



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



21. EXPEDIENTE No.

00-34584

54. TITULO Novedoso Gen de Lianzania SSP. y usos para el mismo

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

007K¹⁴/M5, G12N¹⁵/31, 461K³/02

71. SOLICITANTE

1. Agriculture Victoria Services PTY LTD.
2. Pig Research Development Corporation
3. Pfizer Products Inc.

DOMICILIO

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

74. APODERADO

Dilia Maria Rodriguez D'Aleman

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

Mayo 12, 2000

202099

REPUBLICA DE COLOMBIA

SIC
SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



00 34584

Radicación : 00034584 00000000 Folios: 95
Fecha (AMD): 2000-05-12 11:54:54
Trámite : 002 PATENTE D 1 RESOLUTIVA 411 PRESENTADO
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombre y Apellidos o Razón Social

1) AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD.
2) PIG RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION
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 (4) Inventores Nacionalidad

(72) Nombre del Inventor (es)

Dirección y Domicilio

Identificación

1) Michael PANACCIO - Australiano
2) Everett Lee Rosey . Estadoudinense
3) Detlef HASSE - Australiano
4) Robert Gerard ANKENBAUER - Estadoudinense
1) VER AL RESPALDO

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCIÓN

(54) Título de la Invención NOVEDOSO GEN DE LAWSONIA SSP Y USOS PARA EL MISMO I

PRIORIDAD REIVINDICADA

Sí ☒

No ☐

(33) ESTADOS UNIDOS

(32) MAYO 13, 1999

(31) Nº Solicitud 60/134.022
Provisional

Fuente Normativa: Convenio de París Art. 4º

CLASIFICACION INTERNACIONAL C02 K 14/195, C12N 5/31, A61K 39/02

SOLPA 333

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



2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176088-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 00034584 00000000 Folios: 95
Fecha (AMD): 2000-05-12 15:54:54
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 411 PRESENTADO
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS INVENCIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 30,107
FECHA : MAYO 12 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	VAL. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	999472	2,130,000.00

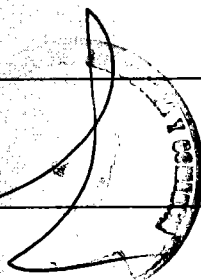
***** C O N C E P T O *****

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

SON: SEISCIENTOS CERO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE Nº.



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 generalmente a composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de condiciones de enfermedad intestinal en animales y aves causadas o exacerbadas por *Lawsonia intracellularis* o microorganismo similar o relacionado de alguna otra manera. En particular, la presente invención provee un novedoso gen derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido o proteína de hemolisina inmunógeno que es particularmente útil como un antígeno en preparación de vacunas para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en huéspedes animales. La presente invención también se refiere a métodos para el tratamiento y/o profilaxis de ese tipo de condiciones de enfermedad intestinal y se refiere a agentes de diagnóstico y procedimientos para la detección de *Lawsonia intracellularis* o microorganismos similares o relacionados de alguna otra manera.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

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

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



FIRMA DEL APODERADO

C.C. 41.654.882

TP N° 20824 CSJ

NOVEDOSO GEN DE LAWSONIA SPP. Y USOS PARA EL MISMO I CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de condiciones de enfermedad intestinal en animales y pájaros causadas o exacerbadas por *Lawsonia intracellularis* o microorganismo similar o relacionado de alguna otra manera. En particular, la presente invención provee un novedoso gen derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido, polipéptido o proteína de hemolisina inmunógeno. El polipéptido de hemolisina descrito en la presente o un homólogo peptídico, su análogo o derivado es particularmente útil como un antígeno en preparación de vacunas para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en huéspedes animales. La presente invención también se refiere a métodos para el tratamiento y/o profilaxis de ese tipo de condiciones de enfermedad intestinal y se refiere a agentes de diagnóstico y procedimientos para la detección de *Lawsonia intracellularis* o microorganismos similares o relacionados de alguna otra manera.

GENERAL

Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia numéricamente en esta memoria descriptiva se mencionan al final de la descripción. Todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones citadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad.

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

Como se utiliza en la presente, la palabra "tlyA", o el término "gen tlyA", hará referencia al gen que codifica al polipéptido de hemolisina de la presente

invención. También se entenderá que el término "polipéptido TlyA" se refiere al polipéptido de hemolisina de la invención.

Como se utiliza en la presente, el término "derivado de" indicará que un producto especificado, en particular una macromolécula como ser un péptido, polipéptido, proteína, gen o molécula de ácido nucleico, molécula de anticuerpo, fracción de Ig u otra macromolécula, o una muestra biológica que comprende dicha macromolécula, se puede obtener de una fuente en particular, organismo, tejido, órgano o célula, aunque no necesariamente en forma directa de esa fuente, organismo, tejido, órgano o célula.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera alguna otra cosa, la palabra "comprende", o variaciones como ser "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un paso establecido o elemento o entero o grupo de pasos o elementos o enteros aunque no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes a aquellas específicamente descritas. Debe entenderse que la invención incluye a todas esas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todos los pasos, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o indicados en esta memoria descriptiva, en forma individual o colectivamente, y cualquiera y la totalidad de las combinaciones o dos o más de dichos pasos, características, composiciones y compuestos.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente, las cuales tienen el propósito de ejemplificación solamente. Los productos funcionalmente equivalentes,

composiciones y métodos se encuentran claramente dentro del alcance de la invención, como se describe en la presente.

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 libre de enfermedades para el consumo humano. La industria está sujeta a una rápida baja económica como respuesta a las condiciones de enfermedad que afectan adversamente al ganado y la calidad de los productos de carne derivados de los mismos, incluyendo aquellas enfermedades que pueden ser potencialmente transmitidas a seres humanos. Por lo tanto, es importante tener tratamientos bien definidos y procedimientos de diagnóstico y profilácticos disponibles para tratar infecciones o potenciales infecciones en animales de ganado y seres humanos.

Los productos de carne derivados de especies porcinas y de ave son productos comerciales importantes en la industria agrícola. En particular, los cerdos forman 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 en porcinos (PPE). Estas enfermedades han sido previamente conocidas como complejo de adenomatosis intestinal (Barker y van Drumel, 1985), adenomatosis intestinal en porcino (PIA), enteritis necrótica (Rowland y Lawson, 1976), enteropatía hemorrágica proliferativa (Love y Love, 1997), ileitis regional (Jonsson y Martinsson, 1976), síndrome de intestino hemorrágico (O'Neil, 1970), enteritis proliferativa en porcino y enteritis inducida por *Campylobacter* spp (Straw, 1990).

Existen dos formas principales de PPE: una forma no hemorrágica representada por adenomatosis intestinal que frecuentemente causa el retardo del crecimiento y leve diarrea; y una forma hemorrágica, que a menudo es fatal, representada por enteropatía hemorrágica proliferativa (PHE), donde el lumen del

intestino delgado distal se atiborra de sangre. La PPE ha sido informada en una cantidad de especies animales incluyendo a los cerdos (McOrist et al, 1993), hámsters (Stills, 1991), hurones (Fox et al, 1989), conejillos de Indias (Elwell et al, 1981), conejos (Schodeb y Fox, 1990) como así también especies de aves (Mason et al, 1998).

Los organismos causantes de PPE es un organismo del tipo *Campylobacter* denominado en la presente " *Lawsonia intracellularis*" (McOrist et al, 1995). El organismo también ha sido denominado previamente *Ileal symbiont intracellularis* (Stills, 1991). Las enfermedades del tipo PPE en cerdos también pueden ser causadas por otros patógenos como ser varias especies de *Campylobacter* (Gebhart et al, 1983).

Lawsonia intracellularis es una bacteria intracelular, posiblemente intracelular ligada. Solo puede cultivarse in vitro con células de cultivo de tejido (Jones et al., 1997; Lawson et al., 1993; McOrist et al, 1995; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US96/09576). *Lawsonia intracellularis* está ubicado en el citoplasma de las células del vello y las células de cripta intestinal de los animales infectados. Los cerdos que sufren de PPE se caracterizan por irregularidades en las células del vello y la estructura de la cripta intestinal con displasia de células epiteliales, en donde los abscesos de la cripta forman formados como los vellos y criptas intestinales se ramifican y se llenan con células inflamatorias.

PPE es un componente de costo significativo asociado con la industria de puercos, especialmente en términos de pérdidas de ganado, costos de medicación, índices de crecimiento reducido de cerdos y costos de alimentación incrementados. PPE también contribuye a costos indirectos descendentes en, por ejemplo, costos de labor adicional y costos ambientales en el trato con contaminación por residuo de antibiótico, y en medidas de control para evitar que el organismo se pase o se contagie a otros animales o seres humanos.

Las estrategias de control actuales para PPE se basan en el uso de antibacterianos. Sin embargo, ese tipo de estrategia se considera solamente de corto a mediano plazo, especialmente debido a que las presiones reglamentarias gubernamentales tienden a desalentar las prácticas de cría de animales que involucran el uso de antibióticos profilácticos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar alternativas efectivas, seguras y de bajo costo al uso de antibióticos y, en particular, para desarrollar preparaciones de vacunas capaces de conferir inmunidad protectora contra la infección por *Lawsonia intracellularis* en animales de ganado.

Las preparaciones de vacunas más efectivas están compuestas generalmente por un componente sumamente antigénico, como ser un péptido, polipéptido, proteína u otra macromolécula que es derivada del organismo patógeno contra el cual se dirige la vacuna, en donde dicho componente antigénico produce pocas contraindicaciones o ninguna cuando se administra a animales huéspedes susceptibles, y produce poca reactividad cruzada antigénica o ninguna con organismos deseables, como ser organismos no patógenos que son una parte de la flora normal del tracto intestinal u otros tejidos de dicho animal huésped. En síntesis, una preparación de vacuna efectiva debe ser inmunógena, específica y segura.

Por lo tanto, existe la necesidad de identificar antígenos altamente inmunógenos producidos por la bacteria *Lawsonia intracellularis*.

La Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU96/00767 describe varias secuencias genéticas parciales de *Lawsonia intracellularis*, y polipéptidos parciales codificados por las mismas. Sin embargo, existe la necesidad de identificar además inmunógenos de polipéptidos producidos por la bacteria *Lawsonia intracellularis* y péptidos inmunógenos derivados de la misma, incluyendo aquellos inmunógenos que son específicos del género o de la especie,

para uso en composiciones de vacunas mejoradas. La invención descrita en la presente provee tales inmunógenos.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido inmunógeno recombinante o aislado que comprende, imitaciones o reacciones cruzadas con un epítoto de células T o células B de *Lawsonia* spp. Preferentemente, el polipéptido inmunógeno recombinante o aislado se selecciona entre el grupo que consiste en:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia con aproximadamente los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii), que imita a un epítoto de células B o células C de *Lawsonia* spp.

En una realización preferida, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en la secuencia amino de SEC ID NO: 1, o aproximadamente sus aminoácidos 1 a 50.

Otro aspecto de la presente invención provee una composición para vacunas para la profilaxis o el tratamiento de infección en un animal, como ser un cerdo o pájaro, por *L. intracellularis* o un microorganismo similar o de otro modo relacionado, comprendiendo dicha composición de vacuna una cantidad inmunológicamente efectiva de un componente inmunógeno el cual comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en

SEC ID NO: 1, o por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia total con los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1 o un homólogo inmunógeno, análogo o su derivado que es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con *Lawsonia intracellularis*; y uno o más portadores, diluyentes y/o adyuvantes adecuados para uso veterinario o farmacéutico.

En una realización preferida, el polipéptido de la composición para vacunas comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o aproximadamente sus aminoácidos 1 a 50.

Otro aspecto de la invención se extiende a una molécula inmunológicamente interactiva, como ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que es capaz de unirse al polipéptido inmunógeno de la invención.

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

Otro aspecto de la presente invención contempla un método para determinar si un animal ha sufrido de una infección pasada o no, o está actualmente infectado, por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado, comprendiendo dicho método contactar una muestra de tejido o fluido, como ser sangre o suero derivado de dicho animal, con el polipéptido inmunógeno de la invención durante un tiempo y en condiciones suficientes para un complejo, como ser un complejo antígeno: anticuerpo, para formar, y luego detectar dicha formación de complejo.

Otro aspecto de la presente invención provee una molécula de ácido nucleico aislada 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 entre lo que sigue:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia total con los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1; o

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

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2, o por lo menos esa porción de SEC ID NO: 2 que codifica a los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1, o su variante degenerada, o tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con la totalidad o parte de la misma.

Aun 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, comprendiendo dicho método los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores de polinucleótidos u oligonucleótidos derivados de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o su secuencia de nucleótidos complementaria, o un homólogo, análogo o derivado de la misma, a dicha muestra, y luego detectar dicha hibridación utilizando un medio de detección. El medio de detección de acuerdo con este aspecto de la invención es cualquier reacción de amplificación o hibridación basada en ácido nucleico.

Otro aspecto de la invención provee una sonda o cebador aislado derivado de SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una representación esquemática que compara la secuencia de aminoácidos deducida de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* (L. int) con las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de hemolisina derivados de *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae* (S. hyo), *Mycobacterium tuberculosis* (M. tub), *Aquifex aeolicus* (A. aeo), *Borrelia burgdorferi* (B. bur), *Helicobacter pylori* (H. pyl.), *Synechocystis* sp. (Synec) y *Bacillus subtilis* Yqx C (B. sub). Se han introducido mellas para optimizar la alineación. Los residuos que son idénticos en las ocho secuencias aparecen en negrita. La secuencia de hemolisina de L. intracellularis (SEC ID NO: 1) fue deducida mediante traducción de la secuencia de nucleótidos del gen tlyA expuesto en SEC ID NO: 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido inmunógeno recombinante aislado que comprende, imitaciones o reactivos cruzados con un epítipo de células B y células T de *Lawsonia* spp.

Los epítopes de *Lawsonia* spp. pueden ser epítopes de células B o epítopes de células T. Es bien sabido que los sitios de unión a anticuerpos (epítopes de células B) involucran epítopes conformacionales como así también lineales (van Regenmortel, 1992). Los epítopes de células B son predominantemente conformacionales. En contraste, las células T reconocen

secuencias de epítopes predominantemente lineales en combinación con moléculas de clase II MHC.

Una identificación precisa y selección cuidadosa de epítopes de *Lawsonia* spp. facilita el desarrollo de reactivos de diagnóstico y composiciones de vacunas para el tratamiento efectivo o profilaxis de las infecciones por *Lawsonia*. La identificación de epítopes y caracterización (es decir determinación del peso molecular, secuencia de aminoácidos y estructura de epítopes de *Lawsonia* spp.) se puede llevar a cabo utilizando técnicas reconocidas en la técnica. Para la detección de epítopes conformacionales, debe evitarse la degradación y desnaturalización de la molécula del epítope a fin de conservar la estructura tridimensional, debido a que la reacción de antígeno- anticuerpo será disminuida si la estructura secundaria del epítope es alterada de manera significativa. En la práctica, la caracterización y aislación de epítopes no conformacionales lineales es más fácil, puesto que cualquier región inmunoreactiva es contenida dentro de un fragmento de péptido único o secuencia de aminoácidos única la cual es capaz de ser purificada bajo un rango de condiciones.

Tanto los epítopes conformacionales como los no conformacionales se pueden identificar en virtud de su capacidad de unir cantidades detectables de anticuerpos (como ser IgM o IgG) de suero de animales inmunizados contra o infectados con *Lawsonia* spp. y, en particular, *L. intracellularis*, o un polipéptido aislado derivado del mismo, o alternativamente, en virtud de su capacidad de unir cantidades detectables de anticuerpos en una fracción de Ig purificada derivada de tales sueros. Los anticuerpos pueden ser derivados de o contenidos dentro de grupos de sueros policlonales, o pueden ser anticuerpos monoclonales. También se pueden emplear fragmentos de anticuerpos o anticuerpos recombinantes, como ser aquellos expresados sobre la superficie de una partícula de bacteriófago o virus, como ser en una genoteca de exhibición de fagos.

La determinación de epítopes de células T se lleva a cabo analizando la capacidad de los péptidos de epítope para inducir la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos o clones de células T. La identificación de los epítopes de células T se logra utilizando una variedad de métodos como ser los conocidos en la técnica, incluyendo el uso de proteína antigénica recombinante o natural fragmentada y entera, como así también el método de "péptido superpuesto" más comúnmente empleado. En el último método, los péptidos superpuestos que abarcan la secuencia entera de un polipéptido derivados de *Lawsonia* spp. son sintetizados y ensayados para determinar su capacidad para estimular respuestas in vitro proliferativas o citotóxicas de células T.

La determinación de la estructura de los epítopes lineales no conformacionales y conformacionales no lineales se puede efectuar mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis cristalográfico de rayos X. La determinación de epítopes utilizando técnicas de rayos X requiere que se cristalice el complejo de proteína- anticuerpo, mientras que la RMN permite el análisis del complejo en un estado líquido. La RMN mide la cantidad de aminoácidos como así también la vecindad de protones de diferentes residuos aminoácidos, en donde el efecto alternante de dos protones a lo largo de la estructura de carbono es característico de un epítope en particular.

Un método exitoso para reconocer epítopes lineales no conformacionales es el inmunoblot y en particular, el Western blot. Los péptidos pueden ser generados de un polipéptido de *Lawsonia* spp. completo mediante digestión con proteasas específicas del sitio, como ser tripsina o quimotripsina, y los péptidos generados así se pueden separar utilizando procedimientos cromatográficos o electroforéticos convencionales. Por ejemplo, después de electroforesis de acuerdo con el peso molecular utilizando SDS/PAGE (SDS/ electroforesis en gel de poliacrilamida) y/o de acuerdo con el punto isoeléctrico utilizando IEF (enfoco

isoeléctrico) o alternativamente, mediante electroforesis bidimensional, los péptidos pueden ser transferidos para inmovilizar membranas de nilón o nitrocelulosa e incubados con sueros cultivados contra los polipéptidos intactos. Los péptidos que comprenden regiones inmunógenas (es decir, epítopes de células T o células B) son unidos por los anticuerpos en los sueros y los anticuerpos unidos pueden ser detectados utilizando anticuerpos secundarios, como ser anticuerpos anti-IgG, que han sido rotulados radioactivamente o enzimáticamente. Los epítopes pueden ser caracterizados a continuación mediante purificación sobre la base de su tamaño, carga o capacidad de unirse específicamente a anticuerpos contra el polipéptido intacto, utilizando una o más técnicas, como ser cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o ELISA entre otros. Después de la purificación del epítope, solamente una banda o punto debería ser detectable con electroforesis en gel. El secuenciamiento total o N-terminal del péptido ofrece la posibilidad de comparar el péptido con proteínas conocidas en bases de datos.

Varios algoritmos conducidos por computación se han ideado ahora para buscar epítopes de células T en proteínas (Margalit et al, 1987; Vajda y C. DeLisi, 1990; Altuvia et al., 1995; Parker et al. 1994; De Groot et al., 1995; Gabriel et al, 1995; Meister et al., 1995). Estos algoritmos buscan la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada para características que se cree que son comunes a los péptidos inmunógenos, localizando regiones que probablemente inducen una respuesta in vitro inmune celular. Los algoritmos impulsados por computadora pueden identificar regiones de un polipéptido de *Lawsonia* spp. que contienen epítopes y son menos variables entre los diferentes aislados. Alternativamente, los algoritmos impulsados por computadora pueden identificar rápidamente regiones de proteínas más variables de cada aislado que deberían incluirse en una vacuna multivalente.

El algoritmo AMPHI (MARGalit et al., 1987), que se basa en la periodicidad de epítopes de células T, se ha utilizado ampliamente para la predicción de sitios antígenos de células T de información de secuencia solos. Esencialmente, AMPHI describe un patrón estructural común de motivos de unión a MHC, puesto que los motivos de unión a MHC (es decir, patrones de aminoácidos que parecen ser comunes para la mayoría de los péptidos que se unen a una molécula de MHC específica) parecen exhibir la misma periodicidad como una hélice alfa. La identificación de epítopes de células T localizando motivos de unión a MHC en una secuencia de aminoácidos provee un medio efectivo para identificar epítopes inmunógenos en ensayos de diagnóstico.

El algoritmo EpiMer (Meister et al., 1995; Gabriel et al., 1995; De Groot et al., 1995) localiza motivos de unión a MHC agrupados en secuencias de aminoácidos de proteínas, sobre la base de la correlación entre regiones densas en motivos de unión a MHC y péptidos que pueden tener la capacidad de unirse a una variedad de moléculas de MHC (ligantes promiscuos o multi-determinantes) y para estimular una respuesta inmune en estos varios contextos de MHC también (epítopes multi-determinantes o promiscuos). El algoritmo EpiMer utiliza una genoteca de motivos de unión de MHC para alelos de HLA de clase I y clase II múltiples para predecir sitios antígenos dentro de una proteína que tienen el potencial de inducir una respuesta inmune en sujetos con una variedad de antecedentes genéticos. EpiMer localiza uniones a cada motivo de unión a MHC dentro de la secuencia primaria de un antígeno de proteína determinado. La densidad relativa de estas uniones de motivos se determina a lo largo de la longitud del antígeno, dando como resultado la generación de un histograma de densidad de motivos. Finalmente, el algoritmo identifica regiones de proteínas en este histograma con una densidad de uniones de motivos por encima de un valor de densidad de corte definido mediante el algoritmo, y produce una lista de

subsecuencias que representan estas regiones ricas en motivos o agrupadas. Las regiones seleccionadas mediante EpiMer pueden actuar más probablemente como péptidos de unión multi-determinantes que como péptidos escogidos al azar del mismo antígeno, debido a su concentración de uniones de motivos de enlace a MHC. La selección de regiones que son densas en motivos de enlace a MHC aumenta la probabilidad de que el péptido predicho contenga un motivo "válido", y asimismo, que la reiteración de motivos idénticos puede contribuir al enlace peptídico.

Se han descrito algoritmos basados en motivos de enlace a MHC adicionales por Parker et al. (1994) y Altuvia et al. (1995). En estos algoritmos, la unión a una molécula MHC determinada se predice por una función lineal de los residuos en cada posición, sobre la base de parámetros empíricamente definidos, y en el caso del algoritmo de Altuvia et al. (1995), también se pueden considerar estructuras cristalográficas conocidas.

Los métodos recombinantes ofrecen la oportunidad de obtener epítopes bien caracterizados de alta pureza para la producción de reactivos de diagnóstico y formulaciones para vacunas específicas de epítopes (Mohapatra et al., 1995). Sobre la base de la secuencia de aminoácidos de un epítipo lineal y la identificación de la correspondiente secuencia de nucleótidos que codifica al mismo, se puede realizar una reacción en cadena de polimerasa (RCP) para amplificar la región que codifica al epítipo de ADNc. Después de la clonación y expresión en un sistema de vector/ huésped adecuado, se puede extraer una gran cantidad de epítopes de alta pureza. Por consiguiente, la presente invención claramente se extiende a polipéptidos no recombinantes aislados y a polipéptidos recombinantes en una forma impura o aislada.

El término "polipéptido" como se utiliza en la presente se referirá a cualquier polímero que consiste en aminoácidos ligados por enlaces covalentes e

incluye dentro de su alcance proteínas de longitud completa y partes o fragmentos de las mismas como ser, por ejemplo, oligopéptidos y secuencias de péptidos cortas que consisten en por lo menos aproximadamente 5 residuos aminoácidos, preferentemente por lo menos aproximadamente 10 residuos aminoácidos, más preferentemente por lo menos aproximadamente 12 residuos aminoácidos, e incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente 15 residuos aminoácidos. También se incluyen dentro del alcance de la definición de un "polipéptido" a las variantes de secuencia de aminoácidos, que contienen una o más sustituciones de aminoácidos preferentemente conservadores, deleciones o inserciones, que no alteran por lo menos una propiedad esencial de dicho polipéptido como ser, por ejemplo, su inmunogenicidad, uso como un reactivo de diagnóstico, o efectividad como una vacuna de péptido contra *Lawsonia* spp. entre otros. Por consiguiente, un polipéptido puede ser aislado de una fuente de la naturaleza, o sintetizado químicamente. Adicionalmente, un polipéptido puede ser derivado de una proteína de longitud completa mediante escisión química o enzimática, utilizando reactivos como ser CNBr, tripsina o quimotripsina, entre otros.

Las sustituciones de aminoácidos conservadores son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, uno o más residuos aminoácidos de un polipéptido de hemolisina natural de la invención pueden ser sustituidos de manera conservadora con un residuo aminoácido de carga, tamaño o polaridad similar, con el polipéptido resultante que retiene una capacidad de funcionar en una vacuna o como un reactivo de diagnóstico como se describe en la presente. Las normas para hacer tales sustituciones incluyen las descritas por Dayhof (1978). Más específicamente, las sustituciones de aminoácidos conservadores son aquellas que generalmente se producen dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados

genéticamente son generalmente divididos en cuatro grupos: (1) ácido = aspartato, glutamato; (2) básico = lisina, arginina e histidina; (3) no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptofano; y (4) polar no cargado = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Fenilalanina, tirosina y triptofano son también clasificados conjuntamente como aminoácidos aromáticos. Uno o más reemplazos dentro de cualquier grupo en particular, como ser, 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 residuo aminoácido con un residuo aminoácido estructuralmente relacionado, tendrá generalmente un efecto insignificante sobre la función del polipéptido resultante.

La presente invención no está limitada por la fuente del inmunógeno en cuestión y claramente se extiende a polipéptidos aislados y recombinantes que son derivados de una fuente no natural o natural.

El término "polipéptido recombinante" como se utiliza en la presente se referirá a un polipéptido que es producido in vitro o en una célula huésped mediante la expresión de una secuencia genética que codifica a dicho polipéptido, secuencia genética que está bajo el control de un promotor adecuado, en donde una manipulación genética se ha llevado a cabo a fin de lograr dicha expresión. Por lo tanto, el término "polipéptido recombinante" claramente abarca polipéptidos producidos mediante la expresión de secuencias genéticas contenidas en vectores virales, plásmidos o cósmidos que han sido introducidos en células procarióticas o eucarióticas, tejidos u órganos. Las manipulaciones genéticas que se pueden utilizar en este contexto serán conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, aunque no se limitan a aislamiento de ácido nucleico, digestión con endonucleasa de restricción, digestión con exonucleasa, llenado de extremos utilizando el fragmento Klenow de polimerasa I de ADN de *E. coli* o enzimas de

polimerasa de ADN T4, formación de extremos romos de moléculas de ADN utilizando polimerasa de ADN T4 o enzimas ExoIII, mutagénesis dirigida al sitio, ligación, y reacciones de amplificación. Como es sabido por los expertos en la técnica, las técnicas adicionales como ser hibridaciones de ácido nucleico y análisis de secuencia de nucleótidos también se pueden utilizar en la preparación de polipéptidos recombinantes, en la confirmación de la identidad de una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido recombinante deseado y una construcción genética que comprende la molécula de ácido nucleico.

En donde el polipéptido de la presente invención es un polipéptido recombinante, se puede producir en, y si se desea, puede ser aislado de un vector viral recombinante o sistema de expresión de células huéspedes. Como lo sabrán los expertos en la técnica relevante, una célula para la producción de un polipéptido recombinante se selecciona sobre la base de varios parámetros incluyendo las construcciones genéticas utilizadas para expresar el polipéptido bajo consideración, como así también la estabilidad y actividad de dicho polipéptido. Los expertos en la técnica también sabrán que la estabilidad o actividad de un polipéptido recombinante se puede determinar, por lo menos en parte, mediante modificaciones de pos-traducción al polipéptido como ser, por ejemplo, reacciones de glicosilación, acilación o alquilación, entre otras, que pueden variar entre líneas celulares utilizadas para producir el polipéptido recombinante.

Por consiguiente, en una realización más particularmente preferida, la presente invención se extiende a un polipéptido recombinante o un derivado, homólogo o análogo del mismo como está presente en una partícula del virus, o como es producido en una célula huésped procariótica o eucariótica, o en un virus o cultivo celular del mismo.

La presente invención también se extiende a un polipéptido recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas que se produce en una célula bacteriana que pertenece al género *Lawsonia*, en particular una célula de *L. intracelullaris*, o un cultivo de la misma.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la presente invención que ha sido purificado hasta cierto punto, preferentemente hasta por lo menos aproximadamente 20 % en peso de proteína, preferentemente hasta por lo menos aproximadamente 50 % en peso de proteína, más preferentemente hasta por lo menos aproximadamente 60 % en peso de proteína, aun más preferentemente hasta por lo menos aproximadamente 70 % en peso de proteína e incluso más preferentemente hasta por lo menos aproximadamente 80 % en peso de proteína o más, de su fuente natural o, en el caso de polipéptidos no naturales, del medio de cultivo o entorno celular en el cual fue producido. Tal aislación puede llevarse a cabo para mejorar la inmunogenicidad del polipéptido de la presente invención, o para mejorar la especificidad de la respuesta inmune contra ese polipéptido, o para eliminar del mismo los contaminantes tóxicos o indeseables. El grado necesario o requerido de pureza de un polipéptido aislado varía dependiendo del propósito para el cual el polipéptido es pretendido, y para muchas aplicaciones será suficiente para la preparación del polipéptido que no contenga contaminantes que reducirían la inmunogenicidad del polipéptido cuando se administra a un animal huésped, en particular un animal porcino o ave que es inmunizado contra PPE o, alternatively, el cual inhibiría el enlace inmuno-específico en un inmunoensayo para el diagnóstico de PPE o su agente causante.

La pureza de un polipéptido aislado de la presente invención se puede determinar mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, incluyendo el grado de homogeneidad de una preparación proteica como se

evaluó mediante SDS/ electroforesis en gel de poliacrilamida, electroforesis bidimensional, o análisis de composición de aminoácidos o análisis de secuencia.

Preferentemente, el polipéptido de la presente invención será sustancialmente homogéneo o sustancialmente libre de proteínas no específicas, como se evaluó mediante SDS/ electroforesis en gel de poliacrilamida, electroforesis bidimensional, o análisis de composición de aminoácidos o análisis de secuencia.

El polipéptido de la presente invención se puede purificar para uso como un componente de una composición para vacuna mediante cualquiera o una combinación de métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de fase inversa, HPLC, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad, entre otros.

En una realización preferida, el polipéptido recombinante o aislado de la invención posee actividad de hemolisina o es derivado de un polipéptido que posee actividad de hemolisina, como ser por ejemplo, hemolisina de *L. intracellularis* o, alternativamente, es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con el polipéptido de hemolisina de *L. intracellularis* de la presente invención, según lo determinado por inmunoensayo convencional como ser RIA o ELISA, entre otros.

Como se utiliza en la presente, el término "actividad de hemolisina" significará actividad enzimática de hemolisina según lo determinado mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica como ser, por ejemplo, mediante la lisis de glóbulos rojos como describe Basaraba et al. (1998).

En otra realización preferida, el polipéptido recombinante o aislado de la invención es derivado de *Lawsonia* spp. y más preferentemente, el polipéptido en cuestión es derivado de *Lawsonia intracellularis*.

Un epítipo de células B o células T de un polipéptido o un derivado, homólogo o análogo del mismo puede comprender cualquier combinación de los siguientes:

(i) una secuencia de aminoácidos primaria de dicha región, conocida en la técnica como un epítipo continuo no conformacional;

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

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

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

Por consiguiente, los polipéptidos inmunógenos o derivados, homólogos o análogos de los mismos que comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos primaria y en adelante definida como "inmunógenos que comprenden epítipo de células B o células T" o término similar.

Los polipéptidos inmunógenos o derivados, homólogos, o análogos de los mismos que comprenden diferentes secuencias de aminoácidos primarias pueden comprender inmunógenos inmunológicamente idénticos, debido a que poseen epítopes de células B o células T conformacionales que son reconocidos por el sistema inmune de una especie huésped como idénticos. Tales polipéptidos inmunógenos o derivados, homólogos o análogos de los mismos son en adelante definidos como "inmunógenos que imitan o reaccionan en forma cruzada con un epítipo de células B o células T", o término similar.

Por consiguiente, la presente invención se extiende a un inmunógeno que comprende, imitaciones, o reactivos cruzados con un epítipo de células B o

células T de un polipéptido aislado o recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas o un derivado, homólogo o análogo del mismo. En una realización particularmente preferida, la presente invención provee un inmunógeno que comprende, imitaciones, o reactivos cruzados con un epítipo de células T o células B de un polipéptido aislado o recombinante que se encuentra en su forma natural es obtenible de una especie de *Lawsonia* como ser, aunque no limitado a *L. intracellularis* y polipéptido que posee preferentemente actividad de hemolisina.

Para mejorar la inmunogenicidad de un polipéptido en cuestión de la presente invención uno o más aminoácidos que no corresponden a la secuencia proteica original se pueden agregar a la terminal amino o carboxilo del polipéptido. Ese tipo de aminoácidos extras son útiles para acoplar el polipéptido a otro péptido o polipéptido, a una proteína portadora grande o a un soporte sólido. Los aminoácidos que son útiles para estos propósitos incluyen aunque no se limitan a tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y sus derivados. Se pueden utilizar técnicas de modificación de proteínas adicionales como ser, por ejemplo, NH_2 acetilación o amidación de terminal COOH , para proveer medios adicionales para acoplar el polipéptido a otro polipéptido, proteína, o molécula de péptido, o a un soporte sólido. Los procedimientos para acoplar polipéptidos entre sí, o a proteínas portadoras o soportes sólidos, son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos que contienen los residuos de aminoácidos extras antes mencionados en las terminales carboxilo o amino y no acoplados o acoplados a un portador o soporte sólido, se encuentran por consiguiente dentro del alcance de la presente invención.

Adicionalmente, el polipéptido puede ser inmovilizado a un portador polimérico o material de soporte.

En una realización alternativa, la inmunogenicidad de un polipéptido de la presente invención se puede mejorar utilizando técnicas de biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene uno o más polipéptidos de la presente invención fusionados a una molécula portadora como ser una proteína sumamente inmunógena. Por ejemplo, una proteína de fusión que contiene un polipéptido de la presente invención fusionado a la subunidad B sumamente inmunógena de la toxina del cólera se puede utilizar para aumentar la respuesta inmune al polipéptido. La presente invención también contempla proteínas de fusión que comprenden una citocina, como ser una interleucina, fusionada al polipéptido en cuestión de la presente invención y genes que codifican a las mismas.

Preferentemente, el polipéptido de la presente invención, o un derivado, homólogo o análogo del mismo, cuando es administrado a un mamífero, induce una respuesta inmune en dicho mamífero. Más preferentemente, el polipéptido de la presente invención, cuando se administra a un mamífero, en particular un animal porcino (por ejemplo, un cerdo) induce una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia* spp., y preferentemente contra *L. intracellularis*, en el mismo. Como se utiliza en la presente, la frase "inducción de una respuesta inmune protectora", y similares, se refiere a la capacidad del polipéptido administrado de la presente invención de evitar o hacer más lento en forma detectable el comienzo, desarrollo o progreso de los síntomas asociados con la infección de *Lawsonia*, y preferentemente, para evitar o hacer más lento en forma detectable el comienzo, desarrollo o progreso de los síntomas asociados con PPE en cerdos.

Preferentemente, el polipéptido inmunógeno de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO. 1 o es por lo menos aproximadamente 70 % idéntica en general a SEC ID NO: 1, o es por lo menos aproximadamente 75 %

idéntica a por lo menos aproximadamente 8 o más aminoácidos contiguos de SEC ID NO: 1. En una realización preferida, el polipéptido inmunógeno de la presente invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica hemolisina presente en pALK12 (ATCC 207195) o aproximadamente sus primeros cincuenta aminoácidos.

Para los propósitos de nomenclatura, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 representa al polipéptido de hemolisina codificado por el gen *tlyA* de *Lawsonia intracellularis*, cuya secuencia de nucleótidos es expuesta en SEC ID NO: 2.

Preferentemente, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID NO: 1 es por lo menos aproximadamente 80 %, más preferentemente por lo menos aproximadamente 85 %, aun más preferentemente por lo menos aproximadamente 90 % e incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente 95 % similar a SEC ID NO: 1.

En la determinación de si dos secuencias de aminoácidos caen o no dentro de estos límites de porcentajes, los expertos en la técnica se darán cuenta que es necesario conducir una comparación lado a lado o una múltiple alineación de secuencias. En tales comparaciones o alineaciones, surgirán diferencias en el posicionamiento de residuos no idénticos, dependiendo del algoritmo utilizado para realizar la alineación. En el presente contexto, la referencia a un porcentaje de identidad de secuencia o similaridad entre dos o más secuencias de aminoácidos se tomará como refiriéndose a la cantidad de residuos idénticos o similares respectivamente, entre dichas secuencias según lo determinado utilizando cualquier algoritmo convencional conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las identidades o similitudes de secuencias de aminoácidos se pueden calcular utilizando el programa GAP del Computer Genetics Group,

Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América (Devereaux et al., 1984). El programa GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) para maximizar la cantidad de residuos idénticos/ similares y para reducir al mínimo la cantidad y/o longitud de separaciones de secuencias en la alineación. Alternativamente o adicionalmente, donde más de dos secuencias de aminoácidos están siendo comparadas, se puede utilizar el programa ClustalW de Thompson et al (1994).

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

“Homólogos” de un polipéptido son aquellos polipéptidos que contienen sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos relacionados con el polipéptido sin alterar una o más de sus propiedades, como ser su inmunogenicidad, actividad biológica o actividad catalítica. En ese tipo de moléculas, los aminoácidos pueden ser reemplazados mediante otros aminoácidos que tienen propiedades similares como ser, por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, momento hidrófobo, antigenicidad, predisposición a formar o romper estructuras helicoidales α o estructuras de lámina β y demás.

Las variantes sustitucionales son aquellas en las cuales por lo menos un residuo en la secuencia ha sido eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos únicos, aunque pueden ser agrupados dependiendo de restricciones funcionales impuestas sobre el polipéptido; las inserciones serán generalmente del orden de aproximadamente 1-10 residuos aminoácidos, y las deleciones oscilarán entre alrededor de 1-20 residuos. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos comprenderán sustituciones de aminoácidos conservadoras como ser aquellas descritas supra.

Las variantes de secuencias de aminoácidos insercionales son aquellas en las cuales uno o más residuos aminoácidos son introducidos en un sitio predeterminado en la proteína. Las inserciones pueden comprender fusiones de terminal amino y/o terminal carboxilo como así también inserciones entre secuencias de aminoácidos únicos o múltiples. Generalmente, las inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos serán más pequeñas que las fusiones de terminales amino o carboxilo, del orden de aproximadamente 1 a 4 residuos.

Las variantes delecionales se caracterizan por la remoción de uno o más residuos de la secuencia.

Las variantes de aminoácidos del polipéptido de la presente invención se pueden preparar fácilmente utilizando técnicas sintéticas de péptido bien conocidas en la técnica, como ser síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o mediante manipulaciones de ADN recombinante. La manipulación de las secuencias de ADN para producir proteínas variantes que se manifiestan como variantes sustitucionales, insercionales o delecionales son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene secuencia conocida son bien conocidas por los expertos en la técnica, como ser mediante mutagénesis de 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 aunque contienen ciertos residuos aminoácidos no naturales o modificados como será de conocimiento de los expertos en la técnica. Por consiguiente, un "análogo" como se define en la presente no necesita comprender una secuencia de aminoácidos que es similar a la secuencia de aminoácidos expuesta en la presente, por ejemplo, péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que son derivados de predicciones por computación o datos empíricos que revelan la estructura

secundaria, terciaria o cuaternaria del polipéptido de hemolisina de la presente invención, y que por lo tanto no comprenden la misma secuencia de aminoácidos primaria de dicho polipéptido de hemolisina, aunque no obstante imitan o hacen reacción cruzada con epítotope de células B o células T de *Lawsonia* spp. y preferentemente, simulan o reaccionan en forma cruzada con epítotope de células B o células T de *Lawsonia intracellularis*.

Por ejemplo, mimotopes (análogos de polipéptido que hacen reacción cruzada con un epítotope de células B o células T del polipéptido de *Lawsonia* de la invención aunque, sin embargo, comprenden una secuencia de aminoácidos diferente a dicho epítotope) se pueden identificar clasificando secuencias de aminoácidos al azar en genotecas de péptidos con anticuerpos que se unen a un epítotope de células T o células B deseado. Como con las técnicas para la identificación de epítotopes de células B o células T como se describe más arriba, los anticuerpos utilizados para identificar tales mimotopes pueden ser anticuerpos recombinantes o monoclonales o policlonales, en forma cruda o purificada. Los mimotopes de un epítotope de células T puede ser luego analizado adicionalmente para determinar su capacidad para estimular respuestas in vitro proliferativas o citotóxicas de células T. Los mimotopes son particularmente útiles como análogos de epítotopes no lineales (es decir, conformacionales) del polipéptido de la presente invención, debido a que los epítotopes conformacionales son generalmente formados de regiones no contiguas en un polipéptido, y los mimotopes proveen equivalentes inmunógenos de los mismos en la forma de una sola molécula del péptido.

Adicionalmente, el uso de análogos de polipéptidos puede dar como resultado polipéptidos con aumentada actividad inmunógena y/o antígena, que son menos sensibles a la degradación enzimática, y que son más selectivos. Un análogo de prolina adecuado es el ácido 2-aminociclopentancarboxílico (β AC⁵c)

que ha demostrado aumentar la actividad inmunógena 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 en la presente son aquellos péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que comprenden por lo menos aproximadamente cinco residuos aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1. Un "derivado" puede comprender además residuos aminoácidos adicionales naturales, glicosilados alterados, acilados o no naturales en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1. Alternativamente o adicionalmente, un derivado puede comprender uno o más sustituyentes no aminoácido como ser, por ejemplo, una molécula informante u otro ligando, unido covalente o no covalentemente a la secuencia de aminoácidos como ser, por ejemplo, una molécula informante que está unida a la misma para facilitar su detección.

Otros ejemplos de mutantes y derivados sintéticos o recombinantes de los inmunógenos del péptido de la presente invención incluyen aquellos que incorporan sustituciones, deleciones y/o adiciones únicas o múltiples allí, como ser carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos. Las formas naturales o glicosiladas alteradas o aciladas de los presentes péptidos son particularmente contempladas por la presente invención. Adicionalmente, los homopolímeros o heteropolímeros que comprenden una o más copias del péptido en cuestión mencionado en SEC ID NO: 1, o uno o más derivados, homólogos o análogos están dentro del alcance de la invención.

Preferentemente, los homólogos, análogos y derivados del polipéptido de la invención son "inmunógenos", definido en adelante como la capacidad de dicho polipéptido, o su derivado, homólogo o análogo de producir respuestas de células B y/o células T en el huésped, en respuesta a la inmunización.

Los homólogos, análogos y derivados preferidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 incluyen aquellas variantes de aminoácidos que funcionan como epítopes de células B o células T de dicha secuencia de aminoácidos que son capaces de intervenir en una respuesta inmune como ser, por ejemplo, mimotopes del polipéptido inmunógeno descrito en la presente que ha sido producidos mediante medios sintéticos, como ser mediante química de Fmoc. El único requisito de tales moléculas es que reaccionen en forma cruzada inmunológicamente con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1, o sus primeros 50 residuos aminoácidos, o un derivado de la misma que comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos en longitud de SEC ID NO: 1.

Como será evidente para los expertos en la técnica, tales homólogos, análogos y derivados del polipéptido de las moléculas de la invención será útiles para preparar anticuerpos que hagan reacción cruzada con anticuerpos contra dicho polipéptido y/o para producir una respuesta inmune protectora de especificidad similar a la producida mediante dicho polipéptido. Tales moléculas también serán útiles en aplicaciones de diagnóstico y otras aplicaciones que son inmunológicas por naturaleza como ser, por ejemplo, diagnósticos que utilizan uno o más formatos de inmunoensayos (por ejemplo, ELISA, RIA y similares).

Por consiguiente, el inmunógeno de la presente invención o un derivado, homólogo o análogo del mismo es útil en composiciones para vacunas que protegen a un individuo contra la infección por *L. intracellularis* y/o como un antígeno para producir producción de anticuerpos policlonales o monoclonales y/o en la detección de anticuerpos contra *L. intracellularis* en animales infectados, particularmente en animales porcinos y aves.

Los presentes inventores también han demostrado que la región N-terminal de SEC ID NO: 1 es particularmente única, en comparación con otras

secuencias de aminoácidos inmunógenas, incluyendo aquellas de las moléculas de hemolisina de otros patógenos en animales. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que comprenden tales regiones de epítopes únicas de SEC ID NO: 1, tendrán especificidad mejorada en comparación con otras regiones de la molécula de hemolisina de *Lawsonia* spp. Las ventajas particulares de tales péptidos serán inmediatamente evidentes para los expertos en la producción de composiciones para vacunas, donde la especificidad contra un patógeno de interés es una consideración importante.

En particular, los presentes inventores han demostrado que los aminoácidos 1 a 50 del polipéptido de hemolisina de *L. intracellularis*, según lo expuesto en SEC ID NO: 1, no son sumamente conservados en comparación con la correspondiente región de otros polipéptidos de hemolisina, siendo solamente aproximadamente 50 % idénticos a las secuencias de aminoácidos en la región N-terminal de los polipéptidos de hemolisina de *Mycobacterium tuberculosis* y *Serpula hyodysenteriae*. Por consiguiente, esta región del polipéptido de hemolisina de *L. intracellularis* es un péptido antígeno prometedor para la formulación de vacunas específicas de *Lawsonia* y diagnósticos para la detección específica de *Lawsonia* spp. en muestras biológicas.

Por lo tanto, en una realización alternativa, la presente invención provee un polipéptido inmunógeno aislado o recombinante o un derivado, homólogo o análogo del mismo que comprende, mímicas o reacciones cruzadas con un epítipo de células B o células T de una *Lawsonia* spp. en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia a aproximadamente residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácidos 50 del polipéptido de hemolisina de *L. intracellularis*, como se expone en SEC ID. NO: 1. Preferentemente, el porcentaje de identidad de secuencia a los aminoácidos 1 a

50 de SEC ID NO: 1 es por lo menos de alrededor de 60 %, más preferentemente por lo menos alrededor del 70 %, incluso más preferentemente por lo menos alrededor del 80 %, y aun más preferentemente por lo menos alrededor del 90 %. En una realización particularmente preferida, el polipéptido en cuestión comprende una secuencia de aminoácidos de aproximadamente el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 50 de SEC ID NO:1.

Un segundo aspecto de la presente invención provee una composición para vacunas para la profilaxis o el tratamiento de la infección en un mamífero o ave por *L. intracellularis* o microorganismo similar o de otro modo relacionado, comprendiendo dicha composición para vacunas una cantidad efectiva de un componente inmunógeno el cual comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos alrededor del 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o por lo menos alrededor del 50 % de identidad de secuencia total con aproximadamente el residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 50 de SEC ID NO: 1, o un homólogo, análogo o derivado inmunógeno del mismo que es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con *Lawsonia intracellularis*; y uno o más portadores, diluyentes o adyuvantes adecuados para uso veterinario o farmacéutico.

Como se utiliza en la presente, el término "componente inmunógeno" se refiere a un péptido, polipéptido o una proteína codificada por ADN de, o derivada de, *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado con el mismo que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora en un animal, en particular un animal porcino o ave, ya sea que dicho péptido, polipéptido o proteína esté o no en forma aislada o recombinante. Por lo tanto, la composición para vacunas claramente abarca aquellas composiciones para vacunas que comprenden aislados atenuados, muertos o no patógenos o formas de *L. intracellularis* o

microorganismos relacionados a los mismos que comprenden o expresan dicho péptido, polipéptido o proteína.

Por "respuesta inmune protectora" se quiere decir que el componente inmunógeno produce una respuesta inmune en el animal a cual se administra la composición para vacuna en el nivel humoral y/o celular lo cual es suficiente para evitar la infección por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado a la misma y/o lo cual es suficiente para reducir en forma detectable uno o más síntomas o condiciones, o para hacer más lento detectablemente el comienzo de uno o más síntomas o condiciones, asociados con la infección por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con la misma en un huésped animal, en comparación con un animal infectado control. El término "cantidad efectiva" de un componente inmunógeno presente en la composición para vacuna se refiere a esa cantidad de dicho componente inmunógeno que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora después de haber administrado una sola dosis completa, después de haber administrado varias dosis divididas.

Preferentemente, el componente polipeptídico de la composición para vacuna en cuestión comprende una secuencia de aminoácidos que es tanto inmunógena y específica, en virtud de su reactividad cruzada inmunológica con el agente causante de PPE, *Lawsonia intracellularis*. En este respecto, será evidente de la descripción precedente que tales componentes de polipéptido pueden comprender una secuencia de aminoácidos derivada de SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 como ser, por ejemplo, un mimótope de dicha secuencia.

El polipéptido inmunógeno u homólogo, análogo o derivado inmunógeno puede ser un péptido, oligopéptido o polipéptido natural en forma aislada o recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas más arriba o ejemplificadas en la presente. Preferentemente, el polipéptido inmunógeno u

homólogo, análogo o derivado inmunógeno es derivado de *Lawsonia* spp., en particular *L. intracellularis* o un microorganismo que se relaciona con la misma.

Preferentemente, el componente inmunógeno ha sufrido por lo menos un paso de purificación o por lo menos concentración parcial de un cultivo celular que comprende *L. intracellularis* o un microorganismo relacionado con la misma, o de una preparación lisada de células de *L. intracellularis* o microorganismo relacionado, o de otro cultivo en el cual el componente inmunógeno es expresado recombinantemente. La pureza de ese tipo de componente que tiene las propiedades inmunógenas necesarias es preferentemente por lo menos de alrededor del 20 % en peso de proteína en una preparación en particular, más preferentemente por lo menos alrededor del 50 %, aun más preferentemente por lo menos alrededor del 60 %, aun más preferentemente por lo menos alrededor del 70 % e incluso más preferentemente por lo menos alrededor del 80 % o más.

El componente inmunógeno de la vacuna de la presente invención puede comprender un único péptido, polipéptido o proteína, o un rango o combinación de diferentes péptidos, polipéptidos o proteínas que cubren epítopes diferentes o similares. Adicionalmente o alternativamente, se puede proveer un único polipéptido con múltiples epítopes. Este último tipo de vacuna se denomina vacuna polivalente. Un epítope múltiple incluye dos o más epítopes localizados dentro de una molécula del péptido o polipéptido.

La formulación de vacunas es generalmente conocida en la técnica y se puede hacer referencia convenientemente a Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, Estados Unidos de América.

Una forma particularmente útil de la vacuna es una vacuna recombinante producida, por ejemplo, en un vector de vacuna, como ser aunque sin limitarse a

una célula transfectada con un vector del virus vaccinia o una célula bacteriana capaz de expresar el componente inmunógeno.

La presente invención claramente se extiende a composiciones para vacuna recombinante en las cuales el componente inmunógeno por lo menos es contenido dentro de vectores de vacunas muertos preparados, por ejemplo, mediante tratamiento con calor, formalina u otro tratamiento químico, choque eléctrico o fuerzas de alta o baja presión. De acuerdo con esta realización, el componente inmunógeno de la vacuna es generalmente sintetizado en un vector de vacuna vivo el cual es matado antes de la administración a un animal.

Adicionalmente, el vector de vacuna que expresa el componente inmunógeno puede ser no patógeno o atenuado. Dentro del alcance de esta realización están las células que han sido transfectadas con virus atenuados o no patógenos que codifican el componente inmunógeno de la vacuna y células no patógenas o atenuadas que expresan directamente el componente inmunógeno.

Las células huéspedes atenuadas o no patógenas incluyen aquellas células que no son dañinas para un animal al cual se administra la vacuna en cuestión. Como será conocido por los expertos en la técnica, "vacunas vivas" pueden comprender un vector de virus atenuado que codifica el componente inmunógeno o una célula huésped que comprende al mismo, que es capaz de replicación en un animal al cual se administra la vacuna, y utilizando maquinaria de células huéspedes para expresar el componente inmunógeno, aunque produciendo efectos colaterales no adversos en el mismo. Tales vectores de vacunas pueden colonizar el intestino u otro órgano del animal vacunado. Tales vectores de vacunas vivas son eficaces en virtud de su capacidad para expresar de manera continua el componente inmunógeno en el animal huésped durante un tiempo y a un nivel suficiente para conferir inmunidad protectora contra un patógeno que expresa un equivalente inmunógeno de dicho componente

inmunógeno. La presente invención claramente abarca el uso de tales vectores no patógenos o atenuados y preparaciones de vacunas vivas.

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

Tales células y líneas celulares son capaces de expresión de una secuencia genética que codifica un péptido, polipéptido o proteína de la presente invención de *L. intracellularis* en una forma efectiva para inducir una respuesta inmune protectora en el animal. Por ejemplo, una bacteria no patógena se podría preparar que contiene una secuencia recombinante capaz de codificar un péptido, polipéptido o proteína de *L. intracellularis*. La secuencia recombinante estaría en la forma de un vector de expresión bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Luego se le permitiría a la bacteria colonizar lugares adecuados en un intestino de cerdo y se le permitiría crecer y producir el péptido, polipéptido o proteína recombinante en cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune protectora contra *L. intracellularis*.

En una realización alternativa adicional, 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 es inyectada en tejido muscular u otro tejido adecuado en un cerdo bajo condiciones suficientes para permitir la expresión transitoria de dicho ADN o ARN para producir una cantidad

de péptido, polipéptido o proteína efectiva para inducir una respuesta inmune protectora. En una realización preferida, la vacuna de ADN está en la forma de un plásmido, en donde el ADN es operativamente conectado con una región promotora capaz de expresar la secuencia de nucleótidos que codifica al inmunógeno en células del animal inmunizado.

En la producción de una vacuna recombinante, excepto por una vacuna de ADN descrita en la presente, es necesario, por lo tanto, expresar el componente inmunógeno en un sistema de vector adecuado. Para el presente propósito, el componente inmunógeno puede ser expresado:

(i) colocando una molécula de ácido nucleico aislada en un formato expresable, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico la región codificadora de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o un homólogo, análogo o derivado que codifica proteína de SEC ID NO: 2 seleccionado entre el grupo que consiste en:

(a) secuencias de nucleótidos que tienen por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con SEC ID NO:2;

(b) secuencias de nucleótidos que se hibridan bajo al menos hibridación de baja severidad, preferentemente al menos bajo condiciones de severidad moderadas, e incluso más preferentemente bajo condiciones de severidad elevada, al complemento de SEC ID NO: 2; y

(c) secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o su homólogo, análogo o derivado, incluyendo, por ejemplo, un mimótope del aminoácido expuesto en SEC ID NO: 1;

(ii) introduciendo la molécula de ácido nucleico aislada de (i) en un formato expresable en un vector de vacuna adecuado; y

(iii) incubando o cultivando el vector de vacuna durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se produzca la expresión del componente inmunógeno codificado por dicha molécula de ácido nucleico.

Para los propósitos de definir el nivel de severidad, una baja severidad se define en la presente como una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en un buffer de 6 x SSC, 0,1 % (p/v) SDS a 28 °C. Una severidad moderada se define en la presente como una hibridación y/o lavado llevado a cabo en un buffer de 2 x SSC, 0,1 % (p/v) SDS a una temperatura en el rango de 45 °C a 65 °C. Una severidad elevada se define en la presente como una hibridación y/o lavado llevado a cabo en un buffer de 0,1 x SSC, 0,1 % (p/v) SDS a una temperatura de por lo menos 65 °C.

Generalmente, la severidad es aumentada reduciendo la concentración de buffer de SSC, y/o aumentando la concentración de SDS y/o aumentando la temperatura de la hibridación y/o lavado. Los expertos en la técnica se darán cuenta de que las condiciones para la hibridación y/o el lavado pueden variar dependiendo de la naturaleza de la membrana de hibridación o del tipo de sonda de hibridación utilizada. Las condiciones para las hibridaciones y los lavados son bien comprendidas por una persona de conocimiento normal en la técnica. Para los propósitos de aclaración de los parámetros que afectan a la hibridación entre moléculas de ácido nucleico, se encuentra referencia en las páginas 2.10.8 a 2.10.16. de Ausubel et al. (1987) la cual se incorpora a la presente como referencia.

Como se utiliza en la presente, una "molécula de ácido nucleico en un formato expresable" es una región codificadora de proteínas de una molécula de ácido nucleico colocada en conexión operable con un promotor u otra secuencia reguladora capaz de regular la expresión en el sistema de vectores de vacunas.

La referencia en la presente a un "promotor" debe ser tomada en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales de un gen genómico clásico, incluyendo la casilla TATA que es requerida para la iniciación de la transcripción precisa, con o sin una secuencia de casilla CCAAT y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras ascendentes, intensificadores y silenciadores) que alteran la expresión genética en respuesta a estímulos de desarrollo y/o externos, o en una forma específica de tejidos. En el presente contexto, el término "promotor" también se utiliza para describir una molécula recombinante, sintética o de fusión, o derivado que confiere, activa o intensifica la expresión de una molécula de ácido nucleico al cual está conectada operativamente, y el cual codifica el polipéptido inmunógeno. Los promotores preferidos pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos para aumentar adicionalmente la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de dicha molécula de ácido nucleico.

La colocación de una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de es decir, "en conexión operable con" una secuencia promotora significa posicionar a dicha molécula de modo que se controle la expresión mediante la secuencia promotora. Los promotores son generalmente, aunque no necesariamente, posicionados 5' (corriente arriba) a los genes que controlan. En la construcción de combinaciones de promotor heterólogo/ gen estructural se prefiere en general posicionar al promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción de genes que es aproximadamente la misma a la distancia entre ese promotor y el gen que controla en su ambiente natural, es decir, el gen del cual el promotor es derivado. Adicionalmente, los elementos reguladores que comprenden un promotor son generalmente posicionados dentro de 2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen. Como es sabido en la técnica, alguna

variación en esta distancia puede ser adaptada sin pérdida de función del promotor. De manera similar, el posicionamiento preferido de un elemento de secuencia regulador con respecto a un gen heterólogo a ser colocado bajo su control se define mediante el posicionamiento del elemento en su ubicación natural, es decir, los genes de los cuales es derivado. Nuevamente, como es sabido en la técnica, cierta variación en esta distancia también puede ocurrir.

El prerequisite para producir polipéptidos intactos en bacterias como ser *E. coli* es el uso de un promotor fuerte con un sitio de unión de ribosomas efectivo. Los promotores típicos adecuados para la expresión en células bacterianas como ser *E. coli* incluyen, aunque sin limitarse a, el promotor lacZ, promotores λ_L o λ_R sensibles a la temperatura, promotor T7 o el promotor tac IPTG inducible. Una cantidad de otros sistemas de vectores para expresar la molécula de ácido nucleico de la invención en *E. coli* son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al (1987) o Sambrook et al (1989). Numerosos plásmidos con secuencias promotoras adecuadas para la expresión en bacterias y sitios de enlace de ribosomas eficientes se han descrito, como ser por ejemplo, pKC30 (λ_L : Shimatake y Rosenberg, 1981), pKK173-3 (tac: Amann y Brosius, 1985), pET-3 (T7: Studier y Moffat, 1986), la serie pFLEX de vectores de expresión (Pfizer Inc., CT, Estados Unidos de América) o la serie pQE de vectores de expresión (Qiagen, CA) entre otros. Los promotores típicos adecuados para la expresión en virus de células eucarióticas y células eucarióticas incluyen al promotor tardío SV40, promotor temprano SV40 y promotor de citomegalovirus (CMV), promotor CMV IE (temprano inmediato de citomegalovirus) entre otros.

Medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o una construcción genética que comprende a la misma en una célula para expresión del componente inmunógeno de la composición para vacunas son bien conocidos

por los expertos en la técnica. La técnica utilizada para un organismo determinado depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células animales incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas como ser utilizando lipofectamina (Gibco, MD, Estados Unidos de América) y/o cellfectina (Gibco, MD, Estados Unidos de América), absorción de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas como ser utilizando partículas de oro o tungsteno revestidas con ADN (Agracetus Inc., WI, Estados Unidos de América) entre otros.

El componente inmunógeno de una composición para vacuna según lo contemplado en la presente exhibe excelente actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento y/o profilaxis de PPE cuando se administra en una cantidad que depende del caso en particular. Por ejemplo, para las moléculas del péptido recombinantes, entre aproximadamente 0,5 ug y aproximadamente 20 ug, se pueden administrar, preferentemente entre aproximadamente 1 ug y aproximadamente 10 mg, más preferentemente entre aproximadamente 10 ug y aproximadamente 5 mg y más preferentemente entre aproximadamente 50 ug y aproximadamente 1 mg equivalente del componente inmunógeno en un volumen de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml. Para las vacunas de ADN, una cantidad preferida es de aproximadamente 0,1 ug/ ml a aproximadamente 5 mg/ml en un volumen de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml. El ADN puede estar presente en forma "despojada" o se puede administrar junto con un agente que facilita la captación celular (por ejemplo, en liposomas o lípidos catiónicos). La característica importante es administrar suficiente inmunógeno para inducir una respuesta inmune protectora. Las cantidades antes mencionadas se pueden administrar como se indica o calcula por kilogramo de peso corporal. El régimen de dosificación se puede ajustar para proveer la respuesta terapéutica

óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden administrarse o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. También puede ser necesaria la administración de un refuerzo.

La vacuna de la presente invención puede comprender además uno o más componentes inmunomoduladores adicionales como ser, por ejemplo, un adyuvante o molécula de citocina, entre otros, que es capaz de aumentar la respuesta inmune contra el componente inmunógeno. Los ejemplos no limitativos de adyuvantes que se pueden utilizar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema de adyuvantes RIBI (Ribi Inc., Hamilton, MT, Estados Unidos de América), alumbre, geles minerales, como ser, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones agua en aceite como ser, por ejemplo, Block co-polymer (CytRxm Atlanta GA, Estados Unidos de América), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA, Estados Unidos de América), SAF-M (Chiron, Emeryville CA, Estados Unidos de América), adyuvante denominado comercialmente AMPHIGEN, adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; y Saponina, QuilA u otra fracción de saponina, lípido A de monofosforilo, y adyuvante de lípido- amina Avridine. Otros agentes inmunomoduladores que se pueden incluir en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más citocinas, como ser interferón y/o interleucina, u otras citocinas conocidas. También se pueden incluir surfactantes no iónicos como ser, por ejemplo, oleiléter de polioxietileno y polietilenéter de n-hexadecilo en las vacunas de la presente invención.

Las composiciones de las vacunas se pueden administrar de manera conveniente como ser por ruta oral, intravenosa (donde sea soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o como supositorio o mediante implantación (por ejemplo, utilizando tecnología de liberación lenta). Dependiendo

de la ruta de administración, puede ser necesario revestir el componente inmunógeno en un material para protegerlo de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que lo pueden inactivar, como ser aquellas en el tracto digestivo.

La composición para vacunas también se puede administrar parenteral o intraperitonealmente. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos o en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el desarrollo de microorganismos. Alternativamente, la composición para vacunas puede ser almacenada en forma liofilizada para ser rehidratada con un vehículo o portador apropiado antes del uso.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos la forma debe ser fluida hasta el punto en que existe facilidad en la capacidad de aplicarse con jeringa, a menos que la forma farmacéutica sea un sólido o semi-sólido como ser cuando se emplea tecnología de liberación lenta. En cualquier evento, debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos.

El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas y aceites vegetales. La adecuada fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento como ser lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse mediante diversos

agentes antibacterianos y antifúngicos como ser, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos como ser, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción como ser, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiere, seguido por esterilización con filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril el cual contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos seleccionados entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de soluciones previamente filtradas estériles.

La presente invención se extiende a composiciones para vacunas que confieren protección contra la infección por uno o más aislados o subtipos de *L. intracellularis* incluyendo aquellos que pertenecen al mismo serogrupo o serovar que *Lawsonia intracellularis*. La composición para vacuna preferentemente también confiere protección contra la infección por otras especies del género *Lawsonia* u otros microorganismos relacionados con la misma según lo determinado en el nivel de nucleótido, bioquímico, estructural, fisiológico y/o inmunointeractivo; siendo el único requisito que dichas otras especies u otro microorganismo exprese un polipéptido que es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con el polipéptido de la invención descrito en la presente. Por

ejemplo, tales microorganismos relacionados pueden comprender ADN genómico que es por lo menos alrededor del 70 % idéntico en general al ADN genómico de *Lawsonia intracellularis* según lo determinado utilizando hibridación de ADN genómico y técnicas de análisis.

Los términos "serogrupo" y "serovar" se relacionan con una clasificación de microorganismos que se basa en datos de tipo serológico, en particular datos obtenidos utilizando ensayos de aglutinación como ser el ensayo de aglutinación microscópica (MAT). Los expertos en la técnica se darán cuenta de que los antígenos de serogrupo y serovar son un mosaico en la superficie celular y, como consecuencia no habrá una delineación estricta entre las bacterias que pertenecen a un serovar y/o serogrupo. Asimismo, los organismos que pertenecen a diferentes especies pueden ser clasificados en el mismo serovar o serogrupo puesto que los mismos no son distinguibles mediante determinación antigénica. Como se utiliza en la presente, el término "serovar" significa una o más cepas de *Lawsonia* que son antígenamente idénticas con respecto a determinantes antígenos producidos por uno o más lugares. Cuantitativamente, los serovars pueden ser diferenciados uno del otro mediante técnicas de absorción de aglutinación cruzada. Como se utiliza en la presente, el término "serogrupo" se refiere a un grupo de *Lawsonia* spp. cuyos miembros se aglutinan en forma cruzada con antígenos de grupos compartidos y no se aglutinan en forma cruzada con los miembros de otros grupos y, como consecuencia, los miembros de un serogrupo tienen más o menos relaciones antigénicas cercanas uno con el otro mediante simple aglutinación cruzada.

La presente invención por lo tanto claramente se extiende a composiciones de vacunas para el tratamiento y/o profilaxis de animales, en particular, composiciones de vacunas para el tratamiento y/o profilaxis de especies porcinas y/o de aves, contra cualquier bacteria que pertenece al mismo

serovar o serogrupo que *Lawsonia intracellularis*. Preferentemente, tales organismos expresan un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos alrededor del 70 % en total con respecto a SEC ID NO:1 y/o por lo menos alrededor del 50 % con respecto a los aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO:1.

La presente invención se extiende además a composiciones para vacunas capaces de conferir protección contra una "variante genética" de *Lawsonia intracellularis*, siendo el único requisito que dicha variante exprese un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos total de por lo menos alrededor del 70 % con respecto a SEC ID NO:1 y/o por lo menos alrededor del 50 % con respecto a los aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO:1 o un homólogo, análogo o derivado que es inmunológicamente reactiva en forma cruzada. Las variantes genéticas de *L. intracellularis* pueden desarrollarse mediante mutación, recombinación, conjugación o transformación de *L. intracellularis* o puede ocurrir naturalmente. Será de conocimiento de una persona capacitada en la técnica la manera de producir tales variantes.

En una realización particularmente preferida, la composición para vacunas de la invención es adecuada para la profilaxis y/o tratamiento de infección en un cerdo o ave por *L. intracellularis*.

Los expertos en la técnica reconocen la aplicabilidad general de la invención en la vacunación de animales que no sean cerdos y aves contra *L. intracellularis* y/o microorganismos relacionados. En la aplicación general de la vacuna de la presente invención, el único prerequisite es que el animal en el cual se confiere la protección sea capaz de ser infectado con *Lawsonia intracellularis* y/o un microorganismo relacionado con la misma y que, en el caso de un microorganismo relacionado con *L. intracellularis*, dicho microorganismo relacionado exprese un epítipo de células B o células T que se asemeja o

reacciona en forma cruzada con el componente polipeptídico de la composición para vacunas descrita en la presente. Los animales que pueden ser protegidos mediante la vacuna de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, seres humanos, primates, animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros), ganado (por ejemplo, cerdos, ovejas, ganado vacuno, caballos, burros, cabras), animales de tests de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejillos de Indias, conejos) y animales salvajes cautivos (por ejemplo, canguros, zorros, ciervo). La presente invención también se extiende a la vacunación de pájaros como ser aves de corral, aves de juego y pájaros enjaulados.

La presente invención además se extiende a vacunas de combinación que comprenden una cantidad efectiva de un primer componente inmunógeno que comprende el polipéptido de la presente invención combinado con una cantidad efectiva de un segundo componente inmunógeno que comprende uno o más otros antígenos capaces de proteger a un animal porcino, o pájaro, contra *Lawsonia* spp. u otro patógeno que infecta y causa enfermedad en dicho animal. En una realización preferida, el segundo componente inmunógeno se selecciona entre el grupo que consiste en los polipéptidos de autolisina de *L. intracellularis*, OmpH, FlgE, y SodC y sus homólogos, análogos o derivados, en particular sus variantes inmunógenas o derivados, y moléculas de ácido nucleico que codifican a los mismos.

El polipéptido aislado o recombinante de la invención o un homólogo, análogo o derivado del mismo 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 con la misma.

Como se utiliza en la presente, el término "molécula inmunológicamente interactiva" incluye anticuerpos y derivados de anticuerpos y equivalentes

funcionales, como ser un Fab o un SCAB (anticuerpo de única cadena), cualquiera de ellos puede ser conjugado optativamente a una enzima, radiactivo o etiqueta fluorescente entre otros. El único requisito de tales moléculas inmunológicamente interactivas es que son capaces de unirse específicamente al polipéptido inmunógeno de la presente invención como se describe en lo que antecede.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se extiende a una molécula inmunológicamente interactiva que es capaz de unirse a cualquiera o más de los siguientes:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos alrededor del 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO:1.

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos alrededor del 50 % de identidad de secuencia total con los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO:1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii) que se asemeja a su epítipo de células T o células B.

En una realización preferida, la molécula inmunológicamente interactiva es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEC ID NO:1, o a sus primeros cincuenta aminoácidos.

Se pueden utilizar métodos convencionales para preparar las moléculas inmunológicamente interactivas. Por ejemplo, utilizando un polipéptido de la presente invención, antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un ratón, hámster o conejo) se puede inmunizar con una forma inmunógena del polipéptido de la presente invención que produce una respuesta de anticuerpo en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en un

polipéptido incluyen conjugación a portadores u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser administrado en presencia de adyuvante o se puede acoplar a una molécula portadora, como es conocido en la técnica, que aumenta la inmunogenicidad del polipéptido. El progreso de la inmunización se puede monitorear mediante detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Se puede utilizar ELISA estándar u otro inmunoensayo con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Luego de la inmunización, los antisueros se pueden obtener y, por ejemplo, se pueden aislar moléculas de IgG que corresponden a los anticuerpos policlonales de los antisueros.

Para producir anticuerpos monoclonales, las células que producen anticuerpos (linfocitos) se pueden cosechar de un animal inmunizado con un péptido de la presente invención y fusionadas con células de mieloma mediante procedimientos de fusión de células somáticas convencionales, inmortalizando de ese modo a estas células y produciendo células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (1975), como así también otras técnicas como ser la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983), la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985), y clasificación de genotecas de anticuerpos combinatoriales (Huse et al., 1989). Las células de hibridoma se pueden aislar y clasificar inmunológicamente para la producción de anticuerpos que son específicamente reactivos con el polipéptido y los anticuerpos monoclonales aislados de las mismas.

Como con todas las composiciones inmunógenas para producir anticuerpos, las cantidades inmunogénicamente efectivas de los péptidos de la invención se deben determinar empíricamente. Los factores a ser considerados

incluyen la inmunogenicidad del péptido natural, ya sea que el péptido esté complejoado o no con o covalentemente unido a un adyuvante o proteína portadora u otro portador, la ruta de administración para la composición, es decir, intravenosa, intramuscular, subcutánea, etc., y la cantidad de dosis de inmunización a ser administradas. Tales factores son conocidos en la técnica de las vacunas y se encuentran dentro del conocimiento de los inmunólogos para hacer tales determinaciones sin indebida experimentación.

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente tiene el propósito de incluir sus fragmentos que son también específicamente reactivos con un péptido que se asemeja o reacciona en forma cruzada con un epítoto de células B o células T del polipéptido de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* expuesta en SEC ID NO:1. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales y los fragmentos clasificados para utilidad de la misma manera como se describe anteriormente para anticuerpos enteros. Por ejemplo, fragmentos $F(ab')_2$ pueden generarse tratando anticuerpo con pepsina. El fragmento $F(ab')_2$ resultante se puede tratar para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab' .

Se encuentra dentro del alcance de esta invención incluir cualquier anticuerpo secundario (monoclonal, policlonal o fragmentos de anticuerpos), incluyendo anticuerpos anti-idiotípicos, dirigidos hacia los primeros anticuerpos mencionados discutidos anteriormente. Tanto el primer como el segundo anticuerpo se pueden utilizar en ensayos de detección o un primer anticuerpo se puede utilizar con un anticuerpo anti-inmunoglobulina comercialmente disponible. Un anticuerpo como se contempla en la presente incluye cualquier anticuerpo específico de cualquier región de un péptido que se asemeja, o reacciona en forma cruzada con un epítoto de células B o células T del polipéptido de

hemolisina de *Lawsonia intracellularis* expuesto en SEC ID NO:1 como se describe en lo precedente.

Los anticuerpos descritos en la presente son útiles para determinar epítopes de células B y células T de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO:1 como ser, por ejemplo, analizando la capacidad de los péptidos sintéticos para inmunológicamente reaccionar en forma cruzada con dicha secuencia de aminoácidos o para producir la producción de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con dicha secuencia de aminoácidos. Utilizando los métodos descritos en la presente, los anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales quiméricos también se pueden cultivar a péptidos que se asemejan a o reaccionan en forma cruzada con un epítipo de células B o células T del polipéptido de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* expuesto en SEC ID NO:1.

Más particularmente, los anticuerpos policlonales, monoclonales o monoclonales quiméricos se pueden utilizar para detectar a los péptidos de la invención y/o cualquier homólogo, análogo o derivado de los mismos, en diversos materiales biológicos. Por ejemplo, se pueden utilizar en un ensayo ELISA, radioinmunoensayo o ensayo histoquímico. En otras palabras, los anticuerpos se pueden utilizar para analizar para determinar la unión a un polipéptido de la invención o a un homólogo, análogo o derivado del mismo, en una muestra biológica para diagnosticar la presencia de *Lawsonia intracellularis* en la misma.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención provee un método para diagnosticar la infección de un animal por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con la misma, comprendiendo dicho método los pasos de poner en contacto una muestra biológica derivada de dicho animal con una molécula inmunológicamente interactiva que es capaz de unirse a un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta

en SEC ID NO:1 o su homólogo, análogo o derivado, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forma un complejo de antígeno: anticuerpo, y detectar dicha formación de complejo. De acuerdo con esta realización de la presente invención, la molécula inmunológicamente interactiva es preferentemente una molécula de anticuerpo preparada contra el polipéptido de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* expuesto en SEC ID NO:1 o un análogo o derivado del mismo.

La muestra biológica es una que puede contener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO:1 o su homólogo, análogo o derivado, en particular una muestra biológica derivada de un huésped porcino o de ave del patógeno *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con el mismo, y puede incluir cualquier muestra de tejido o fluido apropiada del animal. Las muestras biológicas preferidas son derivadas del ileon, intestino ciego, intestino delgado, intestino grueso, suero entero o nódulos linfáticos del animal huésped porcino o ave que se está analizando. Además o alternativamente, la muestra de ensayo biológica puede comprender materia fecal o una torunda rectal derivada del animal.

Los inmunoensayos convencionales se pueden utilizar para llevar a cabo esta realización de la invención. Un amplio rango de técnicas de inmunoensayo están disponibles como se puede observar mediante referencia a las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estas incluyen, naturalmente, ensayos de un solo sitio y dos sitios o "sandwich" de los tipo no competitivos, como así también los ensayos de unión competitivos tradicionales. Estos ensayos también incluyen el enlace directo de un anticuerpo rotulado a un objetivo. Será fácilmente evidente para el experto en la técnica el modo de modificar u optimizar tales ensayos para llevar a cabo esta realización de la

presente invención, y todas esas modificaciones y optimizaciones son abarcadas por la presente invención.

En una realización alternativa, la presente invención contempla un método para identificar si un animal ha sufrido o no de una infección pasada, o está actualmente infectado con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con la misma, comprendiendo dicho método poner en contacto sangre o suero derivado de dicho animal con el polipéptido inmunógeno de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forma un complejo antígeno: anticuerpo, y detectar dicha formación de complejo. Esta realización se diferencia de la realización descrita más arriba porque se basa en la detección de anticuerpos circulantes contra *Lawsonia intracellularis* o un organismo relacionado en la sangre o suero del animal que están presentes como consecuencia de una infección pasada o presente por este patógeno. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que el principio del formato de ensayo es el mismo. Como con otras realizaciones de la invención referidas más arriba, se pueden utilizar inmunoensayos convencionales. Las personas capacitadas en la técnica serán capaces fácilmente de varias los formatos de inmunoensayos conocidos para llevar a cabo la presente realización. Esta realización de la invención también puede utilizar derivados de sangre y suero que comprenden moléculas inmunológicamente interactivas, por ejemplo fracciones de IgG o IgM parcialmente purificadas y muestras de piel de búfalo, entre otros. La preparación de tales fracciones también será conocida por los expertos en la técnica.

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

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos alrededor del 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO:1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos alrededor del 50 % de identidad de secuencia total con alrededor del residuo aminoácido 1 a alrededor del residuo aminoácido 50 de SEC ID NO:1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii) que se asemeja a un epítotope de células B o células 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 codifica, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica, un inmunógeno del polipéptido que comprende, se asemeja o reacciona en forma cruzada con un epítotope de células B o células T del polipéptido de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* expuesto en SEC ID NO: 1.

En una realización particularmente preferida, la presente invención provee una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido de hemolisina de *L. intracellularis* que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o que codifica aproximadamente los primeros cincuenta residuos aminoácidos de la misma.

Se encuentra dentro del alcance de la invención abarcar formas poliméricas del polipéptido inmunógeno descrito en la presente, como ser agregados de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o su homólogo, análogo o derivado, o alternativamente, como polipéptidos que comprenden repeticiones de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado de la misma. La presente invención se

extiende además a moléculas de ácido nucleico que codifican a ese tipo de formas poliméricas.

Alternativa o adicionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende además una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma. Más preferentemente, el porcentaje de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 o con una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma es por lo menos alrededor del 80 %. Aun más preferentemente, el porcentaje de identidad de secuencia es de por lo menos alrededor del 90 %. Aun más preferentemente, el porcentaje de identidad de secuencia es de por lo menos alrededor del 95 %.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o la secuencia de nucleótidos que codifica a la hemolisina presente en pALK12 (ATCC 207195), o una variante degenerada de la misma, y sus complementos.

Cuando se determina si dos secuencias de nucleótidos caen o no dentro de estos límites de porcentajes, los expertos en la técnica se darán cuenta que es necesario conducir una comparación lado a lado o una múltiple alineación de secuencias. En tales comparaciones o alineaciones, pueden surgir diferencias en el posicionamiento de residuos no idénticos, dependiendo del algoritmo utilizado para realizar la alineación. En el presente contexto, la referencia a un porcentaje de identidad entre dos o más secuencias de nucleótidos se tomará como refiriéndose a la cantidad de residuos idénticos entre dichas secuencias según lo determinado utilizando cualquier algoritmo convencional conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos se pueden alinear y se puede calcular su identidad utilizando el programa BESTFIT u otro programa

apropiado del Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América (Devereaux et al., 1984).

Alternativa o adicionalmente, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención es capaz de hibridación bajo al menos bajas condiciones de severidad a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma o a un fragmento de ácido nucleico que comprende por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos contiguos en longitud derivado de la secuencia expuesta en SEC ID NO: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma.

Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse bajo por lo menos condiciones de severidad moderadas e incluso más preferentemente bajo condiciones de severidad elevadas.

La presente invención claramente abarca construcciones genéticas que comprenden la molécula de ácido nucleico en cuestión en un formato expresable adecuado para la preparación de un polipéptido inmunógeno recombinante de la presente invención, como ser para el uso en vacunas recombinante polivalentes o univalentes recombinantes.

En esos casos, la molécula de ácido nucleico será operativamente conectada a una secuencia promotora que puede así regular la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en una célula procariótica o eucariótica como se describe más arriba.

La construcción genética optativamente comprende además una secuencia terminadora. El término "terminadora" se refiere a una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Un "terminador" es una secuencia de nucleótidos, generalmente ubicada dentro de la región 3' no traducida de un gen o ARNm, que comprende una señal de poliadenilación para facilitar la adición pos-transcripcional de una

secuencia de poliadenilato al extremo 3' de una transcripción de ARNm primaria. Las secuencias terminadoras se pueden aislar de las secuencias genéticas de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas. Los terminadores activos en células animales son conocidos y se describen en la bibliografía.

En una realización preferida, la construcción genética puede ser un vector de clonación o de expresión como es conocido en la técnica, como ser un plásmido, cósmido, o fago, que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención, y células huéspedes transformadas o transfectadas con la misma. En una realización no limitativa, el vector es el plásmido pALK12 (No. de Acceso ATCC 207195).

Las construcciones genéticas de la presente invención son particularmente útiles para producir el componente inmunógeno de la composición para vacunas descrita en la presente o para uso en una vacuna de ADN.

Un rango de ensayos de diagnóstico genéticos para detectar la infección de un animal por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado se puede emplear utilizando la molécula de ácido nucleico descrita en la presente como ser, por ejemplo, ensayos basados en la reacción en cadena de polimerasa (RCP) y la hibridación de ácido nucleico. Todos dichos ensayos son contemplados en la presente invención.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención provee un método de diagnóstico para detectar *Lawsonia intracellularis* o microorganismo relacionado en una muestra biológica derivada de un sujeto animal, comprendiendo dicho método los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores derivados de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma o su homólogo, análogo o derivado, a una molécula de ADN o ARN presente en dicha muestra y luego detectar dicha hibridación utilizando un medio de detección.

Como se utiliza en la presente, el término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es derivada de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 y que es capaz de ser utilizada en su detección. Las sondas pueden comprender ADN (de una sola hebra o de doble hebra) o ARN (es decir, ribosondas) o sus análogos.

El término "cebador" se refiere a una sonda como se define en lo que antecede que es capaz además de ser utilizada para amplificar una secuencia de nucleótidos de *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo relacionado con la misma en una RCP.

Las sondas y cebadores preferidos incluyen fragmentos de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 y moléculas de ADN o ARN de una sola hebra sintéticas de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud derivados de la secuencia expuesta en SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma.

Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con esta realización comprenderán por lo menos alrededor de 20 nucleótidos contiguos derivados de SEC ID NO: 2 o una secuencia complementaria a la misma, incluso más preferentemente por lo menos alrededor de 25 nucleótidos contiguos, aun más preferentemente por lo menos alrededor de 50 nucleótidos contiguos e incluso más preferentemente por lo menos alrededor de 100 nucleótidos hasta alrededor de 500 nucleótidos derivados de la secuencia expuesta en SEC ID NO: 2 o un complemento de la misma. Las sondas y cebadores que comprenden la longitud completa de SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma son también abarcados por la presente invención.

Para el presente propósito, "homólogos" de una secuencia de nucleótidos se referirá a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica a un polipéptido que es funcionalmente equivalente al polipéptido codificado por la molécula de

ácido nucleico de la presente invención o a un polipéptido que es un homólogo, análogo o derivado de SEC ID NO: 1, no obstante la aparición dentro de dicha secuencia, de una o más sustituciones, inserciones, deleciones o redistribuciones de nucleótidos.

"Análogos" de una secuencia de nucleótidos expuesta en la presente se referirá a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica a un polipéptido 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 de SEC ID NO: 1, no obstante la aparición de cualquier constituyente no nucleótido no presente normalmente en dicha molécula de ácido nucleico como ser, por ejemplo, carbohidratos, radioquímicos incluyendo radionucleótidos, moléculas informantes como ser, aunque sin limitarse a, biotina, DIG, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, entre otros.

"Derivados" de una secuencia de nucleótidos expuesta en la presente se referirá a cualquier molécula de ácido nucleico aislada que contiene por lo menos alrededor del 50 % de identidad de secuencia de nucleótidos con 15 o más nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma. Generalmente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar sujeta a mutagénesis para producir sustituciones, deleciones y/o inserciones de nucleótidos únicas o múltiples. Los derivados insercionales de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la presente invención incluyen fusiones en las terminales 5' y 3' como así también inserciones entre secuencias de nucleótidos únicos o múltiples o análogos de nucleótidos.

Las variantes de secuencias de nucleótidos insercionales son aquellas en donde uno o más nucleótidos o análogos de nucleótidos son introducidos en un

sitio predeterminado en la secuencia de nucleótidos de dicha secuencia, si bien la inserción al azar también es posible realizándose la clasificación adecuada del producto resultante. Las variantes de secuencias de nucleótidos delecionales se caracterizan por la remoción de uno o más nucleótidos de la secuencia de nucleótidos. Las variantes de secuencias de nucleótidos sustitucionales son aquellas en donde por lo menos un nucleótido en la secuencia ha sido eliminado y se ha insertado un nucleótido diferente o análogo de nucleótido en su lugar. En una realización preferida, tales sustituciones son seleccionadas sobre la base de la degeneración del código genético, como es conocido en la técnica, con la variante sustitucional resultante que codifica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o al menos aproximadamente los primeros 50 aminoácidos de la misma.

Las sondas o cebadores pueden comprender residuos inosina, adenina, guanina, timidina, citidina o uracilo o sus análogos o derivados funcionales que son capaces de ser incorporados dentro de una molécula de polinucleótidos. siempre que la sonda o cebador resultante sea capaz de hibridación bajo al menos condiciones de severidad bajas a SEC ID NO: 2 o a una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma, o es por lo menos alrededor del 70 % idéntica a SEC ID NO: 2 o a su secuencia de nucleótidos complementaria.

La muestra biológica de acuerdo con este aspecto de la invención incluye cualquier órgano, tejido, célula o exudado que contiene o probablemente contiene *Lawsonia intracellularis* o un derivado de ácido nucleico de la misma. Se puede preparar una muestra biológica en una solución adecuada como ser, por ejemplo, un buffer de extracción o buffer de suspensión. La presente invención se extiende al análisis de soluciones biológicas preparadas de ese modo, siendo el único requerimiento que dicha solución por lo menos comprenda una muestra biológica como se describe en la presente.

El ensayo de diagnóstico de la presente invención es útil para la detección de *Lawsonia intracellularis* o de un microorganismo que está relacionado con la misma que expresa al polipéptido de hemolisina de la presente invención o un polipéptido del tipo de hemolisina.

La presente invención contempla claramente ensayos de diagnóstico que son capaces de detección específica de género y específica de especie. Por consiguiente, en una realización, la sonda o cebador, o un homólogo, análogo o derivado, comprende ADN capaz de ser utilizado para detectar *Lawsonia* spp.. En una realización alternativa, la sonda o cebador o un homólogo, análogo o derivado comprende ADN capaz de ser utilizado para distinguir *Lawsonia intracellularis* de microorganismos relacionados.

Las regiones menos- altamente conservadas dentro de SEC ID NO: 2, como ser aquellas que codifican alrededor de los residuos aminoácidos 1 a 50 del polipéptido de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* son particularmente útiles como sondas y/o cebadores específicos de especie para la detección de *L. intracellularis* y especies muy estrechamente relacionadas.

Adicionalmente, los ensayos de diagnóstico descritos en la presente se pueden adaptar a un ensayo específico de la especie o específico del género variando la severidad del paso de hibridación. Por lo tanto, se puede utilizar una hibridación de baja severidad para detectar diversas especies diferentes de *Lawsonia* en una o más muestras biológicas que se están ensayando, mientras que se puede utilizar una hibridación de alta severidad para distinguir *Lawsonia intracellularis* de tales otras especies.

Los medios de detección de acuerdo con este aspecto de la invención pueden ser cualquier medio de detección basado en ácido nucleico como ser, por ejemplo, técnicas de hibridación de ácido nucleico o ensayo de hibridación por cromatografía de papel (PACHA), o una reacción de amplificación como ser RCP,

o un sistema de amplificación basado en secuencia de ácido nucleico (NASBA). La invención además abarca el uso de diferentes formatos de ensayo de dicho medio de detección basado en ácido nucleico, incluyendo polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismo de cadena de una sola hebra (SSCP), amplificación y detección de unión mal hecha (AMD), reacción en cadena de polimerasa de secuencias repetitivas intercaladas (IRS-PCR), reacción en cadena de polimerasa inversa (iPCR), reacción en cadena de polimerasa in situ y reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), entre otros.

Cuando el medio de detección es una técnica de hibridación de ácido nucleico, la sonda puede ser rotulada con una molécula informante capaz de producir una señal identificable (por ejemplo, un radioisótopo como ser ^{32}P o ^{35}S o una molécula biotinilada). De acuerdo con esta realización, los expertos en la técnica se darán cuenta de que la detección de dicha molécula informante provee la identificación de la sonda y que, luego de la reacción de hibridación, la detección de las correspondientes secuencias de nucleótidos en la muestra biológica es facilitada. Se pueden utilizar sondas adicionales para confirmar los resultados del ensayo obtenidos utilizando una sola sonda.

Una variación de la técnica de hibridación de ácido nucleico contemplada en la presente invención es el ensayo de hibridación por cromatografía de papel (PACHA) descrito por Reinhartz et al. (1993) y sus equivalentes, en donde una molécula de ácido nucleico objetivo es rotulada con una molécula informante como ser biotina, aplicada a un extremo de una tira de filtro de membrana de nilón o nitrocelulosa y sometida a cromatografía bajo la acción de fuerzas capilares 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 a la cual una

sonda de ADN es inmovilizada como ser, por ejemplo, en la región media. De acuerdo con este formato de detección, el ácido nucleico objetivo rotulado que comprende las secuencias de nucleótidos de *Lawsonia* spp. complementarias a la sonda se hibrida a la misma y queda inmovilizado en esa región de la membrana a la cual se une la sonda. Las secuencias no complementarias a la sonda se difunden pasando el sitio donde la sonda se une. 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 este medio de detección que utiliza las secuencias de nucleótidos descritas en la presente son abarcadas claramente por la presente invención.

En donde el medio de detección es un RFLP, ácido nucleico derivado de la muestra biológica, en particular ADN, es digerido con una o más enzimas de endonucleasa de restricción y el ADN digerido es sometido a electroforesis, transferido a un soporte sólido, como ser, por ejemplo, una membrana de nilón o nitrocelulosa, y se hibrida a una sonda optativamente rotulada con una molécula informante como se define en lo que antecede.

De acuerdo con esta realización, un patrón específico de fragmentos de ADN es desplegado sobre el soporte, en donde dicho patrón es preferentemente específico para una especie de *Lawsonia* en particular, para permitir al usuario distinguir entre diferentes especies de la bacteria.

En donde el medio de detección es una reacción de amplificación como ser, por ejemplo, una reacción en cadena de polimerasa o un sistema de amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) o una variante del mismo, una o más moléculas de cebador de ácido nucleico de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de longitud derivables de SEC ID NO: 2 o su secuencia de nucleótidos complementaria, o su homólogo, análogo o derivado, se hibrida a ácido nucleico derivado de una muestra biológica, y copias de ácido nucleico de

las secuencias genéticas que codifican hemolisina en dicha muestra, o una parte o fragmento de las mismas, son amplificadas enzimáticamente.

Los expertos en la técnica se darán cuenta de que debe haber un porcentaje suficientemente alto de identidad de secuencia de nucleótidos entre los cebadores y las secuencias en la molécula molde de la muestra biológica a la cual se hibridan (es decir, la "molécula molde"). Como se indica previamente, las condiciones de severidad se pueden seleccionar para promover la hibridación.

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

Los expertos en la técnica también conocerán que, en un formato, la RCP provee la hibridación de cebadores no complementarios a diferentes hebras de la molécula molde, de modo que los cebadores hibridados son posicionados para facilitar la síntesis 5' – 3' de ácido nucleico en la región que interviene, bajo el control de una enzima de polimerasa de ADN termoestable. Como consecuencia, la RCP provee una ventaja con respecto a otros medios de detección en tanto que la secuencia de nucleótidos en la región entre los cebadores hibridados puede ser desconocida y no relacionada con ninguna secuencia de nucleótidos conocida.

En una realización alternativa, en donde el medio de detección es AFLP, los cebadores son seleccionados de modo que, cuando el ácido nucleico derivado de la muestra biológica, en particular ADN, es amplificado, se producen productos de amplificación de longitud diferente de diferentes especies de *Lawsonia*. Los productos de amplificación pueden ser sometidos a electroforesis, transferidos a un soporte sólido como ser, por ejemplo, una membrana de nilón o nitrocelulosa e hibridados a una sonda optativamente rotulada con una molécula informante como se describió anteriormente en la presente. De acuerdo con esta realización, un patrón específico de fragmentos de ADN amplificados es desplegado sobre el

soporte, dicho patrón optativamente específico para una especie de *Lawsonia* en particular, para permitir al usuario distinguir entre diferentes especies de la bacteria en una forma muy similar a la del análisis de RFLP.

La técnica de AMD facilita, no solo la detección de ADN de *Lawsonia* spp. en una muestra biológica, sino además la determinación de variantes de secuencias de nucleótidos que se diferencian de los cebadores y sondas utilizados en el formato de ensayo. En donde el medio de detección es AMD, la sonda es rotulada en los extremos con una molécula informante adecuada y se mezcla con un exceso de la molécula molde amplificada. Las mezclas son subsiguientemente desnaturalizadas y se dejan renaturalizar para formar "moléculas de híbrido de sonda: molde" o "híbridos" de ácido nucleico, de modo que cualquier variación de secuencia de nucleótidos entre la sonda y la molécula molde a la cual se hibrida interrumpirá el apareamiento de bases en los híbridos. Estas regiones de unión errónea son sensibles a la modificación química específica utilizando hidroxilamina (residuos citosina unidos erróneamente) o tetróxido de osmio (residuos de timidina erróneamente unidos), permitiendo la subsiguiente escisión del sitio modificado utilizando piperidina. El ácido nucleico escindido puede ser analizado utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, seguido por hibridación de ácido nucleico estándar como se describió en lo que antecede, para detectar las secuencias de nucleótidos derivadas de *Lawsonia*. Los expertos en la técnica conocerán los medios de rotular los extremos de una sonda genética de acuerdo con el rendimiento de la invención descrita en esta realización.

De acuerdo con esta realización, el uso de una sonda con rotulación en extremos única permite la localización inequívoca de la variación de secuencias. La distancia entre el o los puntos de variación de secuencia y la rotulación en extremos se representa por el tamaño del producto de escisión.

En una realización alternativa de AMD, la sonda es rotulada en ambos extremos con una molécula informante, para facilitar el análisis simultáneo de ambas hebras de 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 de ADN derivado de *Lawsonia* o un homólogo, análogo o derivado del mismo. Como consecuencia, este formato de ensayo es particularmente útil cuando es deseable determinar la expresión de uno o más genes de *Lawsonia*. De acuerdo con esta realización, la muestra de ARN es sometida a transcripción inversa para producir el ADN de una sola hebra complementario que es posteriormente amplificado utilizando procedimientos convencionales.

Las variaciones de las realizaciones descritas en la presente son descritas en detalle por McPherson et al. (1991).

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

El medio de detección por reacción de amplificación descrito más arriba puede ser adicionalmente acoplado a un medio de detección por reacción de hibridación clásico para adicionalmente aumentar la sensibilidad y especificidad del método inventivo, como ser hibridando el ADN amplificado con una sonda que es diferente a cualquiera de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación.

Similarmente, el medio de detección por reacción de hibridación descrito más arriba puede ser acoplado además con un segundo paso de hibridación que emplea una sonda que es diferente a la sonda utilizada en la primera reacción de hibridación.

Un aspecto adicional de la invención provee una sonda o cebador aislado derivado de SEC ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma.

La presente invención es adicionalmente descrita mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1

FUENTES DE TEJIDO DE CERDO

Intestinos de Cerdo Infectados

Las secciones de iliones espesados excesivamente se tomaron de cerdos natural o experimentalmente afectados por PPE. La presencia de bacterias de *L. intracellularis* en los iliones se confirmó utilizando coloración inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales específicos (McOrist et al, 1987). Un ejemplo de un anticuerpo adecuado es el anticuerpo monoclonal IG4 disponible de la Universidad de Edinburgh, Reino Unido.

EJEMPLO 2

ASLAMIENTO DE BACTERIAS DE LAWSONIA INTRACELLULARIS DEL ILION DE CERDO INFECTADO

Las bacterias de *Lawsonia intracellularis* fueron extraídas directamente de lesiones de PPE en cerdos mediante filtración y se purificaron adicionalmente sobre un gradiente Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) de la siguiente manera. Los iliones infectados fueron recogidos de cerdos y se confirmó la presencia de *L. intracellularis* histológicamente antes del almacenamiento a -80°C . Se descongelaron secciones de ilion y se rasparon de la pared intestinal aproximadamente 8 g de mucosa infectada. La mucosa fue homogeneizada con 40 ml de salina tamponada con fosfato estéril (PBS) a media velocidad durante 10 segundos utilizando una omnimezcladora Sorvall. Esta suspensión fue centrifugada a 2000 xg durante 4 minutos. El sobrenadante fue descartado y el

pellet celular fue resuspendido en 40 ml de PBS y recentrifugado. Este paso de lavado fue repetido dos veces. Luego, el pellet celular fue resuspendido en 20 ml de PBS y homogeneizado a velocidad completa durante un minuto para liberar las bacterias de *L. intracellularis*.

Este homogenado fue centrifugado a 1000 xg durante 4 minutos proporcionando un pellet que contenía una mezcla cruda de células epiteliales homogeneizadas y bacterias intestinales. El sobrenadante fue filtrado utilizando filtros con poro de tamaño 3 μ m, 1,2 μ m y 0,8 μ m (Millipore Corporation, MA, Estados Unidos de América). El filtrado fue centrifugado a 8000 xg durante 30 minutos, dando como resultado un pequeño pellet de bacterias de *L. intracellularis*. Las bacterias de *L. intracellularis* fueron adicionalmente purificadas utilizando un gradiente percoll de autoformación al 45 % de la siguiente manera: 2 ml de la preparación bacteriana se mezclaron mediante inversión en 30 ml de un gradiente Percoll de autoformación al 45 % (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) (45 % v/v de Percoll, 150 mM de NaCl). Los gradientes fueron centrifugados en una centrífuga Sorvall utilizando el rotor SS34, a 20.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Generalmente, una cantidad de bandas se forman dentro del gradiente. La banda (generalmente ubicada aprox. 10-20 mm de la base del tubo) que contiene las bacterias de *L. intracellularis* se recogió y el volumen se hizo llegar a 16 ml con PBS. Luego, la solución fue centrifugada durante 15 minutos a 8000 rpm. El pellet resultante fue lavado con PBS antes de ser resuspendido en un volumen final de aproximadamente un ml.

EJEMPLO 3

PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS

El ADN genómico fue extraído de bacterias de *Lawsonia intracellularis* purificadas con gradiente Percoll recuperadas de raspaduras de iliones de cerdo

infectados (Ejemplo 2) mediante los métodos descritos por Anderson et al (1984) y Sambrook et al (1989).

Brevemente, las células de *L. intracellularis* fueron peletizadas mediante centrifugación a 14.000 x g a 4 °C durante 15 min. Las células fueron resuspendidas en 10 ml de buffer TE (1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8,0) y centrifugadas como antes. Luego, el pellet fue resuspendido en 4 ml de buffer TE que contenía 4 mg/ ml de lisozima (Sigma Chemical Co.) y se incubó a 37 °C durante 20 min. Se agregó SDS y proteinasa K (Promega, WI, Estados Unidos de América) a concentraciones finales de 1% (p/v) y 200 ug/ml, respectivamente, y se continuó la incubación a 45 °C durante 4 horas. Luego, el lisado fue extraído con un volumen igual de fenol, fenol: cloroformo (1:1) y cloroformo, respectivamente, y los ácidos nucleicos fueron recuperados del sobrenadante mediante precipitación con etanol. El pellet fue suavemente disuelto en TE, tratado con RnaseA (Promega, WI, Estados Unidos de América) a 37 °C durante 30 min y luego se digirió con proteinasa K en presencia de 0,5 % (p/v) de SDS durante 1 h a 50 °C. Después de otra ronda de fenol: cloroformo (1:1) y precipitación con etanol, el ADN purificado fue disuelto en TE. Luego, el ADN fue almacenado a 4 °C.

EJEMPLO 4

INMUNOCLASIFICACIÓN DE UNA GENOTECA DE *L. INTRACELLULARIS* UTILIZANDO SUEROS EXPERIMENTALES DE CERDOS VACUNADOS

El ADN genómico del Ejemplo 3 fue parcialmente digerido con la endonucleasa de restricción Sau3A (Promega) y se ligó en Lambda ZAP Express (Stratagene, CA, Estados Unidos de América). La genoteca de lambda fue colocada en placas en una estopilla de células XLI-Blue de *E. coli* a una densidad de 1000 unidades formadoras de fago (pfu) por 150 mm de placa de agar de

caldo L. La genoteca fue clasificada utilizando el método descrito en el Protoblot Technical Manual (Promega, WI, Estados Unidos de América). Los filtros fueron bloqueados en buffer de bloqueo (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,05 % de Tween 20 y 5 % de blotto), antes de clasificar con sueros de los cerdos Y12 y/o 395. Los cerdos Y12 y 395 habían sido previamente inmunizados con *L. intracellularis* matadas con formalina y *L. intracellularis* matadas con calor, respectivamente, como se describió en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU96/00767. Las placas positivas identificadas en la clasificación primaria fueron recogidas, vueltas a colocar en placas a una densidad inferior y reclasificadas con uno de los dos sueros o ambos hasta que se identificó una placa positiva individual. El ADN plásmido del clon de fago lambda positivo fue aislado mediante escisión in vivo, según lo recomendado por el fabricante (Stratagene, CA, Estados Unidos de América). Este clon contenía el gen *tlyA* parcial de *L. intracellularis*.

EJEMPLO 5

ANÁLISIS DE *L. INTRACELLULARIS* QUE EXPRESA CLONES DE FAGOS

ADN de fagomida de clones de fagos λ ZAP Express positivos se aisló mediante escisión in vivo, mediante las condiciones recomendadas por el fabricante (Stratagene).

El ADN plásmido para el análisis de restricción fue extraído mediante lisis alcalina, como se describe en Sambrook et al (1989), y para el secuenciamiento automático, utilizando el Kit High Pure Plasmid, según lo recomendado por el fabricante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

La secuencia de nucleótidos (320 pb) de la región 3' del gen *tlyA* de *Lawsonia intracellularis* se obtuvo a partir del clon lambda descrito en el Ejemplo 4. La porción restante del gen *tlyA* fue amplificada a partir de ADN genómico de *L.*

intracellularis, utilizando el Sistema Vectorette como se describe por los fabricantes (Genosys Biotechnologies Inc., TX, Estados Unidos de América).

Brevemente, el Sistema Vectorette permite la amplificación de fragmentos de ADN específico donde la secuencia de solamente un cebador es conocida. Existen tres pasos básicos de la siguiente manera:

- (i) digestión de ADN objetivo (ADN genómico de *L. intracellularis* en este caso) con una enzima de restricción;
- (ii) ligación de oligonucleótidos de Vectorette sintéticos al ADN digerido; y
- (iii) amplificación de la secuencia de nucleótidos restante del gen *tlyA* utilizando un cebador específico a la secuencia conocida de *tlyA* obtenida del clon lambda descrito en el Ejemplo 4 y un segundo cebador dirigido hacia el oligonucleótido Vectorette sintético ligado.

La secuencia de nucleótidos del producto amplificado que contiene el gen *tlyA* se obtuvo a continuación.

El secuenciamiento de ADN de ADN amplificado e insertos de clones aislados se llevó a cabo mediante el método Dye-terminator de secuenciamiento automático (ABI Biosystems, CA, Estados Unidos de América).

La secuencia de nucleótidos de la región codificadora completa del gen *tlyA* se expone en SEC ID NO: 2.

EJEMPLO 6

IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES DE *L. INTRACELLULARIS*

La similaridad de secuencia de las moléculas de ADN que codifican a los candidatos para vacunas identificados en el Ejemplo 4 y 5, se identificó utilizando algoritmos BLAST (Gish and States, 1993) para buscar en el GenBank. La secuencia de nucleótidos expuesta en la presente como SEC ID NO: 2 y su correspondiente secuencia de aminoácidos deducida expuesta como SEC ID NO: 1 tienen cierto grado de similaridad de secuencia con genes codificadores de

hemolisina y polipéptidos, respectivamente, que son derivados de otros microorganismos patógenos (Figura 1).

Las regiones únicas del polipéptido de hemolisina de *Lawsonia intracellularis* son evidentes a partir de una comparación de la secuencia de aminoácidos de este polipéptido a aquellas de otros microorganismos (Figura 1).

EJEMPLO 7

PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA DEPÓSITO – AMPLIFICACIÓN DE *tlyA*

El ADN molde fue purificado a partir de mucosa interstinal de cerdo aislada del ilion de cerdos infectados con *L. intracellularis*. La purificación de ADN de la mucosa intestinal se llevó a cabo de acuerdo con el método de Nollau et al. (1996). Debido a la presencia de polisacáridos contaminantes y otro material, el contenido de ADN de las muestras no fue cuantificado y las muestras se utilizaron empíricamente en amplificaciones por RCP.

Las amplificaciones por RCP consistieron en 1 ul de ADN aislado de la mucosa intestinal de cerdo infectado, 1 uM cada uno de los cebadores delantero (RA 168: 5' AAATAATAAGATGAG 3'; SEC ID NO: 3) e inverso (RA 169: 5' ATAGAATACAAATTATAATAAG 3'; SEC ID NO: 4), 7,5 unidades de polimerasa KlenTaqI (Ab Peptides, inc., St. Louis, Missouri), 0,075 unidades de polimerasa Pfu (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California), 1 x buffer PC2 (KlenTaqI) y 0,2 mM de dNTPs en un volumen de 50 ul. La RCP se llevó 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) se mantuvo a 4 °C.

El fragmento de la RCP que comprende el gen *tlyA* de *L. intracellularis* fue subclonado en pCR2.1-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y designado pALK12.

DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

El plásmido pALK12 fue depositado ante la American Type Culture Collection (ATCC) en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Estados Unidos de América el 8 de abril de 1999 y fue asignado el No. de Acceso ATCC 207195.

REFERENCIAS

1. Altuvia, Y., Schueler, O., and Margalit, H. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**:244-250.
2. Amann and Brosius (1985). *Gene* **40**: 183.
3. Anderson, B.J., M.M. Bills, J.R. Egerton, and J.S. Mattick. (1984) *Journal of Bacteriology* **160**:748-754.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, RE, Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987). *In: Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience (ISBN 047150338).
5. Barker, I.K. and Van Dreumel, A.A. (1985) In "Pathology of Domestic Animals," 3rd Edition, Vol. 2 p. 1-237, eds K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer. (Academic Press: Orlando).
6. Basaraba, R.J., Byerly, A.N., Stewart, G.C., MOSIER, D.A., Fenwick B.W., Chengappa, M.M., and Laegreid, W.W.(1998) Actin enhances the haemolytic activity of *Escherichia coli*, *Microbiology*, **144**:1845-1852.
7. Cole *et al.* (1985) *In: Monoclonal antibodies in cancer therapy*, Alan R. Bliss Inc., pp 77-96.
8. Dayhof, M.D. (1978) *In: Nat. Biomed. Res. Found. Washington D.C. Vol15, Suppl. 3.*
9. 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., and Ramirez, B.D.L.L. (1995) *Vaccines* **96**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
10. Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984). *Nucl. Acids Res.* **12**: 387-395.
11. Elwell, MR, Chapman, AL and Frenkel, JK (1981) *Veterinary Pathology* **18**: 136-139.
12. Fox, JG, Murphy, JC, Otto, G Pecquet-Goad, ME, Larson, QHK and Scott JA (1989) *Veterinary Pathology* **26**: 515-517.
13. Gabriel, E. Meister, G.E., Caroline, G.P., Roberts, C.G.P., Berzofsky, J.A., and De Groot, A.S. (1995) *Vaccines* **95**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

14. Gebhart, C.J., Ward, G.E., Chang, K. And Kurtz, H.J. (1983). *American Journal of Veterinary Research* **44**:361-367.
15. Gish, W and States, D.J. (1993) *Nature Genetics* **3**: 266-272.
16. Goodman et al. (1987) *Biopolymers* **26**: 525-532.
17. Huse et al. (1989) *Science* **246**: 1275-1281.
18. Jones, L.A., Nibbelink, S., and Glock, R.D. (1997) *Am. J. Vet. Res.* **58**: 1125-1131.
19. Jonsson, L. and Martinsson, K. (1976) *Acta Veterinaria Scandinavica* **17**:223-232.
20. Kohler and Milstein (1975) *Nature* **256**: 495-499
21. Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* **4**: 72.
22. Lawson, G.H.K., McOrist, S., Jansi, S. and Mackie, R.A. (1993) *Journal of Clinical Microbiology* **31**:1136-1142.
23. Love, R.J. and Love, D.M. (1977) *Veterinary Record* **100**:473
24. Margalit, H., Spouge, J.L., Cornette, J.L., Cease, K.B., DeLisi, C., and Berzofsky, J.A. (1987) *J. Immunol.* **138**:2213-2229.
25. Mason, RW, Monkton, P and Hasse D (1998) *Australian Veterinary Journal* (submitted for publication).
26. McOrist, S., Boid, R., Lawson, G.H.K. and McConnell, I. (1987) *The Veterinary Record* **121**:421-422.
27. McOrist, S, Jasni, S, Mackie, RA, MacIntyre, N, Neef, N. and Lawson GHK (1993) *Infection and Immunity* **61**: 4286-4292.
28. McOrist, S et al (1995) *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 820-825.
29. McPherson, M.J., Quirke, P., and Taylor, G.R. (1991) *In: PCR: A Practical Approach.* (series editors, D. Rickwood and B.D. Hames) IRL Press Limited, Oxford. pp1-253.
30. Meister, G.E., Roberts, C.G.P., Berzofsky, J.A., and De Groot, A.S. (1995) *Vaccine* **13**: 581-591.
31. Mierke et al. (1990) *Int. J. Peptide Protein Research* **35**:35-45.
32. Mohapatra, S.S., Cao, Y., Ni, H., and Salo, D. (1995) *Allergy* **50**:37-44.

33. Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
34. Nollau, P., Moser, C. and C. Wagener (1996) *BioTechniques* 20:784-788.
35. O'Neil, I. P.A. (1970) *Veterinary Record* 87:742-747.
36. Parker, K.C., Bednarek, M.A., and Coligan, J.E. (1994) *J. Immunol.* 152:163-175.
37. Portoghese *et al.* (1990) *J. Med. Chem.* 33:1714-1720.
38. Reinhartz, A., Alajem, S., Samson, A. and Herzberg, M. (1993). *Gene* 136: 221-226.
39. Rowland, A.C. and Lawson, G.H.K. (1976) *Veterinary Record* 97:178-180.
40. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition.* Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
41. Schodeb, TR and Fox JG (1990) *Veterinary Pathology* 27: 73-80.
42. Shimatake and Rosenberg (1981) *Nature* 292: 128.
43. Stills, H.F. (1991). *Infection and immunology* 59: 3227-3236.
44. Straw, B.E. (1990). *Journal of American Veterinary Medical Association* 197: 355-357.
45. Studier and Moffat (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113.
46. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
47. Vajda, S. and DeLisi, C. (1990) *Biopolymers* 29:1755-1772.
48. van Regenmortel, M. (1992) Molecular dissection of protein antigens. *In: Structure of antigens, (van Regenmortel M. ed.)* CRC Press, London, pp1-27.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Novedoso gen de lawsonia spp. y usos para el mismo l

<130> p: \oper\mro\lawson-1.pct

<140>

<141>

<150> US 60/134,022

<151> 1999-05-12

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 251

<212> PRT

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 1

Met Ala Lys His Lys Val Arg Ala Asp Glu Leu Val Phe Leu Gln Gly
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ser Arg Glu Gln Ala Lys Arg Leu Ile Met Ala Gly Lys
20 25 30

Val Thr Leu Thr Asn Asn Ser Thr Thr Ile Pro Leu Arg Leu Glu Lys
35 40 45

Pro Gly His Lys Tyr Pro Leu Glu Ser Ile Cys Ser Leu Ile Gly Val
50 55 60

Glu Arg Phe Val Ser Arg Gly Ala Tyr Lys Leu Leu Thr Ala Leu Asp
65 70 75 80

Phe Phe Lys Ile Asp Val Lys Ser Cys Ile Cys Leu Asp Ala Gly Ala
85 90 95

Ser Thr Gly Gly Phe Thr Asp Cys Leu Leu Gln His Gly Ala Ser Lys
100 105 110

Val Tyr Ala Ile Asp Val Gly Lys Gly Gln Leu His Glu Lys Leu Tyr
115 120 125

Thr Asn Glu Gln Val Ile Asn Ile Glu Gly Val Asn Leu Arg Thr Ala
130 135 140

Ser Lys Asp Leu Ile Pro Glu Glu Val Asp Ile Leu Thr Ile Asp Val

29

145 150 155 160
 Ser Phe Ile Ser Leu Thr Leu Ile Leu Pro Ser Cys Ile Arg Trp Leu
 165 170 175
 Lys Ala Ser Gly Ile Ile Ile Ala Leu Ile Lys Pro Gln Phe Glu Leu
 180 185 190
 Tyr Pro Asp Lys Ile Lys Lys Gly Val Val Lys Glu Thr Ser Leu Gln
 195 200 205
 Tyr Glu Ala Val Glu Lys Ile Ile His Phe Cys Gln Ser Glu Leu Gly
 210 215 220
 Leu Ile Phe Ile Gly Val Val Pro Ser Val Ile Lys Gly Pro Lys Gly
 225 230 235 240
 Asn Gln Glu Tyr Leu Ile Tyr Leu Lys Lys Arg
 245 250

<210> 2
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> *Lawsonia intracellularis*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(753)

<400> 2
 atg gcc aaa cat aaa gta cgt gct gat gaa ctt gtt ttt tta caa ggg 48
 Met Ala Lys His Lys Val Arg Ala Asp Glu Leu Val Phe Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 tta gca gaa agt cgt gaa caa gct aaa cga ctt att atg gca ggt aag 96
 Leu Ala Glu Ser Arg Glu Gln Ala Lys Arg Leu Ile Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 gtt aca tta act aat aat tct aca act ata cca tta cgt ttg gaa aaa 144
 Val Thr Leu Thr Asn Asn Ser Thr Thr Ile Pro Leu Arg Leu Glu Lys
 35 40 45
 cca gga cat aaa tat cca tta gaa agt atc tgc agt tta ata ggg gta 192
 Pro Gly His Lys Tyr Pro Leu Glu Ser Ile Cys Ser Leu Ile Gly Val
 50 55 60
 gaa cgt ttt gtg agt aga gga gca tat aag cta tta act gct cta gat 240
 Glu Arg Phe Val Ser Arg Gly Ala Tyr Lys Leu Leu Thr Ala Leu Asp
 65 70 75 80

80

ttt ttt aaa att gat gta aaa agt tgt att tgt ctt gat gca ggc gca	288
Phe Phe Lys Ile Asp Val Lys Ser Cys Ile Cys Leu Asp Ala Gly Ala	
85 90 95	
tct act ggt ggg ttt aca gat tgt ctt tta caa cat gga gca tct aaa	336
Ser Thr Gly Gly Phe Thr Asp Cys Leu Leu Gln His Gly Ala Ser Lys	
100 105 110	
gta tat gcg att gat gta ggc aaa ggt caa tta cat gag aaa ctg tat	384
Val Tyr Ala Ile Asp Val Gly Lys Gly Gln Leu His Glu Lys Leu Tyr	
115 120 125	
act aat gaa caa gtr ata aat att gag gga gtg aat tta cgt aca gca	432
Thr Asn Glu Gln Val Ile Asn Ile Glu Gly Val Asn Leu Arg Thr Ala	
130 135 140	
tct aaa gat ctt att cct gaa gaa gta gat att tta act att gat gtt	480
Ser Lys Asp Leu Ile Pro Glu Glu Val Asp Ile Leu Thr Ile Asp Val	
145 150 155 160	
tct ttt ata tcg ctt act ttg att tta ccg tca tgt ata cgt tgg cta	528
Ser Phe Ile Ser Leu Thr Leu Ile Leu Pro Ser Cys Ile Arg Trp Leu	
165 170 175	
aag gct tcc gga att att att gcc tta ata aag cct caa ttt gaa tta	576
Lys Ala Ser Gly Ile Ile Ile Ala Leu Ile Lys Pro Gln Phe Glu Leu	
180 185 190	
tat cca gat aaa ata aaa aaa ggt gta gta aaa gaa act agc ttg caa	624
Tyr Pro Asp Lys Ile Lys Lys Gly Val Val Lys Glu Thr Ser Leu Gln	
195 200 205	
tat gaa gca gta gaa aaa att att cat ttt tgt caa tca gaa ctt gga	672
Tyr Glu Ala Val Glu Lys Ile Ile His Phe Cys Gln Ser Glu Leu Gly	
210 215 220	
ctt ata ttt att ggt gtt gtt ccg tcg gta ata aaa ggt cca aaa gga	720
Leu Ile Phe Ile Gly Val Val Pro Ser Val Ile Lys Gly Pro Lys Gly	
225 230 235 240	
aat caa gaa tat ctt att tac ttg aaa aaa cgt taa	736
Asn Gln Glu Tyr Leu Ile Tyr Leu Lys Lys Arg	
245 250	

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 3

aaataataag atgag

15

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 4

atagaataca aattataata ag

22

REIVINDICACIONES

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

1. Un polipéptido inmunógeno recombinante o aislado que comprende, imitaciones o reactivos en forma cruzada con un epítipo de células B o células T de un polipéptido de hemolisina de *Lawsonia* spp.

2. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 1, capaz de producir la producción de anticuerpos contra *Lawsonia* spp. cuando se administra a un ave o puerco.

3. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 1, capaz de conferir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia* spp. cuando se administra a un ave o puerco.

4. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la *Lawsonia* spp. es *L. intracellularis*.

5. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la *Lawsonia* spp. es *L. intracellularis*.

6. Un polipéptido inmunógeno recombinante o aislado seleccionado entre lo que sigue:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia con aproximadamente los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1; o

(iii) un homólogo, análogo o derivado de (i) o (ii), que imita a un epítipo de células B o células C de un polipéptido de hemolisina de *Lawsonia* spp.

7. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 6, capaz de causar la producción de anticuerpos contra *Lawsonia* spp. en un ave o puerco.

8. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 7, capaz de conferir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia* spp. en un ave o puerco.

9. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 8, capaz de inducir inmunidad humoral contra *Lawsonia* spp. en un ave o puerco.

10. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 9, capaz de inducir inmunidad humoral contra *Lawsonia* spp. en un puerco.

11. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la *Lawsonia* spp. es *L. intracellularis*.

12. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la *Lawsonia* spp. es *L. intracellularis*.

13. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica a la hemolisina de pALK12 (ATCC 207195) y es capaz de inducir la producción de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* cuando se administra a un ave o puerco.

14. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 13 que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica a la hemolisina de pALK (ATCC 207195).

15. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14 capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un ave o puerco.

16. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 15 capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un animal porcino.

17. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende los residuos aminoácidos aproximadamente 1 a aproximadamente 50 de SEC ID NO: 1 y es capaz de inducir la producción de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* cuando se administra a un ave o animal porcino.

18. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 17 que consiste esencialmente en aproximadamente el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 50 de SEC ID NO: 1.

19. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 17 capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un animal porcino o ave.

20. El polipéptido inmunógeno recombinante o aislado de acuerdo con la reivindicación 19 capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra *Lawsonia intracellularis* en un animal porcino.

21. Una composición para vacunas para la profilaxis o el tratamiento de infección de un animal por *Lawsonia* spp., comprendiendo dicha composición de vacuna una cantidad efectiva de un componente inmunógeno el cual comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1, o por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia total con los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1 o un

homólogo, análogo o su derivado inmunógeno que es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con *Lawsonia intracellularis*; y uno o más portadores, diluyentes o adyuvantes adecuados para uso veterinario o farmacéutico.

22. La composición para vacunas de acuerdo con la reivindicación 21 en donde la *Lawsonia* spp. es *L. intracellularis*.

23. La composición para vacunas de acuerdo con la reivindicación 22 en donde el componente inmunógeno comprende un polipéptido aislado o recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica a la hemolisina de pALK12 (ATCC 207195).

24. La composición para vacunas de acuerdo con la reivindicación 23 en donde el componente inmunógeno consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1.

25. La composición para vacunas de acuerdo con la reivindicación 22 en donde el componente inmunógeno comprende un polipéptido aislado o recombinante que comprende aproximadamente al residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 50 de SEC ID NO: 1.

26. La composición para vacunas de acuerdo con la reivindicación 25 en donde el componente inmunógeno consiste esencialmente en aproximadamente el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 50 de SEC ID NO: 1.

27. Una composición para vacunas de combinación para la profilaxis o el tratamiento de la infección de un animal por *Lawsonia* spp., comprendiendo dicha composición para vacunas:

(i) un primer componente inmunógeno que comprende un polipéptido aislado o recombinante que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia total

con los residuos aminoácidos 1 a 50 de SEC ID NO: 1 o un homólogo, análogo o derivado inmunógeno de la misma que es inmunológicamente reactiva en forma cruzada con *Lawsonia intracellularis*;

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

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

28. Un vector para vacunas que comprende, en una forma expresable, una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunógeno recombinante o aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1, de modo que dicho polipéptido inmunógeno es expresable a un nivel suficiente para conferir inmunidad contra *Lawsonia spp.*, cuando se administra a un animal porcino o ave.

29. El vector para vacunas de acuerdo con la reivindicación 28 en donde el polipéptido inmunógeno se expresa utilizando los pasos de:

(i) colocar una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o una variante degenerada, un homólogo, análogo o derivado de la misma que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia a la misma, en conexión operable con una secuencia promotora;

(ii) introducir la molécula de ácido nucleico aislada y secuencia promotora del paso (a) en el vector para vacunas; y

(iii) incubar, cultivar o propagar el vector para vacunas durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se produzca la expresión del polipéptido inmunógeno codificado por dicha molécula de ácido nucleico.

30. El vector para vacunas de acuerdo con la reivindicación 28 en donde la *Lawsonia spp.* es *L. intracellularis*.

87
82

31. Una molécula de anticuerpo policlonal o monoclonal que es capaz de unirse específicamente a un polipéptido de hemolisina o un derivado de un polipéptido de hemolisina que es derivado de *Lawsonia* spp. y tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1.

32. La molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 31 en donde el polipéptido de hemolisina o su derivado comprende la secuencia de aminoácido expuesta en SEC ID NO: 1.

33. La molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 31 en donde el polipéptido de hemolisina o su derivado comprende aproximadamente al aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 50 de SEC ID NO: 1.

34. Un método para el diagnóstico de la infección de un animal porcino o ave por *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo que es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con la misma, comprendiendo dicho método los pasos de poner en contacto una muestra biológica derivada de dicho animal con la molécula de anticuerpo de la reivindicación 31 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forme un complejo antígeno: anticuerpo, y luego detectando dicha formación de complejo.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34 en donde la muestra biológica comprende suero entero, nódulos linfáticos, ilion, intestino ciego, intestino delgado, intestino grueso, materia fecal o una torunda rectal derivado de un animal porcino.

36. Un método para identificar si un animal porcino o ave ha sufrido o no de una infección pasada, o está actualmente infectado con *Lawsonia intracellularis* o un microorganismo que es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con la misma, comprendiendo dicho método poner en contacto sangre o suero derivado de dicho animal con el polipéptido inmunógeno de acuerdo con la

88

reivindicación 1 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se forme un complejo antígeno: anticuerpo, y luego detectar dicha formación de complejo.

37. Una molécula de ácido nucleico aislada 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 entre lo siguiente:

(i) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia total con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1;

(ii) un péptido, oligopéptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un amino que tiene por lo menos aproximadamente 50 % de identidad de secuencia total con el residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 50 de SEC ID NO: 1; o

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

38. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el péptido, oligopéptido o polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica a la hemolisina de pALK12 (ATCC 207195) o aproximadamente el residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 50 de la misma, o su epítipo de células B o el epítipo de células T.

39. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 38 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID

NO: 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma, o su variante degenerada.

40. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 39 que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o su variante degenerada.

41. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 38 que comprende esa porción de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2, o su variante degenerada, que codifica aproximadamente el residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 50 de SEC ID NO: 2.

42. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 41 que consiste esencialmente en esa porción de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2, o su variante degenerada, que codifica aproximadamente el residuo aminoácido 1 hasta aproximadamente el residuo aminoácido 50 de SEC ID NO: 2.

43. Un método para detectar *Lawsonia intracellularis* o microorganismo relacionado en una muestra biológica derivada de un sujeto animal porcino o ave, comprendiendo dicho método los pasos de hibridar una o más sondas o cebadores derivados de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO: 2 o su secuencia de nucleótidos complementaria a dicha muestra y luego detectar dicha hibridación utilizando un medio de detección.

44. El método de acuerdo con la reivindicación 43 en donde la muestra biológica comprende suero entero, nódulos linfáticos, ilion, intestino ciego, intestino delgado, intestino grueso, materia fecal o una torunda rectal derivado de un animal porcino.

45. El método de acuerdo con la reivindicación 44 en donde el medio de detección comprende cualquier hibridación basada en ácido nucleico o reacción de amplificación.

46. Una sonda o cebador que tiene por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de longitud derivados de SEC ID NO: 2 o su secuencia de nucleótidos complementaria.

47. Un plásmido designado pALK12 (No. de Acceso del ATCC 207195).

48. La composición para vacunas de combinación de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el segundo componente inmunógeno comprende un péptido, polipéptido o proteína de *L. intracellularis* antígeno, seleccionado entre el grupo que consiste en SodC, OmpH, FlgE y autolisina.

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

RESUMEN

La presente invención se refiere generalmente a composiciones terapéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de condiciones de enfermedad intestinal en animales y aves causadas o exacerbadas por *Lawsonia intracellularis* o microorganismo similar o relacionado de alguna otra manera. En particular, la presente invención provee un novedoso gen derivado de *Lawsonia intracellularis* que codifica un péptido, polipéptido o proteína de hemolisina inmunógeno que es particularmente útil como un antígeno en preparación de vacunas para conferir inmunidad humoral contra *Lawsonia intracellularis* y patógenos relacionados en huéspedes animales. La presente invención también se refiere a métodos para el tratamiento y/o profilaxis de ese tipo de condiciones de enfermedad intestinal y se refiere a agentes de diagnóstico y procedimientos para la detección de *Lawsonia intracellularis* o microorganismos similares o relacionados de alguna otra manera.

Se retiraron folios 94 y 95
de Angostas.

93 gb

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADI

Supervisión y Control
Radicación : 00034584 00000000 Policia: 66
Fecha (AMD): 2000-05-12 11:54:54
Tramite : 002 PATENTES D : REGISTRO 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS OPERACIONES

PATENTE DE INVENCION []

- 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: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

94

430

2000-05-15

**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA**

EXPEDIENTE 2000-34584

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 la Resolución 002 del 4 de Enero del 2000).

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

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

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

SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: 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., 15 de Mayo del 2000


EXAMINADOR JURIDICO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
1er. EXAMEN DE FORMA

430
2000-09-05

Radicación no 00-34584.

Concepto Técnico no 1473 Clasificación Internacional de Patentes CO7K 41/195, B12N 9/31
A61K 39/02.

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

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

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

Santa Fe de Bogotá, D.C., 5 de septiembre de 2000

202016
EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO: 1473
EXPEDIENTE: 00034584
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 hemolisina 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 tres objetos de invención definidos cada uno de ellos en los literales i), ii) y iii). Sirvase fraccionar esta reivindicación en tres donde cada una de ellas se refiera tan solo a un objeto de invención y hacer que las reivindicaciones que dependen de la actual reivindicación 6 sean modificadas para que ellas se indiquen la dependencia de la correspondiente reivindicación modificada.
4. Se recomienda eliminar de las reivindicaciones el término aproximadamente, debido a que dicho término resta precisión al objeto de invención puesto que es un término subjetivo cuyo significado no delimita la invención.
5. Las reivindicaciones 21, 27 y 29 no son claras pues ellas tratan de 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 21, 27 o 29 sean modificadas para que ellas se indiquen la dependencia de la correspondiente reivindicación modificada.
6. Las reivindicaciones 31 a 33 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.

Santa Fe de Bogotá,

/202016

430

2000-09-14

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 2000-34584

AUTO 1567

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.

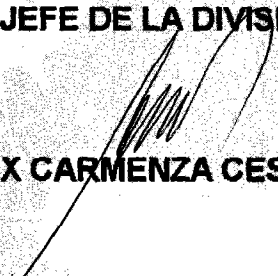
ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

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

12 SEP 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

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

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

27-10-00

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ☒ NO ☐

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA
202022

13-12-00