

00-34576  
12

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

Registración CS

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

**PATENTE DE INVENCION**

INVENTARIO

21. EXPEDIENTE No.

00-34576

54. TÍTULO Novedoso gen de lawsonia SSP y usos IV

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL CO 7K 14/195, C12N 15/31, A61K

71. SOLICITANTE 1. Agriculture Victoria Services Pty Ltd.  
2. pig research and development corporation  
3. Prizer Products Inc

DOMICILIO Australia, Australia, Estados Unidos

74. APODERADO Dilia Maria Rodriguez D' Aleman

22. BOGOTÁ, D. C., Mayo 12, 2000



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

00-34576

54. TITULO

Novedoso Gen de Lawsonia SSP. y usos

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

007K<sup>14</sup>/95, C12N<sup>15</sup>/31, A61K<sup>31</sup>/02

71. SOLICITANTE

1. Agriculture Victoria Services Pty Ltd.  
2. Pig Research and Development Corporation  
3. Pfizer Products Inc.

DOMICILIO

Australia, Australia, Estados Unidos

74. APODERADO

Dilia Maria Rodriguez D'Alaman

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

Mayo 12, 2000

202099

REPUBLICA DE COLOMBIA

SIC

SUPERINTENDENCIA

DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



00 34576

IT

IN

EN

REGISTRO DE PATENTES  
Radicación : 00024576 00000000  
Fecha (AMD) : 2000-05-12 15:52:02  
Trámite : 001 PATENTES I 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC  
Dependencia: 2020 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  
3) PFIZER PRODUCTS INC.

Nº de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Departamento o Estado

Ciudad

Dirección

- 1) AUSTRALIA  
2) AUSTRALIA  
3) ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA  
1) VICTORIA  
2) BURTON, TERRITORIO DE CAPITAL AUSTRALIANO  
3) GROTON, Estado de Connecticut  
1) 475 Mickleham road, Attwood, Victoria, 3049 Australia  
2) 3rd Floor, Industry House, 10 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory, 2600, Australia  
3) Eastern Point Road, Groton, Connecticut, 06240, Estados Unidos

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

Dirección

DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN  
Carrera 11 numero 93-43 oficina 404, SantaFe de Bogotá, S.A.

DATOS DEL INVENTOR Son (6) Inventores  
Nacionalidad

(72) Nombre del Inventor (es)

Dirección y Domicilio

- 1) Michael PANACCIO - Australiano  
2) Everett Lee Rosey - Estadoudinense  
3) Detlef HASSE - Australiano  
4) Meri SINISTAJ - Australiano  
5) Jim PARSONS - Australiano  
6) Robert Gerard ANKENBAUER - Estadoudinense  
1) VER AL RESPALDO

Identificación

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

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

PRIORIDAD REIVINDICADA

Sí ☒

No ☐

(33) ESTADOS UNIDOS

(32) MAYO 13, 1999

(31) Nº Solicitud 60/133.973  
Provisional

Fuente Normativa: Convenio de París Art.4º

CLASIFICACION INTERNACIONAL

C07K 14/195, C12N 15/31, A61K 39/02

SOLPA 337

SRR

## INVENTORES:

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

2) Everett Lee Rosey . Estadoudinense  
457 Route 164, Preston, Connecticut 06365, Estados Unidos

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

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

5) Jim PARSONS, Australiano  
11 Kanandah Court,  
Research, Victoria 3095, Australia

6) Robert Gerard ANKENBAUER - Estadoudinense  
104 Castle Hill Road,  
Pawcatuck, Connecticut 06379, Estados Unidos



2

# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

Radiacion : 00034576 00000000  
 NIT : 800171 Fecha (AMD): 2000-05-12 16:52:05 Folios: 100  
 Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO 411 PRESENTAC  
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 30,106  
 FECHA : MAYO 12 DE 2000

### \*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE                 | TIPO PAGO    | BANCO         | SUCURSAL | CUENTA      | Nº. PAGO | Vº. PAGO     |
|-----------------------------|--------------|---------------|----------|-------------|----------|--------------|
| CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | BOGOTA   | 050-00024-9 | 999472   | 2,400,000.00 |

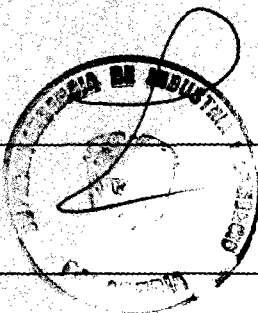
### \*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 400,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | 400,000.00     |

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 las composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de las enfermedades intestinales en animales y pájaros provocada o exacerbada por *Lawsonia intracellularis* o similar, o microorganismo relacionado. En particular, la presente invención provee un gen nuevo derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido, polipéptido o proteína FlgE que es particularmente útil como un antígeno en la preparación de una vacuna para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados con huéspedes animales. La presente invención también está dirigida a los métodos para el tratamiento y/o profilaxis de estas condiciones de las enfermedades intestinales y a los agentes para el diagnóstico y procedimientos para detectar *Lawsonia intracellularis* o similar o 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

☒

Titulo 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

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a las composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o la profilaxis de las condiciones de enfermedad intestinal en animales y pájaros provocado por *Lawsonia intracellularis* o similar u otro microorganismo relacionado. En particular, la presente invención provee un nuevo gen derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido inmunogénico, polipéptido o proteína. El polipéptido descrito aquí, designado como FlgE, o un homólogo del péptido, análogo o su derivado es particularmente útil como antígeno en la preparación de una vacuna para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y otros patógenos relacionados en los huéspedes animales. La presente invención también está dirigida a los métodos para el tratamiento y/o profilaxis de estas condiciones de enfermedad intestinal y a los agentes para el diagnóstico y procedimientos para detectar al *Lawsonia intracellularis* o similar o microorganismos relacionados de alguna manera.

### GENERAL

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas numéricamente en esta especificación se ofrecen al final de la descripción. Todas las patentes, solicitudes de patentes, y publicaciones citadas aquí se incorporan como referencia en su integridad.

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

204.724

pfc

Como se usa aquí, la palabra "flgE" o el término "gen flgE" se refiere al gen que codifica la proteína de gancho flagelar de la presente invención. También se

debe entender que el término "polipéptido flgE" se refiere a la proteína de gancho flagelar de la invención.

Como se usa aquí, el término "derivado de" indica que un producto especificado, en particular, una macromolécula como por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, gen o molécula de ácido nucleico, molécula de anticuerpo, fracción Ig, u otra macromolécula, o muestra biológica que comprende a dicha molécula, se puede obtener de una fuente particular, organismo, tejido, órgano o célula, aunque no necesariamente directamente de esa fuente, organismo, tejido, órgano o célula.

En toda esta especificación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprender" o variaciones como por ejemplo, "comprende" o "que comprende" se entenderá implican la inclusión de un paso o elemento o entero o grupo de pasos o elementos o enteros dados pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

Los expertos en el arte, apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes de aquellas específicamente descritas. También debe entenderse que la invención incluye a todas estas variaciones o modificaciones. La invención también incluye a todos los pasos, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de dos o más de dichos pasos, características, composiciones y compuestos.

La presente invención no está limitada al alcance por medio de las realizaciones específicas descritas aquí, que pretenden tener la finalidad de ejemplificar solamente. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención, como describimos aquí.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sector productor de carne de la industria agrícola depende de la salud de su ganado y existe la necesidad de mantener al ganado sano para el consumo humano. La industria queda sometida a un revés económico rápido como respuesta a las enfermedades que afectan al ganado de manera adversa y la calidad de los productos de carne derivados de él, incluyendo a aquellas enfermedades que potencialmente se pueden transmitir al hombre. Es importante, por lo tanto, tener tratamientos y profilaxis bien definidos y procedimientos de diagnóstico para tratar las infecciones e infecciones potenciales en los animales y los humanos.

Los productos de la carne derivados de porcinos y las especies avícolas son productos comerciales significativos en la industria agrícola. En particular, los cerdos conforman un componente principal de la industria de la carne. Sin embargo, los cerdos son sensibles a un amplio espectro de enfermedades intestinales referidas colectivamente como enteropatía proliferativa porcina (PPE). Estas enfermedades, han sido conocidas previamente como complejo adenomatosis intestinal (Barker y Van Drumel, 1985), adenomatosis intestinal porcina (PIA), enteritis necrótica (Rowland y Lawson, 1976), enteropatía hemorrágica proliferativa (Love y Love, 1977), ileitis regional (Jonsson y Martinsson, 1976), síndrome de intestino hemorrágico (O'Neil, 1970), enteritis proliferativa porcina y enteritis inducida por *Campylobacter* spp. (Straw, 1990).

Existen dos formas principales de PPE: una forma no hemorrágica representada por la adenomatosis intestinal que frecuentemente provoca el retardo del crecimiento y diarrea leve; y una forma hemorrágica, que a menudo es fatal, representada por la enteropatía hemorrágica proliferativa (PHE), donde el lumen distal del intestino delgado se vuelve atiborrado con sangre. Se ha informado la PPE en una cantidad de especies animales incluyendo a los cerdos

(McOrist et al., 1993), hámsteres (Stills, 1991), hurones (Fox et al, 1989), conejillo de Indias (Elwell et al, 1981), conejos (Schodeb y Fox, 1990) así como también las especies avícolas (Mason et al., 1998).

El organismo que provoca la Patente estadounidense N° es un organismo tipo *Camphylobacter* referido aquí como "*Lawsonia intracellularis*" (McOrist et al., 1995). El organismo también ha sido previamente referido como *Ileal symboint intracellularis* (Stills, 1991). Las enfermedades tipo PPE en los cerdos también pueden ser provocadas por otros patógenos como por ejemplo, diversas especies de *Camphylobacter* (Gebhart et al., 1983).

*Lawsonia intracellularis* es una bacteria intracelular, posiblemente intracelular ligada. Sólo se puede cultivar in vitro con células de cultivo de tejido (Jones et al., 1997; Lawson et al., 1993); McOrist et al, 1995; solicitud de Patente internacional Nr PCT/US 96/09576).

*L. intracelullaris* está ubicada en el citoplasma de las células vello y células folículo intestinales de los animales infectados. Los cerdos que sufren de PPE están caracterizados por irregularidades en las células vello y estructura folicular intestinal con displasia de célula epitelial, donde se forman abscesos foliculares al irse ramificando los folículos vellosos e intestinales y se llenan de células inflamatorias.

La PPE es un componente significativo en los costos asociados con la industria del cerdo, especialmente en términos de pérdida de stock, costos de medicación, velocidades de crecimiento reducidas en cerdos y costos aumentados en la alimentación. La PPE también colabora con los costos indirectos por ejemplo, por ejemplo, los costos de mano de obra adicional y costos ambientales para tratar la contaminación residual de antibióticos, y las medidas de control para prevenir que el organismo pase a o sea llevado hacia otros animales y humanos.

Las estrategias normales de control de PPE recaen en el uso de antibacterianos. Sin embargo, esta estrategia es considerada a corto o mediano plazo, especialmente debido a que las presiones reguladoras gubernamentales tienden a desalentar las prácticas de cría de animales que incluyen el uso de antibióticos profilácticos. Existe, por lo tanto, la necesidad de desarrollar alternativas efectivas, seguras y a bajo costo del uso de antibióticos y, en particular, al desarrollo de vacunas capaces de conferir una inmunidad protectora contra la infección por *Lawsonia intracellularis* en los animales para ganado.

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

De acuerdo con esto, existe la necesidad de identificar los antígenos altamente inmunogénicos producidos por la bacteria *Lawsonia intracellularis*.

La solicitud de Patente internacional NR PCT/AU 96/00767 describe varias secuencias genéticas parciales de *L. intracellularis*, y los polipéptidos parciales codificados. Sin embargo, existe la necesidad de identificar inmunogenes de polipéptidos producidos por medio de la bacteria *L. intracellularis* y péptidos inmunogénicos derivados, incluyendo a aquellos inmunogenes que son específicos de género o especie, para usar en las composiciones mejoradas de vacunas.

## SÍNTESIS DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención está dirigido a un polipéptido aislado o recombinante inmunogénico que comprende, imita o tiene reacción cruzada con una célula B o epítipo de célula T del polipéptido FlgE derivado de *Lawsonia spp.* Preferentemente, el polipéptido inmunogénico aislado o recombinante se selecciona del grupo formado por lo siguiente:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos alrededor del 60% de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende al menos alrededor de 5 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido definida por el Nr ID de SEC: 1;

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii) que imita un epítipo de célula B o de célula T de *Lawsonia spp.*

En una realización preferida, el polipéptido comprende o está formado esencialmente por la secuencia de aminoácido Nr ID de SEC: 1.

Otro aspecto de la invención provee una composición para vacuna para la profilaxis o tratamiento de la infección en un animal, como por ejemplo, un cerdo o pájaro, por *L. intracellularis* o un microorganismo similar o relacionado, dicha composición para vacuna comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1, o comprende al menos 5 aminoácidos contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1 o, un homólogo inmunogénico, análogo o su derivado que tiene reacción inmunológicamente cruzada con *Lawsonia intracellularis*, y uno o más portadores, diluyentes y/o adyuvantes adecuados para el uso veterinario o farmacéutico.

En una realización preferida, el polipéptido de la composición para vacuna comprende y está formado esencialmente por la secuencia de aminoácido de la Nr ID de SEC: 1.

Otro aspecto de la invención se extiende a una molécula inmunológicamente interactiva, como por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que sea capaz de enlazarse al polipéptido inmunogénico de la invención.

Otro aspecto de la invención provee un método para el diagnóstico de la infección de un animal por *Lawsonia intracellularis* o microorganismo relacionado, dicho método comprende el paso de hacer contactar una muestra biológica derivada de dicho animal con una molécula inmunológicamente interactiva de la presente invención durante un tiempo y bajo las condiciones suficientes para un complejo, como por ejemplo, un complejo antígeno : anticuerpo, para formar y luego detectar dicha formación compleja.

Otro aspecto de la presente invención contempla un método para determinar si el animal ha sufrido o no de una infección anterior, o si está normalmente infectado, por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado, dicho método comprende hacer contactar un tejido o muestra de fluido, como por ejemplo, sangre o suero derivado de dicho animal, con el polipéptido inmunogénico de la invención durante un tiempo y bajo las condiciones suficientes para que un complejo, como por ejemplo, un complejo antígeno : anticuerpo, forme y luego detecte dicha formación compleja.

Otro aspecto de la presente invención provee una molécula de ácido nucleico aislada 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 al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr. ID de SEC: 1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende al menos alrededor de 5 aminoácidos contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii), que imita al epítopo de célula B o célula T de *Lawsonia spp.*

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada comprende a la secuencia de nucleótido determinada en el Nr ID de SEC: 2, o su variante degenerada, tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia en toda o parte de ella.

Incluso otro aspecto de la invención provee un método de diagnóstico para detectar *Lawsonia intracellularis* o 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 derivado de la secuencia de nucleótido determinada en el Nr ID de SEC: 2 o su secuencia de nucleótido complementaria o un homólogo, análogo o su derivado, a 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 una reacción de hibridación o amplificación basada en el ácido nucleico.

Otro aspecto de la invención provee una sonda o cebador aislado derivado del Nr ID de SEC: 2 o su secuencia de nucleótido complementaria.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una representación esquemática comparada con la secuencia de aminoácido de FlgE de proteína de gancho flagelar de *Lawsonia intracellularis* (l. int.) con las secuencias de aminoácido de proteínas de gancho flagelar derivada de *Treponema phagedenis* (T. Fago), *Treponema pallidum* (T. Palli),

*Salmonella typhimurium* (S. typhi), *Escherichia coli* (E. Coli), *Aquifex aeolicus* (A. Aeo), *Vibrio parahaemolyticus* (V. parah) y *Borrelia burgdorferi* (B. Burgd). Se han introducido las brechas para optimizar la alineación. Las posiciones que contienen a los residuos de aminoácido idénticos con respecto al polipéptido FlgE de *Lawsonia intracellularis* (Nr ID de SEC: 1) están sombreadas. Los residuos que son idénticos en todas las ocho secuencias aparecen en negritas.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Durante el trabajo llevado a cabo para la presente invención, los inventores buscaron identificar las proteínas inmunogénicas de *Lawsonia intracellularis* para usar en las vacunas para la profilaxis y el tratamiento del PPE en animales, incluyendo cerdos y pájaros.

De acuerdo con esto, un aspecto de la invención está dirigido a un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante que comprende, imita o hace la reacción entrecruzada con un epítipo de célula B o de célula T del polipéptido FlgE 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 que se enlazan al anticuerpo (epítopes de célula B) incluyen a los epítopes lineales así como también conformacionales (van Regenmortel, 1992). Los epítopes de célula B son predominantemente conformacionales. En contraste, las células T reconocen secuencias de epítipo predominantemente lineales en combinación con las moléculas MHC de clase II.

Una identificación precisa y una selección cuidadosa de epítopes de *Lawsonia spp.*, facilita el desarrollo de reactivos para diagnóstico y composiciones para vacuna para el tratamiento o profilaxis efectiva de las infecciones por *Lawsonia*. La identificación y caracterización del epítipo (por ejemplo, la determinación del peso molecular, secuencia de aminoácido y estructura de epítopes de *Lawsonia spp.*) se puede realizar usando las técnicas reconocidas en

el arte. Para la detección de epítopes conformacionales, se puede evitar la degradación y desnaturalización de la molécula del epítope para conservar la estructura tridimensional, debido a que la reacción antígeno-anticuerpo disminuirá si la estructura secundaria del epítope se altera de manera significativa. EN la práctica, la caracterización y aislamiento de los epítopes no conformacionales lineales es más fácil, debido a que cualquier región inmunoreactiva está contenida dentro de un solo fragmento de péptido o una sola secuencia de aminoácido que se capaz de ser purificada bajo un rango de condiciones.

Se pueden identificar tanto los epítopes no conformacionales como conformaciones en virtud de su capacidad para enlazar cantidades detectables de anticuerpos (como por ejemplo, IgM o IgG) del suero de animales inmunizados contra o infectados con *Lawsonia spp.*, y, en particular, *L. intracellularis*, o un polipéptido aislado derivado o, alternativamente, en virtud de su capacidad para enlazarse a cantidades detectables de anticuerpos en una fracción Ig purificada derivada de ese suero. Los anticuerpos pueden derivar de o estar contenidos en pools de suero policlonal, o pueden ser anticuerpos monoclonales. También se pueden utilizar los fragmentos del anticuerpo o anticuerpos recombinantes, como por ejemplo, aquellos expresados sobre la superficie de un bacteriófago o partícula de virus, como por ejemplo, en la biblioteca de fagos.

La determinación de los epítopes de célula T se puede realizar analizando al capacidad de los péptidos del epítope para inducir la proliferación de linfocitos de sangre periférica o clones de célula T. La identificación de los epítopes de célula T se logra usando una variedad de métodos como se sabe en la técnica, incluyendo el uso de una proteína antigénica recombinante o natural entera o fragmentada, así como también el método más comúnmente utilizado de "traslapo de péptido". En este último método, los péptidos que se traslapan se extienden sobre la secuencia completa de un polipéptido derivado de *Lawsonia spp* se sintetizan y se

prueban en su capacidad para estimular las respuestas citotóxicas o proliferativas de la célula T *in vitro*.

La determinación de la estructura de tanto los epítopes conformacionales no lineales como lineales no conformacionales se puede realizar por medio de la espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis cristalográfico por rayos X. La determinación de epítopes usando las técnicas por rayos X requieren de la cristalización de un complejo proteína – anticuerpo, mientras que la RMN permite el análisis del complejo en estado líquido. La RMN mide la cantidad de aminoácidos así como también la cercanía de protones de diferentes residuos aminoácidos, donde el efecto alternador de dos protones a lo largo de la cadena principal de carbono es característico de un epítope particular.

Un método exitoso para reconocer los epítopes lineales no conformacionales es el inmunoblot y, en particular, el Western Blot. Los péptidos se pueden generar de un polipéptido de *Lawsonia* spp. completo por medio de la digestión con las proteasas específicas de un sitio, como por ejemplo, la tripsina o quimiotripsina, y los péptidos generados de este modo se pueden separar usando los procedimientos electroforéticos o cromatográficos estándar. Por ejemplo, después de la electroforesis de acuerdo con el peso molecular usando SDS/PAGE (electroforesis en gel SDS / poliacrilamida) y/o de acuerdo con el punto isoeléctrico usando IEF (enfoque isoeléctrico) o alternativamente, por medio de la electroforesis bidimensional, los péptidos se pueden transferir para inmovilizar las membranas de nylon o nitrocelulosa y se pueden incubar con suero desarrollado contra los polipéptidos intactos. Los péptidos que comprenden regiones inmunogénicas (es decir, epítopes de célula B o de célula T) están unidos por los anticuerpos en el suero y se pueden detectar los anticuerpos enlazados usando los anticuerpos secundarios, como por ejemplo, los anticuerpos anti-IgG, que han sido rotulados radiactivamente o enzimáticamente. Los epítopes luego se pueden

caracterizar por purificación basándose en su tamaño, carga o capacidad para enlazarse específicamente a los anticuerpos contra el polipéptido intacto, usando una o más de las técnicas, como por ejemplo, la cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía por afinidad o ELISA entre otros. Después de la purificación del epítipo, sólo una banda o punto debe ser detectable con la electroforesis del gel. El N-terminal o secuenciado total del péptido ofrece la posibilidad de comparar el péptido con las proteínas conocidas en las bases de datos.

Ahora se han diseñado varios algoritmos por computadora para buscar los epítopes de célula T en las proteínas (Margalit et al, 1987; Bajad y C. DeLisi, 1990; Altuvia et al., 1994; Parker et al., 1994; DeGroot et al., 1995; Gabriel et al, 1995; Meister et al., 1995). Estos algoritmos buscan la secuencia de aminoácido de una proteína dada de acuerdo con las características que se creen son comunes a los péptidos inmunogénicos, localizando las regiones que probablemente inducen una respuesta inmune celular, *in vitro*. Los algoritmos por computadora pueden identificar las regiones de un polipéptido *Lawsonia* spp que contienen epítopes que son menos variables entre los diferentes aislados. Alternativamente, los algoritmos por computadora pueden identificar rápidamente las regiones de las proteínas más variables del aislado que deben incluirse en una vacuna multivalente.

El algoritmo AMPHI (Margalit et al., 1987) que está basado en la periodicidad de los epítopes de célula T ha sido utilizado ampliamente para la predicción de sitios antigénicos de célula T solamente de la información de secuencia. Esencialmente, el AMPHI describe un diseño estructural común de motivos de enlace MHC, ya que los motivos de enlace MHC (es decir, los patrones de aminoácidos que parecen ser comunes a la mayoría de los péptidos que se enlazan a una molécula MHC) parecen exhibir la misma periodicidad que la hélice

alfa. La identificación de los epítopes de célula T utilizando los motivos de enlace MHC en una secuencia de aminoácido provee 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 enlace MHC agrupados en las secuencias de aminoácido de las proteínas, basados en la correlación entre las regiones densas de motivos de enlace MHC y los péptidos que pueden tener la capacidad de enlazarse a una variedad de moléculas MHC (aglutinantes promiscuos o multi-determinantes) y estimular una respuesta inmunológica entre estos diversos contextos MHC también (epítopes promiscuos o multi-determinantes). El algoritmo EpiMer utiliza una biblioteca de motivos de enlace MHC para los alelos múltiples de clase I y clase II HLA para predecir los sitios antigénicos dentro de una proteína que tiene el potencial de inducir una respuesta inmunológica en los sujetos con una variedad de entornos genéticos. EpiMer ubica las coincidencias para cada motivo de enlace MHC dentro de la secuencia primaria de un antígeno de proteína dado. La densidad relativa de estas coincidencias de motivo está determinada a lo largo de la longitud del antígeno, resultando en la generación de un histograma de densidad de motivo. Finalmente, el algoritmo identifica las regiones de la proteína en este histograma con una densidad de coincidencia de motivo superior al valor de densidad de corte definido por el algoritmo, y produce una lista de sub-secuencias que representan a estas regiones agrupadas o ricas en motivos. Las regiones seleccionadas por EpiMer, tienen más probabilidades de actuar como péptidos de enlace multi-determinantes que los péptidos elegidos del mismo antígeno, debido a su concentración de coincidencias de motivo de enlace MHC. La selección de las regiones que son densas en motivos de enlace MHC aumenta la probabilidad de que el péptido predicho contenga un motivo "válido" y,

por lo tanto, que la reiteración de motivos idénticos pueda contribuir al enlace del péptido.

Los algoritmos basados en el motivo de enlace MHC han sido descritos por Parker et al (1994) y Altuvia et al (1994). En estos algoritmos, el enlace a una molécula MHC dada se predice por medio de una función lineal de los residuos en cada posición, basada en los parámetros empíricamente definidos, y, en el caso del algoritmo Altuvia et al (1994), también se pueden tomar en consideración las estructuras cristalográficas conocidas.

Los métodos recombinantes ofrecen la oportunidad de obtener epítopes bien caracterizados de elevada pureza para la producción de reactivos de diagnósticos y formulaciones de vacuna específica del epítope (Mohapatra et al., 1995). Basándose en la secuencia de aminoácido de un epítope y en la identificación de la correspondiente secuencia de nucleótido que la codifica, se puede realizar la reacción de cadena de polimerasa (PCR) para amplificar la región que codifica al epítope del cADN. Después de clonar y de la expresión en un sistema vector / huésped adecuado, se puede extraer una gran cantidad de epítopes de elevada pureza. De acuerdo con esto, la presente invención se extiende claramente tanto a los polipéptidos no recombinantes aislados y polipéptidos recombinantes en una forma impura y aislada.

El término "polipéptido" como se usa aquí se refiere a cualquier polímero formado por aminoácidos enlazados por enlaces covalentes e incluye dentro de su alcance a las proteínas de longitud completa y sus partes o fragmentos como por ejemplo, oligopéptidos y secuencias de péptido cortas formadas por al menos alrededor de 5 residuos de aminoácido, preferentemente al menos alrededor de 10 residuos de aminoácido, más preferentemente al menos alrededor de 12 residuos de aminoácido, e incluso más preferentemente al menos alrededor de 15 residuos de aminoácido. Además, se incluye dentro del alcance de la definición

de un "polipéptido" las variantes de secuencia de aminoácido, que contienen una o más sustituciones de aminoácido preferentemente conservativas, eliminaciones o inserciones, que no alteran al menos una propiedad esencial de dicho polipéptido como por ejemplo, su inmunogenicidad, el uso como reactivo para diagnóstico o efectividad como una vacuna de péptido contra *Lawsonia spp*, entre otras. De acuerdo con esto, un polipéptido se puede aislar de una fuente en la naturaleza, o se puede sintetizar químicamente. Más aun, un polipéptido puede derivar de una proteína de longitud completa por medio de la separación químico o enzimático, usando reactivos como por ejemplo, CNBr, tripsina o quimiotripsina, entre otros.

Las sustituciones de aminoácido conservativas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede sustituir de manera conservativa uno o más residuos de aminoácido de una proteína de gancho flagelar natural de la presente invención con un residuo de aminoácido de carga, tamaño o polaridad similar, el polipéptido resultante retiene la capacidad de funcionar como vacuna o como reactivo para el diagnóstico como describimos aquí. Las reglas para preparar estas sustituciones incluyen a aquellas descritas por Dayhof (1978). Más específicamente, las sustituciones de aminoácido conservativo son aquellas que generalmente tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados generalmente se dividen 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, aspargina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. También se clasifican conjuntamente la fenilalanina, tirosina y triptofano como aminoácidos aromáticos. Uno o más reemplazos con cualquier grupo particular, como por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina o valina o alternativamente, la sustitución de

aspartato por glutamato o treonina por serina, o de cualquier otro residuo aminoácido con un residuo aminoácido estructuralmente relacionado, generalmente tendrá un efecto significativo sobre la función del polipéptido resultante.

La presente invención no está limitada por la fuente del inmunogen objetivo y se extiende claramente a los polipéptidos aislados o recombinantes que derivan de una fuente natural o no natural.

El término "polipéptido recombinante" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que se produce in vitro o en una célula huésped por medio de la expresión de una secuencia genética que codifica a dicho polipéptido, cuya secuencia genética está bajo el control de un promotor adecuado, donde se ha realizado la manipulación genética para lograr dicha expresión. De acuerdo con esto, el término "polipéptido recombinante" incluye claramente a los polipéptidos producidos por medio de la expresión de secuencias genéticas contenidas en los vectores virales, cósmidos o plásmidos que han sido introducido en las células, tejidos u órganos procarióticos o eucarióticos. Las manipulaciones genéticas que pueden usarse en este contexto son conocidas por los entendidos en la materia e incluyen, pero no están limitadas a, el aislamiento de ácido nucleico, digestión de endonucleasa de restricción, digestión de exonucleasa, relleno usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. Coli o enzimas de polimerasa T4 ADN, la terminación roma de las moléculas de ADN usando la polimerasa T4 ADN o enzimas ExoIII, mutagénesis dirigida al sitio, ligadura y reacciones de amplificación. Como conocen los expertos en la técnica, las técnicas adicionales como por ejemplo, las hibridaciones de ácido nucleico y análisis de secuencia de nucleótido también se pueden utilizar en la preparación de polipéptidos recombinantes, al confirmar la identidad de una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido recombinante deseado y una construcción genética que

comprende a la molécula de ácido nucleico. Cuando el polipéptido de la presente invención es un polipéptido recombinante, se puede producir en y, convenientemente, aislar de un sistema de expresión de vector viral recombinante o célula huésped. Como saben los expertos en la técnica, una célula para la producción de un polipéptido recombinante se selecciona sobre la base de varios parámetros incluyendo a las construcciones genéticas usadas para expresar el polipéptido bajo consideración, así como también la estabilidad y actividad de dicho polipéptido. Los expertos en la materia también saben que la estabilidad o actividad de un polipéptido recombinante se puede determinar, al menos en parte, por medio de modificaciones post-traduccionales del polipéptido como por ejemplo, la glicosilación, acilación o reacciones de alquilación, entre otras, que pueden variar entre las líneas celulares usadas para producir el polipéptido recombinante.

De acuerdo con esto, en una realización particularmente más preferida, la presente invención se extiende a un polipéptido recombinante o un derivado, homólogo o su análogo presente en una partícula de virus, o producido en una célula huésped procariótica o eucariótica, o en un virus o su cultivo celular.

La presente invención también se extiende a un polipéptido recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores que se produce en una célula bacteriana perteneciente al género *Lawsonia*, en particular una célula de *L. intracellularis*, o su cultivo.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la presente invención que ha sido purificado hasta cierto punto, preferentemente hasta al menos alrededor del 20 % en peso de la proteína, preferentemente hasta al menos alrededor del 50 % en peso de la proteína, más preferentemente hasta al menos alrededor del 60 % en peso de la proteína, incluso más preferentemente hasta al menos alrededor del 70 % en peso de la proteína e incluso, más

preferentemente hasta al menos alrededor del 80 % en peso de la proteína o más, de su fuente natural o, en el caso de los polipéptidos no naturales, del medio de cultivo o entorno celular donde se produjo. Este aislamiento se puede realizar para mejorar la inmunogenicidad del polipéptido de la presente invención, o para mejorar la especificidad de la respuesta inmunológica contra ese polipéptido, o para remover los contaminantes tóxicos o los no deseados. El grado necesario o requerido de pureza de un polipéptido aislado puede variar dependiendo del propósito pretendido para el polipéptido, y para muchas aplicaciones será suficiente para la preparación del polipéptido que no contenga contaminantes que podrían reducir la inmunogenicidad del polipéptido cuando se administra a un animal huésped, en particular un animal, cerdo o ave, a ser inmunizado contra PPE, o alternativamente, que podría inhibir el enlace inmuno-específico en un inmunoensayo para el diagnóstico de PPE o su agente causal.

La pureza de un polipéptido aislado de la presente invención se puede determinar por cualquiera de los medios conocidos por los conocedores de la técnica, incluyendo el grado de homogeneidad de una preparación de proteína clasificada por electroforesis de gel SDS / poliacrilamida, electroforesis bidimensional, o análisis de composición del aminoácido o análisis de secuencia.

Preferentemente, el polipéptido de la presente invención será sustancialmente homogéneo o sustancialmente libre de proteínas no específicas, clasificados por electroforesis de gel SDS / poliacrilamida, electroforesis bidimensional, o análisis de composición del aminoácido o análisis de secuencia.

El polipéptido de la presente invención se puede purificar para usar como un componente de una composición para vacuna por medio de una o una combinación de métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, la cromatografía de fase inversa, HPLC, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía por afinidad, entre otras.

En una realización preferida, el polipéptido aislado o recombinante de la invención funciona como proteína de gancho flagelar en una bacteria como por ejemplo, *L. intracellularis*, o deriva de una proteína de gancho flagelar o, alternativamente, produce reacción inmunológicamente cruzada con la proteína de gancho flagelar *L. intracellularis*, FlgE de la presente invención.

En una realización particularmente preferida, el polipéptido aislado o recombinante de la presente invención deriva de *Lawsonia spp* u otro agente patogénico asociado con el inicio y/o el desarrollo de PPE y más preferentemente, el polipéptido objetivo deriva de *Lawsonia intracellularis*.

Un epítipo de célula B o célula T de un polipéptido FlgE o su derivado, homólogo o análogo puede comprender cualquier combinación de lo siguiente:

(i) la secuencia aminoácida primaria de un polipéptido FlgE, conocida en la técnica como un epítipo continuo no conformacional;

(ii) la estructura secundaria que adopta el polipéptido FlgE, conocida en la técnica como un epítipo continuo conformacional;

(iii) la estructura terciaria que adopta un polipéptido FlgE en contacto con otra región de la misma molécula de polipéptido, conocida en la técnica como un epítipo discontinuo conformacional; o

(iv) la estructura cuaternaria que el polipéptido FlgE adopta en contacto con una región de otra molécula de polipéptido, conocida en la técnica como un epítipo discontinuo conformacional.

De acuerdo con esto, los polipéptidos o derivados inmunogénicos, los homólogos o análogos que los comprenden, o sustancialmente la misma secuencia de aminoácido primaria se definen de ahora en más como "inmunogenes que comprenden un epítipo de célula B o de célula T" o término similar.

Los polipéptidos o derivados inmunogénicos, sus homólogos o análogos que comprenden muchas secuencias de aminoácido primaria diferentes pueden comprender inmunogenes inmunológicamente idénticos, debido a que poseen epítopes de célula B o de célula T conformacionales que son reconocidos por el sistema inmunológico de una especie huésped como idénticos. Estos polipéptidos inmunogénicos o derivados, sus homólogos o análogos se denominan de ahora en adelante como "inmunogenes que imitan o tienen reacción cruzada con un epítope de célula B o de célula T", o término similar.

De acuerdo con esto, la presente invención se extiende hasta un inmunogen que comprende, imita o tiene reacción cruzada con un epítope de célula B o de célula T de un polipéptido aislado o recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores o su derivado, homólogo o análogo. EN una realización particularmente preferida, la presente invención provee un inmunogen que comprende, imita, o tiene reacción cruzada con un epítope de célula B o de célula T de un polipéptido aislado o recombinante que en su forma natural se obtiene de una especie de *Lawsonia* como por ejemplo, pero no limitado a *L. intracellularis* y cuyo polipéptido preferentemente funciona como proteína de gancho flagelar.

Preferentemente, estos polipéptidos inmunogénicos no comprenderán una secuencia de aminoácido primaria que está altamente conservada entre *L. intracellularis* y otro microorganismo no patogénico que normalmente está residente en el intestino u otro órgano de un animal, en particular un animal, cerdo o ave. La importancia de esta exclusión de aquellas realizaciones de la invención donde la especificidad es esencial para el rendimiento (por ejemplo, aplicaciones de vacuna y diagnóstico) será obvia para el experto en la materia.

A este respecto, los presentes inventores han demostrado que la secuencia de aminoácido N-terminal del polipéptido FlgE derivado de *L. intracellularis* y la

región 5' del gen *flgE* correspondiente están menos conservadas entre los genes homólogos y polipéptidos derivados de otras especies, comparados con la región C-terminal del polipéptido FlgE *L. intracellularis* y la región 3' del gen *flgE*. De acuerdo con esto, la región N-terminal del polipéptido FlgE es un inmunogen particularmente preferido para usar en los protocolos de vacunación y como reactivos para el diagnóstico con respecto a *L. intracellularis*. De manera similar, el extremo 5' del gen *flgE* se prefiere particularmente para usar como reactivo para el diagnóstico para *L. intracellularis*.

Para mejorar la inmunogenicidad de un polipéptido objetivo de la presente invención se pueden agregar uno o más aminoácidos no correspondientes a la secuencia de proteína original al término amino o carboxilo del polipéptido. Estos aminoácidos extra son útiles para unir el polipéptido a otro péptido o polipéptido, a una proteína portadora grande o un soporte sólido. Los aminoácidos que son útiles para esta finalidad incluyen, pero no están limitados a la tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y sus derivados. Las técnicas de modificación de proteína adicional pueden ser usadas, por ejemplo, NH<sub>2</sub>-acetilación o amidación COOH-terminal, para proporcionar un medio adicional para unir el polipéptido a otro polipéptido, proteína, o molécula de péptido o a un soporte sólido. Los procedimientos para los polipéptidos de unión entre sí, o a proteínas portadoras o soportes sólidos, son conocidos en la técnica. Los polipéptidos que contienen los residuos de aminoácido extra anteriormente mencionados en cualquiera de los terminales carboxilo o amino y tanto unidos o no a un portador o soporte sólido, están consecuentemente, dentro del alcance de la presente invención.

Más aun, el polipéptido se puede inmovilizar en un portador polimérico o material de soporte.

En una realización alternativa, la inmunogenicidad de un polipéptido de la presente invención se puede mejorar usando las técnicas de la biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene uno o más polipéptidos de la presente invención fusionados a moléculas portadoras como por ejemplo, una proteína altamente inmunogénica. Por ejemplo, una proteína de fusión que contiene un polipéptido de la presente invención fusionado a la subunidad B altamente inmunogénica de la toxina del cólera se puede usar para aumentar la respuesta inmunológica al polipéptido. La presente invención también contempla las proteínas de fusión que comprenden una citoquina, como por ejemplo, una interleuquina, fusionada al polipéptido objetivo de la presente invención, y genes que la codifican.

Preferentemente, el polipéptido de la presente invención, o su derivado, homólogo o análogo, cuando se administra a un mamífero, induce una respuesta inmunológica en dicho mamífero. Más preferentemente, el polipéptido de la presente invención, cuando se administra a un mamífero, en particular a un animal porcino (por ejemplo, un cerdo) induce una respuesta inmunológica protectora contra *Lawsonia spp.*, y preferentemente contra *L. intracellularis*. Como se usa aquí, la frase "inducción de una respuesta inmunológica protectora", y similares, se refiere a la capacidad del polipéptido administrado de la presente invención para prevenir o aminorar el inicio, desarrollo o progresión de los síntomas asociados con la infección por *Lawsonia*, y preferentemente para prevenir o aminorar el inicio, desarrollo o progresión de síntomas asociados con PEE en los cerdos.

Preferentemente, el polipéptido inmunogénico de la invención comprende una secuencia de aminoácido que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o tiene al menos un 60 % de identidad total con el Nr ID de SEC: 1, o tiene a menos un 75 % de identidad con

al menos 8 aminoácidos contiguos del NR ID de SEC: 1. En una realización preferida, el polipéptido inmunogénico de la presente invención está formado esencialmente por la secuencia de aminoácido del Nr ID de SEC: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica FlgE presente en pALK11 (ATCC 207156).

Por la nomenclatura, la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 representa la secuencia de aminoácido del polipéptido FlgE codificada por el gen *Lawsonia intracellularis* FlgE. La secuencia del nucleótido del gen *L. intracellularis* FlgE está determinada en el Nr ID de SEC: 2.

Preferentemente, la identidad porcentual de la secuencia de aminoácido con respecto al Nr ID de SEC: 1 es de al menos alrededor del 70 %, más preferentemente al menos alrededor del 80 %, incluso más preferentemente al menos alrededor del 90 % e incluso más preferentemente al menos alrededor del 95 %.

Para determinar si dos secuencias de aminoácido están dentro de estos límites porcentuales o no, los conocedores de la técnica, reconocerán que es necesario llevar a cabo una comparación lado a lado o una alineación múltiple de secuencias. En estas comparaciones o alineaciones, surgirán diferencias en el posicionamiento de los residuos no idénticos, dependiendo en el algoritmo usado para realizar la alineación. En el contexto presente, se tomarán referencias a la identidad o similitud de secuencia porcentual entre dos o más secuencias de aminoácido para referirse a la cantidad de residuos idénticos o similares respectivamente, entre dichas secuencias determinadas usando cualquiera algoritmo estándar conocido para los entrenados en la técnica. Por ejemplo, las identidades o similitudes de secuencia de aminoácido se pueden calcular usando el programa GAP de Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América (Devereaux et al, 1984). El

26

programa GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunchs (1970) para maximizar la cantidad de residuos idénticos / similares y para minimizar la cantidad y/o longitud de las brechas de secuencia en la alineación. Alternativamente o además, cuando se comparan más de dos secuencia de aminoácido, se puede usar el programa ClustalW de Thompson et al (1994).

En una realización alternativa, la presente invención provee un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante que comprende, imita o tiene reacción cruzada con un epítipo de célula B o de Célula T del polipéptido FlgE derivado de *Lawsonia spp.*, donde dicho polipéptido inmunogénico aislado o recombinante comprende una secuencia de aminoácido que comprende al menos 5 residuos de aminoácido contiguos del Nr ID de SEC: 1 o su homólogo, análogo o derivado.

Preferentemente, el polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la invención comprende al menos alrededor de 10 aminoácidos contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1, más preferentemente al menos alrededor de 20 residuos aminoácido contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1, incluso más preferentemente al menos 30 residuos de aminoácido contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1 e incluso más preferentemente, al menos alrededor de 40 residuos de aminoácido contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1.

La presente invención además incluye a los homólogos, análogos o derivados de un polipéptido que comprenden una secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1.

Los "homólogos" de un polipéptido son aquellos polipéptidos que contienen sustituciones, eliminaciones y/o agregados de aminoácido relacionados con el polipéptido sin alterar una o más de sus propiedades, como por ejemplo, su inmunogenicidad, actividad biológica o actividad catalítica. En estas moléculas, se pueden reemplazar los aminoácidos por otros aminoácidos que tienen propiedades similares como por ejemplo, la hidrofobicidad, hidrofiliidad,

momento hidrofóbico, antigenicidad, propensión a formar o romper estructuras  $\alpha$ -helicoidales de estructuras  $\beta$ -laminares y demás.

Las variantes sustituyentes son aquellas en las que al menos un residuo en la secuencia ha sido removido y se insertaron en su lugar diferentes residuos. Las sustituciones de aminoácido típicamente son de residuos simples, pero se pueden agrupar dependiendo de las restricciones funcionales sobre el polipéptido, las inserciones usualmente serán del orden de alrededor de 1-10 residuos de aminoácido, y las eliminaciones estarán dentro de un rango de alrededor de 1-20 residuos. Preferentemente, las sustituciones de aminoácido comprenderán sustituciones de aminoácido conservativo, como por ejemplo, aquellas descritas arriba.

Las variantes de secuencia de aminoácido para insertar son aquellas donde uno o más residuos de aminoácido se introducen en un sitio predeterminado en la proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones amino-terminales y/o carboxi-terminales así como también inserciones intra-secuencia de aminoácidos simples o múltiples. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácido serán más pequeñas que las fusiones amino o carboxilo terminal, del orden de alrededor de 1 a 4 residuos.

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

Las variantes de aminoácido del polipéptido de la presente invención se pueden realizar rápidamente usando las técnicas sintéticas del péptido conocidas en la técnica, como por ejemplo, la síntesis de péptido de fase sólida y similares, o por medio de las manipulaciones de ADN recombinante. La manipulación de las secuencias de ADN para producir proteínas variantes que se manifiesten como variantes sustitutivas, para inserción o eliminación son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para preparar mutaciones de sustitución en sitios

predeterminados en el ADN que tengan la secuencia conocida son conocidas por lo expertos en la materia, como por ejemplo, la mutagénesis M13 u otro protocolo de mutagénesis dirigida al sitio.

Los "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 no naturales o modificados como bien sabe el experto en la materia. De acuerdo con esto, un "análogo" como se define aquí, no necesita comprender una secuencia de aminoácido que sea similar a la secuencia de aminoácido determinada aquí como por ejemplo, péptido, oligopéptidos y polipéptidos que derivan de predicciones por computadora o datos empíricos que revelan la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del polipéptido de la presente invención, y que por lo tanto, no comprendan a la misma secuencia de aminoácido de dicho polipéptido, aunque, sin embargo, imita o tiene reacción cruzada con el epítipo de célula B o de célula T de *Lawsonia* spp., y preferentemente imita o tiene una reacción cruzada con el epítipo de célula B o de célula T de *Lawsonia intracellularis*.

Por ejemplo, los mimótopes (análogos de polipéptido que reaccionan en forma cruzada con un epítipo de célula B o de célula T del péptido *Lawsonia* de la invención, comprenden una secuencia de aminoácido diferente a dicho epítipo) se pueden identificar seleccionando las secuencias de aminoácido aleatorias en las bibliotecas de péptidos con anticuerpos que se enlazan al epítipo de célula T o de célula B deseado. Como con las técnicas para la identificación de los epítopes de célula B o de célula T como describimos arriba, los anticuerpo utilizados para identificar estos mimótopes pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales o recombinantes, en la forma cruda o purificada. Los mimótopes de epítipo de célula T luego se pueden probar en su capacidad para estimular las respuestas citotóxicas o proliferativas in vitro. Los mimótopes son particularmente

útiles como análogos de los epítopes no lineales (es decir, conformacionales) del polipéptido de la presente invención, debido a que los epítopes conformacionales generalmente se forman de las regiones no contiguas en un polipéptido, y los mimótopes proveen sus equivalentes inmunogénicos en la forma de una molécula de péptido simple.

Adicionalmente, el uso de los análogos del polipéptido pueden resultar en polipéptidos con una actividad inmunogénica y/o antigénica aumentada, que son menos sensibles a la degradación enzimática, y que son más selectivos. Un análogo de prolina adecuada es el ácido 2-aminociclopentano carboxílico ( $\beta$ AC<sup>5</sup>c) que ha demostrado aumentar la actividad inmunogénica de un polipéptido natural más de 20 veces (Mierke et al, 1990; Portoghese et al, 1990; Goodman et al, 1987).

Los "derivados" de un polipéptido descrito aquí son aquellos péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que comprenden al menos alrededor de cinco residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácido determinadas en el Nr ID de SEC: 1. Un "derivado" puede además comprender residuos de aminoácido naturales, glicosilados alterados, acilados o no naturales adicionales comparados con la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1. Alternativamente o además, un derivado puede comprender uno o más sustituyentes que no son de aminoácido como por ejemplo, una molécula reportera u otro ligando, covalentemente o no covalentemente unido a la secuencia de aminoácido como por ejemplo, una molécula reportera que está enlazada para facilitar su detección.

Otros ejemplos de mutantes recombinantes o sintéticos y derivados de inmunogenes del péptido de la presente invención incluyen a aquellos que incorporan sustituciones, eliminaciones y/o adiciones simples o múltiples, como por ejemplo, carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos. Las formas

glicosiladas o aciladas naturales o alteradas de los péptidos objetivo se contemplan particularmente en la presente invención. Adicionalmente, los homopolímeros o heteropolímeros que comprenden una o más copias del péptido objetivo listados en el Nr ID de SEC: 1, o uno o más de sus derivados, homólogos o análogos están dentro del alcance de la invención.

Preferentemente, los homólogos, análogos y derivados del polipéptido de la invención son "inmunogénicos", definidos aquí como la capacidad de dicho polipéptido o su derivado, homólogo o análogo de provocar las respuestas de la célula B y/o de la célula T en el huésped, como respuesta a la inmunización.

Los homólogos, análogos y derivados preferidos de la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 incluyen a aquellas variantes de aminoácido que funcionan como epítopes de la célula B o de la célula T de dicha secuencia de aminoácido que son capaces de mediar una respuesta inmunológica como por ejemplo, los mimótopes del polipéptido inmunogénico descrito aquí, que han sido producidos por medios sintéticos, como por ejemplo, por medio de la química Fmoc. El único requerimiento de estas moléculas es que tienen una reacción inmunológicamente cruzada con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o su derivado que comprende al menos 5 aminoácidos contiguos en la longitud del Nr ID de SEC: 1.

Como será obvio para los expertos en la materia, estos homólogos, análogos y derivados del polipéptido de la invención, las moléculas serán útiles para preparar anticuerpos que tienen reacción cruzada con los anticuerpos contra dicho polipéptido y/o producen una respuesta inmunológica protectora de especificidad similar a la producida por dicho polipéptido. Estas moléculas también serán útiles para el diagnóstico y otras aplicaciones que son

inmunológicas por naturaleza como por ejemplo, el diagnóstico que utiliza uno o más formatos del inmunoensayo (por ejemplo, ELISA, RIA y similares).

De acuerdo con esto, el inmunogen de la presente invención o su derivado, homólogo o análogo es útil en las composiciones para vacunas que protegen al individuo contra la infección por *L. intracellularis* y/o como un antígeno para producir la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales y/o en la detección de anticuerpos contra *L. intracellularis* en los animales infectados, particularmente en los animales porcinos y aves.

Los inventores presentes también han demostrado que la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 es particularmente única, comparada con otras secuencias de aminoácido inmunogénicas, incluyendo a aquellas de las proteínas de gancho flagelar derivadas de otras bacterias. De acuerdo con esto, los péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que comprenden regiones únicas de epítipo del Nr ID de SEC: 1 como describimos en la Figura 1, tendrán una especificidad mejorada comparada con otras regiones de la molécula FlgE de *Lawsonia spp.* Las ventajas particulares de estos péptidos será obvia para los expertos en la producción de composiciones para vacuna, donde la especificidad contra un patógeno de interés es una consideración importante.

Las regiones únicas del polipéptido *L. intracellularis* son péptidos antigénicos prometedores para la formulación de las vacunas específicas para *Lawsonia* y el diagnóstico para la detección específica de *Lawsonia spp.* en las muestras biológicas.

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

(i) un componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia de aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 y/o comprende al menos 5 aminoácidos contiguos derivados del Nr ID de SEC: o, su homólogo, análogo o derivado inmunogénico que tiene una relación inmunológicamente cruzada con *Lawsonia intracelullaris*; y

(ii) uno o más portadores, diluyentes y/o adyuvantes adecuados para el uso veterinario o farmacéutico.

Como se usa aquí, el término "componente inmunogénico" se refiere a un péptido, polipéptido o proteína codificada por ADN de, o derivado de, *L. intracellularis* o microorganismo relacionado que es capaz de inducir una respuesta inmunológica protectora en un animal, en particular un porcino o ave, si dicho péptido, polipéptido o proteína está o no en su forma aislada o recombinante. De acuerdo con esto, la composición para vacuna incluye claramente a aquellas composiciones para vacuna que comprende aislados atenuados, muertos o no patógenos de las formas de *L. intracellularis* o microorganismos relacionados que comprenden o expresan a dicho péptido, polipéptido o proteína.

Por "respuesta inmunológica protectora" se entiende que el componente inmunogénico produce una respuesta inmunológica en el animal al cual se le administró la composición para vacuna a nivel humoral y/o celular, composición que es suficiente para prevenir la infección por *Lawsonia intracellularis* o microorganismo relacionado y/o que es suficiente como para reducir de manera detectable uno o más síntomas o condiciones, o para aminorar de manera detectable el inicio de uno o más síntomas o condiciones, asociados con la infección por *Lawsonia intracellularis* o microorganismo relacionado en un huésped animal, comparado con un animal infectado de control. El término

“cantidad efectiva” de un componente inmunogénico presente en la composición para vacuna se refiere a esa cantidad de dicho componente inmunogénico que es capaz de inducir una respuesta inmunológica protectora después de haber administrado una dosis completa simple, o después de haber administrado varias dosis divididas.

Preferentemente, el componente para polipéptido de la composición para vacuna objetivo comprende una secuencia de aminoácido que es tanto inmunogénica como específica, en virtud de su reactividad cruzada inmunológica con el agente causante de PPE, *Lawsonia intracellularis*. A este respecto, será obvio de la descripción precedente que estos componentes de polipéptido pueden comprender una secuencia de aminoácido derivada del Nr ID de SEC: 1 o su homólogo, análogo o derivado de la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1, como por ejemplo, un mimótopo de dicha secuencia.

El polipéptido inmunogénico u homólogo, análogo o derivado inmunogénico puede ser un péptido, oligopéptido o polipéptido natural en la forma aislada o recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descriptas arriba o ejemplificadas aquí.

Preferentemente, el polipéptido inmunogénico u homólogo, análogo o derivado inmunogénico deriva de *Lawsonia spp.*, en particular *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado.

Preferentemente, el componente inmunogénico ha sufrido al menos un paso de purificación o al menos una concentración parcial de un cultivo celular que comprende *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado, o de una preparación sometida a la lisis de células de *L. intracellularis* o microorganismo relacionado, o de otro cultivo donde el componente inmunogénico se expresa de manera recombinante. La pureza de este componente que tiene las propiedades inmunogénicas requeridas preferentemente es de al menos alrededor del 20 % en

peso de la proteína en una preparación particular, más preferentemente al menos alrededor del 50 %, incluso más preferentemente al menos alrededor del 60 %, incluso más preferentemente al menos alrededor del 70 % e incluso más preferentemente al menos alrededor del 80% o más.

El componente inmunogénico de la vacuna de la presente invención puede comprender un solo péptido, polipéptido o proteína, o un rango o combinación de diferentes péptidos, polipéptidos o proteínas que cubren epítopes diferentes o similares. Además, o alternativamente, se puede proporcionar un solo polipéptido con múltiples epítopes. Éste último tipo de vacuna es referida como una vacuna polivalente. Un epítopo múltiple incluye a dos o más epítopes ubicados dentro de una molécula de péptido o polipéptido.

La formulación de vacunas generalmente es conocida en la técnica y se puede hacer referencia a Pharmaceutical Sciences de Remington, Edición 17, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, Estados Unidos.

Una forma particularmente útil de la vacuna es una vacuna recombinante producida por ejemplo, en un vector de vacuna, como por ejemplo, pero no limitándose a, una célula transfectada con un vector de virus de vaccinia o una célula bacteriana capaz de expresar el componente inmunogénico.

La presente invención se extiende claramente hacia las composiciones para vacuna recombinantes donde el componente inmunogénico está contenido dentro de los vectores para vacuna muertos preparados, por ejemplo, por medio de calor, formalina u otro tratamiento químico, electroshock o fuerzas de alta o baja presión. De acuerdo con esta realización, el componente inmunogénico de la vacuna generalmente se sintetiza en un vector para vacuna vivo que se mata antes de administrarlo al animal.

Más aun, el vector de la vacuna que expresa al componente inmunogénico puede ser no patógeno o puede estar atenuado. Dentro del alcance de esta

realización están las células que han sido transfectadas con virus no patogénicos o atenuados que codifican al componente inmunogénico de la vacuna y a las células no patógenas o atenuadas que expresan directamente el componente inmunogénico.

Las células huésped atenuadas o no patógenas incluyen a aquellas células que no son dañinas para un animal al que se le administró la vacuna objetivo. Como saben los expertos en la materia, las "vacunas vivas" pueden comprender un vector de virus atenuado que codifica al componente inmunogénico o una célula huésped que lo comprende, que es capaz de replicarse en un animal al que se lo administró, y usando la maquinaria de célula huésped para expresar el componente inmunogénico aunque sin producir ningún efecto colateral adverso. Estos vectores de vacuna pueden colonizar el intestino u otro órgano del animal vacunado. Estos vectores de vacuna vivos son eficaces en virtud de su capacidad para expresar continuamente el componente inmunogénico en el animal huésped durante un tiempo y a un nivel suficiente como para conferir inmunidad protectora contra un patógeno que expresa un equivalente inmunogénico de dicho componente inmunogénico. La presente invención incluye claramente el uso de estos vectores atenuados o no patogénicos y preparaciones de vacunas vivas.

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

Estas células y líneas celulares son capaces de expresar una secuencia genética que codifica un péptido FlgE, polipéptido o proteína de la presente invención de *L. intracellularis* de manera efectiva como para inducir una respuesta inmunológica protectora en el animal. Por ejemplo, una bacteria no patogénica podría prepararse de manera tal que contenga una secuencia recombinante capaz de codificar un péptido, polipéptido o proteína de *L. intracellularis*. La secuencia recombinante tendría la forma de un vector de expresión bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. La bacteria entonces podría colonizar ubicaciones adecuadas en el intestino del cerdo y se le podría permitir el crecimiento y producción del péptido, polipéptido o proteína recombinante en una cantidad suficiente como para inducir una respuesta inmunológica protectora contra *L. intracellularis*.

En otra realización alternativa, 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 adecuado de un cerdo, bajo condiciones suficientes como para permitir la expresión transitoria de dicho ADN o ARN para producir una cantidad de péptido, polipéptido o proteína efectiva como para inducir una respuesta inmunológica protectora. En una realización preferida, la vacuna de ADN tiene la forma de un plásmido, donde el ADN está conectado operativamente con una región promotora capaz de expresar la secuencia de nucleótido que codifica al inmunogen en las células del animal inmunizado.

Es necesario, por lo tanto, en la producción de una vacuna recombinante, exceptuando a la vacuna de ADN descrita aquí, expresar el componente inmunogénico en el sistema de vector adecuado. Para la finalidad presente, el componente inmunogénico puede expresarse por medio de:

(i) la colocación de una molécula de ácido nucleico aislado en un formato que se puede expresar, dicha molécula de ácido nucleico comprende la región de codificación de la secuencia de nucleótido determinada en el Nr ID de SEC: 2 o un homólogo, análogo o derivado que codifica a la proteína del Nr ID de SEC: 2 seleccionado del grupo formado por:

(a) las secuencias de nucleótido que tienen al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia con respecto al Nr ID de SEC: 2;

(b) secuencias de nucleótido que hibridan bajo al menos una hibridación de baja rigurosidad, preferentemente bajo condiciones al menos de moderada rigurosidad, e incluso más preferentemente bajo condiciones al menos de elevado nivel de rigurosidad, al complemento del Nr ID de SEC: 2; y

(c) las secuencias de nucleótido que codifican la secuencia de aminoácido determinadas en el Nr ID de SEC: 1, o su homólogo, análogo o derivado que incluye, por ejemplo, un mimótopo del aminoácido determinado en el Nr ID de SEC: 1;

(ii) la introducción de la molécula de aminoácido aislada de (i) en un formato que se puede expresar en un vector de vacuna adecuado; y

(iii) por medio de la incubación o crecimiento del vector de vacuna durante un tiempo y bajo condiciones suficientes como para que ocurra la expresión del componente inmunogénico codificado por medio de dicha molécula de ácido nucleico.

Con el propósito de definir el nivel de rigurosidad, se define aquí como baja rigurosidad una hibridación y/o lavado llevado a cabo en un regulador 6xSSC, 0,1 % (p/v) DSD a 28 °C. Una rigurosidad moderada se define como una hibridación y/o lavado llevada a cabo en un regulador 2x SSC, 0,1 p/v SDS a una temperatura dentro de un rango entre los 45°C y los 65 °C. Se define rigurosidad elevada aquí

como una hibridación y/o lavado llevado a cabo en un regulador 0,1 x SSC , 0,1 % (p/v) SDS a una temperatura de al menos 65 °C.

Generalmente, la rigurosidad se aumenta reduciendo la concentración del regulador SSC, y/o aumentando la concentración de SDS y/o aumentando la temperatura de hibridación y/o lavado. Los expertos en la materia serán concientes de que las condiciones para la hibridación y/o lavado pueden variar dependiendo de la naturaleza de la membrana para hibridación o el tipo de sonda de hibridación usada. Las condiciones para las hibridaciones y lavados son comprendidos por los expertos en la materia. Con la finalidad de obtener mayor claridad de parámetros que afectan la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico, se pueden encontrar referencias en las páginas 2.10.8. a 2.10.16 de Ausubel et al (1987), que se incorpora aquí como referencia.

Como se usa aquí, una "molécula de ácido nucleico es un formato que se puede expresar" es una región que codifica a la proteína de una molécula de ácido nucleico en una conexión operativa con un promotor u otra secuencia reguladora capaz de regular la expresión en el sistema de vector de la vacuna.

La referencia hecha aquí a un "promotor" debe tomarse en un contexto más amplio e incluye a la secuencia reguladora transcripcional de un gen genómico clásico, incluyendo al cuadro TATA que se requiere para una iniciación de transcripción precisa, con o sin una secuencia CCAAT y elementos reguladores adicionales ( es decir, secuencias que se activan corriente arriba, fomentadores y silenciadores) que alteran la expresión del gen en respuesta a los estímulos de desarrollo y/o externos, o de manera específica de tejido. En el contexto presente, el término "promotor" también se usa para describir una molécula recombinante, sintética o de fusión, o su derivado que confiere, activa o aumenta la expresión de una molécula de ácido nucleico que está operativamente conectada, y que codifica al polipéptido inmunogénico. Los promotores preferidos pueden contener

copias adicionales de uno o más elementos reguladores para aumentar más la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de dicha molécula de ácido nucleico.

Colocando la molécula de ácido nucleico bajo el control regulatorio de es decir, " en conexión operable con" una secuencia del promotor significa ubicar dicha molécula de manera tal la secuencia promotora controle la expresión. Los promotores generalmente, pero no necesariamente, están ubicados en 5' (corriente arriba) con respecto a los genes que controlan. En la construcción de las combinaciones de gen promotor / estructural heterólogo generalmente se prefiere ubicar al promotor a una distancia del sitio de inicio de transcripción del gen que sea aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en su entorno natural, es decir, el gen del que deriva el promotor. Más aun, los elementos reguladores que comprenden un promotor usualmente están ubicados dentro de los 2 kb del sitio de inicio de transcripción del gen. Como se sabe en la técnica, se puede producir alguna variación en esta distancia sin perder la función del promotor. De manera similar, la ubicación preferida del elemento de la secuencia reguladora con respecto al gen heterólogo a ser ubicado bajo su control se define por medio de la ubicación del elemento en su entorno natural, es decir los genes de los que deriva. Una vez más, como se sabe en la técnica, también puede ocurrir cierta variación en esta distancia.

El pre-requisito para producir polipéptidos intactos en las bacterias como por ejemplo, *E. Coli* es el uso de un promotor fuerte con un sitio de enlace de ribosoma efectivo. Los promotores típicos adecuados para la expresión en las células bacterianas como por ejemplo, *E. Coli*, incluyen, pero no están limitados a, el promotor *lacZ*, promotores  $\lambda_L$  o  $\lambda_R$  sensibles a la temperatura, promotor T7 o el promotor *tac* IPTG-inducible. Una cantidad de otros sistemas de vector para expresar la molécula de ácido nucleico de la invención en *E. coli* son conocidos

en la técnica y se describen por ejemplo, en Ausubel et al (1987) o Sambrook et al (1989). Se han descrito numerosos plásmidos con secuencias promotoras adecuadas para la expresión en las bacterias y sitios de enlace de ribosoma eficientes, como por ejemplo, pKC30 ( $\lambda$ L: Shimatake y Rosenberg, 1991), pKK173-3 (*tac*: Amann y Brosius, 1985), pET-3 (T7: Studier y Moffat, 1986), las series pFLEX y vectores de expresión (Pfizer Inc., CT, USA) o las series pQE de los vectores de expresión (Qiagen, CA), entre otros. Los promotores típicos adecuados para la expresión en los virus de las células eucarióticas y las células eucarióticas incluyen al promotor tardío SV40, al promotor temprano SV40 y al promotor citomegalovirus (CMV), al promotor CMV IE (citomegalovirus inmediato temprano), entre otros.

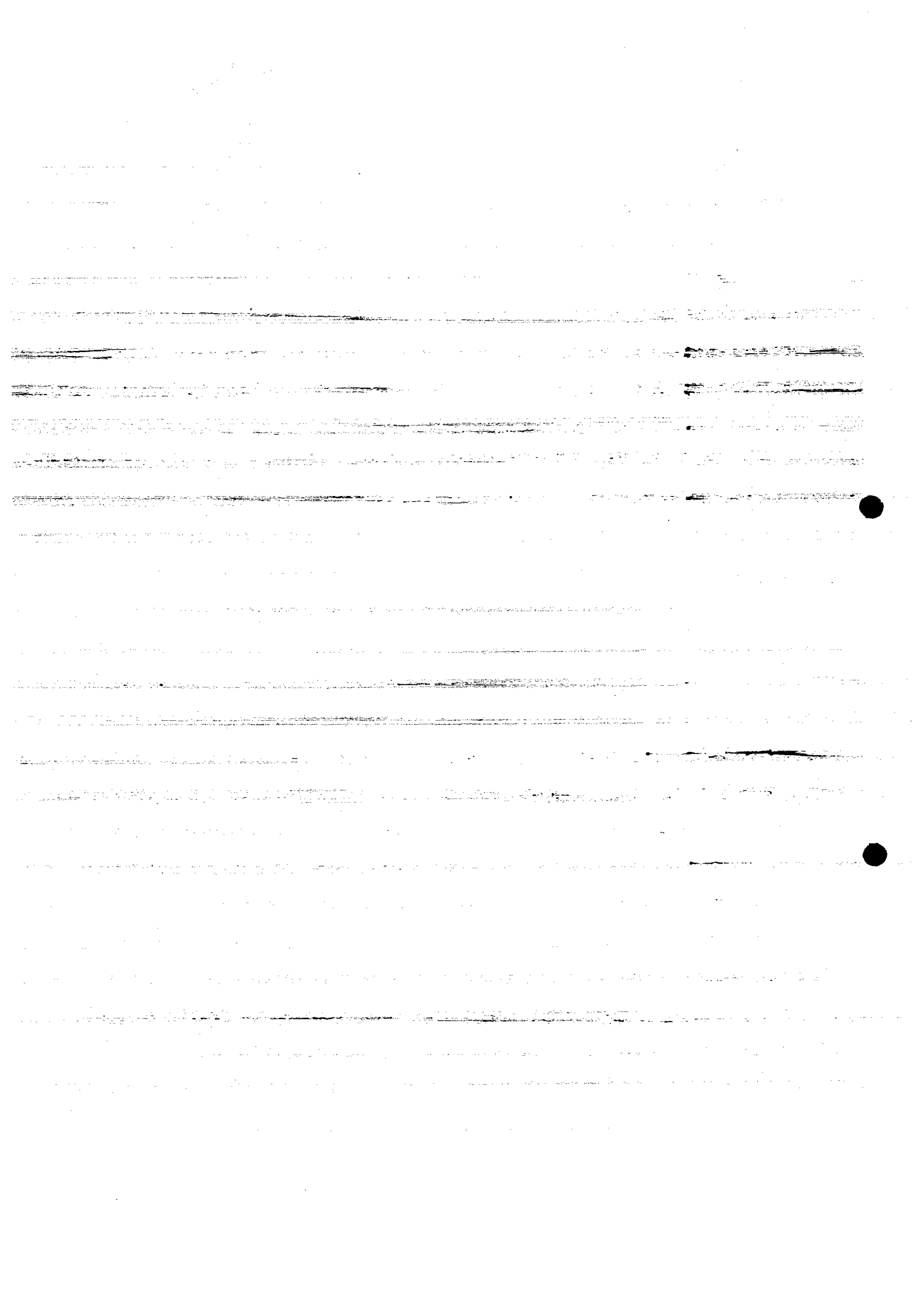
Se conocen los medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o una construcción genética que la comprende dentro de una célula para la expresión del componente inmunogénico de la composición para vacuna. La técnica utilizada para un organismo dado depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir el ADN recombinante en las células animales incluyen a la microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por liposomas como por ejemplo, la utilización de lipofectamina (Gibco, MD, USA) y/o cellfectin (Gibco, MD; USA), la toma de ADN mediada por PEG, la electroporación y bombardeo de micropartículas como por ejemplo, la utilización de tungsteno revestido con ADN o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, USA), entre otros.

El componente inmunogénico de una composición para vacuna como se considera aquí, exhibe una excelente actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento y/o profilaxis de PPE cuando se administra en una cantidad que depende el caso particular. Por ejemplo, para las moléculas de péptido recombinantes, se puede administrar entre alrededor de 0,5  $\mu$ g y alrededor de 20

41  
42

mg, preferentemente entre alrededor de 1  $\mu$ g y alrededor de 10 mg, más preferentemente entre alrededor de 10  $\mu$ g y alrededor de 5 mg, y el más preferible entre alrededor de 50  $\mu$ g y alrededor de 1 mg equivalente al componente en un volumen de alrededor de 1 ml a alrededor de 5 ml. Para vacunas de ADN, una cantidad preferida es de entre alrededor de 0,1  $\mu$ g/ml y alrededor de 5 mg/ml en un volumen de alrededor de 1 a alrededor de 5 ml. El ADN puede estar presente en una forma "desnuda" o puede administrarse junto con un agente para facilitar la captación celular (por ejemplo, en liposomas o lípidos catiónicos). La característica importante es administrar inmunogen suficiente para inducir una respuesta de protección inmune. Las cantidades anteriores pueden administrarse establecidas o calculadas por kilogramo de peso del cuerpo. El régimen de dosificación puede ser ajustado para proveer la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente como lo indican las exigencias de una situación terapéutica. Pueden también requerirse la administración de refuerzo.

La vacuna de la presente invención puede también comprender uno o más componentes inmuno-modulatorios adicionales tales como, por ejemplo, un adyuvante o molécula de citoquina, entre otros, que es capaz de incrementar la respuesta inmune contra el componente inmunogénico. Los ejemplos ilimitados de los adyuvantes que pueden utilizarse en la vacuna de la presente invención, incluyen el sistema adyuvante de RIBI (Ribi Inc., Hamilton, MT, USA), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, el copolímero Block (CytRx, Atlanta GA, USA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA, USA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA, USA), el adyuvante AMPHIGEN®, el adyuvante completo de Freund; el adyuvante incompleto de Freund; y Saponin, QuilA u otra fracción de Saponin, el monofosforil lípido Al, y el adyuvante lípido-amina



Avridine. Otros agentes inmuno-modulatorios que pueden incluirse en la vacuna incluyen, por ejemplo, uno o más citoquinas, tales como interferón y/o interleuquina, u otras citoquinas conocidas. Los surfactantes no iónicos tales como, por ejemplo, el polioxietilen oleil éter y el n-hexadecil polietilén éter pueden también incluirse en las vacunas de la presente invención.

La composición de vacuna puede administrarse en una manera conveniente tal como las rutas oral, intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o como supositorio o mediante implantación (por ejemplo, utilizando la tecnología de liberación lenta). Dependiendo de la ruta de administración, el componente inmunogénico puede requerir estar recubierto en un material para protegerlo de la acción de las enzimas, los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivarlo, tal como las del tracto digestivo.

La composición de vacuna puede también administrarse en forma parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones pueden prepararse en glicerol, glicoles líquidos de polietileno, y sus mezclas o en aceites. Bajo condiciones ordinarias de uso y almacenamiento, estas preparaciones pueden contener un preservativo para prevenir el crecimiento de microorganismos. Alternativamente, la composición de vacuna puede almacenarse en forma liofilizada para ser rehidratada con un vehículo apropiado o un portador previo a su uso.

Las formas farmacéuticas apropiadas para el uso inyectable incluyen soluciones estériles acuosas (cuando son solubles en agua) o dispersiones en polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión estériles inyectables. En todos los casos la forma debe ser fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable, a menos que la forma farmacéutica sea sólida o semi-sólida tal como cuando se emplea la tecnología de liberación retardada. De cualquier forma, debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y

43  
40

almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de los microorganismos.

El portador debe ser un medio solvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilén glicol y glicol de polietileno líquido, y similares), las mezclas apropiadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de revestimientos tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede obtenerse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos tales como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos tales como, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede obtenerse mediante la utilización en las composiciones, de agentes de absorción retardada tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las soluciones estériles inyectables se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida del solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido por esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del ingrediente activo esterilizado dentro de un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos seleccionados de los arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones estériles inyectables, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica de secado criogénico que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtrado del mismo.

44  
45

La presente invención se extiende a composiciones para vacunas que confieren protección contra la infección de uno o más aislados o subtipos de *L. Intracellularis* incluyendo aquellos que pertenecen al mismo serovar o serogrupo como *Lawsonia intracellularis*. La composición de vacuna preferentemente confiere además protección contra la infección por otras especies de los genes *Lawsonia* u otros microorganismos relacionados a éstos; como se determina en los niveles de nucleótido, bioquímico, estructural, fisiológico y/o inmunointeractivo; el único requerimiento es que dichas otras especies u otros microorganismos expresen un polipéptido que tiene una inmunológicamente una reacción cruzada con el polipéptido de la invención que se describe aquí. Por ejemplo, tales microorganismos relacionados pueden comprender el ADN genómico que es al menos alrededor de del 70% idéntico en su totalidad con el ADN genómico del *Lawsonia intracellularis* tal como se determina utilizando las técnicas estándares de hibridación y análisis del ADN genómico.

Los términos "serogrupo" y "serovar" refieren a una clasificación de los microorganismos que se basa en los datos de tipos serológicos, en particular los datos obtenidos utilizando los ensayos de aglutinación tales como la prueba de aglutinación microscópica (MAT). Aquellos expertos en el arte entenderán que los antígenos de serovar o serogrupo son un mosaico sobre la superficie de la célula y, en consecuencia no habrá una delimitación estricta entre las bacterias que pertenecen a un serovar y/o a un serogrupo. Más aún, los organismos que pertenecen a diferentes especies pueden clasificarse dentro del mismo serovar o serogrupo ya que no son distinguibles mediante la determinación antigénica. Como se utiliza aquí, el término "serovar" significa uno o más cepas de *Lawsonia* que son antigénicamente idénticos con respecto a los determinantes antigénicos producidos por uno o más sitios. Cuantitativamente, los serovares pueden diferenciarse uno de otro mediante las técnicas de absorción por aglutinación

cruzada. Como se utiliza aquí, el término "serogrupo" refiere a un grupo de *Lawsonia spp.* Cuyos miembros se aglutinan en forma cruzada con los antígenos que comparten el grupo y no se aglutinan en forma cruzada con los miembros de otros grupos y, en consecuencia, los miembros de un serogrupo tienen más o menos relaciones antigénicas cercanas con algún otro mediante aglutinación cruzada simple.

La presente invención se extiende así claramente a las composiciones para vacunas para el tratamiento y/o profilaxis de animales, en particular, las composiciones de vacunas para el tratamiento y/o profilaxis de las especies porcina y/o avícolas, contra cualquier bacteria que pertenezca al mismo serovar o serogrupo que la *Lawsonia intracellularis*. Preferentemente, tales organismos expresarán un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácido de al menos alrededor del 60% en su totalidad con respecto a la Secuencia ID N° 1.

La presente invención se extiende además a las composiciones de vacunas capaces de proporcionar protección contra una "variante genética" de *Lawsonia intracellularis*, con el único requerimiento de que dicha variante exprese un polipéptido que tiene una identidad sobre toda de secuencia de aminoácido de al menos alrededor del 60% con respecto a la Secuencia ID. N° 1 y/o comprenda al menos alrededor de 5 residuos de aminoácidos contiguos derivados de la Secuencia ID N° 1 o un homólogo, análogo o derivado de ésta que reacciona en forma cruzada con éste. Las variantes genéticas de *L. Intracellularis* pueden desarrollarse por mutación, recombinación, conjugación o transformación de *L. Intracellularis* o puede ocurrir naturalmente. Una persona experta en el arte conocerá cómo producir tales derivados.

En una realización particularmente preferida, la composición para vacuna de la invención es para o adecuada para la profilaxis y/o el tratamiento de la infección

en el animal porcino o ave y más preferentemente, para la profilaxis y/o el tratamiento de un animal porcino de la infección por *L. Intracellularis*.

En una realización particularmente preferida, la composición de vacuna de la invención es para o adecuada para la profilaxis y/o el tratamiento de la infección en un porcino o un ave y más preferentemente, para la profilaxis y/o el tratamiento de un animal porcino de la infección por *L. Intracellularis*.

De acuerdo a esto, la presente invención se extiende claramente al uso del polipéptido inmunogénico de la invención de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes o como se ejemplifica aquí en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la PPE en animales, particularmente cerdos o aves.

La invención también se refiere a un método de tratamiento y/o profilaxis de la PPE en un animal tal como un cerdo o ave, dicho método comprende la administración de una composición de vacuna o el polipéptido inmunogénico de la invención como se describe o ejemplifica aquí a dicho animal durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se produzca una respuesta de inmunidad. Preferentemente, en el caso de la administración de una composición para vacuna, la respuesta inmune al inmunogen es una respuesta inmune de protección.

Aquellos expertos en el arte reconocerán la aplicabilidad general de la invención en la vacunación de animales además de los porcinos y las aves contra *L. Intracellularis* y/o microorganismos relacionados. En la aplicación general de la vacuna de la presente invención, el único pre-requisito es que el animal al que se le confiere la protección pueda infectarse con *Lawsonia intracellularis* y/o un microorganismo relacionado a éste y que, en el caso de un microorganismo relacionado a *Lawsonia intracellularis*, dicho microorganismo relacionado exprese un epítipo de célula B o célula T que reaccione en forma cruzada o se asemeje al

polipéptido componente de la composición de vacuna que aquí se describe. Los animales que pueden protegerse con la vacuna de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates, animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros), animales de ganadería (por ejemplo, cerdos, ovejas, ganado vacuno, caballos, burros, cabras), animales de prueba de laboratorios (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos de guinea, conejos) y animales salvajes en cautiverio (por ejemplo, canguros, zorros, ciervos). La presente invención también comprende a la vacunación de pájaros tales como aves de corral, pájaros de juego o enjaulados.

La presente invención también se extiende a la combinación de vacunas que comprenden una cantidad efectiva de un cebador 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 de otros antígenos capaces de proteger un animal porcino o ave, tanto contra *Lawsonia spp.* como contra algún otro patógeno que infecte o cause la enfermedad en dicho animal. En una realización preferida, el segundo componente inmunogénico se selecciona de un grupo que consiste en la autolisina *L. Intracellularis*, hemolisina, polipéptidos OmpH, y SodC y sus homólogos, análogos o derivados, en particular las variantes inmunogénicas o derivados de éstos, y las moléculas de ácido nucleico que codifican al mismo.

El polipéptido aislado o recombinante FlgE de la invención o un homólogo, análogo o derivado de éste, inmunológicamente equivalente es también 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 a éste.

Como se utiliza aquí, el término "molécula inmunológicamente interactiva" incluye anticuerpos y derivados de anticuerpos y equivalentes funcionales, tales

como un Fab, o un SCAB (anticuerpo de cadena simple), cualquiera de los que pueden opcionalmente estar conjugados con una enzima, un extremo radioactivo o fluorescente, entre otros. El único requerimiento de dichas moléculas inmunológicamente interactivas es que sean capaces de enlazarse específicamente al polipéptido inmunogénico de la presente invención como se describió más arriba.

De acuerdo a esto, un aspecto adicional de la invención se extiende a una molécula inmunológicamente reactiva que es capaz de enlazarse a uno o más de los siguientes:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos alrededor del 60% del total de la secuencia idéntica a la secuencia de aminoácido establecida por el la Secuencia ID N° 1;

(ii) un péptido que comprende al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos derivados de la Secuencia ID N° 1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii) que se identifica con un epítipo de célula B o célula T de éstos.

En una realización preferida, la molécula inmunológicamente interactiva es un anticuerpo que se enlaza específicamente a un polipéptido que consiste en el aminoácido de la Secuencia ID N° 1.

Se pueden utilizar los métodos convencionales para preparar las moléculas inmunológicamente reactivas. Por ejemplo, mediante el uso de un polipéptido de la presente invención, se pueden obtener anticuerpos policlonales, antisueros o monoclonales usando métodos estándares. 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 produce una respuesta de anticuerpo en el mamífero. Las técnicas que confiere inmunogenicidad sobre un polipéptido incluyen la conjugación a portadores, u otras técnicas bien

conocidas en el arte. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse en la presencia de un adyuvante o puede ser adjuntado a una molécula de portador, como se conoce en el arte, que mejora la inmunogenicidad del polipéptido. El progreso de inmunización puede monitorearse mediante la detección de los títulos del anticuerpo en plasma o suero. El ELISA estándar u otro inmunoensayo puede usarse con el inmunogen como antígeno para determinar los niveles de los anticuerpos. Siguiendo la inmunización, se puede obtener el antisuero y, por ejemplo, las moléculas IgG correspondientes a los anticuerpos policlonales pueden aislarse del antisuero.

Para producir los anticuerpos monoclonales, las células (linfocitos) que producen anticuerpos pueden cosecharse de un animal inmunizado con un péptido de la presente invención y fusionarse con células de mieloma mediante procedimientos estándares de fusión celular somática inmortalizando, de esta manera, estas células y produciendo células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en el arte, por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975), así como otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de la célula B humana (Kozbor et al, 1983), la técnica de hibridoma de EBV para producir los anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985), y la selección de las bibliotecas combinatorias de anticuerpos (Huse et al., 1989). Las células de hibridoma pueden aislarse y seleccionarse inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos que son específicamente reactivos con el polipéptido y los anticuerpos monoclonales aislados de él.

Como con todas las composiciones inmunogénicas para producir anticuerpos, las cantidades inmunogénicamente efectivas de los péptidos de la invención deben determinarse empíricamente. Los factores a considerarse incluyen la inmunogenicidad del péptido nativo, sea o no que el péptido esté en un complejo o enlazado covalentemente a un adyuvante o a una proteína portadora u

a otro portador, la ruta de administración para la composición, es decir, intravenosa, intramuscular, subcutánea, etc., y el número de dosis de inmunización a administrarse. Tales factores son conocidos en el arte de las vacunas y está dentro de la destreza de los inmunólogos realizar tales determinaciones sin la debida experimentación.

El término "anticuerpo" como se utiliza aquí, intenta incluir los fragmentos de éste que también reacciona específicamente con un péptido que se asemeja o tiene una reacción cruzada con un epítipo de célula B o célula T del polipéptido FlgE de *Lawsonia intracellularis* establecido en el Nr ID de SEC: 1. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando las técnicas convencionales y los fragmentos se pueden seleccionar para la utilización en una manera similar a se la descrita arriba para el anticuerpo completo. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden generarse mediante el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento resultante F(ab')<sub>2</sub> puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir los fragmentos Fab'.

Se encuentra dentro del alcance de esta invención incluir cualquier anticuerpo secundario (monoclonal, policlonal o fragmentos de anticuerpos), incluyendo los anticuerpos anti-idiotípicos, dirigidos a los primeros anticuerpos discutidos más arriba. Ambos el primero y el segundo anticuerpo pueden usarse en los ensayos de detección o un primer anticuerpo puede usarse con un anticuerpo anti-inmunoglobulina disponible comercialmente. Un anticuerpo considerado aquí incluye cualquier anticuerpo específico a alguna región de un péptido que se identifica, o tiene una reacción cruzada con un epítipo de célula B o célula T del polipéptido FlgE de *Lawsonia intracellularis* determinada en el Nr ID de SEC: 1, como se describió con anterioridad.

Los anticuerpos descritos aquí son útiles para la determinación de los epítopes de las células B o T de la secuencia de aminoácidos determinada en el

Nr ID de SEC: 1 tal como, por ejemplo, probando la capacidad de los péptidos sintéticos para reaccionar en forma cruzada inmunológicamente con dicha secuencia de aminoácidos o para obtener la producción de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con dicha secuencia de aminoácidos. Utilizando los métodos descritos aquí, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales quiméricos pueden también convertirse en los péptidos que se identifican o reaccionan en forma cruzada con el epítipo de la célula B o la célula T del polipéptido FlgE de *Lawsonia intracellularis* determinado en el Nr ID de SEC: 1.

Más particularmente, los anticuerpos policlonales, monoclonales o monoclonales quiméricos pueden usarse para detectar los péptidos de la invención y/o cualquier homólogo, análogo o derivados de éstos, en varios materiales biológicos. Por ejemplo, pueden usarse en un ELISA, radioinmunoensayo, o prueba histoquímica. En otras palabras, los anticuerpos pueden usarse para probar el enlace a un polipéptido de la invención o a un homólogo, análogo o derivado de éste en una muestra biológica o diagnosticar la presencia de *Lawsonia intracellularis* en ella.

De acuerdo a esto, un aspecto adicional de la invención provee un método para el diagnóstico de la infección de un animal por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado a éste, dicho método comprende las etapas de contactar una muestra biológica derivada de dicho animal con una molécula inmunológicamente interactiva que es capaz de enlazar a un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos determinada en el Nr ID de SEC: 1 o un homólogo, análogo o derivado de éstos, por un tiempo y bajo las condiciones suficientes para que se forme un complejo antígeno : anticuerpo, y detectar la formación de dicho complejo. De acuerdo a esta realización e la presente invención, la molécula inmunológicamente interactiva es

preferentemente una molécula de anticuerpo preparada contra el polipéptido FlgE de *Lawsonia intracellularis* determinado en el Nr ID de SEC: 1 o un análogo o derivado de éste.

La muestra biológica es aquella que podría contener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos determinada en el Nr ID de SEC: 1 o un homólogo, análogo o derivado de éste, en particular una muestra biológica derivada de un huésped porcino o ave del *Lawsonia intracellularis* patógeno o una microorganismo relacionado a él, y puede incluir cualquier muestra de tejido o fluido apropiado del animal. Las muestras biológicas preferidas se derivan del íleon, intestino ciego, intestino delgado, intestino grueso, todos los nodos séricos o linfáticos de un animal huésped, cerdo o ave, que está siendo investigado. Alternativamente o adicionalmente la muestra biológica de prueba debe comprender las heces o el escobillado rectal derivado del animal.

Para distinguir el *L. Intracellularis* de otros microorganismos residentes en los intestinos u otro órgano de un animal, los anticuerpos no debieran prepararse contra los epítopes altamente conservados de FlgE tal como aquellas regiones de una longitud de al menos 5 aminoácidos que están conservados entre *L. Intracellularis* y un microorganismo que está presente en el intestino u otro órgano de un animal, animal en el que se busca un diagnóstico como por ejemplo, *E. coli*.

Los inmunoensayos convencionales pueden utilizarse para llevar a cabo esta realización de la invención. Se pueden encontrar por referencia a las Patentes Estadounidenses N° 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653, un amplio rango de técnicas de inmunoensayo disponibles. Esto, por supuesto, incluye tanto los ensayos de sitio único y de dos sitios como los ensayos "sándwich" de los tipos no competitivos, así como los ensayos de enlace competitivo tradicionales. Estos ensayos incluyen también el enlace directo de un anticuerpo marcado a un objetivo. Puede ser rápidamente aparente a un técnico experto cómo modificar u

optimizar tales ensayos para llevar a cabo esta realización de la presente invención, y todas tales modificaciones y optimizaciones están comprendidas por la presente invención.

En otra realización alternativa, la presente invención contempla un método de identificación sea o no que el animal haya sufrido una infección pasada, o que esté infectado actualmente con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado a éste, dicho método comprende poner en contacto sangre o suero derivado de dicho animal con el polipéptido inmunogénico de la invención por un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forme un complejo antígeno : anticuerpo, y detectar la formación de dicho complejo. Esta realización difiere de la descrita más arriba en que se basa en la detección de anticuerpos circulantes contra *Lawsonia intracellularis* u otro organismo relacionado en la sangre o suero de los animales que está presente como una consecuencia de una infección pasada o presente de este patógeno. Sin embargo, será aparente para aquellos expertos en el arte que el principio de formato del ensayo es el mismo. Como con las otras realizaciones de la invención referidas más arriba, se pueden usar los inmunoensayos convencionales. Las personas expertas en el arte serán rápidamente capaces de variar los formatos conocidos de los inmunoensayos para llevar a cabo la presente realización. Esta realización de la invención también utiliza derivados de sangre y suero que comprenden moléculas inmunológicamente interactivas tales como, por ejemplo, IgG parcialmente purificada o fracciones de IgM y muestras de piel de búfalo, entre otras. La preparación de dichas fracciones serán también conocidas por aquellos expertos en el arte.

Otro aspecto adicional de la presente invención provee 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 al menos alrededor del 60% del total de la secuencia idéntica a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1;

(ii) un péptido que comprende al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos derivados del Nr ID de SEC: 1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii) que se identifica con un epítotope de célula B o célula T de *Lawsonia spp.*

En una realización preferida, la presente invención provee una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica, un inmunogen de polipéptido que comprende, se identifica o reacciona en forma cruzada con un epítotope de la célula B o célula T del polipéptido FlgE de *Lawsonia intracellularis* determinado en el Nr ID de SEC: 1.

En una realización particularmente preferida, la presente invención provee una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican al polipéptido FlgE de *L. Intracellularis* que tiene una secuencia de aminoácidos determinada en el Nr ID de SEC: 1.

Está dentro del alcance de la invención comprender las formas poliméricas del polipéptido inmunogénico descrito aquí, tal como agregados a la secuencia de aminoácidos determinada en el Nr ID de SEC: 1 o un homólogo, análogo o derivado de éste. La presente invención se extiende además a las moléculas de ácido nucleico que codifica dichas formas poliméricas.

Alternativamente o adicionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención también comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos alrededor del 60% sobre el total de la secuencia a la secuencia de

nucleótidos determinada en el Nr ID de SEC: 2 o a una secuencia complementaria de ésta. Más preferentemente, el porcentaje de identidad de la secuencia con respecto al Nr ID de SEC: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria de ésta es al menos de alrededor del 80%. Aún más preferentemente, el porcentaje de identidad de la secuencia es al menos de alrededor del 90%. Y aún más preferentemente, el porcentaje de identidad de la secuencia es al menos de alrededor del 95%.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos determinada en el Nr ID de SEC: 2, o en la secuencia de nucleótidos que codifica el FlgE presente en pALK11 (ATCC 207156), o una variante degenerada de éste y los complementos del mismo.

En la determinación de cuándo o no dos secuencias de nucleótidos caen dentro de estos límites de porcentajes, aquellos expertos en el arte se darán cuenta si es necesario llevar a cabo una comparación lado a lado o un alineamiento múltiple de las secuencias. En tales comparaciones o alineaciones, las diferencias pueden aparecer en la posición de residuos distintos, dependiendo en el algoritmo utilizado para llevar a cabo el alineamiento. En el contexto presente, la referencia a un porcentaje de identidad entre dos o más secuencias de nucleótidos será tomada para referir al número de residuos idénticos entre dichas secuencias como se determina usando algún algoritmo estándar conocido a aquellos expertos en el arte. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden alinearse y sus identidades calculadas utilizando el programa BESTFIT u otro programa apropiado al Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América (Devereaux et al, 1984).

Alternativamente o adicionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención es capaz de hibridarse bajo condiciones al menos poco severas y a la secuencia de nucleótidos determinada en el Nr ID de SEC: 2 o a una secuencia

56  
57

de nucleótidos complementaria a ésta o a un fragmento de ácido nucleico que comprende en longitud al menos alrededor de 20 nucleótidos contiguos derivados de la secuencia determinada en el Nr ID de SEC: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria a ésta.

Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse bajo condiciones al menos moderadas de rigurosidad, aún más preferentemente bajo condiciones altamente rigurosas.

Con el propósito de definir el nivel de rigurosidad, una rigurosidad baja se define aquí como que es una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en una solución reguladora 6xSSC, 0,1% (p/v) SDS a 28°C. Una severidad o rigurosidad moderada se define aquí como que es una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en una solución reguladora 2xSSC, 0,1% (p/v) SDS a una temperatura en el rango de los 45°C a 65°C. Una alta rigurosidad se define aquí como que es una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en una solución reguladora 0,1xSSC, 0,1% (p/v) SDS a una temperatura de la menos 65°C.

Generalmente, la severidad se incrementa mediante la reducción de la concentración de la solución reguladora SSC, y/o aumentando la concentración de SDS y/o incrementando la temperatura de la hibridación o el lavado. Aquellos expertos en el arte notarán que las condiciones para la hibridación o el lavado pueden variar dependiendo sobre la naturaleza de la membrana de hibridación o el tipo de sonda de hibridación usada. Las condiciones para las hibridaciones y los lavados se entienden claramente por aquellos expertos en el arte. Con el propósito de clarificar todos los parámetros que afectan la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico, se encuentran las referencias en las páginas 2.10.8 a 2.10.16, de Ausubel et al (1987), el que se incorpora aquí como referencia.

La presente invención comprende claramente las construcciones genéticas que comprenden la molécula de ácido nucleico objeto en un formato adecuado

que pueda ser expresado para la preparación de un polipéptido recombinante inmunogénico de la presente invención, tal como para el uso en vacunas recombinante monovalente o polivalente recombinante.

En tales casos, la molécula de ácido nucleico se conectará operablemente a una secuencia de promotor que pueda por lo tanto, regular la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en una célula procariótica o eucariótica como se describe más arriba.

La construcción genética también comprende opcionalmente una secuencia de terminador. El término "terminador" refiere a una secuencia de ADN en el final de una unidad de transcripción que señala la finalización de la transcripción. Un "terminador" es una secuencia de nucleótidos, generalmente localizada dentro de la región no trasladada 3' de un gen o un ARN-m, que comprende una señal de poliadenilación para facilitar el agregado post-transcripcional de una secuencia poliadenilada en el extremo 3' de un transcripto de ARN-m primario. Las secuencias de terminadores pueden aislarse de las secuencias genéticas de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas. Los terminadores activos en las células animales se conocen y describen en la literatura.

En una realización preferida, la construcción genética puede ser un vector de clonación o expresión, como se conoce en el arte, tal como un plásmido, un cósmido o un fago, que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención, y las células huésped transformadas o transfectadas con éstos. En una realización sin límite, el vector es el plásmido pALK11 (ATCC Acceso N° 207156).

Las construcciones genéticas de la presente invención son particularmente útiles para la producción de componentes inmunogénicos de la composición de vacuna que aquí se describe o para el uso en una vacuna de ADN.

Se pueden emplear un rango de ensayos genéticos de diagnóstico para detectar la infección de un animal por *Lawsonia intracellularis* o un

microorganismo relacionado, utilizando la molécula de ácido nucleico aquí descrita tal como, por ejemplo, los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación de ácido nucleico. Todos tales ensayos están contemplados en la presente invención.

De acuerdo a esto, aún otro aspecto adicional de la invención provee un método de diagnóstico para la detección de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado en una muestra biológica derivada de un animal objeto, dicho método comprende las etapas de hibridar una o más sondas o cebadores derivados de la secuencia de nucleótidos divulgada en la Secuencia ID N° 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a ésta o un homólogo, análogo o derivado de la misma, a una molécula de ADN o ARN presente en dicha muestra y luego detectar dicha hibridación usando medios de detección.

Como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se deriva de la secuencia de nucleótidos determinada en el Nr ID de SEC: 2 y que puede ser usada en la detección de éstos. Las sondas pueden comprender ADN (de filamento único o de doble filamento) o ARN (es decir, ribosondas) o análogos de éstos.

El término "cebador" se refiere a una sonda como se definió más arriba que también puede ser usada para amplificar una secuencia de nucleótidos de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con el mismo en una PCR.

Las sondas y cebadores preferidos incluyen fragmentos de la secuencia de nucleótidos determinada en el Nr ID de SEC: 2 y las moléculas de ADN o ARN sintéticos de filamento único de al menos alrededor de 15 nucleótidos de longitud derivados de la secuencia determinada en el Nr ID de SEC: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria de ésta.

59

Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con esta realización comprenderán al menos alrededor de 20 nucleótidos contiguos derivados del Nr ID de SEC: 2 o una secuencia complementaria de ésta, aún más preferentemente al menos alrededor de 25 nucleótidos contiguos, aún más preferentemente al menos alrededor de 50 nucleótidos contiguos y aún más preferentemente al menos alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 500 nucleótidos derivados de la secuencia determinada en el Nr ID de SEC: 2 o un complemento de ésta. Las sondas y los cebadores que comprenden al Nr ID de SEC: 2 en toda su longitud o una secuencia de nucleótidos complementaria a ésta están también comprendidos por la presente invención.

Para el propósito presente, "homólogos" de una secuencia de nucleótidos deberá tomarse como referido a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido que es funcionalmente equivalente a un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la presente invención o a un polipéptido que es un homólogo, análogo o derivado del Nr ID de SEC: 1, a pesar de la ocurrencia dentro de dicha secuencia, de uno o más sustituciones, inserciones, eliminaciones, o reacomodamientos de nucleótidos.

Los "análogos" de una secuencia de nucleótidos divulgados aquí se deberán tomar en referencia a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido que es funcionalmente equivalente al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la presente invención o a un homólogo, análogo o derivado de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del Nr ID de SEC: 1, a pesar de la ocurrencia de cualquiera de los constituyentes que no son nucleótidos normalmente ausentes en dicha molécula de ácido nucleico aislada tal como, por ejemplo, carbohidratos, radioquímicos incluyendo radio nucleótidos, moléculas reporteras tales como, pero sin limitarse a ellas, biotina, DIG, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, entre otras.

“Derivados” de una secuencia de nucleótidos revelados aquí se tomará como referidos a cualquier molécula de ácido nucleico aislada que contiene al menos alrededor del 50% de la secuencia de nucleótidos idéntica en 15 o más nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótidos determinada en el Nr ID de SEC: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma. Generalmente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser sometida a mutagénesis para producir sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de nucleótidos simples o múltiples. Los derivados de nucleótidos por inserción de una secuencia de nucleótidos de la presente invención incluyen las fusiones terminales 5' y 3' así como las inserciones intra-secuencial de nucleótidos o análogos de nucleótidos simples o múltiples. Las variantes de las secuencias de nucleótidos por inserción son aquellas en las que uno o más nucleótidos o análogos de nucleótidos se introducen dentro de un sitio predeterminado en la secuencia de nucleótidos de dicha secuencia, sin embargo es también posible la inserción al azar cuando se lleva a cabo la selección apropiada del producto resultante. Las variantes de nucleótidos por eliminación se caracterizan por la remoción de uno o más nucleótidos de la secuencia de nucleótidos. Las variantes de nucleótidos por sustitución son aquellas en las que al menos un nucleótido en la secuencia se ha removido y un nucleótido o un análogo de nucleótido diferente ha sido insertado en su lugar. En una realización preferida, dichas sustituciones se seleccionan en base a la degeneración del código genético, como se conoce en el arte, con la variante de sustitución resultante que codifica la secuencia de aminoácidos del Nr ID de SEC: 1.

Las sondas y los cebadores pueden comprender residuos de inosina, adenina, guanina, timidina, citidina o uracilo o análogos funcionales o derivados de los mismos que son capaces de incorporarse dentro de una molécula de polinucleótido, con la condición de que la sonda o el cebador pueda hibridarse

bajo condiciones de al menos baja rigurosidad al Nr ID de SEC: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma, o que sea idéntica en al menos alrededor del 60% al Nr ID de SEC: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma.

La muestra biológica de acuerdo a este aspecto de la invención incluye cualquier órgano, tejido, célula o exudado que contiene o puede contener *Lawsonia intracellularis* o un ácido nucleico derivado de la misma. Una muestra biológica puede prepararse en una solución apropiada tal como, por ejemplo una solución reguladora de extracción o una solución reguladora de suspensión. La presente invención se extiende a la comprobación de las soluciones biológicas así preparadas, con el solo requerimiento que dicha solución comprenda al menos una muestra biológica como se describe aquí.

El ensayo de diagnóstico de la presente invención es útil para detectar al *Lawsonia intracellularis* o a un microorganismo que esté relacionado con él que exprese la proteína de gancho flagelar de la presente invención o un polipéptido del tipo de la proteína de gancho flagelar.

La presente invención claramente contempla los ensayos de diagnóstico que pueden detectar tanto genes específicos como especies específicas. De acuerdo a lo antedicho, en una realización, la sonda o el cebador, o un homólogo, análogo o derivado de ellos, comprende ADN capaz de utilizarse para detectar *Lawsonia spp.* múltiple. En una realización alternativa, la sonda o el cebador o un homólogo, análogo o derivado de ellos comprende ADN capaz de utilizarse para distinguir *Lawsonia intracellularis* de los microorganismos relacionados.

Las regiones mucho menos conservadas dentro del Nr ID de SEC: 2 son particularmente útiles como sondas y/o cebadores específicos para especies para la detección de *L. Intracellularis* y las especies muy cercanas relacionadas.

Más aún, los ensayos de diagnóstico descritos aquí pueden adaptarse a los ensayos específicos de genes o específicos de especies mediante la variación de la rigurosidad de la etapa de hibridación. De acuerdo a esto, una hibridación de baja rigurosidad puede utilizarse para detectar varias especies diferentes de *Lawsonia* en una o más muestras biológicas ensayadas, mientras que una hibridación de alta rigurosidad puede utilizarse para distinguir *Lawsonia intracellularis* de tales otras especies.

Los medios de detección de acuerdo a este aspecto de la invención pueden ser cualquier medio de detección basado en un ácido nucleico tal como, por ejemplo, las técnicas de hibridación de ácido nucleico o el ensayo de hibridación de cromatografía en papel (PACHA), o una reacción de amplificación tal como PCR, o un sistema de amplificación basada en una secuencia de ácido nucleico (NASBA). La invención también comprende el uso de diferentes formatos de ensayos de dichos medios de detección basados en ácidos nucleicos, incluyendo el polimorfismo de restricción de longitud de fragmentos (RFLP), el polimorfismo amplificado de longitud de fragmentos (AFLP), polimorfismo de cadena de filamento único (SSCP), detección por amplificación y diferencia (AMD), reacción en cadena esparcida de polimerasa de secuencia repetitiva (IRS-PCR), reacción en cadena inversa de polimerasa (iPCR), reacción en cadena de polimerasa *in situ* y reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), entre otras.

Cuando el medio de detección es una técnica de hibridación de ácido nucleico, la sonda puede ser marcada con una molécula reportera capaz de producir una señal identificable (por ejemplo, un radioisótopo tal como  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , o una molécula bioestañada). De acuerdo a esta realización, aquellos expertos en el arte notarán que la detección de dicha molécula reportera provee de la identificación de la sonda y que, siguiendo a la reacción de hibridación, se facilita

la detección de las correspondientes secuencias de nucleótidos en la muestra biológica. Las sondas adicionales pueden usarse para confirmar los resultados del ensayo obtenidos usando una sonda única.

Una variación de la técnica de hibridación de ácido nucleico contemplada por la presente invención es el ensayo de hibridación de cromatografía sobre papel (PACHA) descrito por Reinhartz *et al*, (1993) y sus equivalentes, donde una molécula de ácido nucleico objetivo se marca con una molécula reportera tal como biotina, aplicada en un extremo de un fleje de un filtro de membrana de nailon o nitrocelulosa y sometida a la cromatografía bajo la acción de capilaridad u 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 que la sonda de ADN está inmovilizada sobre ella tal como, por ejemplo, en la región media. De acuerdo a este formato de detección, el ácido nucleico objetivo marcado que comprende las secuencias de nucleótidos de *Lawsonia spp.* complementaria a la sonda se hibridará allí y se inmovilizará en esa región de la membrana a la que la sonda está adosada. Las secuencias no complementarias a la sonda difundirán más allá del sitio en donde la sonda está adosada. El ácido nucleico objetivo puede comprender un extracto crudo o parcialmente puro de ADN o ARN o, alternativamente, un ADN amplificado o purificado. Las variaciones adicionales de estos medios de detección que utilizan las secuencias de nucleótidos descritos aquí están claramente incluidos en la presente invención.

Cuando el medio de detección es un RFLP, el ácido nucleico derivado de la muestra biológica, en particular ADN, se digiere con uno o más enzimas endonucleasas de restricción y el ADN digerido se somete a electroforesis, transferido a un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una membrana de nailon o nitrocelulosa, y se hibrida a una sonda marcada opcionalmente con una molécula

reportera como se definió anteriormente. De acuerdo a esta realización, un patrón específico de los fragmentos de ADN se despliega sobre el soporte, en el que dicho patrón es preferentemente específico para una *Lawsonia spp.* particular, para permitir al usuario distinguir entre las diferentes especies de la bacteria.

Cuando el medio de detección es una reacción de amplificación tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de polimerasa o un sistema de amplificación basado en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) o una variante de los mismos, una o más moléculas del cebador de ácido nucleico con una longitud de al menos 15 nucleótidos contiguos que se determina en el Nr ID de SEC: 2 o su secuencia de nucleótidos complementaria, o un homólogo, análogo o derivado de los mismos, se hibrida al ácido nucleico derivado de una muestra biológica, y las copias de ácido nucleico de las secuencias genéticas que codifican FlgE en dicha muestra, o una parte o un fragmento de éste, son amplificadas enzimáticamente.

Aquellos expertos en el arte notarán que debe haber un porcentaje suficientemente elevado de identidad en la secuencia de nucleótidos entre los cebadores y la secuencia de la molécula patrón en la muestra biológica a la cual se hibridan (es decir, la "molécula patrón"). Como se estableció previamente, las condiciones de severidad pueden seleccionarse para promover la hibridación.

Preferentemente, cada cebador es al menos alrededor del 95% idéntico a una región del Nr ID de SEC: 2 o a la secuencia complementaria de su nucleótido en la molécula patrón a la que se hibrida.

Los expertos en el arte notarán también que, de alguna manera, la PCR provee en la hibridación de los cebadores no complementarios a diferentes filamentos es de la molécula patrón, que la ubicación de los cebadores hibridados facilite la síntesis 5' – 3' del ácido nucleico en la región interviniente, bajo el control de una enzima termoestable de polimerasa de ADN. Como consecuencia de esto, la PCR suministra una ventaja por encima de los otros medios de

detección en tanto que la secuencia del nucleótido en la región intermedia de los cebadores hibridados puede ser desconocida y no estar relacionada con cualquier secuencia de nucleótidos conocida.

En una realización alternativa, cuando el medio de detección es AFLP, los cebadores se seleccionan tal que, cuando el ácido nucleico derivado de la muestra biológica, en particular ADN, se amplifica, se producen productos de amplificación de diferentes longitudes a partir de diferentes *Lawsonia spp.* Los productos de amplificación pueden someterse a electroforesis, transferirse a un soporte sólido, como por ejemplo, una membrana de nailon o nitrocelulosa, e hibridarse a una sonda opcionalmente marcada con una molécula reportera como se describió más arriba. De acuerdo a esta realización, un patrón específico de fragmentos de ADN amplificados se despliega en el soporte, siendo dicho patrón opcionalmente específico para una *Lawsonia ssp.* particular, a fin de permitir al usuario distinguir entre las diferentes especies de la bacteria de una forma muy parecida a la del análisis RFLP.

La técnica de AMD facilita, no sólo la detección del ADN de la *Lawsonia spp.* en una muestra biológica, sino que también la determinación de las variantes de secuencias de nucleótidos que difieren de los cebadores y sondas utilizadas en el formato del ensayo. Cuando el medio de detección es AMD, la sonda se marca en su finalización con una molécula reportera adecuada y se mezcla con un exceso de la molécula patrón amplificada. Las mezclas son subsecuentemente desnaturalizadas y se las deja renaturalizarse para formar las "moléculas híbridas sonda : patrón" o los "híbridos" del ácido nucleico, de manera tal que cualquier variación en la secuencia de nucleótidos entre la sonda y la molécula patrón a la cual se hibrida romperá el apareamiento base en los híbridos. Estas regiones desiguales son sensibles a modificaciones químicas específicas utilizando hidroxilamina (residuos desiguales de citosina) o tetróxido de osmio (residuos

desiguales de timidina), permitiendo la subsiguiente segmentación del sitio modificado utilizando piperidina. El ácido nucleico segmentado puede analizarse utilizando electroforesis de desnaturalización de gel de poliacrilamida, seguido por hibridación estándar del ácido nucleico como se describió *supra*, para detectar las secuencias de nucleótidos derivados de *Lawsonia*. Los expertos en el arte estarán enterados de los medios de marcación en el extremo de una sonda genética de acuerdo a la ejecución de la invención descrita en esta realización.

De acuerdo a esta realización, el uso de una sonda simple marcada en el extremo permite la localización unívoca de la variación de la secuencia. La distancia entre el (los) punto(s) de variación de la secuencia y la marca en el extremo se representa por el tamaño del producto de segmentación.

En una realización alternativa de AMD, la sonda se marca en ambos extremos con una molécula reportera, para facilitar el análisis simultáneo de ambos filamentos del ADN.

Cuando el medio de detección es RT-PCR, la muestra de ácido nucleico comprende una molécula de ARN que es un producto de transcripción del ADN derivado de *Lawsonia* o un homólogo, análogo o derivado de éste. Como consecuencia, este formato de ensayo es particularmente útil cuando se desea determinar la expresión en uno o más genes de *Lawsonia*. De acuerdo con esta realización, la muestra de ARN se transcribe en reversa para producir el ADN de filamento simple complementario que es subsecuentemente amplificado utilizando procedimientos estándares.

Las variaciones de las realizaciones descritas aquí se describen en detalle en McPherson *et al.* (1991).

La presente invención se extiende claramente al uso de cualquiera o todos los medios de detección referidos anteriormente con los propósitos de diagnóstico

de la infección por *Lawsonia spp.* y en particular por *Lawsonia intracellularis* en un animal.

Los medios de detección de la reacción de amplificación descritos anteriormente pueden ser también acoplados a los medios de detección clásicos de la reacción de hibridación para mejorar más la sensibilidad y la especificidad del método inventivo, tal como mediante la hibridación de ADN amplificado con una sonda que es diferente de cualquiera de los cebadores usados en la reacción de amplificación.

De modo similar, los medios de detección de la reacción de hibridación descritos más arriba pueden ser también acoplados a una segunda etapa de hibridación empleando una sonda que es diferente de la sonda usada para la primer reacción de hibridación.

Un aspecto adicional de la invención provee una sonda aislada o cebador determinada en el Nr ID de SEC: 2 o una secuencia complementaria de nucleótidos de ésta.

La presente invención no se extiende a los polipéptidos inmunogénicos que comprende exclusivamente a la región terminal C del polipéptido FigE como se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/AU96/00767 o las secuencias de nucleótidos que lo codifica o las composiciones de vacuna de éste.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

### **EJEMPLO 1**

#### **FUENTES DE TEJIDO DE CERDO**

##### **Intestinos de Cerdo Infectados**

Las secciones de íleon excesivamente engrosado se tomaron de cerdos natural o experimentalmente afectados por PPE. La presencia de la bacteria *L. intracellularis* en el íleon se confirmó usando el 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 LA BACTERIA *LAWSONIA INTRACELLULARIS* DE ÍLEON DE CERDO INFECTADO

Se extrajo la bacteria *Lawsonia Intracellularis* directamente a partir de las lesiones de PPE en cerdos mediante filtración y purificación posterior sobre un gradiente Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) como sigue. Se recolectó el íleon infectado de los cerdos y se confirmó la presencia de *L. intracellularis* histológicamente antes del almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las secciones del íleon fueron disueltas y aproximadamente 8 g de mucosa infectada se removieron raspando de la pared intestinal. La mucosa se homogeneizó con 40 ml de solución salina reguladora estéril de fosfato (PBS) a velocidad media durante 10 segundos usando un mezclador Sorvall. Se centrifugó la suspensión a 2000 xg durante 4 minutos. Se descartó el sobrenadante y los pellets de las células se resuspendieron en 40 ml de PBS y se volvieron a centrifugar. Este paso de lavado se repitió 2 veces. El pellet de células se resuspendieron luego en 20 ml de PBS y se homogeneizó a velocidad plena durante un minuto para liberar la bacteria *L. intracellularis*.

Este material homogeneizado se centrifugó a 1000 xg durante 4 minutos obteniendo un pellet que contiene una mezcla cruda de células epiteliales homogeneizadas y la bacteria intestinal. El sobrenadante se filtró utilizando filtros con tamaño de poro de 3  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$  y 0,8  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, MA, USA). El filtrado se centrifugó a 8000 xg durante 30 minutos, dando como resultado un pequeño pellet de la bacteria *L. intracellularis*. La bacteria *L. intracellularis* fue luego purificada adicionalmente utilizando un gradiente Percoll autoformante de

45% como sigue: 2 mls de la preparación de la bacteria se mezcló por inversión dentro de 30 mls de un gradiente Percoll autoformante de 45% (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) (45% v/v de Percoll, 150 mM de NaCl). Los gradientes se centrifugaron en una centrífuga Sorvall utilizando un rotor SS34 a 20.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Usualmente se forma un número de bandas dentro del gradiente. La banda (usualmente localizada aproximadamente a 10- 20 mm de la base del tubo) que contiene la bacteria *L. intracellularis* se recolectó y el volumen se llevó a 16 mls en PBS. La solución se centrifugó luego durante 15 minutos a 8000 r.p.m. El pellet resultante se lavó con PBS antes de ser resuspendido a un volumen final de aproximadamente un mililitro.

### EJEMPLO 3

#### PURIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO DE LA *LAWSONIA* *INTRACELLULARIS*

El ADN genómico se extrajo de la bacteria *Lawsonia intracellularis* purificada por el gradiente Percoll recuperada por el rascado del íleon de cerdo infectado (Ejemplo 2) mediante los métodos descritos por Anderson *et al* (1984) y Sambrook *et al* (1989).

Resumidamente, las células de *L. intracellularis* se transformaron en pellets mediante centrifugación a 14.000 xg a 4°C durante 15 min. Las células se resuspendieron en 10 ml de solución reguladora TE (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8,00) y se centrifugó como anteriormente. El pellet fue luego resuspendido en 4 ml de solución reguladora TE que contiene 4 mg/ml de lisozima (Sigma Chemical Co.) y se incubó a 37 °C durante 20 min. Se agregaron SDS y la proteinasa K (Promega, WI, USA) a concentraciones finales de 1% (p/v) y 200 µg/ml, respectivamente, y se continuó la incubación a 45°C durante 4 horas. El lisado se extrajo luego con un volumen igual de fenol, fenol: cloroformo (1:1) y cloroformo, respectivamente, y los ácidos nucleicos se recuperaron del

70  
21

sobrenadante mediante precipitación con etanol. El pellet se disolvió suavemente en TE, se trató con RnaseA (Promega, WI, USA) a 37°C durante 30 min y luego se digirió con proteinasa K en presencia de 0,5% (p/v) de SDS durante 1 hora a 50°C. Luego se realizó otro tratamiento con fenol: cloroformo (1;1) y precipitación con etanol, el ADN purificado se disolvió en TE. El ADN se almacenó luego a 4°C.

#### EJEMPLO 4

##### INMUNOSELECCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE *L. INTRACELLULARIS* UTILIZANDO SUERO EXPERIMENTAL DE CERDOS VACUNADOS

El ADN genómico del Ejemplo 3 fue parcialmente digerido con la endonucleasa de restricción Sau3A (Promega) y ligado dentro de Lambda ZAP Express (Stratagene, CA, USA). Se hizo una placa con la biblioteca lambda sobre un área de células de *E. Coli* XLI-Blue a una densidad de 1.000 unidades de formación de fagos (pfu) por 150 mm de placa de agar de caldo de cultivo L. La biblioteca se escaneó utilizando el método descrito en el Manual Técnico de Protoblot (Promega, WI, USA). Se bloquearon los filtros con solución reguladora de bloqueo (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,05% Tween 20, 5% Blotto), previo a la selección con suero de los cerdos Y12 y/o 395. Los cerdos Y12 y 395 habían sido inmunizados con *L. intracellularis* muertos con formalina y *L. intracellularis* muertos por calor, respectivamente, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/AU96/00767. Las placas positivas que fueron identificadas en la selección primaria, se recolectaron, se volvieron a colocar en placas a una densidad menor y se volvieron a seleccionar con cada uno o ambos de los sueros hasta que se aisló una placa individual. El ADN del plásmido del clon del fago de lambda positivo se aisló por escisión *in vivo*, como lo recomienda el fabricante (Stratagene, CA, USA). Se identificó de esta forma un clon que contiene un gen flgE parcial de *L. intracellularis*.

71  
72

## EJEMPLO 5

### ANÁLISIS DE LA *L. INTRACELLULARIS* QUE EXPRESA LOS CLONES DE FAGOS

El ADN del fagémido de los clones de  $\lambda$ ZAP positivo que expresa al fago fue aislado mediante la escisión *in vivo*, en las condiciones recomendadas por el fabricante (Stratagene).

El ADN del plásmido para el análisis de la restricción se extrajo mediante lisis alcalina, como se describe en Sambrook *et al* (1989), y por secuencias automatizadas, utilizando el Equipo de Plásmido de Alta Pureza, como lo recomienda el fabricante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

La secuencia de nucleótidos (1005 bp) de la región 5' del gen *flgE* de la *Lawsonia intracellularis* se obtuvo del clon aislado que se describe en el Ejemplo 4. La porción remanente del gen *flgE* se amplificó utilizando el Sistema Vectorette como lo describió el fabricante (Genosys Biotechnologies Inc., TX, USA).

Resumidamente, el Sistema Vectorette permite la amplificación de fragmentos de ADN específicos cuando sólo se conoce la secuencia de un cebador. Hay tres etapas básicas como sigue:

(i) la digestión del ADN objetivo (en este caso el ADN genómico de la *Lawsonia intracellularis*).

(ii) el enlace de oligonucleótidos sintéticos al ADN digerido; y

(iii) la amplificación de la secuencia de nucleótidos del *flgE* remanente utilizando un primer cebador específico para la secuencia 5' conocida del *flgE* y el segundo cebador dirigido hacia el enlace del oligonucleótido sintético.

Se obtuvo luego la secuencia de nucleótidos del producto amplificado que contiene el gen *flgE*. La realización de la secuencia del ADN del ADN amplificado y las inserciones de los clones aislados se llevó a cabo por el método Tintura-terminador de secuenciación automatizada (ABI Biosystems, CA, USA). La

72  
23

secuencia de nucleótidos de la región codificadora completa del gen *flgE* se determina en el Nr ID de SEC: 2.

### EJEMPLO 6

#### IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA *L. INTRACELLULARIS*

La similitud de secuencia de las moléculas de ADN que codifican los candidatos putativos de vacuna identificados en los Ejemplos 4 y 5, se identifica usando los algoritmos BLAST (Gish y States, 1993). La secuencia de nucleótidos Secuencia ID N° 2 y su correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (Secuencia ID N° 1) tienen una similitud de secuencia a los polipéptidos de gancho flagelar derivados de otros microorganismos patógenos (Figura 1). Las regiones únicas del polipéptido *flgE* de la *Lawsonia intracellularis* son aparentes a partir de una comparación de la secuencia de aminoácidos de este polipéptido a aquellos de los otros microorganismos (Figura 1).

### EJEMPLO 7

#### Expresión y purificación del FlgE recombinante en *Escherichia coli*

El gen *FlgE* fue amplificado a partir del ADN cromosómico de *L. intracellularis* usando los siguientes cebadores:

Cebador FlaF: 5'- GCGAATTCCATATGATGGGGAGTTTGTATTGNTGCC -3'  
(Nr ID de SEC: 5); y

Cebador FlgE3': 5'- GCTCTAGAGACTAGTCATATAACGCTTTAGTTCAAGTGC -  
3' (Nr ID de SEC: 6).

El fragmento resultante de PCR de 1,5 kb fue clonado dentro del vector pGEMT-TA (Promega). El fragmento de ADN que contiene *FlgE* fue aislado de esta construcción luego de la digestión completa con *XbaI* y digestión parcial con *NdeI*. La banda resultante fue purificada con gel y clonada direccionalmente,

como un fragmento *NdeI-XbaI*, dentro de un vector de expresión inducible por calor  $\lambda$ -PL.

El vector recombinante se introdujo dentro de las células de *E. Coli* que fueron mantenidas a 30°C. La inducción por calor de la expresión de FlgE ocurrió cambiando la temperatura de incubación a 42°C.

Las células húmedas de *E. Coli* que expresan el FlgE recombinante se sometieron a lisis mediante la homogeneización a 10.000 psi (2 pasadas), y el material particulado que comprende la proteína recombinante FlgE, se recolectó por centrifugación. El material en pellets se lavó con solución reguladora 2 x RIPA/TET [2 x RIPA es Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,3 M, deoxicolato de sodio al 2,0%, y 2% (v/v) de Igepal CA-630™ (Sigma); TET es Tris 0,1 M (pH 8,0), 50 mM EDTA, y 2% (v/v) Triton X-100] en una relación 5:4 (p/v). El pellet lavado se solubilizó luego en Urea 8M, Tris 50 mM, pH 8,0 y se centrifugó (40.000 xg; 40 min).

La proteína solubilizada se aplicó en una columna Q-Sepharose FF utilizando Urea 4M, Tris 50 mM, pH 7,0 como solución reguladora, y se eluyó usando un gradiente de sal. La proteína deseada eluyó de esta columna en NaCl al 10-15% en concentración. Las fracciones de elución en lotes se dializaron en etapas usando una membrana de 10kDa de peso molecular de corte contra Urea 2M, Tris 50 mM (pH 7,2), y luego se dializó en etapas a Tris 50 mM, pH 7,0. El producto final se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu$ M. La concentración de proteína de la solución filtrada fue 0,85 mg/ml, con una pureza estimada de más de alrededor del 80% como se determinó usando SDS/PAGE.

## EJEMPLO 8

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA EL DEPÓSITO – AMPLIFICACIÓN DEL *flgE*

74  
75

El ADN patrón se purificó del ADN aislado de la mucosa intestinal del cerdo infectado aislada del íleon de cerdos infectados con *L. intracellularis*. La purificación del ADN de la mucosa intestinal se llevó a cabo de acuerdo al método de Nollau *et al.* (1996). Debido a la presencia de polisacáridos contaminantes y otros materiales, el contenido de ADN de las muestras no fue cuantificado y las muestras fueron usadas empíricamente en las amplificaciones de PCR.

Las amplificaciones de PCR consistieron en 1 µl de mucosa intestinal de cerdo, 1 µM de cada uno de los siguientes (RA170: 5' CTATTTT TAGGAGATGTTATC 3'; Nr ID de SEC: 3) y los cebadores de reversa (RA171: 5' TACAAAATTAACAATAAAATAC 3'; Nr ID de SEC: 4), 7,5 unidades de polimerasa KlenTaqI (Ab Peptides, Inc., St. Louis, Missouri), 0,075 unidades de polimerasa *Pfu* (Stratagene Cloning System, La Jolla, California), 1 x PC2 (KlenTaqI) solución reguladora y 0,2 mM dNTPs en un volumen de 50 µl. La PCR fue llevada a cabo en 4 etapas: (i) 94°C durante 5 min; (ii) 94°C durante 1 min, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 min, x 33 ciclos; (iii) 72°C durante 10 min, (iv) mantener a 4°C.

El fragmento de PCR que codifica el gen *flgE* de *L. intracellularis* se subclonó dentro de pCR2.1-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se designó como pALK11 (ATCC Acceso N° 207156).

#### DEPÓSITOS DE MICROORGANISMOS

El plásmido pALK11 fue depositado con la Colección de Cultivo Tipo Americana (ATCC) en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, USA el 11 de Marzo de 1999 y se le asignó el número de Acceso de ATCC 207156.

#### REFERENCIAS

1. Altuvia, Y., Schueler, O., y Margalit, H. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**: 244-250.
2. Amann y Brosius (1985). *Gene (Gen)* **40** 183.

28  
75

3. Anderson, B.J., M.M. Bills, J.R. Egerton, y J.S. Mattick. (1984) *Journal of Bacteriology (Periódico de Bacteriología)* **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 (En: Protocolos Corrientes en Biología Molecular)*. Wiley Interscience (ISBN 047150338).
5. Barker, I.K. y Van Dreumen, A.A. (1985) *In "Pathology of Domestic Animals" (Patología de Animales Domésticos)*, 3° Edición, 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 (Anticuerpos monoclonales en la terapia de cáncer)*, Alan R. Bliss Inc., pp 77-96.
7. Dayhof, M.D. (1978) *In: Nat. Biomed. Res. Found. Washington D.C. Vol 5, Suppl. 3.*
8. De Groot, A.S., Carter, E.J., Roberts, C.G.P., Edelson, B.T., Jesdale, B.M., Meister, G.E., Houghten, R.A., Montoya, J., Romulo, R.C., Berzofsky, J.A., y Ramirez, B.D.L.L. (1995) *Vaccines (Vacunas)* **96**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
9. Devereux, J., Haeberli, P. y Smithies, O. (19(4). *Nucl. Acids Res.* **12**: 387-395.
10. Elwell, MR, Chapman, AL y Frenkel, JK (1981) *Veterinary Pathology (Patología Veterinaria)* **18**: 136-139.
11. Fox, JG, Murphy, JC, Otto, G Pecquet-Goad, ME, Larson, QHK y Scott JA (1989) *Veterinary Pathology (Patología Veterinaria)* **26**: 515-517.
12. Gabriel, E. Meister, G.E., Caroline, G.P., Roberts, C.G.P., Berzofsky, J.A., y De Groot, A.S. (1995) *Vaccines (Vacunas)* **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 (Periódico Americano de Investigación Veterinaria)* **44**: 361-367.
14. Gish, W. y States, D.J. (1993) *Nature Genetics (Genética de la Naturaleza)* **3**: 266-272.
15. Goodman et al. (1987) *Biopolymers (Biopolímeros)* **26**: 525-532.
16. Huse et al. (1989) *Science (Ciencia)* **246**: 1275-1281.
17. Jones, L.A., Nibbelink, S., y Glock, R.D. (1997) *Am. J. Vet. Res.* **58**: 1125-1131.
18. Jonsson, L. y Martinsson, K. (1976) *Acta Veterinaria Scandinavica* **17**: 223-232.
19. Kohler y Milstein (1975) *Nature (Naturaleza)* **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 de Clinical Microbiology (Periódico de Microbiología Clínica)* **31**: 1136-1142.
22. Love, R.J., y Love, D.M. (1977) *Veterinary Record* **100**: 473.
23. Margalit, H., Spouge, J.K., Cornette, J.L., Cease, K.B., DeLisi, C., y Berzofsky, J.A. (1987) *J. Immunol.* **138**: 2213-2229.
24. Mason, RW, Monkton, P y Hasse D (1998) *Australian Veterinary Journal (Periódico Veterinario Australiano)* (propuesto para publicación)
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, RA, Macintyre, N, Neef, N., y Lawson GHK (1993) *Infection and Immunity (Infección e Inmunidad)* **61**: 4286-4292.
27. McOrist, S et al (1995) *International Journal of Systematic Bacteriology (Periódico Internacional de Bacteriología Sistemática)* **45**: 820-825.

27  
18

28. McPherson, M.J., Quirke, P., y Taylor, G.R. (1991) *In: PCR: A Practical Approach*. (editores de las series, D. Rickwood y B.D. Hames) IRL Press Limited, Oxford. Pp 1-253.
29. Meister, G.E., Roberts, C.G.P., Berzofsky, J.A., y De Groot, A.S. (1995) *Vaccine (Vacuna)* **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 (Alergia)* **50**: 37-44.
32. Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* **48**: 443-453.
33. Nollau, P., Moser, C., y C. Wagener (1996) *Bio Techniques* **20**: 784-788.
34. O'Neil, I.P.A. (1970) *Veterinary Record* **87**: 742-747.
35. Parker, K.C., Bednarek, M.A., y Coligan, J.E. (1994) *J. Immunol.* **152**: 163-175.
36. Portoghese *et al.* (1990) *J. Med. Chem.* **33**: 1714-1720.
37. Reinhartz, A., Alejem, S., Samson, A., y Herzberg, M. (1993). *Gene (Gen)* **136**: 221-226.
38. Rowland, A.C., y Lawson, G.H.K. (1976) *Veterinary Record* **97**: 178-180.
39. Sambrook, J., E.F. Fritsch, Y T. Maniatis (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition (Clonación molecular. Un manual de laboratorio. Segunda edición)*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
40. Schodeb, TR y Fox JG (1990) *Veterinary Pathology* **27**: 73-80.
41. Shimatake y Rosenberg (1981) *Nature (Naturaleza)* **292**: 128.
42. Stills, H.F. (1991). *Infection and immunology (Infección e inmunología)* **59**: 3327-3236.

43. Straw, B.E. (1990) *Journal of American Veterinary Medical Association* (*Periódico de la Asociación Americana de Médicos Veterinarios*) **197**: 355-357.
44. Studier y Moffat (1986) *J. Mol. Biol.* **189**: 113.
45. Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994) *Nucl. Acids. Res.* **22**: 4673-4680.
46. Vajda, S., y DeLisi, C. (1990) *Biopolymers (Biopolímeros)* **29**: 1755-1772.
47. Van Regenmortel, M. (1992) Molecular dissection of protein antigens. In: *Structure of antigens (Disección molecular de antígenos de proteína. En . Estructura de antígenos)*, (van Regenmortel M., ed.) CRC Press, Londres, pp 1-27.

79  
80

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Agriculture Victoria Services Pty Ltd AND Pig Research and Development Corporation AND Pfizer Products Inc.

<120> Nuevo gen de Lawsonia spp., y sus usos IV

<130> p:\oper\mzo\lawson-4.pct

<140>

<141>

<150> US 60/133,973

<151> 1999-05-12

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 502

<212> PRT

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 1

Met Met Gly Ser Leu Phe Ile Gly Ala Thr Gly Met Lys Thr His Ser

1 5 10 15

Thr Gly Leu Gly Thr Val Ser Asn Asn Ile Ala Asn Ala Asn Thr Ile

20 25 30

Gly Tyr Lys Gln Gln Gln Val Val Phe Gln Asp Leu Phe Ser Gln Asp

35 40 45

Leu Ala Ile Gly Ser Thr Gly Ser Gln Gly Pro Asn Gln Ala Gly Met

50 55 60

Gly Ala Gln Val Gly Ser Val Arg Thr Ile Phe Thr Gln Gly Ala Phe

65 70 75 80

80  
81

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Phe Gln Val Thr Leu Glu Asp Lys Val His Tyr Thr Arg Ala Gly Asn |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Phe Arg Phe Thr Gln Asp Gly Phe Leu Asn Asp Pro Ser Gly Phe Thr |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Leu Met Gly Ser Arg Ile Ser Asn Asn Pro Asn Ile Lys Lys Glu Thr |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Leu Gln Pro Ile Gln Leu Asp Phe Asn Asp Pro Thr Val Ala Lys Ser |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Pro Ala Lys Thr Ser Thr Ala Leu Asn Ala Val Val Asn Leu Gly Asp |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Thr Asp Lys Thr Gln Ser Glu Ala Asn Pro Tyr Phe Ala Leu Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Glu Ser Trp Lys Gly Asn Gly Thr Pro Pro Ile Ser Thr Ser Asn Tyr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Tyr Ala Gln Pro Met Arg Val Tyr Asp Gln Gln Gly Asn Ser His |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Asp Ile Thr Val Tyr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Ser Thr Gly Ser Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Phe Glu Tyr Leu Val Ala Met Asn Pro Ser Glu Asp Gly Ser Ala |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Ala Ser Gly Thr Asp Ser Ala Gly Leu Leu Met Ser Gly Thr Met Thr |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |

81

Phe Ser Ser Asn Gly Glu Leu Lys Asn Met Thr Ala Phe Thr Pro Thr  
275 280 285

Gly Ser Ala Thr Lys Asp Leu Asn Ala Trp Gln Pro Ala Pro Leu Val  
290 295 300

Asn Gly Leu Pro Gln Phe Ser Ala Asn Phe Val Gly Ala Gly Ile Gln  
305 310 315 320

Pro Leu Thr Leu Asp Phe Gly Ile Lys Ser Gln Gln Asn Met Trp Ala  
325 330 335

Gly Ala Pro Ala Ser Ala Ala Ala Ile Gly Thr Asp Ile Gly Lys Leu  
340 345 350

Pro Ser Met Met Pro Ile Gln Thr Ser Ser Gly Asn Ser Thr Ala Arg  
355 360 365

Asn Gly Ser Ser Ser Thr Arg Arg Tyr Ser Gln Asp Gly Tyr Pro Gln  
370 375 380

Gly Asp Leu Val Asp Val Thr Ile Thr Ser Glu Gly Lys Leu Gln Gly  
385 390 395 400

Lys Tyr Ser Asn Ser Gln Val Val Asp Phe Tyr Asn Ile Pro Leu Ala  
405 410 415

Arg Phe Thr Ser Glu Asp Gly Leu Arg Arg Glu Gly Asn Asn His Tyr  
420 425 430

Ser Ala Thr Leu Asp Ser Gly Gly Pro Glu Phe Gly Leu Pro Gly Thr  
435 440 445

82  
53

Ser Asn Tyr Gly Lys Leu Ser Val Asn Gln Leu Glu Thr Ser Asn Val  
450 455 460

Asp Met Ser Arg Glu Met Val Asn Met Ile Ile Ile Gln Arg Gly Phe  
465 470 475 480

Gln Met Asn Ser Lys Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Met Leu Gln Lys  
485 490 495

Ala Leu Glu Leu Lys Arg  
500

<210> 2

<211> 1509

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1506)

<400> 2

atg atg ggg agt ttg ttt att ggt gca aca ggt atg aaa acc cat agt 48  
Met Met Gly Ser Leu Phe Ile Gly Ala Thr Gly Met Lys Thr His Ser  
1 5 10 15

aca ggg ttg ggt att gtc tcc aat aat att gct aac gca aat acc att 96  
Thr Gly Leu Gly Thr Val Ser Asn Asn Ile Ala Asn Ala Asn Thr Ile  
20 25 30

ggg tat aag cag caa cag gta gta ttc cca gac ctg ttt agt caa gat 144  
Gly Tyr Lys Gln Gln Gln Val Val Phe Gln Asp Leu Phe Ser Gln Asp  
35 40 45

83  
55

tta gca ata ggt tct act gga agt cag ggg cca aac cag gct ggt arg 192  
 Leu Ala Ile Gly Ser Thr Gly Ser Gln Gly Pro Asn Gln Ala Gly Met  
 50 55 60

gga gca cag gtt gga agt gtt cgc aca att ttt aca cag ggt gct ttt 240  
 Gly Ala Gln Val Gly Ser Val Arg Thr Ile Phe Thr Gln Gly Ala Phe  
 65 70 75 80

gaa cct ggc aat agt gta aca gat ctt gct att ggt gga aaa ggt ttt 288  
 Glu Pro Gly Asn Ser Val Thr Asp Leu Ala Ile Gly Gly Lys Gly Phe  
 85 90 95

ttt cag gtt acn tta gag gat aac gta cac tat aca cga gca ggg aat 336  
 Phe Gln Val Thr Leu Glu Asp Lys Val His Tyr Thr Arg Ala Gly Asn  
 100 105 110

ttt cgt ttt act caa gat ggt ttt tta aat gat cct agc gga ttt act 384  
 Phe Arg Phe Thr Gln Asp Gly Phe Leu Asn Asp Pro Ser Gly Phe Thr  
 115 120 125

tta atg ggc tca aga ata tct aat aat cct zac ata aaa aag gaa acc 432  
 Leu Met Gly Ser Arg Ile Ser Asn Asn Pro Asn Ile Lys Lys Glu Thr  
 130 135 140

ctt gaa cca att cag tta gac ttt aat gat cct aca gta gca aag tct 480  
 Leu Glu Pro Ile Gln Leu Asp Phe Asn Asp Pro Thr Val Ala Lys Ser  
 145 150 155 160

cct gca aaa aca agt aca gca tta aac gct gtg gta aac ctt ggt gat 528  
 Pro Ala Lys Thr Ser Thr Ala Leu Asn Ala Val Val Asn Leu Gly Asp  
 165 170 175

agt aca gat aaa aca caa agt gaa gct aat cca tac ttt gca ctt ctt 576  
 Ser Thr Asp Lys Thr Gln Ser Glu Ala Asn Pro Tyr Phe Ala Leu Leu

84  
85

| 180                                                             | 195 | 190 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| gag agc tgg aaa gga aat gga aca cct cct att cct aca tca aac cac |     |     | 524 |
| Glu Ser Trp Lys Gly Asn Gly Thr Pro Pro Ile Ser Thr Ser Asn Tyr |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| tca tat gca caa cct atg aga gta tat gat caa caa gga aat tct cac |     |     | 672 |
| Ser Tyr Ala Gln Pro Met Arg Val Tyr Asp Gln Gln Gly Asn Ser His |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| gat ata act gta tat tct gat gga gca ccc tct tca aca gga agt aaa |     |     | 720 |
| Asp Ile Thr Val Tyr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Ser Thr Gly Ser Lys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| aca ttt gaa tac ctc gta gct atg aat cct agt gaa gat gga agt gct |     |     | 768 |
| Thr Phe Glu Tyr Leu Val Ala Met Asn Pro Ser Glu Asp Gly Ser Ala |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| gca tca gga aca gat agt gca ggt ctc cta atg tct gga act atg aca |     |     | 816 |
| Ala Ser Gly Thr Asp Ser Ala Gly Leu Leu Met Ser Gly Thr Met Thr |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| ttt tca agt aat ggc gaa tta aaa tat atg aca gct ttt act cct act |     |     | 864 |
| Phe Ser Ser Asn Gly Glu Leu Lys Asn Met Thr Ala Phe Thr Pro Thr |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| ggc tct gca aca aaa gat tta aat gca tgg caa cca gca cca ata gtc |     |     | 912 |
| Gly Ser Ala Thr Lys Asp Leu Asn Ala Trp Gln Pro Ala Pro Leu Val |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| aat ggt tta cca caa ttt tca gca aat ttt gtt ggt gca gga ata cag |     |     | 960 |
| Asn Gly Leu Pro Gln Phe Ser Ala Asn Phe Val Gly Ala Gly Ile Gln |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |

85  
85

ccg tta aca tta gac ttc gga att aaa agc caa cag aat atg tgg gca 1008  
Pro Leu Thr Leu Asp Phe Gly Ile Lys Ser Gln Gln Asn Met Trp Ala

325 330 335

gga gct cca gca tcc gct gct gcc ata ggt aca gat att ggg aaa ttg 1056  
Gly Ala Pro Ala Ser Ala Ala Ala Ile Gly Thr Asp Ile Gly Lys Leu

340 345 350

cca tca atg atg cca ata caa aca tcc agc ggr aat tct aca gca aga 1104  
Pro Ser Met Met Pro Ile Gln Thr Ser Ser Gly Asn Ser Thr Ala Arg

355 360 365

aat gga tca tct tca aca aga aga tat agc caa gat ggt tat cct cag 1152  
Asn Gly Ser Ser Ser Thr Arg Arg Tyr Ser Gln Asp Gly Tyr Pro Gln

370 375 380

gga gat cta gta gat gtc aca att acc tct gaa ggg aaa tta caa ggt 1200  
Gly Asp Leu Val Asp Val Thr Ile Thr Ser Glu Gly Lys Leu Gln Gly

385 390 395 400

aag tat agt aat agt cag gtc gtt gat tct tat aat act cct tta gca 1248  
Lys Tyr Ser Asn Ser Gln Val Val Asp Phe Tyr Asn Ile Pro Leu Ala

405 410 415

cgc ttc aca agt gag gat gga tta aga cga gaa ggg aat aac cat tat 1296  
Arg Phe Thr Ser Glu Asp Gly Leu Arg Arg Glu Gly Asn Asn His Tyr

420 425 430

tcc gca aca ctt gac tca ggt ggr cca gag ttt gga ttg cca gga aca 1344  
Ser Ala Thr Leu Asp Ser Gly Gly Pro Gln Phe Gly Leu Pro Gly Thr

435 440 445

tct aac tat gga aaa ctt agt gtg aat caa ctt gag act tct aac gta 1392  
Ser Asn Tyr Gly Lys Leu Ser Val Asn Gln Leu Glu Thr Ser Asn Val

450 455 460

86  
87

gac atg agc aga gaa atg gtt aat atg att att att gaa cgt ggt ttt 1440  
 Asp Met Ser Arg Glu Met Val Asn Met Ile Ile Ile Gln Arg Gly Phe  
 465 470 475 480

cag atg aat agt aaa tct gtt aca sca gca gac sca atg cta caa aaa 1488  
 Gln Met Asn Ser Lys Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Met Leu Gln Lys  
 485 490 495

gca ctt gaa cta aag cgt taa 1509  
 Ala Leu Glu Leu Lys Arg  
 500

<120> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 3  
 ctatttttag gagatgttat c 21

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide

<400> 4  
 taccacattt acaataaatt ac 22

87  
58

<120> 5  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 5  
 gccaattcca catgatgggg agtttggtta ttgntgca

38

<210> 6  
 <211> 40  
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

## REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Un polipéptido inmunogénico aislado o recombinante que comprende, imita o tiene una reacción cruzada con un epítipo de célula B o de célula T de un polipéptido *Lawsonia spp.* FlgE.

2. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 1 capaz de provocar la producción de anticuerpos contra *Lawsonia spp* cuando se administra a un animal, cerdo o ave.

3. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 1 capaz de conferir una respuesta inmunológica protectora contra *Lawsonia spp* cuando se administra al animal, ave o cerdo.

4. EL polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 2 donde *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.

5. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 3 donde *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.

6. Un polipéptido aislado o recombinante seleccionado de lo siguiente:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia determinada en el Nr ID de SEC: 1;

(ii) un homólogo, análogo o derivado de (i) que imita a un epítipo de célula B o de célula T de un polipéptido *Lawsonia spp.* FlgE.

7. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 6 capaz de generar la producción de anticuerpos contra *Lawsonia spp* en un animal, cerdo o ave.

8. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 7 capaz de conferir una respuesta inmunológica protectora contra *Lawsonia spp* en un animal, cerdo o ave.

9. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 8, capaz de inducir la inmunidad humoral contra *Lawsonia spp* en un animal, cerdo o ave.

10. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 9, capaz de inducir la inmunidad humoral contra *Lawsonia spp* en un animal porcino.

11. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 8 donde la *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.

12. El polipéptido aislado o recombinante de la Reivindicación 10 donde *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.

13. El polipéptido aislado o recombinante de la Reivindicación 6 que comprende la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica FlgE de pALK11 (ATCC 207156) y es capaz de generar la producción de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* cuando se administra a un animal, cerdo o ave.

14. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 13 que está formado esencialmente por la secuencia de aminoácido del Nr ID de SEC: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia que codifica FlgE de pALK11 (ATCC 207156).

15. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 13 o 14 capaz de inducir una respuesta inmunológica protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un animal, cerdo o ave.

90  
9

16. El polipéptido inmunogénico aislado o recombinante de la Reivindicación 15 capaz de inducir una respuesta inmunológica protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un cerdo.

17. Una composición para vacuna para la profilaxis o tratamiento de la infección de un animal por *Lawsonia spp.*, dicha composición para vacuna comprende un componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o su homólogo, análogo o derivado inmunogénico que tiene reacción inmunológicamente cruzada con *Lawsonia intracellularis*; y uno o más portadores, diluyentes o adyuvantes adecuados para el uso veterinario o farmacéutico.

18. La composición para vacuna de acuerdo con la Reivindicación 17 donde *Lawsonia spp* es *L. intracellularis*.

19. La composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 18 donde el componente inmunogénico comprende un polipéptido aislado o recombinante que comprende la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica FlgE de pALK11 (ATCC 207156).

20. La composición para vacuna de la Reivindicación 19 donde el componente inmunogénico está formado esencialmente por la secuencia de aminoácido del Nr ID de SEC: 1.

21. Una composición para vacuna combinada para la profilaxis o el tratamiento de la infección de un animal por *Lawsonia spp.*, dicha composición para vacuna comprende:

(i) un primer componente inmunogénico que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos alrededor de un 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr

ID de SEC: 1 o su homólogo, análogo o derivado que tiene una reacción inmunológicamente cruzada con *Lawsonia intracellularis*;

(ii) un segundo componente inmunogénico que comprende un péptido, polipéptido o proteína de *L. intracellularis* antigénica; y

(iii) uno o más portadores, diluyentes, o adyuvantes adecuados para el uso veterinario o farmacéutico.

22. Un vector para vacuna que comprende, en una forma que se puede expresar, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que codifica al polipéptido aislado o recombinante inmunogénico que comprende a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 de manera tal que dicho polipéptido inmunogénico se puede expresar en un nivel suficiente como para conferir inmunidad contra *Lawsonia spp.*, cuando se administra a un animal, cerdo o ave.

23. El vector para vacuna de la Reivindicación 22 donde el polipéptido inmunogénico se expresa usando los siguientes pasos:

(i) colocar una molécula de ácido nucleico aislada que comprende a la secuencia de nucleótido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o su variante degenerada, un homólogo, análogo o derivado que tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia, en asociación operativa con una secuencia promotora;

(ii) introducir la molécula de ácido nucleico aislada y la secuencia promotora del paso (a) dentro del vector para vacuna; y

(iii) incubar, hacer desarrollar o 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 *Lawsonia spp.*, es *L. intracellularis*.

25. Una molécula de anticuerpo policlonal o monoclonal que es capaz de enlazarse específicamente a un polipéptido FlgE o un derivado de un polipéptido FlgE que deriva de *Lawsonia* spp., y tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1.

26. La molécula del anticuerpo de la Reivindicación 25 donde el polipéptido FlgE o su derivado comprende a las secuencias de aminoácido determinadas en el Nr ID de SEC: 1.

27. Un método para diagnosticar la infección de un animal, cerdo o ave, por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo que tenga una reacción inmunológicamente cruzada, dicho método comprende los pasos de hacer contactar una muestra biológica derivada de dicho animal con la molécula del anticuerpo de la Reivindicación 25 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes como para que se forme el complejo antígeno : anticuerpo, y luego detectar dicha formación del complejo.

28. El método de la Reivindicación 27 donde la muestra biológica comprende suero entero, nodos linfáticos, íleo, intestino ciego, intestino delgado, intestino grueso, heces o escobillado rectal derivado de un animal porcino.

29. Un método para identificar si un animal, cerdo o ave, ha sufrido de una infección anterior, o está infectado con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo que tiene reacción inmunológicamente cruzada, dicho método comprende hacer contactar la sangre o suero de dicho animal con el polipéptido inmunogénico de la Reivindicación 1 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forme el complejo antígeno : anticuerpo , y luego detectar dicha formación del complejo.

30. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria con una molécula de ácido

nucleico que codifica, a un péptido, oligopéptido o polipéptido seleccionado del grupo formado por:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos alrededor del 60 % de identidad de secuencia total con respecto a la secuencia determinada en el Nr ID de SEC: 1;

(ii) un homólogo, análogo o derivado de (i) que imita a un epítipo de célula B o de célula T de un polipéptido *Lawsonia spp.* FlgE.

31. La molécula de ácido nucleico aislada de la Reivindicación 30, donde el péptido, oligopéptido o polipéptido comprende una secuencia de aminoácido determinada en el Nr ID de SEC: 1 o la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de nucleótido que codifica FlgE de pALK11 (ATCC 207156) o su epítipo de célula B o de célula T.

32. La molécula de ácido nucleico aislada de la Reivindicación 31 que comprende a la secuencia de nucleótido determinada en el Nr ID de SEC: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria o su variante degenerada.

33. La molécula de ácido nucleico aislado de la Reivindicación 32 formada esencialmente por la secuencia de nucleótido del Nr ID de SEC: 2 o su variante degenerada.

34. Un método para detectar *Lawsonia intracellularis* o microorganismo relacionado en una muestra biológica derivada de un sujeto animal, cerdo o ave, dicho método comprende los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores derivados de la secuencia de nucleótido determinada en el Nr ID de SEC: 2 o un nucleótido complementario a dicha muestra y luego detectar dicha hibridación usando un medio de detección.

35. El método de la Reivindicación 34 donde la muestra biológica comprende suero entero, nodos linfáticos, íleon, intestino ciego, intestino delgado, intestino grueso, heces o escobillado rectal derivado de un animal porcino.

94  
95

36. El método de la Reivindicación 34 donde el medio de detección comprende a cualquier ácido nucleico basado en la reacción de hibridación o amplificación.

37. Una sonda o cebador que tiene al menos alrededor de 15 nucleótidos contiguos en longitud derivado del Nr ID de SEC: 2 o una secuencia de nucleótido complementaria.

38. Un plásmido designado pALK11 (Nr de Acceso ATCC 207156).

39. Una vacuna combinada de acuerdo con la Reivindicación 21 donde el segundo componente inmunogénico que comprende un péptido, polipéptido o proteína antigénica *L. intracellularis* seleccionada del grupo formado por OmpH, SodC, hemolisina y autolisina.

p. AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD AND PIG RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION AND PFIZER PRODUCTS INC.

95  
90

## RESUMEN

La presente invención se refiere en general a las composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de las enfermedades intestinales en animales y pájaros provocada o exacerbada por *Lawsonia intracellularis* o similar, o microorganismo relacionado. En particular, la presente invención provee un gen nuevo derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica al péptido, polipéptido o proteína FlgE que es particularmente útil como un antígeno en la preparación de una vacuna para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en huéspedes animales. La presente invención también está dirigida a los métodos para el tratamiento y/o profilaxis de estas condiciones de las enfermedades intestinales y a los agentes para el diagnóstico y procedimientos para detectar *Lawsonia intracellularis* o similar o microorganismos relacionados.



# 84/84

204724

[illegible]

FIGURE 1-2

Se retiraron los folios 99 y 100  
de tarjetas 202016.

Folio 98 extracto publicación  
Feb 13/03 lly



**REQUISITOS MINIMOS PARA AD**

GOVERNAMENTO DE COLOMBIA  
Radicación: 00034578 00000000  
Fecha (AMD): 2000-05-12 16:52:05  
Trámite: 002 PATENTES D REGISTRO/ 411 PRESENTAC  
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 100

**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 2000-34576**

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 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

430

2000-09-05

Radicación no 00-34576Concepto Técnico no 1474 Clasificación Internacional de Patentes C07K 14/195, E12N 15/3  
AGIK 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., 5 de septiembre de 2000

202016  
EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
PRIMER EXAMEN DE FORMA

704  
102

CONCEPTO TÉCNICO: 1474  
EXPEDIENTE: 00034576  
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 FlgE 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 alrededor de..., 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

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.

103

Santa Fe de Bogotá,

/202016

106 104  
430  
2000-09-14

**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

**EXPEDIENTE 2000-34576**

**AUTO 1570**

**DISPONE**

**ARTICULO PRIMERO:** Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele 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**

**12 SEP 2000**

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los \_\_\_\_\_

**EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,**

**ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL**

**NOTIFICADO POR ESTADO**

Santafé de Bogotá D.C., 14 SEP. 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

**VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO 27-10-00**

**SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ☒ NO ☐**

**VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA 12-12-00**

**202022**