI Biosystems, CA, Estados Unidos de Norteamérica). La secuencia de nucleótido de la región de codificación completa del gen *OmpH* se observa en la SEC ID NO: 2.

EJEMPLO 6

ANALISIS OCCIDENTAL DE LA PROTEINA OmpH DE *L.INTRACELLULARIS* QUE EXPRESAN CLONES DE *E.COLIS*

Se diluyó un cultivo nocturno de 1/10 en 10 ml de caldo de LB que contiene la selección apropiada de antibióticos. Luego de incubación a 37°C en un agitador orbital durante 30 minutos, se incorporó una concentración de 1mM IPTG y los cultivos incubados durante 1-2 horas adicionales. Las células (1,5 ml) fueron obtenidas por centrifugación, suspendidas nuevamente en 50 µl de solución tampón muestra (62,4 mM HCl, 2% p/v SDS, 10% de glicerol, 5% v/v mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol, pH 6,8) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos antes de separar las proteínas solubilizadas por electroforesis en un gel de proteína al 12% a 200 V durante 2 horas.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando el procedimiento estándar, como lo recomienda el fabricante (BioRad, CA). La membrana fue bloqueada y monitoreada con suero Y12, como se describió en el Ejemplo 4. La quemiluminiscencia aumentada (ECL, Amersham, IL) fue utilizada para detectar la proteína de *L. intracellularis* inmunorreactiva. Los datos se presentaron en la Figura 1.

EJEMPLO 7

ANTISUERO DE PROTEÍNA recOmpH *L. INTRACELLULARIS*

El antisuero para la proteína recombinante de OmpH *L. intracellularis* fue obtenido en conejos. Se inyectó a los conejos en forma intramuscular en dos lugares separados una preparación de proteína OmpH recombinante. Un total de 400 µg de OmpH purificado fue formulado con el adyuvante incompleto de Freund para obtener un volumen total de 1 ml, y 500 µl se inyectaron en cada sitio. En forma similar, se prepararon otras dos dosis para una segunda vacunación 28 días

después, inyectadas en forma subcutánea. Dos semanas después el conejo fue sacrificado y se obtuvieron muestras de sangre.

EJEMPLO 8

CEPA DE ANTICUERPO FLUORESCENTE USANDO ANTI OmpH DEL CONEJO EN SECCIONES DE PARAFINA Y MUESTRAS FECALES.

Se cortaron secciones de parafina fijadas en formalina sobre deslizadores recubiertos con poli-L-lisina y se secaron a 60°C y luego fueron hidratados nuevamente. Luego fueron digeridos en 0,1% de tripsina, dos veces, durante 5 minutos cada una a 37°C. Las muestras fecales fueron tomadas utilizando un hisopo de algodón que luego fue deslizado en un deslizador de vidrio. El deslizador fue secado al aire antes de ser fijado en acetona durante 10 minutos.

Los deslizadores fueron lavados dos veces en PBST durante 7 minutos. Luego de la aplicación de una tapa, los deslizadores fueron incubados en antisuero anti-OmpH de conejo (ver el ejemplo anterior), diluido en PBS hasta una relación de 1:50, a temperatura ambiente durante 1 hora. Se quitó la tapa y los deslizadores fueron enjuagados (PBST durante 7 minutos, X3) antes de la incorporación de 30 µl de una dilución de 1/75 del antisuero de anti-conejo FITC conjugado (Sigma, MO) y se taparon. Se incubaron los lados a temperatura ambiente durante una hora adicional. Se quitó la tapa y se enjuagaron los deslizadores con PBST como antes, con un enjuague final adicional en PBS. Luego se montaron los deslizadores usando 9 partes de glicerol: 1 parte de solución de PBS y una tapa de vidrio. Las bacterias fluorescentes fueron visualizadas con poder elevado (x 1200) a 340 nm usando un microscopio Lietz laborlux S. Los datos se presentan en las Figuras 2A y 2B.

EJEMPLO 9

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE *L. INTRACELLULARIS*

La similitud de la secuencia de las moléculas de ADN que codifican los candidatos putativos de vacunas identificados en el Ejemplo 4 y 5, fue identificada usando el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994). Las secuencias alineadas de aminoácido de *L. intracellularis* OmpH putativas (SEC ID NO: 1), polipéptidos *Yersinia enterocolitica* OmpH y *Yersinia pseudotuberculosis* OmpH comparten aproximadamente un 20% de la identidad de secuencia de aminoácido y aproximadamente un 35% de similitud general de aminoácido. Adicionalmente, las secuencias de aminoácido alineadas de *L. intracellularis* OmpH putativas (SEC ID NO: 1), polipéptidos *Yersinia enterocolitica* OmpH, *Yersinia pseudotuberculosis* OmpH y *Haemophilus influenzae* OmpH comparten sólo aproximadamente un 12% de identidad de la secuencia de aminoácido y aproximadamente un 25% de similitud general de aminoácido (Figura 3). Las regiones únicas del polipéptido *Lawsonia intracellularis* OmpH son aparentes a partir de una comparación de la secuencia de aminoácido de este polipéptido con respecto a las de otros microorganismos (Figura 3).

EJEMPLO 10

PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA DEPOSITO - AMPLIFICACIÓN DE ompH

El ADN templado para ompH fue plásmido pCLO1. El plásmido pCLO1 fue obtenido de Lambda ZAPII (Stratagene Clonina Systems, La Jolla, California) y es un derivado pBluescript SK, que fue identificado por la selección de una librería lambda de *L.intracellularis* genómica con un antisuero α -*L. intracellularis*.

Las amificaciones de PCR consistían en 0,1 ng de templado de plásmido, 1 μ M cada uno de cebadores hacia delante (RA176: 5'TTTATTCATTCAGAAGGAGCTTC 3'; SEC ID NO: 3) e inversos (RA177: 5'

AAGTTTAGCAATTTCTGAAAG 3'; SEC ID NO: 4), 7,5 unidades de polimerasa KlenTaki (Ab Péptides, Inc., St. Louis, Missouri), 0,0075 unidades de polimerasa *Pfu* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California) 1x PC2 (KlenTaki) de tampón y 0,2 mM dNTPs en un volumen de 50 µl. PCR fue realizada en 4 etapas: (i) 95°C durante 5 minutos (5'); (ii) 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,5 min, x 33 ciclos; (iii) 72°C durante 10 minutos, (iv) mantenido a 4°C.

El fragmento de PCR que codifica el gen *ompH* de *L. intracellularis* fue subclonado en pCR2,1-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y designado como pALK13.

DEPOSITOS DE MICROORGANISMOS.

El plásmido pALK13 fue depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de Norteamérica el 8 de abril de 1999 y fue asignado con Acceso de ATCC No. 207196.

REFERENCIAS

1. Altuvia, Y., Schueler, O., y Margalit, H. (1995) *J. Mol. Biol.* 249:244-250.
2. Amann y Brosius (1985). *Gene* 40: 183.
3. Anderson, B.J., M.M. Bilis, J.R. Egerton, y J.S. Mattick. (1984) *Journal of Bacteriology* 160:748-754.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, RE, Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1987). In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley interscience (ISBN 047150338).
5. Barker, I.K. y Van Dreumel, A.A. (1985) In "Pathology of domestic Animals," 3rd Edition, Vol. 2 p. 1-237, eds K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy y N. Palmer. (Academic Press: Orlando).
6. Cole et al. (1985) In: *Monoclonal antibodies in cancer therapy*, Alan R. Bliss Inc., pp 77-96.
7. Dayhof, M.D. (1978) In: *Nat. Biomed. Res & Found*, Washington D.C. Vol 15, Suppl. 3.
8. De Groot, A.S., Carter, E.J., Roberts, C.G.P., Edeison, B.T., Jesdale, B.M., Meister, G~E, Houghten, R.A., Montoya, J., Romulo, R.C., Barzofsky, J.A., y Ramirez, B.D.L.L. (1995) *Vaccines* 96, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
9. Devereux, 1, Haerberli, P. y Smithies, O. (1984). *Nucl. Acids Res.* 12: 387-395.
10. Elwell, MR, Chapman, AL y Frenkel, JK (1981) *Veterinary Pathology* 18:136-139.
11. Fox, JG, Murphy, JC, Otto, G Pecquet-Goad, ME, Larson, QHK y Scott JA

- (1989) *Veterinary Pathology* 26: 515-517.
12. Gabriel, E. Meister, G.E., Caroline, G.P., Roberta, C.G.P., Berzofsky, J.A., y De Groot, A.S. (1995) *Vaccine* 95, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
 13. Gebhart, C.J., Ward, G.E., Chang, K. Y Kurtz, H.J. (1983). *American Journal of Veterinary Research* 44:361-367.
 14. Gish, W y States, D.J. (1993) *Nature Genetics* 3: 266-272.
 15. Goodman et al. (1987) *Biopolymers* 26: 525-532.
 16. Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281.
 17. Jones, L.A., Nibbelink, S.. y Glock, R.D. (1997) *Am. J. Vet. Res.* 68: 1125-1131.
 18. Jonsson, L. y Martinsson, K. (1976) *Acta Veterinaria Scandinavica* 17:223-232.
 19. Kohler y Miistein (1975) *Natura* 256: 495-499
 20. Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4: 72.
 21. Lawson, G.H.K., McOrist, S., Jansi, S. y Mackie, R.A. (1993) *Journal of Clinical Microbiology* 31:1136-1142.
 22. Love, R.J. y Love, D.M. (1977) *Veterinary Record* 100:473
 23. Margalit, H., Spouge, J.L., Comette, J.L., Cease, K.B., DeLisi, O., y Berzofsky, J.A. (1987) *J. Immunol.* 138:2213-2229.
 24. Mason, R.W, Monkton, P y Hasse D (1998) *Australian Veterinary Journal* (submitted for publication).

25. McOrist, S., Boid, R., Lawson, G.H.K. y McConnell, I. (1987) *The Veterinary Record* 121:421-422.
26. McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., Macintyre, N., Neef, N. y Lawson G.H.K. (1993) *Infection and Immunity* 61: 4286-4292.
27. McOrist, S. et al. (1995) *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 820-825.
28. McPherson, M.J., Quirke, P., y Taylor, G.R. (1991) In: *PCR: A Practical Approach*. (series editors, D. Rickwood y B.D. Hames) IRL Press Limited, Oxford. pp1-253.
29. Meister, G.E., Roberts, C.G.P., Berzofsky, J.A., y De Groot, A.S. (1995) *Vaccine* 13: 581-591.
30. Mierke et al. (1990) *Int. J. Peptide Protein Research* 35:35-45.
31. Mohapatra, S.S., Cao, Y., Ni, H., y Salo, D. (1995) *Allergy* 50:37-44.
32. Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
33. O'Neil, P.A. (1970) *Veterinary Record* 87:742-747.
34. Parker, K.O., Bednarek, M.A., y Coligan, J.E. (1994) *J. Immunol.* 152:163-175.
35. Portoghese et al. (1990) *J. Med. Chem.* 33:1714-1720.
36. Reinhartz, A., Alajem, S., Samson, A. y Herzberg, M. (1993). *Gene* 136: 221-226.
37. Rowland, A.C. y Lawson, G.H.K. (1976) *Veterinary Record* 97:178-180,
38. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, N.Y.

39. Schodeb, IR y Fox JG (1990) *Veterinary Pathology* 27: 73-80.
40. Shimatake y Rosenberg (1981) *Nature* 292: 128.
41. Stills, H.F. (1991). *Infection and immunology* 59: 3227-3236.
42. Straw, B.E. (1990). *Journal of American Veterinary Medical Association* 197: 355-357.
43. Studier y Moffat (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113.
44. Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994) *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
45. Vajda, S. y DeLisi, O. (1990) *Biopolymers* 29:1755-1772.
46. van Regenmortel, M. (1992) Molecular dissection of protein antígenos. In: *Structure of antígenos*, (van Regenmortel M. ed.) CRC Press, London, ppl-27.

Listado de Secuencias

<110> Agriculture Victoria Services Pty Ltd AND Pig Research and Development Corporation
 <120> Nuevo gen de Lawsonia spp y sus usos II
 <130> p:\oper\mrc\lawson-2.pct
 <140>
 <141>
 <150> US 60/133,982
 <151> 1999-05-12
 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Lawsonia intracellularis

 <400> 1
 Met Lys Val Lys Thr Leu Ser Met Ala Ile Leu Ala Cys Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Asn Ser Ala Phe Ser Ala Asp Phe Pro Ile Gly Val Phe Asn Ser
 20 25 30
 Gln Ser Ile Ala Met Glu Ser Glu Ala Ala Lys Ala Ala Gln Lys Lys
 35 40 45
 Leu Gln Ser Glu Phe Gly Asn Glu Lys Thr Gln Leu Glu Lys Gln Ala
 50 55 60
 Lys Asp Leu Gln Thr Lys Ala Asp Asp Leu Gln Ala Lys Ser Ala Ala
 65 70 75 80
 Met Ser Asn Gln Ala Arg Glu Asp Lys Gln Arg Glu Phe Leu Glu Leu
 85 90 95
 Arg Arg Asn Phe Glu Glu Lys Ser Arg Asp Phe Ala Ile Arg Val Glu
 100 105 110
 Gln Ala Glu Asn Thr Leu Arg Gln Tyr Leu Ala Glu Gln Ile Tyr Leu
 115 120 125
 Ala Ala Glu Thr Ile Ala Lys Lys Lys Gly Leu Lys Leu Val Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ala Ser Gly Ser Val Met Tyr Leu Glu Lys Asn Leu Asp Ile Thr

Lys Glu Ile Leu Glu Ala Ile Asn Ala Ala Trp Lys Lys Gly Gly Ser
 165 170 175

Lys Leu Pro Glu Met Ala Asn Arg Lys Lys
 180 185

<210> 1

<211> 561

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(558)

<400> 1

atg aaa gta aaa act ctt tcc atg gct att tta gct tgt tta tta gta 48
 Met Lys Val Lys Thr Leu Ser Met Ala Ile Leu Ala Cys Leu Leu Val
 1 5 10 15

gct aac agt gca ttt tgg ggt gac ttc cct att ggt gtc ttt aat tct 96
 Ala Asn Ser Ala Phe Ser Ala Asp Phe Pro Ile Gly Val Phe Asn Ser
 20 25 30

caa tcc att gcc atg gag agt gaa gca gct aag gcc gct caa aaa aaa 144
 Gln Ser Ile Ala Met Glu Ser Glu Ala Ala Lys Ala Ala Gln Lys Lys
 35 40 45

tta caa tca gaa ttt ggt aat gaa aaa aca caa ctt gaa aaa caa gca 192
 Leu Gln Ser Glu Phe Gly Asn Glu Lys Thr Gln Leu Glu Lys Gln Ala
 50 55 60

aaa gat ttg caa aca aaa gct gat gat tta caa gct aag tca gca gct 240
 Lys Asp Leu Gln Thr Lys Ala Asp Asp Leu Gln Ala Lys Ser Ala Ala
 65 70 75 80

atg tct aac caa gca cgt gaa gat aaa caa aga gaa ttt ctt gaa ctt 288
 Met Ser Asn Gln Ala Arg Glu Asp Lys Gln Arg Glu Phe Leu Glu Leu
 85 90 95

cgt cgt aat ttc gaa gaa aaa tct cgt gac ttt gca ata cgt gtc gaa 336
 Arg Arg Asn Phe Glu Glu Lys Ser Arg Asp Phe Ala Ile Arg Val Glu
 100 105 110

caa gct gaa aac aca tta cgt caa tat cta gct gaa caa atc tat ctt 334
 Gln Ala Glu Asn Thr Leu Arg Gln Tyr Leu Ala Glu Gln Ile Tyr Leu
 115 120 125

gct gct gaa act ata gca aaa aag aaa ggg tta aaa ctt gtt ctt gat 432
 Ala Ala Glu Thr Ile Ala Lys Lys Lys Gly Leu Lys Leu Val Leu Asp
 130 135 140

agt gct agt gga agt gta atg tac ctt gaa aaa aat cta gat att aca 490
 Ser Ala Ser Gly Ser Val Met Tyr Leu Glu Lys Asn Leu Asp Ile Thr
 145 150 155 160

aaa gaa att ctt gaa gcc ata aat gct gca tgg aaa aaa ggt gga agt 528
 Lys Glu Ile Leu Glu Ala Ile Asn Ala Ala Trp Lys Lys Gly Gly Ser
 165 170 175

aaa ctt cca gag atg gcg aac cgg aaa aaa taa 561
 Lys Leu Pro Glu Met Ala Asn Arg Lys Lys
 180 185

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 3

tttatttcatt cagaaggagc ttc 23

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 4

aagtttagca atttctgaaa g 21

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante que comprende, imita o reacciona con un epítipo de célula B o célula T de un polipéptido de *Lawsonia spp.* OmpH.
2. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 1 capaz de lograr la producción de anticuerpos contra *Lawsonia spp.*, cuando se administra en un animal porcino o un ave.
3. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 1 capaz de conferir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia spp.* cuando se administra a un ave o un porcino.
4. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 2 donde la *Lawsonia spp.* es *Lawsonia intracellularis*.
5. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 3 donde la *Lawsonia spp.* es *Lawsonia intracellularis*.
6. Un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante seleccionado de lo siguiente:
 - (i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos un 70% de identidad de secuencia general con la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1;
 - (ii) un homólogo, análogo o derivado de (i) que imita un epítipo de célula B o de célula T de un polipéptido de *Lawsonia spp.* OmpH
7. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 6 capaz de lograr la producción de anticuerpos contra *Lawsonia spp.*, cuando se administra en un animal porcino o un ave.
8. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 7 capaz de conferir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia spp.*

cuando se administra a un ave o un porcino.

9. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 8 capaz de inducir inmunidad humoral contra *Lawsonia spp* cuando se administra a un ave.
10. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 9 capaz de inducir inmunidad humoral contra *Lawsonia spp* cuando se administra a un animal porcino.
11. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 8 donde la *Lawsonia spp* es *Lawsonia intracellularis*.
12. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 10 donde la *Lawsonia spp* es *Lawsonia intracellularis*.
13. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 6 que comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica el OmpH de pALK13 (ATCC 207196) y es capaz de obtener la producción de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* cuando se administra a un ave o un animal porcino.
14. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 13 que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica el OmpH de pALK13 (ATCC 207196).
15. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 13 o 14 capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un ave o un porcino.
16. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la reivindicación 15 capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un porcino.

17. Una composición para vacuna para la profilaxis o el tratamiento de infección de un animal con *Lawsonia spp.* dicha composición para vacuna comprende un componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado inmunogénico de ella que es reactivo a nivel inmunológico con *Lawsonia intracellularis*; y uno o más portadores, diluyentes o adyuvantes apropiados para uso veterinario o farmacéutico.
18. La composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 17 donde la *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.
19. La composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 18 donde el componente inmunogénico comprende un polipéptido recombinante o aislado que comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica el OmpH de pALK13 (ATCC 207196).
20. La composición para vacuna de la reivindicación 19 donde el componente inmunogénico consiste esencialmente en la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1.
21. Una composición de combinación para vacuna para la profilaxis o el tratamiento de la infección de un animal con *Lawsonia spp.*, dicha composición para vacuna comprende:
 - (i) un primero componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo inmunogénico, o derivado de ellos que es

reactivo inmunológicamente con *Lawsonia intracellularis*;

- (ii) un segundo componente inmunogénico que comprende un péptido, polipéptido o proteína de *L. intracellularis* antigénico; y
 - (iii) uno o más portadores, diluyentes o adyuvantes apropiados para uso veterinario o farmacéutico.
22. Un vector para vacuna que comprende, en una forma expresable, una molécula aislada de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido inmunogénico recombinante o aislado que comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1, de modo tal que dicho polipéptido es expresable a un nivel suficiente para conferir inmunidad contra *Lawsonia spp*, cuando se administra a un porcino o un ave.
23. El vector para vacuna de la reivindicación 22, donde el polipéptido inmunogénico es expresado utilizando los pasos de:
- (i) colocar una molécula aislada de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o una variante degenerada, un homólogo, análogo o derivado de ella que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia, en conexión operable con una secuencia promotora;
 - (ii) introducir la molécula de ácido nucleico aislada y la secuencia promotora del paso (a) en el vector para vacuna; y
 - (iii) incubar, criar y propagar el vector para vacuna durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que ocurra la expresión del polipéptido inmunogénico codificado por dicha molécula de ácido nucleico.
24. El vector para vacuna de la reivindicación 23 donde la *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.

25. Una molécula de anticuerpo monoclonal o policlonal que es capaz de unirse específicamente a un polipéptido de OmpH o un derivado de un polipéptido de OmpH que deriva de la *Lawsonia spp* y tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad general de secuencia con la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1.
26. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 25 donde el polipéptido de OmpH o derivado del mismo comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1.
27. Un método para diagnosticar la infección de un porcino o un ave con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo que es inmunológicamente reactivo a ella, dicho método comprende los pasos de contactar una muestra biológica derivada de dicho animal con la molécula de anticuerpo de la reivindicación 25 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo antígeno:anticuerpo, y luego detectar dicha formación del complejo.
28. El método de la reivindicación 27 donde la muestra biológica comprende suero, ganglios linfáticos, íleo, ciego, intestino delgado, intestino grueso, heces o raspado rectal derivados de un animal porcino.
29. Un método de identificar si un porcino o un ave ha sufrido o no una infección en el pasado, o actualmente está infectado, con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo que es inmunológicamente reactivo a ella, dicho método comprende contactar sangre o suero derivados de dicho animal con el polipéptido inmunogénico de la reivindicación 1 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo antígeno:anticuerpo, y luego detectar dicha formación del complejo.
30. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, o es complementaria con una molécula de ácido

nucleico que codifica, un péptido, oligopéptido o polipéptido seleccionados del grupo que consiste en:

- (i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos un 70% de identidad de secuencia general con la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1;
- (ii) un homólogo, análogo o derivado de (i) que imita un epítipo de célula B o de célula T de un polipéptido de *Lawsonia spp.*

31. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 30 donde el péptido, oligopéptido o polipéptido comprende la secuencia de aminoácido que se observa en la SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica el OmpH de pALK13 (ATCC 207196) o un epítipo de la célula B o la célula T de ellos.
32. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 31 que comprende la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella, o una variante degenerada de ella.
33. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 32 que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 2 o una variante de generada de ella.
34. Un método para detectar *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado en una muestra biológica de un sujeto porcino o un ave, dicho método comprende los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores derivados de la secuencia de nucleótido que se observa en la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a dicha muestra y luego detectar dicha hibridación usando medios de detección.
35. El método de la reivindicación 34 donde la muestra biológica comprende

suero, ganglios linfáticos, íleo, ciego, intestino delgado, intestino grueso, heces o raspado rectal derivados de un animal porcino.

36. El método de la reivindicación 34 donde el medio de detección comprende cualquier hibridación o reacción de amplificación basadas en el ácido nucleico.
37. Una sonda o cebador que tiene por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos en longitud que derivan de la SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria a ella.
38. Un plásmido designado pALK13 (Acceso de ATCC No. 207196).
39. La vacuna de combinación de acuerdo con la reivindicación 21 donde el segundo componente inmunogénico comprende un péptido, polipéptido o proteína antigénica de *L. intracellularis* seleccionados del grupo que consiste en SodC, FigE, hemolisina y autolisina.

p. AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD AND PFIZER PRODUCTS

RESUMEN

La presente invención se refiere en general a composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de condiciones de enfermedad intestinal en animales y pájaros causadas o exacerbadas por *Lawsonia Intracellularis* o similar, u otros microorganismos relacionados. En particular, la presente invención suministra un gen nuevo derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido, polipéptido o proteína OmpH inmunogénico que es particularmente útil como antígeno en una preparación para vacuna para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en huéspedes animales. La presente invención también está orientada a métodos para el tratamiento y/o profilaxis de dichas condiciones de enfermedad intestinal y a agentes de diagnóstico y procedimientos para detectar *Lawsonia intracellularis* o similar, u otros microorganismos relacionados.

C. 204.748

1/3

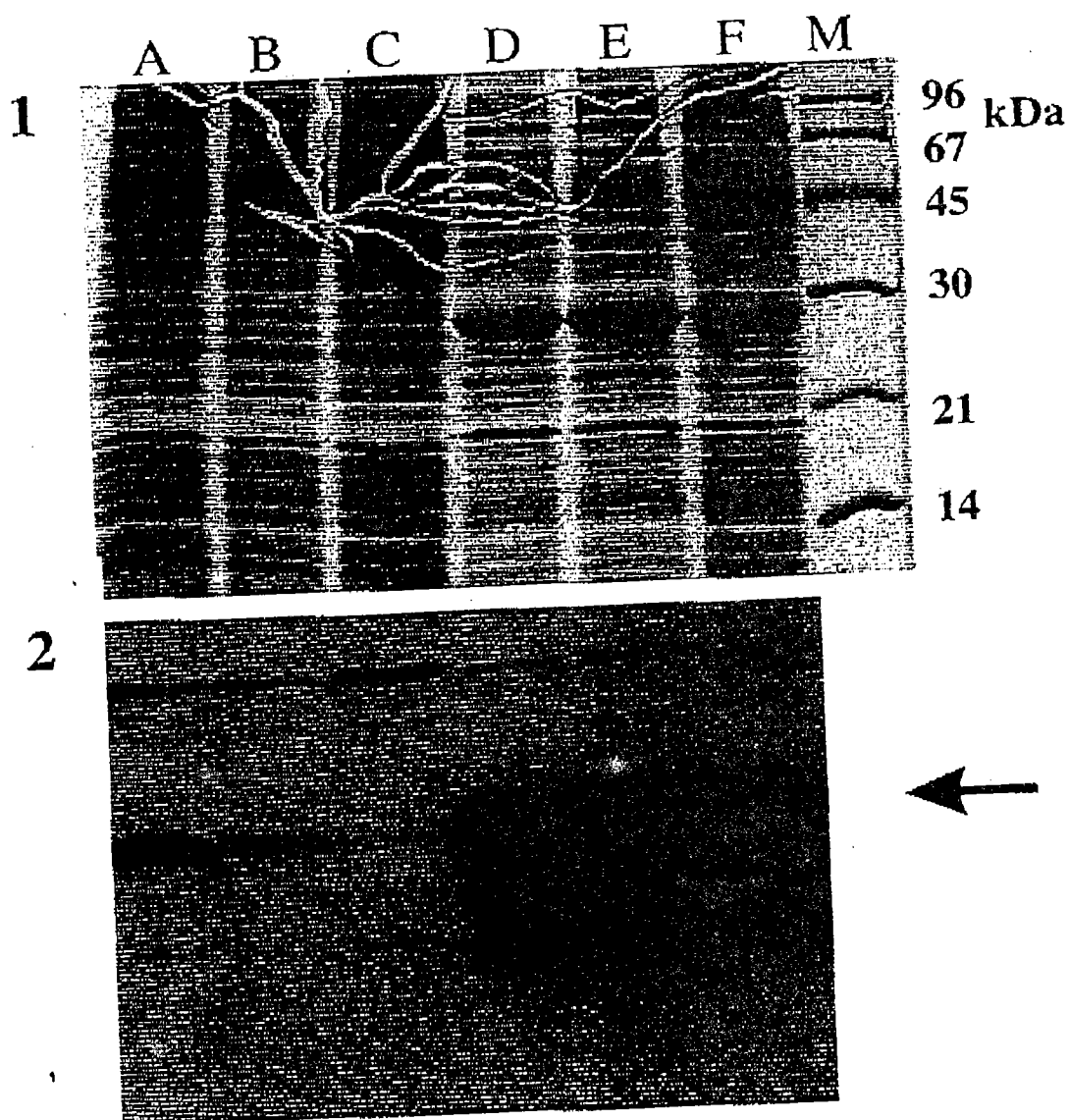


FIGURE 1

2/3

A



B



FIGURE 2



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION - SUPERINDUSIA Y COMERCIO

Radicacion : 00034568 00000000 Folios: 38
Fecha (AMD): 2000-05-12 15:45:43
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [☒]

MODELO DE UTILIDAD [☐]

- Nombre e identificación del Solicitante [☐]
- Nombre e identificación del Inventor [☐]
- Título o nombre de la Invención [☐]
- Descripción [☐]
- Reivindicaciones [☐]
- Resumen [☐]
- Comprobante de Pago [☐]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA [☐]

DISEÑO INDUSTRIAL [☐]

- Nombre e identificación del peticionario [☐]
- Nombre e identificación del inventor o diseñador [☐]
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse [☐]
- Representación gráfica [☐]
- Comprobante de pago [☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]



Firma Responsable

Fecha: _____.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

430
2000-05-16

EXPEDIENTE 2000-34568

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y el Resolución 002 del 4 de Enero del 2000).

SI ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 16 de Mayo del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Primer EXAMEN DE FORMA

Folio 101

98

430

Sin Fecha

Radicación no 00-34568

Concepto Técnico no 1475 Clasificación Internacional de Patentes W7K¹⁴/195, C12N¹⁵/31
A61K 39/02

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☐ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☐ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☐ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
- SI ☐ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☐ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☐ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☐ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☐ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☐ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
- SI ☐ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
- SI ☐ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☐ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☐ NO ☐ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C.,

EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

102
99

372
Sin Fecha

CONCEPTO TÉCNICO: 1475
EXPEDIENTE: 00034568
IPC: C07K 14/195, C12N 15/31, A61K 39/02

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. En general las reivindicaciones no son claras puesto que ellas se refieren a dos objetos de invención, un polipéptido aislado y un polipéptido recombinante, por consiguiente se requiere que dicha reivindicación se divida en dos donde cada una de ellas se refiera únicamente a un objeto de invención.
2. Adicional a lo expresado en el punto anterior se observa que la reivindicación 1 no es clara debido a que el polipéptido no se encuentra definido puesto que con la información suministrada no es posible establecer cual es exactamente el polipéptido que se desea proteger. Además, el polipéptido que imita el epítipo de otro es diferente al polipéptido que reacciona con el epítipo y no es claro, posiblemente se trata de una mala traducción, como un polipéptido de *Lawsonia spp.* puede ser un epítipo de células B y T de *Lawsonia*. Para superar las imprecisiones de esta reivindicación se requiere que se indique la secuencia de aminoácidos o el número de depósito del polipéptido, pues esta es la única manera de saber exactamente cual es el objeto para el que se solicita protección, si el polipéptido es nuevo como se plantea en las reivindicaciones, es necesario definir cual es la secuencia de la proteína que de ahora en adelante se conocerá como OmpH de *Lawsonia*; se aclare que el epítipo es del polipéptido o antígeno de *Lawsonia* que reacciona o es reconocido por células B o células T y que se hagan depender las restantes reivindicaciones de la reivindicación 1 modificada.
3. La reivindicación 6 no es clara pues ella trata de dos objetos de invención definidos cada uno de ellos en los literales i) y ii). Sirvase fraccionar esta reivindicación en dos donde cada una de ellas se refiera tan solo a un objeto de invención y hacer que las reivindicaciones que dependen de la actual reivindicación 6 sean modificadas para que ellas se indiquen la dependencia de la correspondiente reivindicación modificada.
4. Se recomienda eliminar de las reivindicaciones el término aproximadamente, debido a que dicho término resta precisión al objeto de invención puesto que es un término subjetivo cuyo significado no delimita la invención.
5. Las reivindicaciones 17, 21 y 23 no son claras pues ellas tratan de 2 ó 3 composiciones o 3 vectores diferentes, es decir, reclaman tres objetos de invención distintos. Para una mayor claridad se recomienda fraccionar cada una de estas reivindicaciones en tres donde cada una de las nuevas reivindicaciones se refiera tan solo a un objeto de invención y hacer que las reivindicaciones que dependen de la actual reivindicación 17, 21 ó 23 sean modificadas para que ellas se indiquen la dependencia de la correspondiente reivindicación modificada.
6. Las reivindicaciones 25 y 26 no son claras no es clara, ellas no define de manera precisa el objeto de la invención y por ende no cumple con el literal d) del artículo 13 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena donde se indica que: "Las solicitudes para obtener patentes de invención deberán presentarse ante la oficina nacional competente y deberán contener: Una o más reivindicaciones que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente". Es un hecho que un antígeno, en este caso un polipéptido determinado, puede unirse o enlazarse específicamente a más de un anticuerpo, por consiguiente, decir que el anticuerpo que se desea proteger es aquel que se une de manera específica a la proteína... no es suficiente información para establecer de manera precisa cual es el objeto para el que el solicitante desea

103
100

protección. Siendo que un anticuerpo es una proteína, se requiere que para lograr establecer de forma exacta cual es el objeto de la invención que dicho anticuerpo sea definido en función de la secuencia de aminoácidos que constituyen dicha proteína o del número de depósito mediante el cual se puede acceder a dicho anticuerpo, de lo contrario se requiere que se eliminen las reivindicaciones que hagan mención del anticuerpo pues sin los datos mencionados ellas no precisan el objeto de la invención.

Santa Fe de Bogotá,

/202016



430
2000-09-14

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 2000-34568

AUTO 1571

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

12 SEP 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C.] 4 SET. 2000
fecha.

notificado por anotación en estado de esta misma

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ____ NO ____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

202022