

PCT
OK

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

INVENTARIO

**SUPERINTENDENCIA DELEGADA PARA LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL**

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

10-24772

**SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

NÚMERO DE PCT:
PCT/EP2007/058049

PATENTE: NUEVOS GENES Y PROTEÍNAS DE BRACHYSPIRA
HYODYSENTERIAE Y EL USO DE LOS MISMOS

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL:
C07K 14/20 (2006.01), A61K 39/02 (2006.01), A61K
39/40 (2006.01), A61K 48/00 (2006.01), C12N 1/21
(2006.01), C12N 15/31 (2006.01), C12N 15/63 (2006.01),
C12Q 1/68 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01)

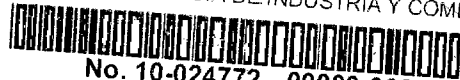
SOLICITANTE: Spirogene Pty Ltd

DOMICILIO: Perth, Australia

APODERADO: Martha BONILLA CASTRO

Bogotá D.C., marzo de 2010

Red, Cui
03-03-2010



No. 10-024772- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 11:17:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 250

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT
ENTRADA FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: Spirogene Pty Ltd
Dirección: Building 191, Campus Drive,
Murdoch University, South Street, Murdoch,
W.A. (AU)
Nacionalidad o Domicilio: Australiana
Lugar de Constitución: Australia
Tel: 571- 2864051 **Fax:**
E-mail: info@brlatina.com

IDENTIFICACIÓN☐ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: Martha BONILLA CASTRO
Dirección: Calle 26 No 4A-45 Piso 11
Bogotá, Colombia
Tel: 2864051 **Fax:**
Email: info@brlatina.com

IDENTIFICACIÓN☒ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Número: 41.566.976

T.P: 41.527

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: BELLGARD, Matthew
Dirección: Building 191, Campus Drive, Murdoch University, Street, Murdoch, AU
Nacionalidad o Domicilio: Australiana

Nombre: HAMPSON, David John
Dirección: Building 191, Campus Drive, Murdoch University, Street, Murdoch, AU
Nacionalidad o Domicilio: Australiana

Nombre: LA, Tom
Dirección: Building 191, Campus Drive, Murdoch University, Street, Murdoch, AU
Nacionalidad o Domicilio: Australiana

PCT (86)

5

Solicitud Internacional No.**Fecha:** Agosto 03 de 2007

PCT/EP2007/058049

Publicación Internacional No.**Fecha:** Febrero 14 de 2008

WO/2008/017636

6 **Título (54)** NUEVOS GENES Y PROTEÍNAS DE BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE Y
EL USO DE LOS MISMOS

7 **Clasificación Internacional (51)** C07K 14/20 (2006.01), A61K 39/02 (2006.01), A61K 39/40
(2006.01), A61K 48/00 (2006.01), C12N 1/21 (2006.01), C12N 15/31 (2006.01), C12N 15/63 (2006.01), C12Q
1/68 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01)

8 **Prioridad**
☒ SI
☐ NO

(33) País de Origen

(32) Fecha
Agosto 03 de 2007(31) Número de solicitud
PCT/EP2007/058049

9 Comprobante de pago No. 10-14593 10-14594 Fecha: Febrero 23 de 2010

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante es persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12 Solicito la concesión de la patente****Nombre:** Martha BONILLA CASTRO**Firma:** 

C.C. 41.566.976

T.P. 41.527

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 14,593
 FECHA : FEBRERO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024772- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 11:17:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 250

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	148641695	23/02/2010	3,252,000.00

***** 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 554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 14,594
FECHA : FEBRERO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024772- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 11:17:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 250

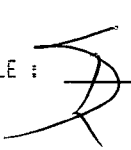
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	148641695	23/02/2010	3,252,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
34	50005-01-01	SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL
			TOTAL : \$ 884,000.00

SON: OCHOCIENTOS OCHENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**TITULO: NUEVOS GENES Y PROTEÍNAS DE *BRACHYSPIRA*
HYODYSENTERIAE Y EL USO DE LOS MISMOS**

5

RESUMEN

Se describen el nuevo Polinucleótido y los aminoácidos de *Brachyspira*
hyodysenteriae. Estas secuencias son útiles para el diagnóstico de la
10 enfermedad de *B. hyodysenteriae* en animales y útiles como un tratamiento
terapéutico o profiláctico de la enfermedad de *B. hyodysenteriae* en
animales. Estas secuencias pueden también ser útiles para el diagnóstico y
para el tratamiento terapéutico y / o profiláctico de enfermedades de los
animales causada por *Brachyspira* en otras especies, incluyendo *B.*
15 *intermedia*, *B. suantatina*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, y
B. pilosicoli.

20

25

30

35

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención hace referencia a los nuevos genes en *Brachyspira*
hyodysenteriae y a las proteínas codificadas en el mismo. Esta invención se
relaciona con el uso de estos nuevos genes y con las proteínas para el
diagnóstico de la enfermedad *B. hyodysenteriae* y vacunas contra *B.*
hyodysenteriae para la detección de compuestos que maten *B.*
10 hyodysenteriae o bloqueen los efectos patógenos de *B. hyodysenteriae*. Estas
secuencias pueden también ser útiles para el diagnóstico terapéutico y / o el
tratamiento profiláctico de enfermedades de los animales causados por otras
especies *Brachyspira* incluyendo *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B.*
aalborgi, *B. innocens*, *B. murdochii*, y *B. pilosicoli*.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La disentería porcina es una delicada enfermedad endémica de los cerdos
principalmente en Australia y en todo el mundo. La disentería porcina es una
20 enfermedad contagiosa dentro de las enfermedades diarreicas muco-
hemorrágicas, caracterizada por una extensa inflamación y necrosis de la
superficie epitelial del intestino grueso. La disentería porcina genera pérdidas
económicas debido al retraso del crecimiento, los costos de los
medicamentos y la mortalidad. El agente causal de la disentería porcina fue
25 identificado como una espiroqueta anaerobia (*Treponema hyodysenteriae*) en
1971, y recientemente fue reasignado a la *Brachyspira hyodysenteriae*
género como *B.* En el caso de disentería porcina establecida en pocilga, el
espectro de la enfermedad puede variar desde leves, transitorias o no
evidentes, a ser grave e incluso mortal. Las estrategias de medicación en
30 pocilgas individuales pueden enmascarar los signos clínicos y en algunas
granjas la enfermedad puede pasar desapercibida o sólo puede que pase
como una sospecha. Sea o no el caso de la enfermedad *B. hyodysenteriae*
puede persistir en los cerdos infectados, o en algunos huéspedes tales como
roedores o el medio ambiente. Todas estas fuentes representan el potencial
35 para la transmisión de la enfermedad a las piaras no infectadas. Las aves de
corral comerciales también pueden ser colonizados por *B. hyodysenteriae*,
aunque no está claro cómo ocurre bajo condiciones de campo.

La colonización por *B. hyodysenteriae*, provoca una fuerte respuesta inmunológica contra la espiroqueta. Por ese motivo, las pruebas indirectas de exposición a la espiroqueta, pueden ser obtenidas mediante medición de niveles de anticuerpos que circulan en la sangre de animales infectados.

5 Estos anticuerpos deben ser mantenidos en niveles bajos incluso en los animales que se han recuperado de la disentería porcina. En ese sentido, las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos tienen un potencial considerable para la detección de infecciones subclínicas en cerdos recuperados portadores que tienen cantidades indetectables en sus largos

10 intestinos. Una variedad de técnicas se han desarrollado para demostrar la presencia de anticuerpos circulantes en contra de *B. hyodysenteriae*. Estas técnicas incluyen pruebas de inmunofluorescencia indirecta, pruebas de hemaglutinación, pruebas de aglutinación de microtitulación, pruebas de fijación del complemento y ELISA utilizando tanto lipopolisacárido o todo las

15 espiroquetas sónicas como antígeno. Todas estas pruebas han sufrido de problemas de especificidad tales como el caso de intestinos no patógenos espiroquetos que pueden inducir a una reacción cruzada de anticuerpos.

Estas pruebas son útiles para la detección de piaras en los que es evidente

20 la presencia de la enfermedad y los altos anticuerpos circulantes, pero donde es difícil la detección de piaras infectadas subclínicamente de los cerdos individuales infectados. Por consiguiente, hasta la fecha, no hay ensayos sensibles y específicos disponibles para la detección de anticuerpos contra *B. hyodysenteriae*. La falta de pruebas de diagnóstico adecuadas ha

25 dificultado el control de la disentería porcina.

Varios métodos se han empelado para el control de la disentería porcina, que van desde el uso profiláctico de agentes antimicrobianos, para lograr la reducción de infecciones dentro de las piaras infectadas, hasta la prevención

30 de la reintroducción de cerdos portadores infectados. Todas estas opciones son costosas y para que sean totalmente eficaces, se requiere uso de sofisticadas pruebas de diagnóstico para monitorear el progreso. Actualmente, la detección de la disentería porcina en piaras con infecciones subclínicas y en animales portadores sanos, sigue siendo un problema

35 importante que obstaculiza la implementación de medidas de control eficaces. El diagnóstico definitivo de la disentería porcina tradicionalmente ha requerido el aislamiento y la identificación de *B. hyodysenteriae* de las heces

o la mucosa de los cerdos enfermos. Los principales problemas se encuentran en el crecimiento lento y en los exigentes requerimientos nutricionales de estas bacterias anaeróbicas y las confusiones que se presentan debido a la presencia de espiroquetas morfológicamente similares en la flora normal del intestino del cerdo.

Una mejora significativa en el diagnóstico de cada uno de los cerdos afectados se logró con el desarrollo de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), en los ensayos para la detección de las espiroquetas de las heces. Desafortunadamente, en las aplicaciones prácticas del límite de detección de PCR se hacía imposible detectar los animales portadores de infecciones subclínicas. Como consecuencia de estos problemas de diagnóstico, existe una clara necesidad de desarrollar una herramienta de diagnóstico simple y eficaz, capaz de detectar la infección por *B. hyodysenteriae* en las piaras de cerdos y en los cerdos individuales. Una respuesta inmunológica fuerte ha sido inducida en contra de la colonización siguiente de la espiroqueta con *hyodysenteriae* B. y los cerdos recuperados de la disentería porcina están protegidos contra la re-infección. A pesar de ello, los intentos de desarrollar vacunas para el control de la disentería porcina han tenido un éxito muy limitado. Ya sea porque han proporcionado una protección inadecuada en las piaras, o porque ha sido demasiado costoso y difícil de producir para que sean comercialmente viables. Las vacunas Bacterin proporcionan un cierto nivel de protección, pero tienden a ser serogrupo lipopolisacárido específico, el cual requiere el uso de bacterianas polivalentes. Además, son difíciles y costosos de producir a gran escala debido a las exigentes necesidades de crecimiento anaerobio de la espiroqueta. Varios intentos se han hecho para desarrollar vacunas vivas atenuadas para la disentería porcina. Este enfoque tiene la desventaja de que las cepas atenuadas muestran una reducción de la colonización, y por lo tanto, causan una reducción de la estimulación inmune. También hay una renuencia por parte de los productores y veterinarios para el uso de vacunas vivas de la disentería porcina, debido a la posibilidad de reversión a la virulencia, especialmente en lo que se conoce acerca de la regulación genética y la organización de *hyodysenteriae* B.

El uso de vacunas en subunidades recombinantes es una alternativa atractiva, ya que los productos serían bien definidos (esencial para el

registro), y relativamente fácil de producir en gran escala. Hasta la fecha el primer empleo informado de una proteína recombinante de *B. hyodysenteriae* como un candidato de vacuna (a 38 kilodalton proteína flagelo), no pudo prevenir la colonización en los cerdos. Este fracaso es probable que se deba

5 específicamente a la proteína recombinante particular utilizada, así como a otras cuestiones de flujo de sistemas de suministro y a las rutas, las tasas de dosis, la elección de los adyuvantes, etc (Gabe, JD, Chang RJ, Slomiany, R , Andrews, WH y McCaman, MT (1995). El aislamiento de proteínas de B204 extracitoplásmico *Serpulina hyodysenteriae* y la clonación molecular del gen

10 que codifica una flaB1 proteína flagelar 38-kilodalton. *Infección e Inmunidad* 63:142-148). El primer recombinante *B.* parcialmente utilizado para la vacunación fue un 29,7 kDa, lipoproteína de membrana externa (Bhlp29.7, también conocido como BmpB y BlpA), el cual tenía homología con las uniones de metionina de las lipoproteínas de varias bacterias patógenas. El

15 uso de la proteína Bhlp29.7 recombinante para la vacunación de los cerdos, seguidos por un desafío experimental con *B. hyodysenteriae*, se tradujo en 17-40% de los cerdos vacunados que desarrollaron la enfermedad, comparado con el 50-70% de los cerdos no vacunados, controlados de desarrollar la enfermedad . Dado que la incidencia de la enfermedad para el

20 Bhlp29.7 en cerdos vacunados fue significativamente ($P = 0,047$) menor que el de los cerdos control, Bhlp29.7 parecía tener potencial como un componente de la vacuna contra la disentería porcina (La, T, Phillips, ND, Reichel MP y Hampson DJ (2004). Protección de los cerdos de la disentería porcina mediante la vacunación con BmpB recombinante, un 29, 7 kDa

25 lipoproteína de la membrana externa de *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology* 102: 97 – 109). Una serie de otros intentos se han realizado para identificar las proteínas que envuelven el exterior de *B. hyodysenteriae* que podrían ser utilizados como componentes de la vacuna recombinante, pero de nuevo, ninguna vacuna eficaz se ha encontrado

30 todavía. Un enfoque mucho más global es necesario para la identificación de proteínas inmunogénicas recombinantes de *B. hyodysenteriae* potencialmente útiles.

Hasta la fecha, sólo un estudio utilizando el ADN para la vacunación ha sido

35 reportado. En este estudio, el gen *B. hyodysenteriae* *ftnA*, que codifica una ferritina putativa, fue clonado en un plásmido de *E. coli* y el ADN plásmido utilizado para envolver cilindros de oro para vacunación balística. Un modelo

murino de la disentería porcina se utilizó para determinar el carácter protector de la vacunación con ADN y / o de proteínas recombinantes. La vacunación con proteínas recombinantes indujo una respuesta sistémica bien contra ferritina sin embargo la vacunación con ADN inducidas sólo indujo una
5 respuesta sistémica detectable. La vacunación con ADN seguido de un impulso con la proteína recombinante induce una respuesta inmune sistémica a la ferritina sólo después de impulsar con la proteína. Sin embargo, ninguno de los regímenes de vacunación de la prueba fue capaz de proporcionar a los ratones con la protección contra la colonización B.
10 hyodysenteriae y las lesiones asociadas. Curiosamente, la vacunación de los ratones con ADN sólo resultó en la exacerbación significativa de la enfermedad (Davis, AJ, Smith, SC, y Moore, RJ (2005). El gen Brachyspira hyodysenteriae ftnA: la vacuna de ADN y la cuantificación real de PCR en tiempo de bacterias en un ratón modelo de la enfermedad. Microbiología
15 actual 50: 285-291).

OBJETO DE LA INVENCION

20 Es objeto de la presente invención es tener nuevos genes de B. hyodysenteriae y las proteínas codificadas por esos genes. Es un objeto adicional de esta invención que los nuevos genes y las proteínas codificadas por esos genes puedan ser utilizados con fines terapéuticos y de diagnóstico. Uno puede utilizar los genes y / o las proteínas en una vacuna contra el B.
25 hyodysenteriae y para diagnosticar las infecciones B. hyodysenteriae.

Es un objeto de esta invención tener nuevos genes de B hyodysenteriae. que tienen la secuencia de nucleótidos que figuran en los números de identificación de secuencias NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21,
30 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65. También es un objeto de esta invención tener secuencias de nucleótidos que son idénticos con los NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65, donde el porcentaje de identidad puede ser al menos del
35 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% (y todo entero dentro del 100 a 70). Esta invención también incluye una vacuna de ADN o composición inmunogénica de DNA que contiene la secuencia de nucleótidos NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49,

- 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, y 65 y las secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85% , el 80%, 75% y 70% idénticas (y todo entero dentro del 100 a 70) a estas secuencias. Esta invención incluye además una prueba de diagnóstico de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos NUM ID SEC:
- 5 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, y 65 y las secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80 %, 75% y 70% idénticos (y todo entero 100 a 70) a estas secuencias.
- 10 También es un objeto de esta invención tener plásmidos que contienen el ADN con los números de secuencia de NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 , 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65; ADN procariotas y / o vectores de expresión eucarióticos que contiene la secuencia NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21,
- 15 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 , 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65, y una célula que contiene los plásmidos que contienen ADN con la secuencia de los números NUM ID SEC: 1, 3, 5, 7, 9, 11 , 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 , 63 y 65.
- 20
- Es un objeto de esta invención tener nuevas proteínas *B. hyodysenteriae* que contienen la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 , 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Es otro objeto de esta
- 25 invención tener proteínas que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. También es un objeto de la invención una vacuna o composición inmunogénicas que
- 30 contienen las proteínas con la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 , 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66, o las secuencias de aminoácidos que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas
- 35 en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Se trata de un aspecto de esta invención tener un kit de diagnóstico que

contengan una o más proteínas que tienen una secuencia de las que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o que sean al menos el 95%, el 90%, 85%, 80%, 75% y 70% (y todo entero entre 100-70) homólogas a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66.

Es otro aspecto de esta invención tener secuencias de nucleótidos que codifiquen las proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66, y que codifiquen las secuencias de aminoácidos que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. La invención también cubre los plásmidos, vectores de expresión eucariotas y procariotas, y las vacunas de ADN, que contienen ADN con una secuencia que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66, y que codifican secuencias de aminoácidos que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en las NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Células que contienen estos plásmidos y vectores de expresión se incluyen en esta invención.

Esta invención incluye anticuerpos monoclonales que se unen a las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o se unen a las proteínas que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homologas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66. Los Kits de diagnóstico que contienen los anticuerpos monoclonales que se unen a las

proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que figuran en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 , 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o que se unen a las proteínas que son al menos el 95%, 90% , 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a las secuencias contenidas en los números NUM ID SEC: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 , 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 se incluyen en esta invención. Estos kits de diagnóstico pueden detectar la presencia de *B. hyodysenteriae* en un animal. El animal puede ser cualquier mamífero y ave, preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro, gato, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono y humano.

La invención también contempla el método de prevención o tratamiento de una infección de *B. hyodysenteriae* en un animal mediante la administración a un animal de una vacuna de ADN que contiene una o más secuencias de nucleótidos que figuran en los números NUM ID SEC 1, 3, 5, 7, 9, 11 , 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 , 63, y 65 o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% idénticos (y todo entero entre 100-70) a estas secuencias. Esta invención también incluye un método de prevención o tratamiento de una infección de *B. hyodysenteriae* en un animal mediante la administración a un animal de una vacuna que contiene una o más proteínas que la secuencia de aminoácidos que contienen en los números NUM SEC ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas (y todo entero entre 100-70) a estas secuencias. El animal puede ser cualquier mamífero y ave, preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro, gato, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono, y humanos.

La invención también contempla el método para generar una respuesta inmune en los animales mediante la administración a un animal de una composición inmunogénica que contiene una o más secuencias de nucleótidos que figuran en los números NUM SEC ID: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 y 65, o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%,

75% y 70% idénticos (y todo entero 100-70) a estas secuencias. Esta invención también incluye un método para generar una respuesta inmune en los animales mediante la administración a un animal de una composición inmunogénica que contiene una o más proteínas de la secuencia de aminoácidos que contiene los números de NUM SEC ID: 2,4,6,8,10,12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, y 66 o secuencias que son al menos el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homóloga (y todo entero 100-70) a estas secuencias. El animal es preferible de cualquier mamífero y ave, más preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro, gato, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono, y humanos.

RESUMEN DETALLADO DE LA INVENCION.

15

Los artículos "a" y "una" aquí se utilizan para referirse a uno o más de uno (a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, un "elemento" significa un elemento o más de un elemento.

20

El término "aminoácidos" pretende abarcar todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad de aminoácidos y que son susceptibles de ser incluidos en un polímero de origen natural aminoácidos. Los aminoácidos ejemplares son los aminoácidos de origen natural; análogo, derivados y congéneres de la misma; aminoácidos análogos del ácido con las cadenas laterales de la variante y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores.

25

Un animal puede ser cualquier mamífero o un ave. Algunos ejemplos de mamíferos incluyen perros, gatos, hámster, jerbo, conejo, hurón, caballo, vaca, oveja, cerdo, mono, y humanos. Ejemplos de las aves incluyen pollo, ganso, pato, pavo, y el perico.

30

El término "residuo de conservación" se refiere a un aminoácido que es un miembro de un grupo de aminoácidos que posean ciertas características comunes. El término "conservador sustitución de aminoácidos" se refiere a la sustitución (conceptual o no) de un aminoácido de uno de estos grupos con un aminoácido diferente del mismo grupo. Una manera funcional para definir las propiedades comunes entre los distintos aminoácidos es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de los organismos homólogos (Schulz, GE y RH Schinner.,

35

Principios de la estructura proteica, Springer-Verlag). Según esos análisis, los grupos de aminoácidos se pueden definir en los aminoácidos dentro de un grupo de intercambio preferencial entre sí, y por lo tanto se asemejan más en su impacto sobre la estructura de la proteína total (Schulz, GE y RH Schirmer, Principios de la estructura proteica, Springer-Verlag). Ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluyen: (i) un grupo cargado positivamente que contengan Lys, Arg, (ii) un grupo con carga negativa que contiene Glu y Asp, (iii) un grupo de aromáticos con Phe, Tyr y Trp, (iv) un grupo de anillos que contienen nitrógeno y su Trp, (v) un gran grupo alifáticos no polares que contienen Val, Leu y de, (vi) un poco-grupo polar que contiene Met y Cys, (vii) un grupo de residuos de pequeña con Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, la ginebra y Pro, (viii) un grupo de alifáticos contiene Val, Leu, De, Met y Cys, y (ix) un pequeño grupo hidroxilo con Ser y Thr.

15

Una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a una proteína quimérica como se conoce en el arte y puede ser construido utilizando los métodos ya conocidos en el arte. En muchos ejemplos de proteínas de fusión, hay dos secuencias polipeptídicas diferentes, y en algunos casos, puede haber más. Las secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína de fusión pueden estar unidas operativamente en el marco, de modo que la proteína de fusión pueda ser traducida correctamente. Una proteína de fusión puede incluir secuencias polipeptídicas de la misma especie o de especies diferentes. En varias realizaciones, el polipéptido de fusión puede contener una o más secuencias de aminoácidos ligados a un polipéptido de primera. En caso de que más de una secuencia de aminoácidos se funda a un polipéptido, en primer lugar, las secuencias de fusión pueden ser varias copias de la misma secuencia o alternativamente, pueden ser diferentes secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos de fusión pueden ser fusionadas con el N-terminal, el C-terminal, o por la N-y C-terminal del polipéptido en primer lugar. Las proteínas de fusión ejemplar incluyen polipéptidos que contienen una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST-tag), la etiqueta histidina (His-tag), un dominio de inmunoglobulina o una inmunoglobulina dominio de unión.

35

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido, realizaciones determinadas preparaciones a partir de ADN recombinante o ARN, o de

origen sintético o de origen natural, o alguna combinación de los mismos, que (1) no está asociada con las proteínas que normalmente se encuentra en la naturaleza, (2) se separa de la celda en la que normalmente se produce, (3) está libre de otras proteínas de la misma fuente celular, (4) se expresa por una célula de una especie diferente, o (5) no se produce en la naturaleza. Es posible que exista un polipéptido aislado, pero no califica como un polipéptido purificado.

El término "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido si el ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, IRNA, o un polinucleótido obtenido de un orgánulo las mitocondrias celulares (como el de cloroplasto), o si de síntesis origen, que (1) no se asocia a la celda en la que el "aislamiento de ácidos nucleicos" se encuentra en la naturaleza, o (2), unido operativamente a un polinucleótido que no está vinculado en la naturaleza. Es posible que un polinucleótido aislado exista, pero no califica como un polinucleótido purificado.

El término "ácido nucleico" y "polinucleótidos" se refiere a una forma de polímeros de nucleótidos, o bien ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótidos. Debe también entenderse que se incluyen como equivalentes, las condiciones de los análogos de cualquiera de ARN o ADN a partir de los análogos de nucleótidos, y según como proceda a la realización se describe, de cadena sencilla (como el sentido o antisentido) y de doble cadena polinucleótidos. El término "ácido nucleico de la invención" y "polinucleótido de la invención" se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Un polinucleótido de la invención puede comprender la totalidad o una parte de un sujeto secuencia de ácido nucleico, una secuencia de nucleótidos que al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % idéntico a la secuencia de ácido nucleico (y cada número entero entre 60 y 100), una secuencia de nucleótidos que híbrida en condiciones estrictas a la secuencia de ácido nucleico de un sujeto; secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a polipéptidos de la invención; secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos al menos un 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga o idéntica a una secuencia de aminoácidos (y cada número entero entre 60 y 100); secuencias de nucleótidos que codifica polipéptidos que tengan una actividad de un polipéptido de la invención, de al menos un 60%, 70%, 80%, 85%,

90%, 95%, 98%, 99% o más de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos (y todo número entero entre 60 y 100), las secuencias de nucleótidos que difieren entre un 1 y un 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o supresiones, como las
 5 variantes alélicas de un sujeto de secuencias de ácidos nucleicos, derivados de los ácidos nucleicos y evolutivamente relacionados con la secuencia del ácido nucleico de un sujeto. Complementos de las secuencias de nucleótidos resultantes de la degeneración del código genético, para todos los ácidos nucleicos anteriores y otras de la invención. Los ácidos nucleicos
 10 de la invención también incluyen homólogos, por ejemplo, ortólogos y paralogos, de la secuencia de un sujeto de ácido nucleico así como las variantes de la secuencia de un sujeto de ácido nucleico codón que han sido optimizados para la expresión en un organismo en particular (por ejemplo, la célula huésped).

15 El término "operativamente vinculado", al describir la relación entre las dos regiones de ácido nucleico, se refiere a una yuxtaposición en el que las regiones están en una relación que les permita funcionar en la forma prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente vinculado" a
 20 una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se realiza en condiciones compatibles con las secuencias de control, como cuando por ejemplo, las moléculas apropiadas (inductores y polimerasas) son vinculadas al control o la secuencia reguladora (s).

25 El término "polipéptido", y los términos "proteínas" y "péptido", que se utilizan indistintamente en este documento, se refiere a un polímero de aminoácidos. Ejemplar polipéptidos incluyen productos de los genes, las proteínas de origen natural, homólogos, ortólogos, paralogos, fragmentos, y otros
 30 equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

Los términos "polipéptido fragmento" o "fragmento", cuando se utilizan en referencia a un polipéptido de referencia, se refieren a un polipéptido en el que los residuos de aminoácidos se suprimen, en comparación con la
 35 referencia al mismo polipéptido, pero que en el resto de la secuencia de aminoácidos, es generalmente idéntico al las posiciones correspondientes en el polipéptido de referencia. Dichas eliminaciones pueden ocurrir en el amino-

terminal o carboxilo-terminal del polipéptido de referencia, o bien ambas cosas. Los fragmentos suelen ser, al menos, 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de largo, por lo menos 14 aminoácidos de largo, al menos, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos de largo, al menos 75 aminoácidos, o por lo menos 100, 150, 200, 300, 500 o más aminoácidos de largo. Un fragmento puede mantener una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un fragmento puede comprender un dominio con la actividad biológica que desee y opcionalmente, los aminoácidos adicionales en uno o ambos lados del dominio. Estos aminoácidos adicionales pueden ser de número 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, o hasta 100 o más residuos. Además, los fragmentos pueden incluir un sub-fragmento de una región específica, sub-fragmento que conserva una función de la región de la que se deriva. En otra realización, un fragmento puede tener propiedades inmunogénicas.

15

El término "polipéptido de la invención" se refiere a un polipéptido que contiene un sujeto de secuencia de aminoácidos, un equivalente, o un fragmento de la misma. Los polipéptidos de la invención contienen la totalidad o una parte de la secuencia de un sujeto de aminoácidos de 1 hasta alrededor de 2,3,4,5,7,10,15,20,30,50,75 o más conservativos de sustituciones de aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos que es al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga a un sujeto de secuencia de aminoácidos (y cada número entero entre 60 y 100), y a los fragmentos funcionales de la misma. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos, por ejemplo, ortólogos y paralogos, de la secuencia de un sujeto de aminoácidos.

25

También es posible modificar la estructura de los polipéptidos de la invención con fines tales como la mejora de la eficacia o la estabilidad terapéutica o profiláctica, (por ejemplo, ex vivo, la vida útil, resistencia a la degradación proteolítica en vivo, etc.) Tales polipéptidos modificados, cuando están diseñados para mantener al menos una actividad de la forma que ocurren naturalmente de la proteína, se consideran "equivalentes funcionales" de los polipéptidos descritos en más detalle en este documento. Tales polipéptidos modificados pueden ser producidos, por ejemplo, por sustitución de un aminoácido, por la supresión o adición que puede consistir en la sustitución total o parcialmente por las sustituciones conservativas de aminoácidos.

35

Por ejemplo, es posible esperar que un conservador aislado de sustitución de un aminoácido, tal como la sustitución por una leucina, isoleucina por una o valina, un aspartato por un glutamato, una serina por treonina, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Un

5 cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido en los resultados de un homólogo funcional, puede ser fácilmente determinado gracias a la evaluación de la capacidad de la variante de polipéptidos para producir una respuesta similar a la de la proteína de tipo salvaje. Los polipéptidos en el que más de una renovación haya tenido lugar fácilmente pueden ser probado

10 en la misma manera.

El término "purificado" se refiere a una especie de objeto que es la especie predominante presente (es decir, en base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). Una "fracción purificada"

15 es una composición donde la especie del objeto es de por lo menos un 50 por ciento (en base molar) de todas las especies presentes. Al hacer la determinación de la pureza o de una especie en solución o dispersión, el disolvente o la matriz en la que la especie se disuelve o dispersa, no suele ser incluido en dicha determinación. Al contrario sólo las especies (incluida la

20 de interés) disueltas o dispersas son tenidas en cuenta. Generalmente, una composición purificada tendrá una especie que es más de alrededor de 80% de todas las especies presentes en la composición, más de un 85%, 90%, 95%, 99% o más del total de todas las especies presentes. Las especies pueden ser purificadas hasta alcanzar una homogeneidad esencial (las

25 especies de contaminantes no pueden ser detectadas en la composición por métodos de detección convencionales) donde la composición es esencialmente de una sola especie.

Un hombre versado de la materia puede purificar un polipéptido de la invención utilizando técnicas estándar para la purificación de proteínas. La

30 pureza de un polipéptido puede ser determinado por una serie de métodos conocidos por los expertos, como por ejemplo, amino-terminal, secuencia de análisis de amino ácido, electroforesis en gel, análisis de espectrometría de masas y los métodos aquí descritos. Los términos "proteína recombinante" o

35 "polipéptido recombinante" se refieren a un polipéptido que se produce por técnicas recombinantes de ADN. Un ejemplo de estas técnicas incluye el caso cuando el ADN que codifica la dicha proteína, se inserta en un vector de

expresión adecuado que a su vez es utilizado para transformar una célula huésped para producir la proteína o polipéptido codificado por el ADN. El término "secuencia regulatoria" es un término genérico utilizado en las especificaciones para hacer referencia a las secuencias de polinucleótidos, tales como las señales iniciales, los potenciadores, los reguladores y promotores que son necesarios o convenientes para afectar la expresión de secuencias de codificación y de no- codificación a los que están vinculados operativamente. Como ejemplo, las secuencias reguladoras se describen en Goeddel; Expresión Génica Tecnología: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990), e incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos del SV40, adenovirus o citomegalovirus. El sistema ALC, el sistema PRT, el TAC o el sistema de la CVR, el promotor de T7, cuya expresión está dirigida por la RNA polimerasa T7, el operador de las principales regiones y el promotor de fago lambda, las regiones de control de la cubierta proteica fd, el promotor para el 3-fosfoglicerato quinasa, otras enzimas glucolítica, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los factores promotores de apareamiento levadura- α , el promotor del poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de las células procariotas y eucariotas, de sus virus y varias combinaciones de la misma. La naturaleza y el uso de secuencias de control pueden diferir dependiendo del organismo hospedador. Tanto en los procariotas, como las secuencias reguladoras, generalmente se incluyen un promotor, sitio de unión ribosomal, y las secuencias de terminación de la transcripción.

25

El término "secuencia regulatoria" tiene la intención de incluir, como mínimo, los componentes cuya presencia pueda influir en su expresión. También pueden incluir los componentes adicionales cuya presencia es una ventaja en las secuencias líderes y en las secuencias de fusión. En algunas realizaciones, la transcripción de una secuencia de polinucleótidos se encuentra bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora), que controla la expresión del polinucleótido en una celda tipo en la que se destina la expresión. Asimismo, se entenderá que el polinucleótido puede estar bajo el control de las secuencias reguladoras que son las mismas o diferentes de aquellas secuencias controlan la expresión de la forma natural de realización del polinucleótido.

El término "homología de secuencia" se refiere a la proporción de encuentros en la base entre dos secuencias de ácido nucleído o la proporción de encuentros de aminoácidos entre dos secuencias de aminoácidos. Cuando la homología de secuencia se expresa como un porcentaje, por ejemplo, el 50%, el porcentaje representa la proporción de pares en la longitud de la secuencia de una secuencia deseada que se compara con alguna otra secuencia. Están permitidos intervalos (en cualquiera de las dos secuencias) para maximizar la concordancia; se suelen utilizar intervalos de 15 bases de longitud o menos, se utilizan con más frecuencia de 6 bases o menos y son utilizados más frecuentemente de 2 bases o menos. El término "identidad de la secuencia" significa que las secuencias son idénticas (es decir, en base a un nucleótido por nucleótido para los ácidos nucleicos o, en base a aminoácido por aminoácido para polipéptidos) en una ventana de comparación.

El término "porcentaje de identidad de la secuencia" se calcula por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, determinando el número de posiciones en el que son idénticos los aminoácidos o nucleótidos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones concordantes, dividiendo el número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos para el cálculo de identidad de la secuencia son conocidos por una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica y son descritas en detalle más adelante.

El término "soluble", como se usa aquí, hace referencia a un polipéptido de la invención u otras proteínas, una vez expresado en cultivos celulares, en la que al menos una parte del polipéptido o de la proteína expresada, permanece en la fracción citoplasmática de la célula y no se fracciona con los restos celulares en la lisis y la centrifugación del lisado. La solubilidad de un polipéptido podrá incrementarse con una variedad de métodos reconocidos del arte, incluida la fusión a una secuencia heteróloga de aminoácido, la eliminación de residuos de aminoácidos, la sustitución de aminoácidos (por ejemplo, enriqueciendo la secuencia con residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas), y modificación química (por ejemplo, la adición de grupos hidrófilos).

La solubilidad de los polipéptidos se puede medir usando una variedad de técnicas reconocidas en el estado arte, incluyendo, dispersión de luz dinámica para determinar el estado de agregación, la absorción de los rayos UV, centrifugación para separar materiales agregados de no agregados, y la electroforesis en gel de SDS (por ejemplo, la cantidad de proteína en la fracción soluble se compara con la cantidad de proteína en las fracciones solubles e insolubles combinadas). Cuando se expresan en una célula huésped, los polipéptidos de la invención pueden ser por lo menos el 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más solubles, por ejemplo, al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del total de la proteína expresada en la célula se encuentra en la fracción citoplasmática. En algunas realizaciones, un litro de un cultivo de células que expresan un polipéptido de la invención producirá por lo menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 miligramos o más de la proteína soluble. En un ejemplo de realización, un polipéptido de la invención es al menos un 10% soluble y va a producir por lo menos alrededor de 1 miligramo de proteína a partir de un litro de cultivo de la célula.

El término "específicamente híbrida" se refiere a la unión específica y detectable de ácido nucleico. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la invención de manera selectiva hibridan con hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y lavado que reduzcan al mínimo las cantidades apreciables de uniones detectables con ácidos nucleicos inespecíficos. Las condiciones estrictas, pueden ser utilizadas para lograr unas condiciones de hibridación selectiva como se conocen en el arte y que aquí se analizan. En general, la identidad de la secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será al menos del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más (y cada número entero entre 30 y 100). En algunos casos, la hibridación y las condiciones de lavado se realizan bajo condiciones estrictas de acuerdo a los procedimientos convencionales de hibridación y como se describe más adelante.

Los términos "condiciones estrictas" o "condiciones estrictas de hibridación" se refieren a las condiciones que promueven la hibridación específica entre dos cadenas de polinucleótidos complementarios a fin de formar un dúplex.

Las condiciones estrictas, pueden ser establecidas para estar cerca de 5 ° C más bajas que el punto de fusión térmica (TM) para un determinado dúplex de polinucleótidos, bajo una determinada fuerza iónica y bajo un pH definido. La longitud de las cadenas de polinucleótidos complementarios y su contenido GC determinará la TM del dúplex, y por lo tanto las condiciones de hibridación necesarios para la obtención de la hibridación específica deseada. La TM es la temperatura (bajo una determinada fuerza iónica y pH) en la que el 50% de una secuencia de polinucleótidos híbrida con una cadena complementaria en perfecta combinación. En algunos casos puede ser conveniente aumentar el rigor de las condiciones de hibridación para ser casi iguales a la TM de un dúplex en particular.

Una variedad de técnicas para la estimación de la TM están disponibles. Típicamente, los pares de bases GC en un dúplex se estima que contribuyen con alrededor de 3 ° C a la TM, mientras que los pares de bases AT se estima que contribuyen con alrededor de 2° C, hasta un máximo teórico de unos 80-100 ° C.

Sin embargo, los modelos más sofisticados de TM disponibles en los cuales las interacciones de apilamiento GC, los efectos del disolvente, la temperatura de ensayo deseada y similares son tenidas en cuenta. Por ejemplo, las sondas pueden ser diseñadas para tener una temperatura de disociación (Td) de aproximadamente 60 ° C, según la fórmula: $Td = (((3 \times \#GC) + (2 \times \#AT)) \times 37) - 562) / \#BP - 5$; donde #GC, #AT, y #BP son el número de pares de bases guanina-citosina, el número de pares de bases adenina-timina, y el número de pares de bases totales, respectivamente, que participan en la formación del dúplex.

La hibridación puede ser llevada a cabo en 5x SSC, 4x SSC, SSC 3x, 2x SSC, 1x SSC o 0.2x SSC por al menos 1 hora, 2 horas, 5 horas, 12 horas o 24 horas. La temperatura de la hibridación puede ser mayor para ajustar el rigor de la reacción, por ejemplo, pasando de unos 25 ° C (temperatura ambiente), a unos 45 ° C, 50 ° C, 55 ° C, 60 ° C o 65 ° C. La reacción de hibridación también puede incluir otro agente que afecte la rigurosidad, por ejemplo, la hibridación puede ser llevada a cabo en presencia de formamida al 50% lo que aumenta el rigor de la hibridación a una temperatura definida.

La reacción de hibridación puede ser seguida por un paso de lavado único, o dos o más pasos de lavado, que pueden estar en el mismo o en diferente nivel de salinidad y de temperatura. Por ejemplo, la temperatura del lavado puede aumentarse, para ajustar el rigor, de unos 25 ° C (temperatura ambiente), a unos 45 ° C, 50 ° C, 55 ° C, 60 ° C, 65 ° C, o superior. El paso de lavado puede realizarse en presencia de un detergente, por ejemplo, 0,1 o 0,2% de SDS. Por ejemplo, la hibridación puede ser seguida por dos pasos de lavado a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 2x SSC, SDS 0,1%, y opcionalmente de dos pasos de lavado adicional a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 0.2x SSC, 0.1% SDS.

Ejemplos de condiciones estrictas de hibridación, incluyen la hibridación durante la noche a 65 ° C en una solución que contiene 50% formamida, 10x Denhardt (0,2% Ficoll, 0,2%, polivinilpirrolidona 0,2% de albúmina de suero bovino) y 200 ug / ml de ADN portador desnaturalizado, por ejemplo, el ADN del espermatozoide de salmón esquilado, seguido de dos pasos de lavado a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 2x SSC, SDS 0,1%, y dos pasos de lavado a 65 ° C cada uno de unos 20 minutos en 0.2x SSC, SDS 0,1%.

La hibridación puede consistir en la hibridación de dos ácidos nucleicos en una solución, o un ácido nucleico en solución a un ácido nucleico en un soporte sólido, por ejemplo, un filtro. Cuando un ácido nucleico está sobre un soporte sólido, un paso prehibridación puede llevarse a cabo antes de la hibridación. La prehibridación puede llevarse a cabo durante al menos 1 hora, 3 horas o 10 horas en la misma solución y en la misma temperatura que la solución de hibridación (sin la cadena de polinucleótidos complementarios).

Las condiciones de rigor adecuadas son conocidas por los técnicos en la materia o pueden determinarse experimentalmente por el artesano calificado. Véase, por ejemplo, los protocolos actuales en Biología Molecular, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-12.3.6; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY; Agrawal, S. (ed.) Methods in Molecular Biology, volumen 20; Tijssen (1993) Técnicas de Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular - hibridación con sondas de ácidos nucleicos, por ejemplo, el capítulo I, parte 2 "Resumen de los principios de la hibridación y la estrategia de ensayos de sonda de ácido

nucleico ", Elsevier, Nueva York, y Tibanyenda, N. et al., EUR. J. Biochem. 139:19 (1984) y Ebel, S. et al., Biochem. 31:12083 (1992).

El término "vector" se refiere a un ácido nucleico capaz de transportar a otro
5 ácido nucleico con el que se le ha relacionado. Un tipo de vectores que
pueden ser utilizados de acuerdo con la invención es un episoma, es decir,
un ácido nucleico capaz de reproducirse extra-cromosómicamente. Otros
vectores son los que son capaces de replicación autónoma y de expresión de
10 dirigir la expresión de genes a las que están vinculados operativamente se
llamaran aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de
expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante tienen a menudo
forma de plásmidos, que se refieren a moléculas de ADN circular de doble
cadena que, en su forma vectorial no están vinculados al cromosoma. En la
15 presente descripción, "plásmido" y "vector" se utilizan indistintamente siendo
el plásmido la forma más usual de vector. Sin embargo, la invención tiene
por objeto incluir como otras formas de vectores de expresión, que cumplen
funciones equivalentes, y que se conocen en el arte, o que pueden
conocerse posteriormente.

20

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser utilizados como reactivo de
diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de la secuencias buscadas
de ADN o ARN a las que se unen específicamente, como para determinar el
nivel de expresión de un ácido nucleico de la invención. En un aspecto, la
25 presente invención contempla un método para detectar la presencia de un
ácido nucleico de la invención o de una parte de éstos, en una muestra, el
método de los pasos de: (a) facilitar un oligonucleótido de al menos ocho
nucleótidos de longitud, el oligonucleótido siendo complementario a una parte
de un ácido nucleico de la invención, (b) poner en contacto el oligonucleótido
30 con una muestra que contenga al menos un ácido nucleico en condiciones
que permitan la hibridación de los oligonucleótidos con un ácido nucleico de
la invención o una parte de ella, y c) detectar la hibridación del
oligonucleótido a un ácido nucleico en la muestra, con lo que se detecta la
presencia de un ácido nucleico de la invención o de una parte de éstos, en la
35 muestra.

En otro aspecto, la presente invención contempla un método para detectar la presencia de un ácido nucleico de la invención o de una parte de éstos, en una muestra, (a) proporcionando un par de oligonucleótidos de una sola cadena, cada uno de ellos de al menos ocho nucleótidos en longitud, complementarios con las secuencias de ácido nucleico de la invención, y en donde las secuencias de los oligonucleótidos que son complementarios tienen por lo menos diez nucleótidos de separación, y (b) contactando los oligonucleótidos con una muestra que contenga al menos un ácido nucleico en condiciones de hibridación; (c) ampliando la secuencia de nucleótidos entre los dos oligonucleótidos, y (d) detectando la presencia de una secuencia amplificada, con lo que se detecta la presencia de un ácido nucleico de la invención, o de una parte de éstos, en la muestra.

En otro aspecto de la invención, el polinucleótido de la invención se da en un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención y operativamente vinculado a al menos una secuencia reguladora. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped para ser transformada y / o el tipo de proteína que se desea expresar. El número de copias del vector, la capacidad de controlar el número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores de antibióticos, deben ser considerados.

Un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la invención puede ser utilizado como un agente farmacológico para el tratamiento de un animal infectado con *B. hyodysenteriae* o como vacuna (también es un agente farmacológico) **para evitar que un animal infectado de *B. hyodysenteriae***, o para reducir los síntomas y el curso de la enfermedad si el animal se infecta. Una forma de utilización de un vector de expresión como un agente farmacéutico es la de administrar una vacuna de ácido nucleico al animal en riesgo de estar infectado o al animal después de ser infectada. La tecnología de la vacuna de ácido nucleico está bien descrita en el arte. Algunas descripciones se pueden encontrar en las Patentes EE.UU. 6.562.376 (Hooper et al.) Patente EE.UU. 5.589.466 (Felgner, et al.) Patente EE.UU. 6.673.776 (Felgner, et al.), y en las patentes EE.UU. 6.710.035 (Felgner, et al.). Vacunas de ácido nucleico pueden ser inyectadas en un músculo o por vía intradérmica, pueden ser electroporadas en el animal (véase la WO

01/23537, King et al., Y WO 01/68889, Malone et al.), a través de composiciones de lípidos (véase Patente EE.UU. 5.703.055, Felgner, et al), o de otros mecanismos conocidos en el campo del arte.

- 5 Vectores de expresión también **pueden** ser transfectados en una bacteria que puede ser administrada a los animales seleccionados para inducir una respuesta inmune a la proteína codificada por los nucleótidos de la presente invención contenida en el vector de expresión. El vector de expresión puede
- 10 contener secuencias de expresión eucarióticas de tal manera que los nucleótidos de la presente invención son transcritos y traducidos en el animal huésped. Alternativamente, el vector de expresión puede ser transcrito en la bacteria y luego se traducen en el animal huésped. La bacteria que se utiliza como soporte del vector de expresión debe ser atenuada, pero aún invasiva. Uno puede usar *Shigella* spp., *Salmonella* spp. *Spp coli.*, y *Aeromonas* spp.,
- 15 sólo para nombrar unas pocas, que han sido atenuadas, pero aún son invasivas. Ejemplos de estos métodos se pueden encontrar en las Patente EE.UU: 5.824.538 (Branstrom et al); 5.877.159 (Powell, et al.) 6.150.170 (Powell, et al.) 6.500.419 (Hone, et al.) 6682729 y (Powell, et al.).
- 20 Alternativamente, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser colocados en ciertos virus que actúan de vector. Los vectores virales pueden expresar las proteínas de la presente invención sobre la superficie del virus, o llevar a los polinucleótidos de la presente invención a una célula animal, donde el polinucleótido es transcrito y traducido en una proteína. El animal
- 25 infectado con los vectores virales puede desarrollar una respuesta inmune a las proteínas codificadas por los polinucleótidos de la presente invención. De esta manera se puede aliviar o prevenir una infección por *B. hyodysenteriae* en el animal que recibió los vectores virales. Ejemplos de vectores **virales se pueden** encontrar en: Patente EE.UU. 5.283.191 (Morgan et al.); Patente
- 30 EE.UU. 5.554.525 (Sondermeijer et al) y la Patente EE.UU. 5.712.118 (Murphy).

El polinucleótido de la invención puede utilizarse para provocar la expresión y, la sobre-expresión de un polipéptido de la invención, en las células que se

35 propagan en un cultivo, por ejemplo, para producir proteínas o polipéptidos, incluyendo proteínas de fusión o polipéptidos.

La presente invención se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante, a fin de expresar un polipéptido de la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede ser expresado en las células bacterianas, como la *E. coli*, células de insecto (baculovirus), levadura, plantas, o células de mamífero. En aquellos casos en que la célula huésped sea humana, puede o no ser en un sujeto vivo. Otras células de acogida adecuadas son conocidas por los expertos en la materia. Además, la célula huésped podrá completarse con las moléculas de ARNt, que no suelen encontrarse en el huésped, a fin de optimizar la expresión del polipéptido. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos puede ser modificada para optimizar la expresión en la célula huésped, sin embargo, la proteína producida tendría alta homología a la proteína codificada originalmente. Otros métodos adecuados para maximizar la expresión del polipéptido se darán a conocer a las personas del arte.

La presente invención se refiere a los métodos de producción de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de la invención puede ser cultivada en condiciones adecuadas para permitir que la expresión del polipéptido que se produzca. El polipéptido puede ser segregado y aislado de una mezcla de células y medios que contengan el polipéptido. Alternativamente, el polipéptido se podrá mantener en el citoplasma y las células cultivadas, "lisiadas" y la proteína aislada.

Un cultivo celular incluye las células huésped, los medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo de células son bien conocidos en el arte. El polipéptido se puede aislar del medio de cultivo celular, de las células del huésped, o de ambos, mediante técnicas conocidas en la técnica de purificación de proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, electroforesis, y purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de un polipéptido de la invención.

Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica la totalidad o una parte seleccionada de polipéptidos de la invención, puede ser utilizado para producir una forma recombinante de la proteína a través de procesos

microbianos o celulares eucariotas. Ligar la secuencia en la construcción de un polinucleótido, como un vector de expresión y transformar o transfectarlos en huéspedes, ya sea células eucariotas (hongos, aves, insectos o mamíferos) o procariotas (células bacterianas), son procedimientos habituales. Los procedimientos similares, o modificaciones de los mismos, pueden ser utilizados para preparar polipéptidos recombinantes de la invención por medio de tejidos microbianos o alta tecnología.

Los vectores adecuados para la expresión de un polipéptido de la invención incluyen plásmidos de los siguientes tipos: pTrcHis derivados de plásmidos, PET derivado de plásmidos, pBR322 derivados de plásmidos, pEMBL derivados de plásmidos, PEX-derivados plásmidos, pBTac derivados de plásmidos y PUC-derivados plásmidos de expresión en las células procariotas, como la E. coli. Los distintos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos de acogida son bien conocidos en la materia. Para otros sistemas de expresión adecuados, tanto para las células procariotas y eucariotas, así como procedimientos generales recombinantes, se recomienda ver: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) los capítulos 16 y 17. Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) los capítulos 16 y 17. Las secuencias codificadas para un polipéptido de interés pueden ser incorporadas como parte de un gen fusión incluyendo una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido diferente. La presente invención contempla un polinucleótido aislado que contiene un ácido nucleico de la invención y al menos una secuencia heteróloga que codifica un péptido heterólogo, vinculado en el marco de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la invención con el fin de codificar una proteína de fusión que contiene el polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo puede estar unido a (a) C-terminal del polipéptido de la invención, (b) al terminal N del polipéptido de la invención, o (c) al C-terminal y el N-terminal del polipéptido de la invención. En algunos casos, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido que permite la detección, aislamiento, solubilidad y / o estabilización del polipéptido al cual se funde. Aún en otras realizaciones, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido, como una etiqueta de poli His tag, myc, HA, GST, proteína A, proteína G, la calmodulina de unión del péptido, tioredoxina, maltosa proteína de unión, poli arginina, su poli-Asp,

FLAG, una porción de una proteína de inmunoglobulina, y un péptido transcritos.

- Los sistemas de expresión de fusión pueden ser útiles cuando se desea producir un fragmento inmunogénico de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, la proteína VP6 cápside de rotavirus puede ser utilizada como transporte inmunológico para porciones de polipéptido ya sea en forma monomérica o en forma de una partícula viral.
- Las secuencias de ácidos nucleicos que corresponden a la porción de un polipéptido de la invención en la que los anticuerpos serán incluidos, pueden ser incorporados en un gen de fusión construcción que incluye las secuencias codificadoras de una proteína virus vaccinia estructural para producir un grupo de virus recombinantes que expresan proteínas fusión y que comprende una porción de la proteína, como parte del virión. El antígeno de superficie de la Hepatitis B también puede ser utilizado en esta función. Del mismo modo, las construcciones quiméricas que codifican las proteínas de fusión que contiene una porción de un polipéptido de la invención y la proteína de la cápside del poliovirus pueden ser creadas para mejorar la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, EP Publicación N °: 0259149, y Evans et al., (1989) *Naturaleza* 339:385; Huang et al., (1988) *J. Virol.* 62:3855, y Schlienger et al., (1992) *J. Virol.* 66:2).339:385; Huang et al., (1988) *J. Virol.* 62:3855, y Schlienger et al., (1992) *J. Virol.* 66:2).
- Las proteínas de fusión pueden facilitar la expresión y / o la purificación de proteínas. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede ser generado como glutatión S-transferasa (GST), proteína de fusión. Estas proteínas de fusión GST pueden ser usadas para simplificar la purificación de un polipéptido de la invención, por ejemplo mediante el uso de matrices de glutatión derivatizada (véase, por ejemplo, los protocolos actuales en *Biología Molecular*, eds. Ausubel et al., (NY: John Wiley & Sons, 1991). En otra realización, un gen fusión que codifica una secuencia líder de purificación, como una secuencia de poli-(Hi) / enteroquinasa punto de corte en la N-terminal de la parte deseada de la proteína recombinante, puede permitir la purificación de la proteína fusión expresada mediante la afinación de la cromatografía, usando una resina Ni²⁺ + metal. En ese sentido, la secuencia líder de purificación puede ser posteriormente eliminada gracias al

tratamiento con enteroquinasa para proporcionar la proteína purificada (por ejemplo, ver Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411: 177; y Janknecht et al. PNAS EE.UU. 88:8972).

5 Las técnicas para la toma de genes fusión son bien conocidas. En esencia, la unión de diferentes fragmentos de ADN codificada por diferentes secuencias polipeptídicas, se realiza de acuerdo con las técnicas convencionales, empleando los extremos romos o extremos escalonados para las uniones terminales, restricción de la enzima de digestión para establecer terminales
10 adecuados, extremos cohesivos, tratamiento del alcalino fosfato para evitar las uniones no deseadas y para la ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede ser sintetizado por técnicas convencionales como sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, la amplificación PCR para fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando los
15 cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos para generar una secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, los protocolos actuales en Biología Molecular, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

20 En otras realizaciones, la invención proporciona los ácidos nucleicos de la invención inmovilizados sobre una superficie sólida, incluyendo, planchas, placas de microtitulación, diapositivas, granos, esferas, películas, hilos, precipitados, geles, láminas, tubos, contenedores, tubos capilares,
25 almohadillas, rodajas, etc. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser inmovilizados en un chip, como parte de una matriz. La matriz puede contener uno o más polinucleótidos de la invención como se describe en este documento. En una realización, el chip contiene uno o más polinucleótidos de la invención como parte de una serie de secuencias de polinucleótidos de la
30 misma especie patógena en tales polinucleótido (s). En la forma preferida de la invención, se proporciona polipéptidos *B. hyodysenteriae* aislados como se describe aquí y también las secuencias de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. Es más deseable los polipéptidos *B. hyodysenteriae* que se proporcionan en forma sustancialmente purificada.

35 Los polipéptidos preferidos de la invención tendrán una o más propiedades biológicas (por ejemplo, in vivo, in vitro o propiedades inmunológicas) que de

polipéptido nativo de cuerpo entero. Los polipéptidos no funcionales se incluyen también en el ámbito de aplicación de la invención, ya que pueden ser útiles, por ejemplo, como los antagonistas de los polipéptidos funcionales. Las propiedades biológicas de los análogos, fragmentos o derivaciones en
 5 relación con el tipo salvaje, pueden ser determinadas por ejemplo, por medio de ensayos biológicos.

Los polipéptidos, incluyendo los análogos, los fragmentados y los derivados, pueden ser preparados de forma sintética (por ejemplo, utilizando las
 10 técnicas conocidas de la fase sólida o de síntesis de péptidos solución). Preferiblemente, se emplean técnicas de síntesis en fase sólida. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden ser preparados con conocidas técnicas de ingeniería genética, como se describe infra. En otra realización, los polipéptidos pueden ser purificados (por ejemplo, la
 15 purificación de inmunoafinidad) a partir de un fluido biológico, tales como mas no limitados a: plasma, heces, suero o orina de los animales, incluyendo mas no limitado a: a, cerdo, pollo, de ganso, pato, pavo, perico, el mono humano, perro, gato, caballo, hámster, jerbo, conejo, hurones, caballos, ganado y ovejas. Un animal puede ser cualquier mamífero o un ave.

20 Los análogos del polipéptido B. hyodysenteriae incluyen los polipéptidos de la secuencia de aminoácidos, en el cual uno o más de los aminoácidos son sustituidos por otro aminoácido donde las sustituciones no alteran sustancialmente la actividad biológica de la molécula.

25 Según la invención, los polipéptidos de la invención producidos recombinantemente o por síntesis química y los fragmentos, otros derivados u otros análogos, incluyendo proteínas de fusión, pueden ser utilizados como inmunógenos para generar anticuerpos que reconozcan los polipéptidos.

30 Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígenos del sistema inmunitario, tales como inmunoglobulinas (anticuerpos) o de células T del receptor de antígeno. Una secuencia antigénica de aminoácidos
 35 contiene al menos un 5, y de preferencia, al menos unos 10, los aminoácidos. Una porción antigénica de una molécula puede ser la parte que es inmunodominante al anticuerpo o al receptor de reconocimiento T de las

células, o puede ser una parte utilizada para generar un anticuerpo contra la molécula mediante la conjugación de la porción antigénica a una molécula transportadora para la inmunización. Una molécula que es antigénica no tiene que ser auto inmunogénica, es decir, capaz de provocar una respuesta
 5 inmune sin un portador.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo los anticuerpos y fragmentos de éstos, que se une a un epítipo específico. El término abarca policlonales, monoclonales, y los anticuerpos quiméricos, los últimos
 10 mencionados se describen en mayor detalle en los números Patente EE.UU. 4.816.397 y 4.816.567, así como partes de la unión del antígeno de los anticuerpos, como Fab, F (ab ') 2 y F (v) (incluyendo los anticuerpos de cadena simple). Por consiguiente, la frase "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales utilizadas en la presente invención, contempla
 15 tanto una molécula de inmunoglobulina intacta y una parte activa inmunológicamente de una molécula de inmunoglobulina que contiene un sitio de combinación de anticuerpos. Un "sitio de combinación de anticuerpos" es la parte estructural de una molécula de anticuerpo formada por la variable de la cadena pesada y ligera y regiones hipervariables que
 20 específicamente se une a un antígeno.

Los modelos ejemplares de moléculas de anticuerpos son: las moléculas de inmunoglobulina intactas, las moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen
 25 paratopo, incluyendo las partes conocidas en el arte como Fab, Fab, F (ab ') 2 y F (V), cuyas porciones son las preferidas para utilizarse en los métodos terapéuticos aquí descritos.

Las porciones Fab y F (ab ') 2 de las moléculas de anticuerpos son
 30 preparadas por la reacción proteolítica de la papaína y la pepsina, respectivamente, por métodos que son bien conocidos en moléculas de anticuerpos sustancialmente intactas. Véase, por ejemplo, EE.UU. Patent No. 4,342,566 para Theofilopolous et al. Las porciones Fab' de las moléculas anticuerpos también son bien conocidas y son producidas a partir de
 35 porciones de F(ab')2 seguidas por reducción con mercaptoetanol de los puentes de disulfuro que unen las dos partes pesadas de la cadena, y seguido por la alquilación de la proteína mercaptans resultante con un

reactivo como yodoacetamida. Un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpos intactos se prefiere aquí.

La expresión "anticuerpos monoclonales", en sus diversas formas gramaticales, se refiere a un anticuerpo que tiene solo un sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunoreaccionar con un antígeno en particular. Un anticuerpo monoclonal lo que normalmente muestra es una afinidad única para unirse con el antígeno con el que inmunoreacciona. Un anticuerpo monoclonal, puede sin embargo contener una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno de inmunoespecífico para un antígeno diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal Biespecíficos (quimérico).

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un tejido de depósito que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que no mejora específicamente la respuesta inmunitaria [Hood et al., En Inmunología, p. 384, segunda ed., Benjamin Cummings, Menlo Park, California (1984)]. A menudo, un reto principal con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, es que dejará de provocar una respuesta humoral o inmune celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activas, como lisolectina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, aceite o emulsiones de hidrocarburos, hemocyanins lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como la BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum. Preferentemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos policlonales para los polipéptidos de la invención. Para la producción de anticuerpos, los diferentes animales de acogida pueden ser inmunizados por inyección con el polipéptido de la invención, incluyendo pero no limitado a los conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc En una realización, un polipéptido de la invención puede ser conjugado a un portador inmunogénico, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de lapa (KLH). Varios adyuvantes se pueden utilizar

para aumentar la respuesta inmunológica dependiendo de la especie huésped, incluyendo pero no limitado a, Freund (completa o incompleta), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activas, como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocyanins lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como la BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos a un polipéptido de la invención, cualquier técnica de producción de moléculas de anticuerpos por medio de líneas continuas de células en cultivo puede ser utilizadas. Estas incluyen pero no se limita a, la técnica de los hibridomas desarrollada originalmente por Kohler et al., (1975) *Nature*, 256:495 497, la técnica trioma, la técnica de los hibridomas de la célula humano de B [Kozbor et al., (1983) *Immunology Today* , 4:72], y la técnica de los hibridomas VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., (1985) en los anticuerpos monoclonales y la terapia del cáncer, pp. 77 96, Alan R. Liss, Inc.]. Las líneas de células inmortales productoras de anticuerpos pueden ser creadas por otras técnicas diferentes de la fusión, como la transformación directa de los linfocitos B con ADN oncogénico, o de la transfección con virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, EE.UU. Patent Nos. 4.341.761; 4.399.121, 4.427.783, 4.444.887, 4.451.570, 4.466.917, 4.472.500, 4.491.632 y 4.493.890.

En una modalidad adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en animales libres de gérmenes utilizando tecnologías recientes. Según la invención, anticuerpos de pollo o cerdo pueden ser utilizados y se puede obtener a base de hibridomas pollo o cerdo o mediante la transformación de las células B con el virus EBV in vitro. De hecho, según la invención, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison et al., (1984) *J. Bacteriol.* 159, 870; Neuberger et al., (1984) *Nature*, 312:604 608; Takeda et al., (1985) *Nature*, 314:452 454] por empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específico para un polipéptido de la invención junto con los genes de una molécula de anticuerpo de actividad biológica adecuada puede ser utilizada; estos anticuerpos se encuentran dentro del alcance de esta invención. Estos anticuerpos quiméricos son los preferidos para uso en la

terapia de enfermedades o trastornos intestinales (descrita más adelante), ya que los anticuerpos son mucho menos probables que los anticuerpos xenogénicos para inducir una respuesta inmune, en particular, una respuesta alérgica.

5

Según la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente EE.UU. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos específicos de cadena única para un polipéptido de la invención. Una modalidad adicional de la invención utiliza las técnicas
10 descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab [Huse et al., (1989) Science, 246:1275-1281] para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de la invención.

15 Los fragmentos de anticuerpos, que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo, pueden ser generados por las técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen pero no están limitados a: el fragmento F (ab')₂ que puede ser producido por la digestión de la pepsina de la molécula de anticuerpo, fragmentos Fab', que pueden ser generados por la reducción de
20 los puentes disulfuro de fragmentos de F(ab')₂, y fragmentos Fab que pueden ser generados por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, la detección de los anticuerpos deseados
25 se puede realizar mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, análisis radioinmuno, ELISA, análisis inmuno "sándwich", análisis inmunorradiométricos, reacciones de precipitación en gel de difusión, análisis de inmunodifusión, análisis de inmunidad in situ (con oro coloidal, etiquetas de enzimas o radioisótopos, por ejemplo) Western blot, reacciones de
30 precipitación, análisis de aglutinación (por ejemplo, análisis de aglutinación del gel, análisis de la hemaglutinación), pruebas de fijación de complemento, pruebas de inmunofluorescencia, pruebas de proteína A, las pruebas de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, el anticuerpo vinculante se detecta mediante la detección de una etiqueta sobre el anticuerpo primario.
35 En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En otra realización, se etiqueta el anticuerpo secundario. Muchos medios son

conocidos en la técnica para la detección de una unión en un inmunoensayo y están dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconozcan un epítipo específico de un polipéptido de la invención, se pueden generar hibridomas de un
 5 producto que se une a un fragmento de un polipéptido de la invención que contiene este epítipo.

La invención abarca también los métodos de diagnóstico y pronóstico para detectar la presencia de *B. hyodysenteriae* con un polipéptido de la invención
 10 y / o anticuerpos que se unen al polipéptido de la invención y kits de útiles para el diagnóstico y pronóstico de las infecciones por *B. hyodysenteriae*.

Los métodos de diagnóstico y pronóstico en general, se llevarán a cabo utilizando una muestra biológica obtenida de un animal, como el pollo o el cerdo. Una "muestra" se refiere a los tejidos de un animal o de fluidos
 15 sospechosos de contener una especie de *Brachyspira*, como *B. hyodysenteriae*, o sus polinucleótidos o sus polipéptidos. Ejemplos de tales tejidos o fluidos incluyen, pero no se limitan a, plasma, suero, materia fecal, orina, pulmón, corazón, músculo esquelético, estómago, intestinos, y en componentes de cultivo in vitro de células.

20 La invención proporciona métodos para detectar la presencia de un polipéptido de la invención en una muestra, con los siguientes pasos: (a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un polipéptido de la invención con un anticuerpo (de preferencia vinculado a un soporte sólido)
 25 que se une específicamente al polipéptido de la invención bajo condiciones que permiten la formación de complejos de reacción incluyendo el anticuerpo y el polipéptido de la invención, y (b) la detección de la formación de complejos de reacción que comprende el anticuerpo y el polipéptido de la invención en la muestra, en la que la detección de la formación de complejos
 30 de reacción indica la presencia del polipéptido de la invención en la muestra.

Preferiblemente, el anticuerpo utilizado en este método se deriva de un anticuerpo policlonal de afinidad purificado, y preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Además, es preferible que las moléculas del **anticuerpo que se
 usan aquí estén** en forma de porciones de Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o las
 35 moléculas de anticuerpo enteras.

Los métodos preferidos particularmente para la detección de *B. hyodysenteriae* basados en el método anterior incluyen análisis de inmunoabsorción ligada a la enzima, pruebas radioinmunes, pruebas inmunoenzimáticas y pruebas inmunoradiométricas, incluyendo, pruebas sandwich utilizando anticuerpos monoclonales y / o anticuerpos policlonales.

Tres de estos procedimientos, son especialmente útiles ya sea para utilizar polipéptido de la invención (o un fragmento de la misma) marcado con una etiqueta detectable, Ab1 anticuerpo marcado con una etiqueta detectable o para Ab2 anticuerpo marcado con una etiqueta detectable. Los procedimientos pueden resumirse en las siguientes ecuaciones en donde el asterisco indica que la partícula se etiqueta y "AA" significa el polipéptido de la invención:

$$AA \text{ A. } * + Ab1 = AA * Ab1 \text{ AA}$$

$$B + AB * 1 = Ab1 \text{ AA } * \text{ AA } +$$

$$15 \quad C. Ab1 + Ab2 * = Ab2 \text{ AA } Ab1 *$$

Los procedimientos y su aplicación son familiares para los expertos en el arte y en consecuencia pueden ser utilizadas en el ámbito de aplicación de la presente invención. La "competitividad" en el procedimiento, procedimiento A, se describe en las Patentes EE.UU. números 3.654.090 y 3.850.752. El procedimiento B es representativo de técnicas bien conocidas en el método competitivo. El procedimiento C, de "sándwich", se describe en la Patente EE.UU. RE Nos. 31.006 y 4.016.043. Sin embargo otros procedimientos son conocidos, como los procedimientos que pueden ser utilizados para los anticuerpos de la "doble" o "DASP".

25

En cada caso, el polipéptido de la invención forma complejos con uno o más de los anticuerpos (es) o de los socios de unión y un miembro del complejo está marcado con una etiqueta detectable. El hecho de que se ha formado un complejo y, si lo desea, el importe de las mismas, puede ser determinada por métodos conocidos de aplicación a la detección de etiquetas.

30

Se desprende de lo anterior, que una propiedad característica de Ab2 es que va a reaccionar con AB1. Esta reacción se debe a que AB1, planteadas en una especie de mamífero, se ha utilizado en otras especies como antígeno para aumentar el anticuerpo, AB2. Por ejemplo, AB2 pueden plantearse en caprinos utilizando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab2 sería, por tanto anticuerpos de conejo planteadas en las cabras. Para efectos de esta

35

descripción y reivindicaciones, Ab1 se conoce como un anticuerpo primario, y Ab2 se conoce como un anticuerpo anti-Ab1 secundario. Las etiquetas más comúnmente empleadas para estos estudios son los elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que presentan fluorescencia cuando son expuestos a la luz ultravioleta, y otros. Ejemplos de materiales fluorescentes capaces de ser utilizados como etiquetas son la fluoresceína, la rodamina y la auramina. Un material en particular es la detección de anticuerpos de conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína, a través de un isotiocianato. Ejemplos de isótopos preferidos: ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, y ¹⁸⁶Re. Las etiquetas de radiactivos pueden ser detectadas por cualquiera de las disponibles en la actualidad en los procedimientos anteriores. Muchas enzimas pueden ser utilizadas, por ejemplo, la glucuronidasa, la peroxidasa, β , β D glucosidasa, β -galactosidasa D, de ureasa, además de la glucosa oxidasa peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Las enzimas están conjugadas en partículas seleccionadas por la reacción con las moléculas de transición, como las Carbodiimidas, los disocianatos, los glutaraldehído y similares. Las etiquetas de enzimas pueden ser detectadas por cualquiera de las técnicas utilizadas actualmente como los colorimétricos, espectrofotométricos, fluorospectrophotometricos, amperométrica o gasométricos. N ° Patente EE.UU. 3.654.090, 3.850.752 y 4.016.043. Estas se refieren al modo de ejemplo para su divulgación de material de etiquetado y los métodos alternativos.

25

La invención también proporciona un método de detección de anticuerpos a un polipéptido de la invención en muestras biológicas, utilizando los pasos siguientes: (a) proporcionar un polipéptido de la invención o un fragmento de la misma, (b) incubación de una muestra biológica con dicho polipéptido de la invención bajo condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, y (c) determinar si un complejo antígeno-anticuerpo con el polipéptido de la invención que está formado.

En otra realización de la invención se proporcionan los métodos in vitro para evaluar el nivel de anticuerpos a un polipéptido de la invención en una muestra biológica, utilizando los pasos siguientes: (a) la detección de la formación de complejos de reacción en una muestra biológica con arreglo al

método que se ha señalado anteriormente, y (b) la evaluación de la cantidad de complejos de reacción formados, cuya cantidad de complejos de reacción se corresponde con el nivel de polipéptido de la invención en la muestra biológica.

5

Además se proporcionan métodos in vitro para la vigilancia del tratamiento terapéutico de una enfermedad asociada a *B. hyodysenteriae* en un huésped animal, mediante la evaluación, como se describe arriba, los niveles de anticuerpos a un polipéptido de la invención de una serie de muestras biológicas obtenidas en el momento de diferentes puntos de un huésped animal sometidos a tal tratamiento terapéutico.

En la presente invención se dispone, además, los métodos para detectar la presencia o ausencia de *B. hyodysenteriae* en una muestra biológica: (a) 15 acercar la muestra biológica en contacto con una sonda de polinucleótidos o cartilla de polinucleótidos de la invención bajo condiciones adecuadas hibridación, y (b) detectar cualquier dúplex formado entre la sonda o la imprimación y de ácidos nucleicos en la muestra.

20 Según una realización de la invención, la detección de *B. hyodysenteriae* puede realizarse directamente de amplificación de secuencias de polinucleótidos de la muestra biológica, utilizando técnicas conocidas para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos de la invención.

En una forma de la invención, el objetivo de la secuencia de ácidos nucleicos 25 es amplificada por PCR y detectados utilizando cualquiera de los métodos específicos mencionados anteriormente. Otras técnicas de diagnóstico útiles para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos se incluyen, mas no están limitados a: 1) alelo-PCR específico, 2) el análisis de conformación de cadena simple, 3) La electroforesis en gel con gradiente, 4) los ensayos de protección de RNasa, 5) el uso de las proteínas que reconocen los 30 desajustes de nucleótidos, como la *E. coli* de proteínas mutS; 6) oligonucleótidos específicos de alelo, y 7) la hibridación fluorescente in situ.

Además de las secuencias anteriores métodos de polinucleótidos se puede detectar el uso de sondas convencionales. Cuando las sondas se utilizan 35 para detectar la presencia de las secuencias de polinucleótidos que se desean, las muestras biológicas para ser analizadas, tales como sangre o suero, pueden ser tratados si se desea, para extraer los ácidos nucleicos.

Las secuencias de polinucleótidos de la muestra se pueden preparar de varias maneras para facilitar la detección de la secuencia objetivo, por ejemplo, la desnaturalización, la digestión de restricción, la electroforesis o punto secante. La región de orientación de la secuencia de polinucleótidos de la muestra, por lo general debe ser al menos parcialmente, de cadena simple para formar híbridos con la secuencia de la orientación de la sonda. Si la secuencia es, naturalmente, una sola cadena, la desnaturalización no será necesaria. Sin embargo, si la secuencia es de doble cadena, la secuencia, probablemente tendrá que ser desnaturalizado. La desnaturalización se puede realizar mediante diversas técnicas conocidas en el arte.

Las secuencias de polinucleótidos y las sondas de la muestra, se incuban en condiciones que promuevan la creación de un híbrido estable de la secuencia diana en la sonda con la secuencia de la supuesta polinucleótido deseado en la muestra. Preferentemente, las condiciones de alta severidad se utilizan para evitar falsos positivos.

La detección de los híbridos resultantes, se realiza normalmente mediante el uso de sondas marcadas. Como alternativa, la sonda puede estar sin etiqueta, pero puede ser detectable por la unión específica con un ligando que se etiqueta, ya sea directa o indirectamente. Un etiquetado adecuado y los métodos de sondas de etiquetado y ligados que se conocen en la materia incluyen, por ejemplo, las etiquetas radiactivo que pueden ser incorporadas por los métodos ya conocidos (por ejemplo, Nick traducción, cebado al azar o kinasing), biotina, grupos fluorescentes, los grupos de quimioluminiscencia (por ejemplo, dioxetanes, en particular disparado dioxetanes), enzimas, anticuerpos, etc. Las variaciones de este esquema básico se conocen en el arte, e incluyen las modificaciones que facilitan la separación de los híbridos para ser detectados a partir de materias extrañas y / o que amplifican la señal de la fracción etiquetados.

También se contempla dentro del ámbito de aplicación de la presente invención, que los ensayos de la sonda de ácido nucleico pueden emplear un cóctel de sondas de ácido nucleico capaz de detectar las secuencias de polinucleótidos deseadas de esta invención. Así, en un ejemplo para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos de la presente invención en una muestra de células, más una sonda complementaria a las secuencias de

polinucleótidos empleada y, en particular el número de sondas diferentes, alternativamente, 2, 3, ó 5 de ácido nucleicos diferentes secuencias de la sonda.

- 5 Las secuencias de polinucleótidos descritos en este documento (preferiblemente en forma de prueba) también pueden ser inmovilizadas en un soporte en fase sólida para la detección de especies *Brachyspira*, incluyendo, mas no limitando a *B. hyodysenteriae*., *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *Innocens B.*, *murdochii B.* y *B. pilosicoli*.
- 10 Alternativamente, las secuencias de polinucleótidos descritas en este documento formarán parte de una biblioteca de moléculas de ADN que pueden ser utilizadas para detectar simultáneamente un número de genes de diferentes especies como *B. Brachyspira*, *hyodysenteriae*. En una alternativa adicional de la invención de las secuencias de polinucleótidos descritos en
- 15 este documento, junto con otras secuencias de polinucleótidos (como el de otras bacterias o virus) puede ser inmovilizado en un soporte sólido de tal manera que permita la identificación de la presencia de una especie como *B. Brachyspira*, *hyodysenteriae* y / o cualquiera de las otras secuencias de polinucleótidos envueltas en el soporte sólido.
- 20 Las técnicas para la producción de colecciones de moléculas de ADN inmovilizadas han sido descritas en la materia. En general, los métodos anteriores en el arte para describir la síntesis de cadena simple molécula de ácido nucleico de las bibliotecas, se realiza utilizando por ejemplo, las
- 25 técnicas de ocultación para crear diversas combinaciones de las secuencias en las distintas posiciones discretas en el sustrato sólido. En la Patente EE.UU. n ° 5.837.832 se describe un método mejorado para la producción de arrays de ADN inmovilizado basado en sustratos de silicio en gran escala de la tecnología de integración. En particular, la Patente EE.UU. n ° 5.837.832
- 30 describe una estrategia denominada "mosaico" para sintetizar un conjunto específico de sondas en las ubicaciones espacialmente definidas en un sustrato que pueden ser utilizadas para producir las bibliotecas de ADN inmovilizadas de la presente invención. La Patent No. 5,837,832 también proporciona referencias para técnicas anteriores, que también pueden ser
- 35 utilizadas. Por lo tanto, las sondas de secuencias de polinucleótido pueden ser sintetizadas in situ en la superficie del sustrato.

Alternativamente, las moléculas en cadena simples deben ser sintetizadas fuera del sustrato sólido y aplicado a cada secuencia pre-formadas en una posición discreta en el sustrato sólido. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden imprimir directamente sobre el sustrato mediante dispositivos de robótica equipado bien sea con pernos o pinzas como dispositivos eléctricos.

Las secuencias de la biblioteca son normalmente inmovilizadas sobre las regiones discretas del sustrato sólido. El sustrato debe ser poroso para permitir la inmovilización del sustrato o sustancialmente no porosa, en cuyo caso las secuencias de la biblioteca son típicamente inmovilizadas en la superficie del sustrato. El sustrato sólido puede ser de cualquier material al que los polipéptidos puedan unirse, ya sea directa o indirectamente. Ejemplos de sustratos sólidos adecuados son el vidrio plano, las obleas de silicio, mica, cerámicas y polímeros orgánicos tales como plásticos, incluyendo poliestireno y polimetacrilato. También puede ser posible usar membranas semipermeables, como las membranas de nitrocelulosa o nylon, que están ampliamente disponibles.

Las membranas semipermeables deben ser colocadas sobre una superficie sólida robusta como el vidrio. Opcionalmente, las superficies pueden estar recubiertas por una capa de metal, como oro, platino o de metales de transición.

Preferiblemente, el sustrato sólido es generalmente un material que permite una superficie rígida o semi-rígida. En realizaciones preferenciales, al menos una superficie del sustrato deberá ser prácticamente plana. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser conveniente separar físicamente las regiones de síntesis de los polímeros diferentes, por ejemplo, regiones replanteadas o agujeros grabados. También es preferible que el sustrato sólido sea adecuado para la aplicación de alta densidad de secuencias de ADN estar en zonas discretas de 50 a 100 micras, con una densidad de 10000 a 40000 dots/cm².

Es conveniente dividir el sustrato sólido en secciones. Esto puede lograrse mediante técnicas como el fotograbado, o por la aplicación de tintas hidrofóbico, por ejemplo, teflón tintas de base (Cel-line, EE.UU.).

Posiciones discretas, en las que se encuentran los diferentes miembros de conjuntos de datos, pueden tener cualquier forma conveniente, por ejemplo, circular, rectangular, elíptica, con forma de cuña, etc...

- 5 La unión de las secuencias de polinucleótidos al sustrato puede ser por medio de covalentes o no covalentes. Las secuencias de polinucleótidos pueden asociarse al sustrato a través de una capa de moléculas a las que la base de datos está unida. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden ser etiquetados con la biotina y el sustrato recubierto con avidina o
- 10 estreptavidina. Una característica conveniente de usar las secuencias de polinucleótidos biotina es que la eficiencia de acoplamiento con el sustrato sólido que se puede determinar fácilmente. Dado que las secuencias de polinucleótidos no se unen de la mejor manera a algunos sustratos sólidos, a menudo es necesario proporcionar una interfaz química entre el sustrato
- 15 sólido (como en el caso del vidrio) y las secuencias de ácido nucleico. Ejemplos de interfaces de químicos adecuados incluyen glicol hexaethylene. Otro ejemplo es el uso de vidrio recubierto de polilisina, luego de ser modificado químicamente mediante el procedimiento habitual para introducir un ligando de afinidad. Otros métodos para fijar las moléculas a las
- 20 superficies del sustrato sólido mediante el uso de agentes de acoplamiento se conocen en el arte, véase, por ejemplo WO98/49557.

- La unión de las secuencias de polinucleótidos complementarias para inmovilizar la base de datos de los ácidos nucleicos, puede ser determinada
- 25 por una variedad de medios tales como cambios en las características ópticas de la secuencia de polinucleótidos envuelta (es decir, por el uso de bromuro de etidio) o por el uso de la etiqueta los ácidos nucleicos, como los polipéptidos marcados con fluorocromos. Otras técnicas de detección que no requieren el uso de etiquetas incluyen técnicas ópticas, como optoacoustics,
 - 30 reflectometría, elipsometría y la resonancia de plasmones de superficie (ver WO97/49989).

- Por lo tanto, la presente invención proporciona un sustrato sólido que inmoviliza al respecto por lo menos un polinucleótido de la presente
- 35 invención, preferiblemente dos o más secuencias de polinucleótidos diferentes de la presente invención.

La presente invención también puede utilizarse como profiláctico o terapéutico, que puede ser utilizado para el propósito de estimular la respuesta inmune humoral y celular en los animales, como pollos y cerdos, proporcionando así la protección contra la colonización con especies

5 Brachyspira, incluyendo mas no limitando a, B. hyodysenteriae, B. suanatina B. . intermedia, B. alvinipulli, B. aalborgi, B. Innocens B, murdochii B. y B. pilosicoli. La infección natural con una especie de Brachyspira, como la B. hyodysenteriae induce los anticuerpos circulantes contra las proteínas

10 descritas en este documento. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos descritos en este documento o sus partes, tienen el potencial para formar la base de una forma sistémica o por vía oral profilácticos o terapéuticos para proporcionar protección contra spirochaetosis intestinal.

Como consecuencia, en una realización de la presente invención, se

15 proporcionan las secuencias de aminoácidos aquí descritos o fragmentos de los anticuerpos que se unen las secuencias de aminoácidos o las secuencias de polinucleótidos también aquí descritos en una cantidad terapéuticamente efectiva mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente.

20

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se utiliza aquí para hacer referencia a una cantidad suficiente para reducir en al menos un 15%, 50%, y aún más preferible en un 90%, y más preferiblemente evitar un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y la respuesta del huésped

25 animal. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr una mejora en una condición clínicamente significativa en el animal huésped.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y

30 composiciones que son fisiológicamente tolerables y no suelen producir una reacción alérgica o reacciones adversas similares, tales como molestias gástricas y similares, cuando se le administra al animal. El término "porteador" se refiere a un diluyente, coadyuvantes, excipiente o conductor con el que se administra el compuesto. Estos conductos farmacéuticos de

35 líquidos pueden ser estériles. Por ejemplo el agua y aceites, incluyendo el petróleo animal o vegetal o los de origen sintético, como el aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. El agua o las

soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y las soluciones acuosas de glicerol, son preferentemente empleados como conductores, en particular para soluciones inyectables. Las adaptaciones a los conductores farmacéuticos se describen en: Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

En una forma más específica de la invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen cantidades terapéuticamente efectivas de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento o un análogo, fragmento o un producto derivado de ellos o los anticuerpos correspondientes, junto con diluyente farmacéuticamente aceptable, conservantes, solubilización, emulsionantes, aditivos y / o conductores. Dichas composiciones son diluyentes de los diferentes contenidos de amortiguación (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fuerza de fosfato), el pH y iónicos y otros aditivos, como por ejemplo, los detergentes y agentes solubilizantes (Tween 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias volumen (por ejemplo, la lactosa, manitol). El material debe ser incorporado en los preparativos de partículas de compuestos de polímeros, como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. El ácido Hylauronic también debe ser utilizado. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación en vivo, y la tasa de aclaramiento en vivo de las proteínas presentes y derivados. Véase, por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) 1435 1712 páginas que se incorporan por referencia en este documento. Las composiciones deben ser preparados en forma líquida, o puede ser en polvo seco, como forma de liofilizado.

Alternativamente, los polinucleótidos de la invención pueden ser optimizados por la expresión en las plantas (por ejemplo, el maíz). La planta puede ser transformada con plásmidos que contienen los polinucleótidos optimizados. Entonces, la planta se cultiva y las proteínas de la invención se expresan en la planta, o la versión optimizada de la planta se expresa. La planta es más tarde cosechada y la sección de la planta que contiene las proteínas de la invención es procesada para la alimentación de los animales. Esta alimentación de los animales impartirá la inmunidad contra *B. hyodysenteriae*

cuando es comida por el animal. Ejemplos de la técnica en detalle estos métodos se pueden encontrar en U. S. Patent 5,914,123 (Arntzen, et al.), U. S. Patent 6,034,298 (Lam et al.), U. S. Patent 6,136,320 (Arntzen, et al.).

Se puede apreciar que las composiciones farmacéuticas siempre de acuerdo a la invención pueden ser administradas por cualquier medio conocido en el arte. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para la administración son administradas por inyección, por vía oral, pulmonar, o por vía nasal. Las secuencias de aminoácidos que se describen en este documento o anticuerpos derivados de los mismos son preferiblemente administrados por vía intravenosa, vía intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos descritos en este documento o anticuerpos derivados de los mismos, bien definidas, puede ser administrado por vía nasal u oral.

Se incluye también en la presente invención el uso de secuencias de polinucleótidos de la invención, así como el antisentido y las secuencias de polinucleótidos ribozima hybridizable a una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos según la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con *B. hyodysenteriae*.

Las secuencias de polinucleótidos que codifica las secuencias antisentido son construidas o ribozimado para su uso en métodos terapéuticos son deseablemente administrados directamente como un ácido nucleico desnudo. La captación de ácido nucleico desnudo construido por las células bacterianas, se ve reforzada por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplo de estos agentes son los agentes catiónicos (por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectants. Normalmente, el ácido nucleico de las construcciones, se mezclan con el agente de transfección para producir una composición.

Alternativamente, los antisentidos construidos o ribozimados pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable diluyente para producir una composición farmacéutica. Los conductores convenientes y diluyentes incluyen la solución salina isotónica, por ejemplo, la solución salina de fosfato tamponado. La composición puede formularse para la

administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica. Las vías de administración descritas están destinadas sólo como una guía, ya que un médico experto podrá determinar fácilmente la ruta óptima de administración así como la dosis de cualquier animal en particular y el estado.

La invención también incluye los kits para la detección en los animales que sospechosamente pueden estar infectados con una especie *Brachyspira*, como *B. hyodysenteriae* o confirmar que un animal está infectado con una especie *Brachyspira*, como *B. hyodysenteriae*. En una realización de esta invención, los equipos adecuados para su uso por un especialista puede estar preparado para determinar la presencia o ausencia de especies *Brachyspira*, incluyendo pero no limitado a *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. Innocens*, *B. murdochii*. y *B. pilosicoli* ante la sospecha de animales infectados o para medir cuantitativamente una especie *Brachyspira*, incluyendo mas no limitado a *hyodysenteriae* B., *B suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi* infección *B. pilosicoli*. De conformidad con las técnicas de prueba que se mencionaron anteriormente, estos kits pueden contener al menos una versión de la etiqueta de una de las secuencias de aminoácidos aquí descritas o de su pareja de unión, por ejemplo, un anticuerpo específico al respecto y las direcciones en función del método seleccionado, por ejemplo, "competitivo", "sandwich", "DASP" y similares. Como alternativa, estos kits pueden contener, al menos una secuencia de polinucleótidos complementarios a una porción de una de las secuencias de polinucleótidos descritos en este documento, junto con instrucciones para su uso. Los kits también pueden contener reactivos de periféricos, tales como amortiguadores, estabilizadores, etc.

Como consecuencia, un kit de prueba para la demostración de la presencia de una especie *Brachyspira*, incluyendo mas no limitando a *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina* B., *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. Innocens.*, *B. murdochii* y *B. pilosicoli*, debe contener lo siguiente:

(a) una cantidad determinada de al menos un reactivo marcado inmuniquímicamente obtenido por la fijación directa o indirecta de una de las secuencias de aminoácidos que se describen en este documento o de una pareja de unión específica al mismo, en una etiqueta detectable;

- (b) otros reactivos, y
- (c) las instrucciones para el uso de dicho kit.

Más concretamente, el kit de prueba de diagnóstico puede incluir:

- (a) una cantidad conocida de una de las secuencias de aminoácidos que aquí se describen como se describió anteriormente (pareja o un enlace), generalmente ligado a una fase sólida para formar un inmunoensayo, o como alternativa, unida a una etiqueta adecuada, o bien habrá una pluralidad de productos finales, tales, etc;
- (b) si es necesario, otros reactivos, y
- (c) las instrucciones para el uso de dicho equipo para la prueba.

En una variante más, el kit de prueba puede contener:

- (a) un componente etiquetado que ha sido obtenido por un acoplamiento de las secuencias de aminoácidos que aquí se describen a una etiqueta detectable;
- (b) uno o más reactivos de inmunoquímica adicional de que al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, que ligando es seleccionado del grupo consistente en:
 - (i) un ligado capaz de unirse con el componente de etiquetado (a);
 - (ii) un ligado capaz de unirse con una pareja de unión de los componentes etiquetados (a);
 - (iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componente (s) que se determinen, o
 - (iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los socios de la unión de al menos uno de los componente (s) que se determinen,
- (c) las instrucciones para la realización de un protocolo para la detección y / o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre una de las secuencias de aminoácidos que se describe en este documento y una pareja de unión específica al mismo.

Preparación de la biblioteca genómica

- Una biblioteca genómica se prepara utilizando un campo aislado de la especie porcina de Australia hyodysenteriae B. (WA1 cepa). Esta variedad ha sido bien caracterizada y demostrada ser virulenta y ser el desafío

experimental de cerdos. El método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se utiliza para preparar el ADN cromosómico de alta calidad adecuada para la preparación de las bibliotecas de ADN genómico. *B. hyodysenteriae* se cultiva en 100 ml de tripticasa anaeróbica de cultivo de soja a una densidad celular de 10⁹ células / ml. Las células se cosechan a 4.000 xg durante 10 minutos, el sedimento celular es resuspendido en 9,5 ml de buffer TE. SDS. Posteriormente se añade a una concentración final de 0,5% (w / v), y las células lisis a 37 ° C durante 1 hora con 100 mg de proteinasa K. Se añade el NaCl a una concentración final de 0,7 M y 1,5 ml de CTAB / NaCl (solución al 10% w / v CTAB, 0,7 M NaCl), antes de incubar la solución a los 65 ° C durante 20 minutos. El lisado se extrae con un volumen igual de cloroformo / alcohol isoamílico, y el tubo se centrifuga a 6.000 xg durante 10 minutos para separar las fases. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se añaden 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN de alto peso molecular. El precipitado de ADN se recoge mediante una varilla de vidrio conectado y transferido a un tubo que contiene 1 ml de 70% (v / v) de etanol. El tubo se centrifuga a 10.000 xg y el ADN en pelotas se redisuelven en 4 ml de TE de la noche a la mañana. Un gradiente de cloruro de cesio que contiene 1,05 g / ml CsCl y 0,5 mg / ml de bromuro de etidio se prepara utilizando la solución de ADN redisuelto. El gradiente se transfiere a tubos herméticos de 4 ml y se centrifuga a 70.000 xg durante la noche a 15 ° C. El ADN separado se visualiza bajo una luz ultravioleta, y el ADN de alto peso molecular se retira del gradiente usando una aguja de 15-g. El bromuro de etidio se extrae el ADN mediante extracción secuencial con isopropanol saturado de CsCl. El ADN cromosómico purificado es dializado con 2 litros de TE y se precipita con isopropanol. El DNA genómico resuspendido se corta con una tijera de genes (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI), y el ADN cortado usando polimerasa Klenow de ADN para generar fragmentos de punta roma. Un centenar de ng de fragmentos de ADN de punta roma se liga con 25 ng de vector VC pSMART (Lucigen, Meddleton, WI) usando ligasa de ADN CloneSmart. El ADN ligado es a continuación electroporado en células de *E. coli*. Una inserción de una pequeña (2-3 kb) biblioteca y una inserción de una mediana (3-10 kb) biblioteca se construye en la versión de copia baja del vector VC pSMART.

Secuenciación de genomas

Después que se obtiene la biblioteca genómica, son recogidos clones individuales de *E. coli* que contiene el vector de CV pSMART. El ADN plásmido es purificado y secuenciado. Los plásmidos purificados son sometidos a secuenciación directa automatizada del vector VC pSMART con el avance y retroceso cebadores específicos para el vector de CV pSMART. Cada reacción de secuenciación se lleva a cabo en un volumen de 10 µl compuesto de 200 ng de ADN plásmido, 2 pmol de cebador, y 4 µl de la ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones cíclicas incluyen 2 minutos de desnaturalización a 96 ° C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 96 ° C durante 10 segundos, y una combinación de cebador y un paso de extensión a 60 ° C durante 4 minutos. Los Terminadores de tinte residuales se eliminan de los productos de secuenciación por precipitación con un 95% (v / v) de etanol que contiene 85 mM de acetato de sodio (pH 5,2), 3 mM de EDTA (pH 8), y **secada** al vacío. Los plásmidos se ordenan por duplicado utilizando cada cebador. Los productos de secuenciación se analizan utilizando un secuenciador de ADN ABI 373A (PE Applied Biosystems).

Anotación

Las secuencias parciales del genoma de *B. hyodysenteriae* se ensamblan y se anotan usando una serie de herramientas de bioinformática de dominio público para analizar y volver a analizar las secuencias como parte de un procedimiento de aseguramiento de calidad en el análisis de datos. Los marcos de lectura abierta (ORF) son previstos utilizando una variedad de programas, incluyendo GeneMark, Glimmer, Orfeo, SELFID y GetORF. ORF Putativos se examinan en busca de homología (ADN y proteínas) con bases de datos internacionales existentes mediante búsquedas incluyendo BLAST y FASTA. Todos los ORF previstos se analizan para determinar su localización celular mediante programas que incluyen PSI-BLAST, FASTA, motivos, FINDPATTERNS, PHD, SignalP y PSORT. Se utilizan bases de datos incluidas, Interpro, Prosite, PRODOM, Pfam y Blocks para predecir la superficie de las proteínas asociadas tales como los dominios

transmembrana, los péptidos líder, homologías a las proteínas de superficie conocidas, la firma de lipoproteínas, los motivos de anclaje de la membrana externa y dominios de unión de la célula huésped. Los análisis Filogenéticos y de evolución molecular se realizan con genes identificados y con otras especies para ayudar en la asignación de la función. El análisis in silicio de ambos genomas secuenciados produce una lista completa de todos los ORFs presentes en la secuencia de datos disponibles. Cada ORF es interrogado por información descriptiva, como el peso molecular previsto, punto isoeléctrico, hidrofobicidad, y la localización subcelular que permitan su correlación con las propiedades in vitro del producto del gen nativo. Los genes previstos que codifican proteínas similares a la superficie de los componentes localizados y / o factores de virulencia en otras bacterias patógenas son seleccionados como objetivos potenciales de la vacuna.

15

Resultados Bioinformáticos

La secuenciación del genoma de *B. hyodysenteriae* resulta en 94,6% (3.028,6 KB de 3200 kb previstos) del genoma que ha sido secuenciado. La secuencia de *B. hyodysenteriae* se compone de 294 contigs con un tamaño promedio de 10,3 kb. Para la *B. hyodysenteriae*, 2.593 marcos de lectura abierta (ORF) se preveen de los 294 contigs. La comparación de los ORF previstos con genes presentes en el ácido nucleico y bases de datos de proteínas indican que aproximadamente el 70% de los ORFs tienen una homología con genes contenidos en las bases de datos públicas. No se conoce la identidad del 30% restante de los ORF previstos.

25

Candidatos a Vacunas

Para ayudar a reducir el número de ORFs que pueden ponerse a prueba como candidato a vacuna, las ORF que muestren una homología razonable (E-valor inferior a E-15) con proteínas de superficie exterior, proteínas secretadas, y posibles factores de virulencia, presentes en las bases de datos públicas son seleccionadas como posibles candidatas a vacunas. De los 2.593 ORFs obtenidos en la secuenciación genómica, muchos pasaron este examen, pero los resultados de treinta y tres genes se presentan aquí. El cuadro 1 muestra treinta y tres genes seleccionados como blanco

35

potencial de la vacuna y su similitud con otras secuencias de aminoácido conocidas, obtenidas de la base de datos SWISS-PROT. Cabe señalar que la identidad de los aminoácidos no llega a más de 58%, mientras que la similitud u homología de aminoácidos sigue siendo menos del 71%, lo que indica que estos ORFs son únicos.

Cuadro 1

Gen	Identidad de la proteína con más alta homología	Identidad (amino ácidos)	Similaridad (amino ácidos)	Número de accesión
NAV-H54	Proteína de superficie Variable(VspD) de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	106/223 (47%)	136/223 (60%)	O68157
NAV-H55	Proteína Flagelar B de <i>Leptospira interrogans</i>	58/213 (27%)	108/213 (50%)	Q72SJ3
NAV-H56	Antígeno mayor de la cuasi miosina	288/1509 (19%)	609/1509 (40%)	P21249
NAV-H57	Transglycosylato Lítico de murein (membrana externa, posiblemente)	97/318 (25%)	158/318 (41%)	Q6F7W9
NAV-H58	Proteína exterior de la membrane de <i>Treponema pallidum</i>	57/175 (32%)	90/175 (51%)	P96127
NAV-H59	Antígeno mayor de la cuasi miosina	204/1012 (20%)	432/1012 (42%)	P21249
NAV-H60	Proteína de membrane exterior y lipoproteína de peptidoglycan asociada	46/139 (33%)	68/139 (48%)	COG2885
NAV-H61	Lipoproteína putative de <i>Treponema denticola</i>	336/805 (41%)	483/805 (60%)	Q73NT0
NAV-H62	NlpA lipoproteína de <i>Streptococcus suis</i>	92/269 (34%)	151/269 (56%)	Q303L3
NAV-H63	NlpA lipoproteína de <i>Streptococcus suis</i>	106/312 (33%)	167/312 (53%)	Q303L3
NAV-	NlpA lipoproteína de	112/337	198/337	Q303L3

H64	<i>Streptococcus suis</i>	(33%)	(58%)	
NAV-H65	Proteína putativa secretada de <i>Streptomyces violaceoruber</i>	50/127 (39%)	68/127 (53%)	Q849M9
NAV-H66	Toxina (YoeB) de <i>Escherichia coli</i>	42/85 (58%)	60/85 (76%)	P69349
NAV-H67	Proteína de membrana exterior (TolC)	80/350 (20%)	171/350 (39%)	Q2Z054
NAV-H68	Proteína probablemente relacionada con la hemolysina <i>Dehalococcoides</i> sp.	121/415 (29%)	204/415 (49%)	Q3ZYG1
NAV-H69	Proteína de superficie externa de <i>Bacillus cereus</i>	193/357 (54%)	256/357 (71%)	Q4MWS0
NAV-H70	Lipoproteína de membrana asociada a <i>Vibrio vulnificus</i>	146/417 (35%)	203/417 (48%)	Q2SRL9
NAV-H71	Proteína de capa de superficie de <i>Methanosarcina barkeri</i>	72/201 (36%)	112/201 (49%)	Q8TJE3
NAV-H72	Transglycosylato Lítico de murein (membrana externa, posiblemente)	51/141 (36%)	6/141 (53%)	P44049
NAV-H73	Toxina (YoeB) de <i>Escherichia coli</i>	42/84 (50%)	62/84 (73%)	P69349
NAV-H74	Proteína de membrana exterior/antigeno protector	210/833 (25%)	339/833 (40%)	COG4775
NAV-H22	Proteína de superficie variable (VspH) de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	29% (133/454)	43% (199/454)	AAK14803.1
NAV-H23	Lipoproteína asociada a la membrana de <i>Mycoplasma mycoides</i>	43% (114/263)	60% (159/263)	AAF27178.1
NAV-	Lipoproteína de	32%	53%	ZP00300921.1

H24	membraba externa de Geobacter metallireducens	(46/142)	(76/142)	
NAV- H30	Antigen de superficie (BspA) de Bacteroides forsythus	38% (83/216)	55% (120/216)	AAC82625.1
NAV- H32	Proteína hemolítica (HlpA) de Nostoc sp.	35% (49/137)	56% (77/137)	NP488469.1
NAV- H33	Proteína hemolítica de Prevotella intermedia	54% (64/117)	70% (83/117)	AAC05836.1
NAV- H37	Proteína de mediación virulenta (VirC) de Vibrio parahaemolyticus	36% (58/159)	63% (101/159)	NP800579.1
NAV- H40	transglycosylaso líticco de murein (contiene LysM/dominios invasivos)	26% (120/449)	41% (185/449)	ZP00146104.1
NAV- H41	Antigen de superfice BspA de Bacteroides forsythus	41% (84/201)	57% (115/201)	AAC82625.1
NAV- H43	Hemolysinas y proteínas relacionadas de Anabaena variabilis	35% (150/425)	56% (242/425)	ZP00162711.2
NAV- H44	Membrana exterior de Leptospira interrogans	20% (79/393)	41% (163/393)	YP001419.1
NAV- H45	Proteína de factor de virulancia (MviN) de Geobacter sulfurreducens	32% (153/469)	49% (231/469)	NP952225.1

El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H54 se encuentran en los números ID SEC: 1 y 2, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H55 se encuentran en los números ID SEC: 3 y 4, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H56 se encuentran en los números ID SEC: 5 y 6, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H57 se encuentran en los números ID SEC: 7 y 8, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H58 se encuentran en los números ID SEC: 9 y 10, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H59 se encuentran en los

números ID SEC: 11 y 12, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H60 se encuentran en los números ID SEC: 13 y 14, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H61 se encuentran en los números ID SEC: 15 y 16, respectivamente. El ADN y las

5 secuencias de aminoácidos de NAV-H62 se encuentran en los números ID SEC: 17 y 18, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H63 se encuentran en los números ID SEC: 19 y 20, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H64 se encuentran en los

10 números ID SEC: 21 y 22, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H65 se encuentran en los números ID SEC: 23 y 24, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H66 se encuentran en los números ID SEC: 25 y 26, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H67 se encuentran en los números ID SEC: 27 y 28, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de

15 NAV-H68 se encuentran en los números ID SEC: 29 y 30, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H69 se encuentran en los números ID SEC: 31 y 32, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H70 se encuentran en los números ID SEC: 33 y 34, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H71 se encuentran en los números ID SEC: 35 y 36, respectivamente. El ADN y las

20 secuencias de aminoácidos de NAV-H72 se encuentran en los números ID SEC: 37 y 38, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H73 se encuentran en los números ID SEC: 39 y 40, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H74 se encuentran en los números ID SEC: 41 y 42, respectivamente.

25 El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H22 se encuentran en los números ID SEC: 43 y 44, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H23 se encuentran en los números ID SEC: 45 y 46, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H24 se encuentran en los números ID SEC: 47 y 48, respectivamente. El ADN y las

30 secuencias de aminoácidos de NAV-H30 se encuentran en los números ID SEC: 49 y 50, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H32 se encuentran en los números ID SEC: 51 y 52, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H33 se encuentran en los números ID SEC: 53 y 54, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H37 se encuentran en los números ID SEC: 55 y 56, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H40 se

35

- encuentran en los números ID SEC: 57 y 58, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H41 se encuentran en los números ID SEC: 59 y 60, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H43 se encuentran en los números ID SEC: 61 y 62, respectivamente.
- 5 El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H44 se encuentran en los números ID SEC: 63 y 64, respectivamente. El ADN y las secuencias de aminoácidos de NAV-H45 se encuentran en los números ID SEC: 65 y 66, respectivamente.
- 10 Para reducir aún más el número de ORFs que se pondrán a prueba como una vacuna, son abandonados los productos de genes, previstos por el análisis en silicio, que se localicen en el citoplasma o en la membrana interna de la espiroqueta. Como resultado, veinte de los treinta y tres genes presentan en la Tabla 1 se analiza con mayor profundidad. Estos incluyen
- 15 NAV-H58, H60-NAV, NAV-H62, H64-NAV, NAV-H66, NAV-H67, H69-NAV, NAV-H71, H73-NAV, NAV-H22, H23-NAV, NAV-H24, NAV-H30, NAV-H32, H33-NAV, NAV-H37, H40-NAV, NAV-H41, NAV-H43, H44-NAV, y NAV-H45.

20 Análisis de la distribución de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Uno o dos primeros pares que se ajustan fuertemente a las diferentes regiones del gen objetivo de la región codificada están diseñados y optimizados para la detección PCR. Los primeros individuales están
- 25 diseñados utilizando Oligo Explorer 1.2 y son seleccionados los primeros grupos con temperaturas calculadas de fusión de aproximadamente 55-60 ° C. Estos primeros grupos son también seleccionados para generar productos PCR superiores a 200 pb. Una primera temperatura de 50 ° C para un refuerzo de un medio –rígido, es seleccionada para el análisis de PCR de
- 30 distribución. Las condiciones del medio- rígido permitirán a las posibles secuencias menores no coincidentes (debido a diferencias de tensión) y que ocurren en los primeros sitios de unión, no afectar las primeras uniones. El análisis de la distribución del objetivo de los genes de veintiún *B. hyodysenteriae* se realizan en 23 cepas de *B. hyodysenteriae*; incluyendo
- 35 dos cepas que hayan demostrado ser virulentas. El análisis PCR se realiza en un volumen total de 25 μ L utilizando una Taq de polimerasa de ADN (Biotech International, Thurmont, MD). La mezcla de amplificación consta de

1x tampón PCR (que contiene 1,5 mM de MgCl₂), 1 U de Taq ADN polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 0,5 μ M del primer par, y 1 μ l purificado plantilla de ADN cromosómico. Las condiciones cíclicas implican un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 50 ° C durante 15 segundos, y una primer extension a 68 ° C durante 4 minutos. Los productos PCR son sometidos a electroforesis en 1% (w / v) de geles de agarosa en tampón 1x TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), se tiñeron con un 1 μ g / ml de solución de bromuro de etidio y la visión sobre la luz UV. Los iniciadores utilizados para los genes de los dieciocho (de los veinte uno) se indican en la Tabla 2. De estos genes de dieciocho años, tres de ellos (NAV-H23, NAV-NAV-H41 y H71) están presentes en el 83% de las cepas de B. hyodysenteriae de prueba, tres de ellos (NAV-H24, NAV-NAV-H30 y H73) están presentes en el 87% de las cepas estudiadas, siete de ellos (NAV-H22, NAV-H32, H33-NAV, NAV-H37, H43-NAV, NAV-NAV-H64 y H69) están presentes en el 91% de las cepas de prueba, y tres de ellos (NAV-H40, NAV-H44, H45 y NAV-) están presentes en el 100% de las cepas analizadas. Los otros tres genes están presentes en menos del 80% de las cepas de B. hyodysenteriae prueba. La mala distribución de estos genes hace menos útiles como una subunidad de la vacuna. Por esta razón, el nuevo análisis de estos genes se ha abandonado.

Cuadro 2

Gen	Primer nombre	Primer Sequencia (5'-3')
NAV-H22	H22-F4	AAACGTTTATATTTTATTTTATC (SEQ ID NO: 67)
	H22-R1308	AAACTTCCAAGTGATACC (SEQ ID NO: 68)
NAV-H23	H23-F4	AAATATAAACCTACAAGCAG (SEQ ID NO: 69)
	H23-R2366	AATATTTTCAGTTAATCTAAAATC (SEQ ID NO: 70)
NAV-H24	H24-F19	ACTTTAATCTTTGTATTAATTTTG (SEQ ID NO: 71)
	H24-R729	TTGTTTTAATTTGATAATATCAG (SEQ ID NO: 72)

Cuadro 2 (continúa)

Gen	Primer nombre	Primer Sequencia (5'-3')
NAV-H30	H30-F4	AAAAAAATTATTTTATTAATATTTATATT (SEQ ID NO: 73)
	H30-R969	TTCTCTTATAATCTTTACAGTTG (SEQ ID NO: 74)
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC (SEQ ID NO: 75)
	H32-R564	TTTTTTGATAAATAAGTTTTTTTATTTG (SEQ ID NO: 76)
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTATTT (SEQ ID NO: 77)
	H33-R396	AAGGAGAATCACCAGAAA (SEQ ID NO: 78)
NAV-H37	H37-F4	AATGATATTATTAAAGTGATAAA (SEQ ID NO: 79)
	H37-R825	AAAATCTAATATAACGGATT (SEQ ID NO: 80)
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCCATTATAGG (SEQ ID NO: 81)
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTTAAC (SEQ ID NO: 82)
NAV-H41	H41-F19	TATATTTTCATTATATATTTATTAG (SEQ ID NO: 83)
	H41-R1067	CTAGGCATAGATTTTCCA (SEQ ID NO: 84)
NAV-H43	H43-F46	TTTGCCATGTCTGGAAATTGCAG (SEQ ID NO: 85)
	H43-R1236	TATTCTAGCACCGTCCATATC (SEQ ID NO: 86)
NAV-H44	H44-F43	GTATGTTTATATGCTCAGGATAC (SEQ ID NO: 87)
	H44-R2931	AACAGCAGCACTATCTTGTA (SEQ ID NO: 88)
	H44-F80	CAGCAGCAACAAATAATACTACTG (SEQ ID NO: 89)

	H44- R929	TGAATATAAACACCTTCTCTCAAAG (SEQ ID NO: 90)
NAV- H45	H45-F52	AAAATGTCATTGGTAACTACTGTAAG (SEQ ID NO: 91)
	H45- R1595	CTTGATAATCTGCCTTTAAACATAC (SEQ ID NO: 92)
NAV- H62	H62-F69	ATGTGAGGAAAAAACAGAAAG (SEQ ID NO: 93)
	H62- R866	TCATTACCAGAAAACCATACTC (SEQ ID NO: 94)
NAV- H64	H64-F69	AGGAAATAAAGCTCCTGCTGCTTCAGC (SEQ ID NO: 95)
	H64- R253	GCATAGCAGCAACTTCAGAAGGTCCA (SEQ ID NO: 96)
NAV- H66	H66- F114	CTTATTAATTGGTATAGGAAAACC (SEQ ID NO: 97)
	H66- R200	AATCTATGTTCTTGATTTATTAGCC (SEQ ID NO: 98)
NAV- H69	H69- F546	AGAAGCTACTTTTGGACCTTGGCCTGT (SEQ ID NO: 99)
	H69- R662	ACACAGTCAACACCAAGAGC (SEQ ID NO: 100)
NAV- H71	H71- F568	AAACAGCAGACTAGCTGGTG (SEQ ID NO: 101)
	H71- R773	TGACCATTACTTACACCGGATACCCCA (SEQ ID NO: 102)
	H71-F37	TTAATGACTATATCGCTTTCATACACTTTC (SEQ ID NO: 103)
	H71- R1241	TCAATTCTTCCAGACATAAAATCAGTAAG (SEQ ID NO: 104)
NAV- H73	H73-F37	TATATAGAGTGGGTATCAGAAG (SEQ ID NO: 105)
	H73- R254	TCATAATGGTATTTACAAGATG (SEQ ID NO: 106)

Extracción del plásmido pTrcHis

Los clones *Escherichia coli* clones JM109 que albergan el plásmido pTrcHis
 5 plásmido (Invitrogen, Carlsbad, CA) son alineados fuera del almacenamiento
 del glicerol Luria-Bertani (LB) dentro de la placas de agar completado con
 100 mg / l de ampicilina y encubado a 37 ° C durante 16 horas. Una sola
 colonia se utiliza para inocular 10 ml de caldo LB completado con 100 mg / l
 de ampicilina, y el caldo de cultivo se incuba a 37 ° C durante 12 horas con
 10 agitación. El cultivo nocturno se centrifuga a 5.000 xg durante 10 minutos, y
 el plásmido contenido en las células, se obtiene mediante los QIAprep
 Miniprep Spin Kit (Qiagen, Doncaster VIC). Las células granuladas son
 resuspendidas a 250 µl buffer P1 celular y luego se seccionan con la adición
 de 250 lisis µl buffer P2 celular. Las células lisas son neutralizadas con 350
 15 de N3 de neutralización µl, y los restos de las células granuladas se
 centrifugan 20.000 xg durante 10 minutos. El sobrante se transfiere a una
 columna giratoria y se centrifuga a 10.000 xg durante 1 minuto. Después de
 descartar el flujo 500 se utiliza el tampón de lavado a la columna y se
 centrifuga como el paso anterior. El flujo se descarta y la columna se seca
 20 con centrifugación a 20.000 xg durante 3 minutos. El plásmido de ADN es
 eluido de la columna con 100 de elución µl EB. El plásmido purificado se
 cuantificará mediante un fluorímetro Dynaquant ADN (Hoefer, San Francisco,
 CA), y la concentración de ADN se ajusta a 100 µg / ml por dilución con
 tampón TE. El plásmido pTrcHis purificado se almacena a -20 ° C.

25

Preparación del Vector

Dos µg del plásmido purificado de pTrcHis es digerido a 37 ° C durante 1-4
 horas en un volumen total de 50 µL con 5 U de dos enzimas de restricción
 30 en 100 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de
 DTT y 100 µg / ml de BSA. El primer par de enzimas para la restricción que
 se usan depende de la secuencia de las primeras y de la secuencia ORF. El
 objetivo es utilizar cebos que no se extraen de la ORF. El vector restringido
 es verificado por electrophoresing 1 µl de la reacción de la digestión a través
 35 de un 1% (w / v) de gel de agarosa en buffer TAE 1X a 90 V durante 1 hora.

La electroforesis de DNA se tiñe con bromuro de $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ de etidio para que se vea mejor con los rayos ultravioleta (UV).

El vector Linealizado pTrcHis es purificado con ayuda de la Limpieza PCR
 5 UltraClean-up Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). En resumen, la
 reacción de restricción (50 microlitro) se mezcla con el B1 250 μl SpinBind de
 amortiguamiento, y el volumen total se agrega a una columna giratoria.
 Después de la centrifugación a 8.000 xg durante 1 minuto, el flujo continuo se
 10 descarta y se añaden 300 μl B2 búfer SpinClean a la columna. La columna
 se centrifuga como antes y el flujo es descartado antes del secado de la
 columna a 20.000 xg durante 3 minutos. El vector purificado es eluido de la
 columna con 50 μl buffer TE. El Vector lineal purificado se evalúa mediante
 un fluorímetro, y la concentración de ADN se ajusta a $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ por dilución
 con un tampón TE. El vector purificado restringido se almacena a -20°C .

15

Primer diseño de para la preparación insertada:

Los primeros pares están diseñados para ampliar lo máximo posible la región
 codificada del gen objetivo utilizando el ADN genómico como punto de
 20 partida. Todas las primeras secuencias incluyen sitios de enzima terminal
 para permitir la cohesión final como resultado del pTrcHis. Los primeros, se
 analizarán con el Amplify 1,2 (Universidad de Wisconsin, Madison, WI) y la
 secuencia de ampliación teórica se inserta en la posición adecuada en la
 secuencia de vectores pTrcHis. Esta translación deducida de la expresión
 25 quimérica, se realiza utilizando la versión del Vector NTI 6 (Informax), a fin
 de confirmar que el gen se inserta en el marco de lectura correcto. El Cuadro
 3 también proporciona el tamaño del gen, el tamaño de la proteína, la
 predicción de peso molecular de la proteína nativa en daltons y el IP predicho
 de la proteína. Cabe señalar que la histidina-fusión de la proteína
 30 recombinante añade aproximadamente 4 kDa de peso molecular para la
 proteína nativa predicha.

35

Cuadro 3

Gen	Tamaño del Gen (bp)	Tamaño de la Proteína (aa)	Proteína nativa MW predictada (Da)	pI predictada
NAV-H40	1815	605	97,733	9.4853
NAV-H41	1068	356	39,870	5.2168
NAV-H44	2940	980	113,722	5.1864
NAV-H62	1014	338	37642	4.3944
NAV-H64	1011	337	36468	4.4953
NAV-H66	264	88	10629	9.3027
NAV-H69	1080	360	41525	5.7123
NAV-H73	258	86	10527	9.5920

5 La amplificación del gen insertado:

Utilizando el ADN genómico, todos los genes insertados se amplifican por el PCR en un volumen total de 100 µ L, usando la polimerasa Taq polimerasa de ADN (Biotech International) y la polimerasa Pfu DNA (Promega, Madison, WI). La mezcla de amplificación consta de 1x de PCR (que contiene 1,5 mM de MgCl₂), 1 U de Taq polimerasa de ADN, 0,01 U Pfu ADN polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 0,5 µ M de la pareja de imprimación adecuada y 1 µ l de ADN cromosómico purificada. El ADN cromosómico se prepara de la misma B. hyodysenteriae utilizado para la secuenciación del genoma. Las condiciones cíclicas implican un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 50 ° C durante 15 segundos, y primer extension a 68 ° C durante 4 minutos. Los productos de PCR son sometidos a electroforesis en 1% (w / v) de geles de agarosa en tampón TAE 1x, se tiñen con un 1 µ g / ml de solución de bromuro de etidio y de esa manera se podrán apreciar mejor a la luz UV. Después de verificar la presencia y el tamaño correcto del producto PCR, la reacción de PCR se purifica mediante la PCR UltraClean Clean-up Kit (Mo Bio Laboratorios, Carlsbad, CA). La reacción de PCR (100 microlitro) se mezcla con el B1 500 µl SpinBind de amortiguamiento y el volumen total se agrega a una columna

10

15

20

25

giratoria. Después de la centrifugación a 8.000 xg durante 1 minuto, el flujo continuo se descarta, y 300 µl B2 de búfer SpinClean se añade a la columna. La columna se centrifuga como antes y el flujo es descartado antes del secado de la columna a 20.000 xg durante 3 minutos. El vector purificado es

5 eluido columna con 100 µl buffer TE.

Digestión de la enzima de restricción del gen insertado

Treinta µl de producto PCR purificado es digerido en un volumen total

10 de 50 µl con 1 U de cada enzima de restricción compatible con la restricción terminal de sitio endonucleasa determinado mediante la clonación del primer olinucleótido. La reacción de la restricción contiene 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 100 µg/ml BSA con 1 U de cada enzima de restricción a 37°C for 1-4 horas. El DNA digerido

15 insertado es purificado mediante el uso de UltraClean PCR Clean-up Kit (ver abajo). EL DNA digerido purificado es cuantificado usando el fluorímetro. La concentración de DNA se ajusta 20 µg/ml con el mediante la dilución con el TE buffer. EL DNA restringido purificado es usado inmediatamente por el vector de ligación.

20

Ligación del gen insertado en el vector pTrcHis

Las reacciones de ligación son todas realizadas en un volumen total de 20 µl. 100 ng de pTrcHis linearizados se encubran con 20 ng con

25 inserciones restringidas a 16°C por 16 horas in 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 1 mM ATP conteniendo 1 U de T4 DNA (Promega). Una ligación idéntica que contenga DNA no insertado, también se incluye como vector de control negativo de re-circulación. Las enzimas apropiadas son usadas para cada reacción.

30

Transformación de las ligaciones pTrcHis en células *E. coli*

Las células *E. coli* JM109 (Promega) competentes son descongeladas a -80°C, almacenados en hielo y posteriormente 50 µl de las células son

35 transformadas en tubos microfugados de 1.5 ml de hielo frío que contienen 5 µl de las reacciones de ligación nocturna (equivalentes a 25 ng del vector pTrcHis). Los tubos son mezclados mediante un suave movimiento de la

- punta de cada tubo en la rejilla. Esto se deja en hielo por 30 minutos. Las células son posteriormente golpeadas por el calor metiendo los tubos en un baño de agua 42°C por 45 segundos antes de devolver los tubos al hielo durante 2 minutos. Las células transformadas son recompuestas en 1 ml LB de cultivo por una hora a 37°C mediante una mezcla suave. Las células recompuestas se cultivan a 2,500 x g por 5 minutos. Las células son resuspendidas en 50 µl de LB cultivo fresco. Todo el contenido de 50 µl de células recompuestas se esparce incluso dentro del plato agar LB que contiene 100 mg/l de ampicilina, usando un vidrio esterilizado cultivo. Los platos son incubados a 37°C por 16 horas.

La detección de pTrcHis recombinante en construcciones de E. coli por el PCR

- 15 Doce colonias transformantes únicas para cada construcción son alineadas en LB frescos con 100 mg / l de ampicilina. Estos últimos deben ser incubados a 37 ° C durante 16 horas. Una sola colonia de cada evento de transformación se resuspende en 50 µ l de TE y se hierve durante 1 minuto. Dos µ l de agua de células hervidas se utilizan como plantilla para la PCR. La
- 20 mezcla de amplificación consta de 1x tampón PCR (que contiene 1,5 mM de MgCl₂), 1 U de Taq ADN polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µ M de la pTrcHis de primeros F (5' - CAATTTATCAGACAATCTGTGTG-3 ', SEQ ID NO: 107) y 0,5 µ M de la pTrcHis imprimador R (5'-TGCCTGGCAGTTCCTACTCTCG-3 ', SEQ ID NO: 108). Las condiciones
- 25 cíclicas implican un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 60 ° C durante 15 segundos, y una extensión de imprimación a 72 ° C durante 1 minuto . Los productos PCR son sometidos a electroforesis en 1% (w / v) de geles de agarosa en tampón TAE 1x, se tiñen con un 1 µ g /
- 30 ml de solución de bromuro de etidio y se ven más de la luz UV. La clonación de los insertos en los distintos vectores de expresión recombinante produce construcciones de pTrcHis de diferentes tamaños.

Expresión piloto de proteínas recombinantes His-agregadas

De cinco a diez colonias aisladas de pTrcHis recombinante construidas en E. coli JM109 se inoculan LB 3 ml de caldo en un tubo de 5 ml con 100 mg / l de ampicilina y 1 mM IPTG. Se incuba a 37 ° C durante 16 horas con agitación. Las células se cultivan por centrifugación a 5.000 xg durante 10 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se desecha, y cada pastilla se resuspende con 10 µl de Ni-NTA desnaturalización tampón de lisis (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 8,0). Después de la agitación del tubo durante 1 minuto, los restos celulares son granulados por centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se almacenan a -20 ° C hasta su análisis.

Electroforesis del gel poliacrilamida de Sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE)

El análisis SDS-PAGE de la proteína se realiza mediante un sistema discontinuo. Tris buffer de glicina. Treinta µl de la muestra de proteínas se mezclan con 10 µl de 4x para el tratamiento de la muestra (250 mM Tris-HCl (pH 6,0), 8% (w / v) SDS, 200 mM DTT, 40% (v / v) de glicerol y de 0,04% (w / v) de azul de bromofenol). Las muestras se hierven durante 5 minutos inmediatamente anteriores a la carga 10 µl de la muestra en los pocillos del gel. El gel consta de un gel de apilamiento (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% w / v acylamide, 0,15% w / v bis-acrilamida y 0,1% w / v SDS) y un gel de separación (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 12% w / acylamide V, 0,31% w / v bis-acrilamida y 0,1% w / v SDS). Estos geles son polimerizados por la adición de 0,1% (v / v) y TEMED 0,05% (w / v) recién preparada una solución de sulfato de amonio y adicionado a las células de doble placa mini-proteica (Bio-Rad, Hercules, California). Las muestras se ejecutan a 150 V a temperatura ambiente (RT) hasta que el colorante azul de bromofenol alcanza el fondo del gel. Los estándares de peso de pre-teñido molecular son sometidos al proceso de electroforesis paralelamente con las muestras, a fin de permitir las estimaciones del peso molecular. Inmediatamente después de la electroforesis, el gel se tiñe con Coomassie G250 (Bio-Rad) azul brillante o es sometido a una electro-transferencia en la membrana de nitrocelulosa para el borrado Western.

Análisis de Western blot

La transferencia de electroforéticos de proteínas separadas desde el gel de SDS-PAGE para la membrana de nitrocelulosa se realiza mediante la transferencia del sistema Towbin. Después de la electroforesis, el gel se equilibra en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v / v de metanol, pH 8,3) durante 15 minutos. Las proteínas en el gel son electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN, Schleicher y Schuell BioScience, Inc., Keene, NH), utilizando el mini-aparato proteico transblot (Bio-Rad) a 30 V durante la noche a 4 ° C. La membrana de nitrocelulosa recién transferida que contiene las proteínas separadas se bloquea con 10 ml de solución salina tamponada de Tris (TBS) con 5% (w / v) de leche desnatada en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lava con TBS el cual contiene 0,1% (v / v) de Tween 20 (TBST) y luego se incuba con 10 ml de anticuerpo anti- his de ratón (diluidos 5.000 veces, con TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar tres veces durante 5 minutos con TBST, la membrana se incuba con 10 ml de anti- mouse IgG de cabra (molécula completa)-AP diluidos 5.000 veces en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se desarrolla utilizando el sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La reacción de desarrollo es detenida por el lavado de la membrana con agua destilada. La membrana se seca y se analizan en busca de presentación.

Verificación de la lectura del marco pTrcHis recombinante construido mediante el análisis de secuencia directa

Dos clones transformantes para cada construcción que producen la medida correcta PCR se inoculan en 10 ml de caldo de LB con 100 mg / l de ampicilina y se incuban a 37 ° C durante 12 horas con agitación. Los cultivos nocturnos se centrifugan a 5.000 xg durante 10 minutos, y el plásmido que figuran en las células se extraen utilizando el QIAprep Miniprep Spin Kit como se describió anteriormente. El plásmido purificado se cuantificará mediante un fluorímetro. Ambos plásmidos purificados son sometidos a secuenciación directa automática de lapTrcHis utilizando el pTrcHis-F y pTrcHis primers R. Cada reacción de secuenciación se lleva a cabo en un volumen de 10 l μ compuesta de 200 ng de ADN plásmido, 2 pmol de cebador, y 4 μ l de la ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE

Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones cíclicas requieren de 2 minutos de desnaturalización a 96 ° C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 96 ° C durante 10 segundos, y un primer combinado más un paso de extensión a 60 ° C durante 4 minutos. Los residuos finales de

5 tinta se eliminan de los productos de secuenciación por precipitación con un 95% (v / v) de etanol que contienen acetato de sodio 85 mM (pH 5,2), 3 mM de EDTA (pH 8), y se secan al vacío. Los plásmidos se ordenan por duplicado utilizando cada primer. Los productos de secuencia se analizan utilizando un secuenciador de ADN ABI 373A (PE Applied Biosystems). La

10 secuenciación de nucleótidos de la pTrcHis se realiza para verificar que la expresión está en el marco de lectura correcto para cada una de las construcciones.

Expresión y purificación del marcado-His recombinante

15 Una colonia sola del pTrcHis recombinante es construida en células E. coli JM109. Se inocula en 50 ml de caldo de LB en un matraz cónico de 250 ml con 100 mg / l de ampicilina y se incuba a 37 ° C durante 16 horas con agitación. En un erlenmeyer de 2 litros con 1 l de caldo de LB lleno con 100

20 mg / l de ampicilina se inocula con 10 ml del cultivo durante la noche y se incuba a 37 ° C, hasta que la densidad óptica de las células a 600 nm sea de 0,5 (aproximadamente 3-4 horas). El cultivo es inducido gracias a la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, y las células se devuelven a 37 ° C con agitación. Después de 5 horas de inducción, el cultivo se transfiere a

25 botellas de 250 ml de centrifugación. Estas botellas se centrifugan a 5.000 xg durante 20 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se desecha, y cada pastilla se desnaturaliza con 8 ml Ni-NTA de lisis (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 8,0). Las células resuspendidas se almacenan a -20 ° C durante la noche.

30 La suspensión celular se retira del almacenamiento a -20 ° C para ser descongeladas en hielo. Entonces, el lisado de células se realiza sobre hielo 3 veces durante 30 segundos y 1 minuto de incubación en hielo entre las rondas de sonicación. La lisis de las células se retira por centrifugación a

35 20.000 xg durante 10 minutos a 4 ° C, y el sobrenadante se transfiere a una columna de 15 ml que contiene una cuneta de 0,5 ml de volumen de resina

agarosa Ni-NTA (Qiagen). La proteína His6 recombinante puede ahora unirse a la resina durante 1 hora a 4 ° C extremo a extremo de la mezcla. La resina se lava con 30 ml de Ni-NTA de lavado de desnaturalización (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 6,3) antes de elución con 12 ml de Ni-NTA elución desnaturalización (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, urea 8 M, pH 4,5). Cuatro fracciones de 3 ml del eluido se recogen y se almacenan a 4 ° C. Treinta μ l de cada eluido se trata con 10 μ l de 4x tratamiento de la muestra y se hierva durante 5 minutos. Las muestras son sometidas a SDS-PAGE y se tiñen con Coomassie G250 (Bio-Rad) azul brillante. El gel teñido se equilibra en agua destilada durante 1 hora y se seca entre dos láminas de celulosa durante la noche a temperatura ambiente. La expresión de los clones recombinantes seleccionados E. coli se realiza en un medio de escala para generar proteínas recombinantes suficiente para la vacunación de ratones (véase más abajo).

15

Diálisis y liofilización de la proteína recombinante His-marcada.

Las proteínas se agrupan y se eluyen y se transfieren a un tubo de diálisis hidratado (Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) con un corte de peso (MWCO) de 3.500 Da. Una parte de 200 μ L del eluido combinados se toma y se cuantifica mediante un ensayo comercial de proteínas (Bio-Rad). Las proteínas son dializadas frente a 2 l de agua destilada a 4 ° C con agitación. El buffer de diálisis se cambia 8 veces en intervalos de 12 horas. Las proteínas de diálisis se transfieren desde el tubo de diálisis en un tubo de centrifugación de 50 ml (40 ml de volumen máximo) y se colocan -80 ° C durante la noche. Los tubos se colocan en una congelación MAXI-secadora (HETO-Holten, Allerød, Dinamarca), se liofilizan y se secan. Las proteínas son entonces liofilizadas rehidratadas con PBS hasta una concentración calculada de 2 mg / ml y almacenadas a -20 ° C. Después de la diálisis y liofilización, antígeno recombinante estable, es producido con éxito.

30

Ocho de los genes de dieciocho años tienen clonado con éxito en la expresión de E. coli del sistema y de la proteína recombinante puede ser expresado establemente de estos clones.

35

Serología usando proteína recombinante purificada

Veinte mg de proteína recombinante purificada se carga en un 7 cm IEF bien, a través de electroforesis un 10% (w / v) de gel de SDS-PAGE, y son electro-transferidas a las membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche-TBS descremada (5% w / v) y se ensamblan en un aparato multi-
5 pantalla (Bio-Rad). Los pozos se incuban con 100 µ l de suero de cerdo diluido (100 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. El suero de cerdo se obtiene de cerdos de alto estatus de salud (n = 3), cerdos con SD (n = 5), clínicos, cerdos seroconvirtiendo infectados naturalmente (n = 5), y cerdos recuperados de una infección natural (n = 4). La membrana luego se quita
10 del aparato y se lava tres veces con TBST (0,1% v / v) antes de la incubación con 10 ml de cabra anti-IgG porcina (molécula completa)-AP (5.000 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces con TBST antes de que se desarrolle el color utilizando sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La membrana se lava con agua suficiente cuando el
15 desarrollo se haya producido, se seca y se escanea para su presentación. La reactividad del suero de cerdos obtenidos de animales en diferentes estados de salud se muestra en la tabla de abajo. Todas las proteínas son reconocidas por el 100% del grupo de suero lo que indica que los genes se expresan en vivo y que son capaces de inducir una respuesta inmune
20 sistémica tras la exposición a la espiroqueta.

Tabla 4. La distribución de genes y la reactividad serológica de los ocho expresada con éxito vacunas *B. hyodysenteriae*.
La distribución de genes por PCR se analizó utilizando un panel de 23 cepas
25 diferentes. La serología se realizó con 19 muestras de suero de cinco categorías diferentes de la enfermedad.

Gen	Distribución (%)	Serologia (%)
NAV-H40	100	100%
NAV-H41	83	100%
NAV-H44	100	100%
NAV-H62	96	100%
NAV-H64	91	100%
NAV-H66	96	100%
NAV-H69	91	100%
NAV-H73	87	100%

La vacunación de ratones utilizando proteínas recombinantes purificadas His-marcadas.

- Por cada una de las proteínas recombinantes purificadas su-puso proteínas,
- 5 diez ratones son inmunizados por vía oral y sistémica, para determinar si la proteína recombinante sería inmunogénica. La proteína recombinante se emulsiona con el 30% (v / v) de agua en adyuvante oleoso y se inyecta por vía intramuscular en el músculo cuádriceps de diez ratones (Balb / CJ: 5 semanas de edad los varones). Todos los ratones reciben 100 mg de
- 10 proteínas en un volumen total de 100 microlitros. Tres semanas después de la primera vacunación, todos los ratones, reciben segunda vacuna idéntica de la primera vacunación por vía intramuscular. Todos los ratones se matan a las dos semanas después de la segunda vacunación. Los sueros se obtienen a partir del corazón post-mortem y probados en el análisis de
- 15 Western blot para detectar anticuerpos contra los extractos celulares de *B. hyodysenteriae*.

Análisis de Western blot

- 20 Veinte mg de proteína recombinante purificada se carga en un 7 cm IEF bien, a través de electroforesis un 10% (w / v) de gel de SDS-PAGE, y electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche-TBS descremada (5% w / v) y ensamblados en el aparato multi-pantalla (Bio-Rad). Los pozos se incuban con 100 μ l de suero de ratón
- 25 diluido (100 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se quita del aparato y se lava tres veces con TBST (0,1% v / v) antes de la incubación con 10 ml de cabra anti-IgG de ratón (molécula completa)-AP (5.000 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces con TBST desarrollando el color antes de utilizar un sustrato de
- 30 fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La membrana se lava con agua suficiente y cuando el desarrollo se ha producido, se seca y se escanea para su presentación.

- El análisis de Western blot muestra un aumento significativo en la reactividad
- 35 de anticuerpos en los ratones a los antígenos de la vacuna recombinante tras la vacunación. Todos los ratones reconocen proteínas recombinantes, que son similares en peso molecular a la Coomassie azul manchada de las

proteínas recombinantes purificadas. Estos experimentos proporcionan evidencia de que las proteínas recombinantes son inmunogénicas cuando se usan para vacunar a los ratones y que el protocolo de vacunación empleado puede inducir títulos de anticuerpos circulantes específicos frente al antígeno.

- 5 Los resultados indican que las proteínas recombinantes pueden ser útiles en una vacuna eficaz para la especie animal de ser colonizada por *B. hyodysenteriae*.

10 La vacunación de los cerdos con proteínas His- marcadas recombinantes purificadas.

- 15 Por cada una de las proteínas His-marcadas recombinantes purificadas, se inyectan diez cerdos sero-negativos por vía intramuscular con 1 mg de antígeno en particular en el volumen 1 ml de vacuna. El antígeno se emulsiona con un volumen igual de agua en adyuvante oleoso. Los cerdos fueron vacunados en tres semanas de edad y de nuevo a las seis semanas de edad. Un segundo grupo de diez cerdos sero-negativo se utilizaron como controles negativos y se quedan sin vacunar. Todos los cerdos son ensayados con 100 ml de una cultivo activo *B. hyodysenteriae* (~ 10⁹ células / ml) a las ocho semanas de edad. Los cerdos se observan para señales clínicas de disentería porcina, durante el experimento (hasta el puesto de seis semanas-de ensayo) y en el examen post-mortem.

25 Kit de diagnóstico:

- 30 El suero se obtiene de cerdos en pocilga con infección conocida de *B. hyodysenteriae*, de cerdos de los que se sabe que no han sido infectados con *B. hyodysenteriae* y de cerdos en pocilga con un infección desconocida de *B. hyodysenteriae*. Veinte mg de proteína recombinante purificada se carga bien en un 7 cm IEF, a través de electroforesis con un 10% (w / v) de gel de SDS-PAGE, y son -transferidas a membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche-TBS-leche descremada (5% w / v) y ensamblados en el aparato multi-pantalla (Bio-Rad). Los pozos se incuban con 100 μ l de suero de cerdo diluido (100 veces) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana luego se quita el aparato y se lava tres veces con TBST (0,1% v / v) antes de la incubación con 10 ml de cabra anti-IgG porcina (molécula completa)-AP (5.000 veces) durante 1 hora a

temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces con TBST antes de que se desarrolle el color utilizando sustrato de fosfatasa alcalina Kit (Bio-Rad). La membrana se lava con agua suficiente para el desarrollo cuando se ha producido, se seca y escaneado para su presentación. Uno puede
5 determinar si los cerdos están infectados con *B. hyodysenteriae* comparando los resultados con el control positivo y negativo.

Aunque esta invención ha sido descrita con referencia a las modalidades específicas, será obvio para aquellos con competencias normales en la
10 materia que las variaciones en estos métodos y composiciones pueden ser utilizados y que está previsto que la invención puede ser practicada de otra manera que como específicamente aquí se describen. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones comprendidas dentro del espíritu y el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

15 Aunque esta invención ha sido descrita con referencia a las modalidades específicas, será obvio para aquellos con competencias normales en la materia, que las variaciones en estos métodos y composiciones pueden ser utilizadas y practicadas de otra manera como específicamente aquí se
20 describen. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones comprendidas dentro del espíritu y el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

25

30

35

REIVINDICACIONES

Reivindicación 1. Un polinucleótido **que comprende** la secuencia
5 seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15,
17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55,
57, 59, 61, 63 y 65.

Reivindicación 2. Un plásmido que comprende el polinucleótido de la
reivindicación 1.

10 **Reivindicación 3.** El plásmido de la reivindicación 2 en donde dicho
plásmido es un vector de expresión.

Reivindicación 4. Una célula que contiene el plásmido de la reivindicación 2.

Reivindicación 5. Una célula que contiene el plásmido de la reivindicación 3.

Reivindicación 6. Una composición inmunogénica que comprende el
15 plásmido de la reivindicación 3.

Reivindicación 7. La composición de la vacuna para el tratamiento o la
prevención de *Brachyspira hyodysenteriae* que comprende el vector de
expresión de la reivindicación 3.

Reivindicación 8. La composición de la vacuna para el tratamiento o la
20 prevención de *Brachyspira hyodysenteriae* que comprende la celda de la
reivindicación 4.

Reivindicación 9. Una molécula de ADN que comprende una secuencia que
es al menos 70% idéntica a la de los polinucleótidos de la reivindicación 1.

Reivindicación 10. Un plásmido que comprende el polinucleótido de la
25 reivindicación 9.

Reivindicación 11. La molécula de ADN de la reivindicación 9 donde dicha
molécula de ADN es al menos un 80% idéntica a la de los polinucleótidos de
la reivindicación 1.

Reivindicación 12. Un plásmido que comprende el polinucleótido de la
30 reivindicación 11.

Reivindicación 13. La molécula de ADN de la reivindicación 9 donde dicha
molécula de ADN es al menos un 90% idéntica a la de los polinucleótidos de
la reivindicación 1.

Reivindicación 14. Un plásmido que comprende el polinucleótido de la
35 reivindicación 13.

Reivindicación 15. Un polipéptido que comprende la secuencia
seleccionada del grupo que consiste de los números SEQ ID: 2, 4, 6, 8, 10,

12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66.

Reivindicación 16. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la reivindicación 15.

- 5 **Reivindicación 17.** Un plásmido que comprende el polinucleótido de la reivindicación 16.

Reivindicación 18. El plásmido de la reivindicación 17 en donde dicho plásmido es un vector de expresión.

- 10 **Reivindicación 19.** Una célula que contiene el plásmido de la reivindicación 17.

Reivindicación 20. Una composición inmunogénica que comprende la celda de la reivindicación 19.

Reivindicación 21. Una proteína que comprende una secuencia que es al menos el 70% homóloga a la polipéptido de la reivindicación 15.

- 15 **Reivindicación 22.** La proteína de la reivindicación 21 donde dicha proteína es al menos un 80% homóloga al polipéptido de la reivindicación 15.

Reivindicación 23. La proteína de la reivindicación 22 donde dicha proteína es al menos un 90% homóloga al polipéptido de la reivindicación 15.

- 20 **Reivindicación 24.** Una composición inmunogénica que comprende la proteína de la reivindicación 23.

Reivindicación 25. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la reivindicación 15.

- 25 **Reivindicación 26.** La composición de la vacuna para el tratamiento o la prevención de *Brachyspira hyodysenteriae* que comprende el polipéptido de la reivindicación 15.

Reivindicación 27. Un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido de la reivindicación 15.

- 30 **Reivindicación 28.** Un kit para el diagnóstico de la presencia de *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal. Dicho kit compuesto por el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 27.

Reivindicación 29. Un kit para el diagnóstico de la presencia de *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal. Dicho kit comprende los polipéptidos de la reivindicación 15.

- 35 **Reivindicación 30.** Un kit para el diagnóstico de la presencia de *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal. Dicho kit que incluye los polinucleótidos de la reivindicación 1.

Reivindicación 31. Un método para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que comprende administrar a dicho animal la composición de los animales inmunogénico de la reivindicación 24.

5 **Reivindicación 32.** Un método para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que contiene el suministro de dicha composición a los animales inmunogénicos de la reivindicación 25.

Reivindicación 33. Un método para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que contiene el suministro a dicho animal la composición de los animales inmunogénicos de la reivindicación 6.

10 **Reivindicación 34.** Un método para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que contiene el suministro de dicha composición al los animales inmunogénicos de la reivindicación 20.

15 **Reivindicación 35.** Un método para tratar o prevenir una enfermedad causada por *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que necesite dicho tratamiento y que comprende el suministro a dicho animal, de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la vacuna de la reivindicación 7.

20 **Reivindicación 36.** Un método para tratar o prevenir una enfermedad causada por *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal en necesidad de dicho tratamiento que comprende el suministro a dicho animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la vacuna de la reivindicación 8.

25 **Reivindicación 37.** Un método para tratar o prevenir una enfermedad causada por *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que necesite dicho tratamiento, que comprende el suministro a dicho animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la vacuna de la reivindicación 26.

30 **Reivindicación 38.** El uso de la proteína de la reivindicación 23 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal.

Reivindicación 39. El uso de la proteína de la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal.

35 **Reivindicación 40.** El uso del plásmido de la reivindicación 3 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal.

Reivindicación 41. El uso de la celda de la reivindicación 19 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune a *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal.

5 **Reivindicación 42.** El uso del vector de expresión según la reivindicación 3 para la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad causada por *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que necesite dicho tratamiento.

10 **Reivindicación 43.** El uso de la célula de la reivindicación 4 para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad causada por *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que necesite dicho tratamiento.

15 **Reivindicación 44.** El uso del polipéptido de la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad causada por *Brachyspira hyodysenteriae* en un animal que necesite dicho tratamiento.

20

25

30

35

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Novartis AG
 Murdoch University
 5 David Hampson
 Tom La
 Matthew Bellgard
- <120> Nuevos Genes y proteínas de *Brachyspira*
 10 *hyodysenteriae* y sus consecuentes usos.
- <130> 50346
- <160> 108
- 15 <170> FastSEQ para version Windows 4.0
- <210> 1
 <211> 600
 20 <212> DNA
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*
- <400> 1
 atgggtatta gtttagatcc tcaaatacaga tactatacag gaatagattt gctcaatcaa 60
 25 gtaagattaa tagttaaata tggtatgaat caaactaaaa ctgcatcaga aacatataca 120
 gcttcttctt ttggtttga tticagatta tatttcggag ctatgggtgg aaatgttact 180
 cttaatcctt tcatcaaagt aacttatgat acttctttag gtgctaaagg taaatctact 240
 ggaagttatg aagtattatc agacagtgtt gttattccta caacaactgc agctgattta 300
 cttagatagag aaacttatac ttatctata ctctactt tagctttaga ggcaagcagt 360
 30 gatgtagttt ctctttattt agagcctgga ttaggttatt ctatttatga tgatggtaga 420
 aaaggttcta aactaatca ttcttagct tggcagctt atgcagaact ttatattact 480
 cctgttgaag atttagaatg gtatttgag atggatgtaa ataagaggg aggagttcct 540
 attagctttg catctactac aggtattact tggacttgc ctctttcgg agcagcagag 600
- 35 <210> 2
 <211> 200

<212> PRT

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 2

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

<210> 3

<211> 717

35 <212> DNA

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 3
 atgaaactac aaataggaat ttaactata gtaaatttaa tagcatttat accactatta 60
 tatatgtttg atatatttgg tgttgtaat tattatactt taatgcgtaa taaaatagca 120
 cctaattgtac cgggtttttt aacaagattc actcaaaaac ctagagtaga agatatgact 180
 5 cttttggcta gagaagatct taataaaatg agagaatcat tcaatttaag agaaaaagat 240
 ttgcaggctc aggaatcttt aatagcaagc agagcaatag aattgaacac tcaatctgaa 300
 ttgatagaac aagacagaca aaatctttta aatgcttggt ctaattatca agctactatg 360
 gatgaatctt ctcatatca attagtatta actgaccttg ctaataaaat caatagtatg 420
 cctcctcaaa gctctgtggc attacttaat cagttagctg ctaatgggtc tgatgactta 480
 10 atcatagatg tattattaga aatggactct atagctgctg ctgaaggaag aaacagtact 540
 acttcttacc ttttaagctt aatggatccg aatgttgctg ctagaatatt agaaaaatat 600
 gaagcaagat ctaatcctgg aaataataca gtaccttctt cacctaata cttcccta 660
 tatatgctg ataataatga cgctatgta aatgaaggca taatggatat gggagca 717

15 <210> 4
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

20 <400> 4
 Met Lys Leu Gln Ile Gly Ile Leu Thr Ile Val Asn Leu Ile Ala Phe
 1 5 10 15
 Ile Pro Leu Leu Tyr Met Phe Asp Ile Phe Gly Val Val Asn Tyr Tyr
 20 25 30
 25 Thr Leu Met Arg Asn Lys Ile Ala Pro Asn Val Pro Gly Phe Leu Thr
 35 40 45
 Arg Phe Thr Gln Lys Pro Arg Val Glu Asp Met Thr Leu Leu Ala Arg
 50 55 60
 Glu Asp Leu Asn Lys Met Arg Glu Ser Phe Asn Leu Arg Glu Lys Asp
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Ala Gln Glu Ser Leu Ile Ala Ser Arg Ala Ile Glu Leu Asn
 85 90 95
 Thr Gln Ser Glu Leu Ile Glu Gln Asp Arg Gln Asn Leu Leu Asn Ala
 100 105 110
 35 Trp Ser Asn Tyr Gln Ala Thr Met Asp Glu Ser Ser Gln Tyr Gln Leu
 115 120 125
 Val Leu Thr Asp Leu Ala Asn Lys Ile Asn Ser Met Pro Pro Gln Ser

130 135 140
Ser Val Ala Leu Leu Asn Gln Leu Ala Ala Asn Gly Ser Asp Asp Leu
145 150 155 160
Ile Ile Asp Val Leu Leu Glu Met Asp Ser Ile Ala Ala Ala Glu Gly
5 165 170 175
Arg Asn Ser Thr Thr Ser Tyr Leu Leu Ser Leu Met Asp Pro Asn Val
180 185 190
Ala Ala Arg Ile Leu Glu Lys Tyr Glu Ala Arg Ser Asn Pro Gly Asn
195 200 205
10 Asn Thr Val Pro Ser Ser Pro Asn Asp Phe Pro Asn Tyr Met Pro Asp
210 215 220
Asn Asn Asp Ala Met Leu Asn Glu Gly Ile Met Asp Met Gly Ala
225 230 235

15
<210> 5
<211> 4671
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

20
<400> 5
atgtcagatg ttgatgtatt gttaaaagat gaagttaaag ctctatcaag cagattatca 60
gattttgaag agagaataaa agatgatata gtaagagatt tagatgaata ttctatagaa 120
ttaaataatc ttactgataa tgtaggaaaa ttaaattcaa gaatagatga tgttaaataca 180
25 caaatagaag atagcattaa taaatcttct gaattggaaa ctcttatttc tagtgaaaaa 240
gaagaattag ataataaact atctactatt aaggatgagt tagtatctaa gtctgaaaat 300
gatgatacta tagagaaatt attcactcaa gaaaaagaaa aattaaatga acttttcaat 360
caaataaaag atgataataa agagttcaga tatagattag agaaacgtgt tgcttatttt 420
gaggacactt ggtcagacag cagcagattg aaaaatattt tctcaactga tataagagaa 480
30 caattggata atatcagaaa tgataatgag attaaatttg aaaattctat aaattatttg 540
aaagataaag tagaatctat agataatgat atatctaatt ggaaagaaaa cactgttgat 600
gaattagtta aacaattagg tgaagctaga gaaagcatat ctaattattt gaatgattca 660
gagataaaag gaaaagaatt agtagataat cttttatcta aaatagatga aaaagaaaaat 720
agcatgtatc agactttaga agataaagag aagaacatgt atcaaacttt agatgataaa 780
35 gaaaagagta tgtatcaaac tctagatgat agagcaagaa acatgtataa atctttagat 840
gaaaaagaaa agtctatata tgaaatctta gataataaag tacaggaaat agaaagcaga 900
ttatctctta ttgattctaa attgaatgat gatataactt ctaacttaga aaatctatat 960

gatatgctaa atgaagcagt agctaaatat gatgaagaga taaaaaatat tgagcattat 1020
 agattagatg agaataataa gattttagat gatattgata atgtaggaaa agaaataaga 1080
 tcttctatg aaaattattc taagcttata gaagagggtt ataataattc tcttaattca 1140
 ttaaaagatt attctaattc tattaagat gagatagaaa aatcaagaga agaaacagaa 1200
 5 gaaagacact tgtctagtg gagagaatat attgatgagt attgaaagg atattcagaa 1260
 aaattagaat ctcaagtatc tgataagata aatatattga atgatgctaa aactgattta 1320
 gataatatgt taaaatcttc tttgatgat ttagaagcaa gatttaatga atctatgact 1380
 aagtttgaag aatcttcaaa taacagagta ttcaaaactt tacaagatat agagaaaaaa 1440
 gctgatgatg taatttatgg aaacaattat atctacaaga tagaagataa agtaaaagac 1500
 10 ttctatggta aaatagatac taaactactt cattttgctg atagatatga tactttagag 1560
 aaaaagatat atgatttga gagcaatcaa aattatatat tcagactcga agataaaatt 1620
 agagatttga atgaaaagct agatgataga ataacaaatg ttaatgaaag atatgataat 1680
 ttaagaaaat ctttgatga taaatttgtt catatagaaa gtgctgtatt gaataatgag 1740
 caagttcaga aattgagaga tgatttcatt atttcaaag atgatgtatt gaaagctaat 1800
 15 agagataata taccagagct attcaataaa gaaaaagaaa aatttgaaga gttatttaat 1860
 tcgttcgcta atgatataat atctaaatta gatacttcta atgctaatat agaagagttc 1920
 aaaaatacta tgtatgatga aaagaattct atattagaaa atatggaatc atttagatat 1980
 gagttagatg aattaaagaa caatgattct attgaagctt tagaagctga gaaagctaga 2040
 ttagaagata cttcaattc ttcagagaa gaatttgaag gactttatga ttggaaagt 2100
 20 gaagtttata attgaaaag taatttagat ggtgttgatt ctaatttaag aagcgatgtt 2160
 gataaattat ttgatgaagt ttctgagttt aaatatgctt tagaagaaaa aatagatat 2220
 ttagaagata atacagttc tagagattta tttgatgatg acagagaaaa attatattct 2280
 ttatatgatg aactgaagc aggaaataaa gactttaag attaatgga taagagaata 2340
 agttatttg aagatacttg gtctgacct aataaggctt taaaacttta tgaaaatgct 2400
 25 ttaacacctg aagtagataa ttgaaatct gaaatacttt ctaatgtaa agatcaagta 2460
 aatgaaatag aaaagaactt atctgtttgg aaagatgata attgtctct tcttttagag 2520
 caattaaaag aggctaaaga aaatatcgat aactttatag aaagtctaa agacaagaag 2580
 aatggtatta ttccaaaat gatattctt ataaaagagg aaatattagg caaagaaagt 2640
 gagataaata ctgctcttga agaaaaactt tcttctgtta atgaaagaat tgctgattta 2700
 30 gaaaatagat taacttctga tgtagcaga ttaataata tgatatctga agcagttgat 2760
 aaatatgaag atgagcttaa gaatatagaa tcttatagat tagaagaaaa tgaatctata 2820
 atgagaaatt tggaagatat tggaagaaat ataattcaa attatgataa ttattctaaa 2880
 atgctagatt ctgtttatga gaataataaa aatgctttag atgagtattc aaacagctta 2940
 agaatagaaa tagaaaaagc tagagttgat actaataaag gttatataga tgaatatttg 3000
 35 agtgaatatt ctctaaagt agaggctgat ataaaagaaa gactagaaga gcttgagaaa 3060
 aataaatata atttagatgt tatgataaat gattcattta ataattgaa tcaaagtatt 3120
 aataatgcag tatctaaaat gatagaagat tctgattcta aattaagaga tgttatagat 3180

aatttagaag ttcagataaa tgatcttata gctaataaag aagaagaaat agttagcaga 3240
 atatcagctt atgaaacaga tctaaaaaat gaacagtatt cttcacttga agatattaaa 3300
 aatgagttat taggtcttta taatgagttt aaagagaatg ttaattatga taatttgaaa 3360
 gatatactg aaaaattaga tagtatagaa acttcattgt tagaagttaa tactcaatta 3420
 5 gaaaataaag ctaaagatat ttctgataga atagatttag aaaaagaaga attatatgct 3480
 tctgttaata aattgtcttc agaatttgaa gatttcaa at caaatataga tgacagattc 3540
 aaaactcaag taagcgattt tgtatcta at aatgagcata tattatcact ctttggtgaa 3600
 tatagtgaga aaatttcttc tgtaactaat atattggaag acatagaaaa tgttaaagta 3660
 tctttaattg aagaaataaa taaagtaaaa gaagaaatag ataataaata tcaagtcctt 3720
 10 actaaagatt ttgataaatc aatagatgat ataaaagatg ctgtattaga taagaataat 3780
 atacttcaat attatataaa tgaaaaagaa ttgttatgga aagagattga tgcttgaaa 3840
 gctacttttg cttcaatgaa agataatata ttgaatgcta atgaagcagt tgctaaatat 3900
 gctccttcta tcattgatag tgagaaagtt cgtatacagt ctgttataga cgatgtattt 3960
 gaaactttaa gtgctaaaa at aaataataat gaagacagta ttctaattt agaattctt 4020
 15 ttctctgaat ataaatctct tatatcagat gctatagacg gatttaaaga tgaaatttct 4080
 tctataagaa atagtaataa ctatgatgat ttaattgaag agagaaatag attggaagaa 4140
 tcatttaatt ctcttaaaga tgatttctca aaaatagaag atttggaaaa agatttacet 4200
 cttgttaaag ctaagttaaa aggtgatgac agcagcttga ttgatgaagt tatgagactt 4260
 tctgatgagc ttgaaatctt gaaagataat gtatcaaata tgaataatac agataataat 4320
 20 gtaaatgata ataatgatat tgatgctatt tatgaagatt tcaaacagtt aaatgaaagt 4380
 ttagaatcat tcaaagaaac tgttattcct caattatcta ctttagtaa attggaagat 4440
 aagatatcag aaaatagaga ggaaatctat aaatatatca atagtataat gtattcttta 4500
 cctgaagctt atataagcag agaagagata tctaatttag aaaataaatt atatgatata 4560
 ttaataaact tcaatgacgg catagtatct ataaagaatg atttagtttt ctatatagag 4620
 25 aaagacacta aagatttcaa agatagaata gaaaagaaga atagagttct t 4671

<210> 6

<211> 1557

<212> PRT

30 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 6

Met Ser Asp Val Asp Val Leu Leu Lys Asp Glu Val Lys Ala Leu Ser

1 5 10 15

35 Ser Arg Leu Ser Asp Phe Glu Glu Arg Ile Lys Asp Asp Ile Val Arg

20 25 30

Asp Leu Asp Glu Tyr Ser Ile Glu Leu Asn Asn Leu Thr Asp Asn Val

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

Ile Glu His Tyr Arg Leu Asp Glu Asn Asn Lys Ile Leu Asp Asp Ile
 340 345 350
 Asp Asn Val Gly Lys Glu Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Asn Tyr Ser Lys
 355 360 365
 5 Leu Ile Glu Glu Val Tyr Asn Asn Ser Leu Asn Ser Leu Lys Asp Tyr
 370 375 380
 Ser Asn Ser Ile Lys Asp Glu Ile Glu Lys Ser Arg Glu Glu Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Arg His Leu Ser Ser Glu Arg Glu Tyr Ile Asp Glu Tyr Leu Lys
 10 405 410 415
 Gly Tyr Ser Glu Lys Leu Glu Ser Gln Val Ser Asp Lys Ile Asn Ile
 420 425 430
 Leu Asn Asp Ala Lys Thr Asp Leu Asp Asn Met Leu Lys Ser Ser Phe
 435 440 445
 15 Asp Asp Leu Glu Ala Arg Phe Asn Glu Ser Met Thr Lys Phe Glu Glu
 450 455 460
 Ser Ser Asn Asn Arg Val Phe Lys Thr Leu Gln Asp Ile Glu Lys Lys
 465 470 475 480
 Ala Asp Asp Val Ile Tyr Gly Asn Asn Tyr Ile Tyr Lys Ile Glu Asp
 20 485 490 495
 Lys Val Lys Asp Phe Tyr Gly Lys Ile Asp Thr Lys Leu Leu His Phe
 500 505 510
 Ala Asp Arg Tyr Asp Thr Leu Glu Lys Lys Ile Tyr Asp Leu Glu Ser
 515 520 525
 25 Asn Gln Asn Tyr Ile Phe Arg Leu Glu Asp Lys Ile Arg Asp Leu Asn
 530 535 540
 Glu Lys Leu Asp Asp Arg Ile Thr Asn Val Asn Glu Arg Tyr Asp Asn
 545 550 555 560
 Leu Arg Lys Ser Phe Asp Asp Lys Phe Val His Ile Glu Ser Ala Val
 30 565 570 575
 Leu Asn Asn Glu Gln Val Gln Lys Leu Arg Asp Asp Phe Ile Ile Phe
 580 585 590
 Lys Asp Asp Val Leu Lys Ala Asn Arg Asp Asn Ile Pro Glu Leu Phe
 595 600 605
 35 Asn Lys Glu Lys Glu Lys Phe Glu Glu Leu Phe Asn Ser Phe Ala Asn
 610 615 620
 Asp Ile Ile Ser Lys Leu Asp Thr Ser Asn Ala Asn Ile Glu Glu Phe

625 630 635 640
 Lys Asn Thr Met Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Ile Leu Glu Asn Met Glu
 645 650 655
 Ser Phe Arg Tyr Glu Leu Asp Glu Leu Lys Asn Asn Asp Ser Ile Glu
 5 660 665 670
 Ala Leu Glu Ala Glu Lys Ala Arg Leu Glu Asp Thr Phe Asn Ser Phe
 675 680 685
 Arg Glu Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Asp Leu Glu Ser Glu Val Tyr Asn
 690 695 700
 10 Leu Lys Ser Asn Leu Asp Gly Val Asp Ser Asn Leu Arg Ser Asp Val
 705 710 715 720
 Asp Lys Leu Phe Asp Glu Val Ser Glu Phe Lys Tyr Ala Leu Glu Glu
 725 730 735
 Lys Ile Asp Ile Leu Glu Asp Asn Thr Val Ser Arg Asp Leu Phe Asp
 15 740 745 750
 Asp Asp Arg Glu Lys Leu Tyr Ser Leu Tyr Asp Glu Leu Glu Ala Gly
 755 760 765
 Asn Lys Asp Phe Lys Asp Leu Met Asp Lys Arg Ile Ser Tyr Phe Glu
 770 775 780
 20 Asp Thr Trp Ser Asp Pro Asn Lys Ala Leu Lys Leu Tyr Glu Asn Ala
 785 790 795 800
 Leu Thr Pro Glu Val Asp Asn Leu Lys Ser Glu Ile Leu Ser Asn Val
 805 810 815
 Lys Asp Gln Val Asn Glu Ile Glu Lys Asn Leu Ser Val Trp Lys Asp
 25 820 825 830
 Asp Asn Leu Ser Leu Leu Leu Glu Gln Leu Lys Glu Ala Lys Glu Asn
 835 840 845
 Ile Asp Asn Phe Ile Glu Ser Ser Lys Asp Lys Lys Asn Gly Ile Ile
 850 855 860
 30 Ala Lys Met Ile Ser Ser Ile Lys Glu Glu Ile Leu Gly Lys Glu Ser
 865 870 875 880
 Glu Ile Asn Thr Arg Leu Glu Glu Lys Leu Ser Ser Val Asn Glu Arg
 885 890 895
 Ile Ala Asp Leu Glu Asn Arg Leu Thr Ser Asp Val Ser Arg Phe Asn
 35 900 905 910
 Asn Met Ile Ser Glu Ala Val Asp Lys Tyr Glu Asp Glu Leu Lys Asn
 915 920 925

Ile Glu Ser Tyr Arg Leu Glu Glu Asn Glu Ser Ile Met Arg Asn Leu
 930 935 940
 Glu Asp Ile Gly Arg Asn Ile Ile Ser Asn Tyr Asp Asn Tyr Ser Lys
 945 950 955 960
 5 Met Leu Asp Ser Val Tyr Glu Asn Asn Lys Asn Ala Leu Asp Glu Tyr
 965 970 975
 Ser Asn Ser Leu Arg Ile Glu Ile Glu Lys Ala Arg Val Asp Thr Asn
 980 985 990
 Lys Gly Tyr Ile Asp Glu Tyr Leu Ser Glu Tyr Ser Ser Lys Val Glu
 10 995 1000 1005
 Ala Asp Ile Lys Glu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys Asn Lys Tyr Asn
 1010 1015 1020
 Leu Asp Val Met Ile Asn Asp Ser Phe Asn Asn Leu Asn Gln Ser Ile
 1025 1030 1035 1040
 15 Asn Asn Ala Val Ser Lys Met Ile Glu Asp Ser Asp Ser Lys Leu Arg
 1045 1050 1055
 Asp Val Ile Asp Asn Leu Glu Val Gln Ile Asn Asp Leu Ile Ala Asn
 1060 1065 1070
 Lys Glu Glu Glu Ile Val Ser Arg Ile Ser Ala Tyr Glu Thr Asp Leu
 20 1075 1080 1085
 Lys Asn Glu Gln Tyr Ser Ser Leu Glu Asp Ile Lys Asn Glu Leu Leu
 1090 1095 1100
 Gly Leu Tyr Asn Glu Phe Lys Glu Asn Val Asn Tyr Asp Asn Leu Lys
 1105 1110 1115 1120
 25 Asp Ile Ser Glu Lys Leu Asp Ser Ile Glu Thr Ser Leu Leu Glu Val
 1125 1130 1135
 Asn Thr Gln Leu Glu Asn Lys Ala Lys Asp Ile Ser Asp Arg Ile Asp
 1140 1145 1150
 Leu Glu Lys Glu Glu Leu Tyr Ala Ser Val Asn Lys Leu Ser Ser Glu
 30 1155 1160 1165
 Phe Glu Asp Phe Lys Ser Asn Ile Asp Asp Arg Phe Lys Thr Gln Val
 1170 1175 1180
 Ser Asp Phe Val Ser Asn Asn Glu His Ile Leu Ser Leu Phe Gly Glu
 1185 1190 1195 1200
 35 Tyr Ser Glu Lys Ile Ser Ser Val Thr Asn Ile Leu Glu Asp Ile Glu
 1205 1210 1215
 Asn Val Lys Val Ser Leu Ile Glu Glu Ile Asn Lys Val Lys Glu Glu

	1220	1225	1230
	Ile Asp Asn Lys Tyr Ser Ser Leu Thr Lys Asp Phe Asp Lys Ser Ile		
	1235	1240	1245
	Asp Asp Ile Lys Asp Ala Val Leu Asp Lys Asn Asn Ile Leu Gln Tyr		
5	1250	1255	1260
	Tyr Ile Asn Glu Lys Glu Leu Leu Trp Lys Glu Ile Asp Ala Leu Lys		
	1265	1270	1275
	Ala Thr Phe Ala Ser Met Lys Asp Asn Ile Leu Asn Ala Asn Glu Ala		
	1285	1290	1295
10	Val Ala Lys Tyr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Ser Glu Lys Val Arg Ile		
	1300	1305	1310
	Gln Ser Val Ile Asp Asp Val Phe Glu Thr Leu Ser Ala Lys Ile Asn		
	1315	1320	1325
	Asn Asn Glu Asp Ser Ile Ser Asn Leu Glu Ser Ser Phe Ser Glu Tyr		
15	1330	1335	1340
	Lys Ser Leu Ile Ser Asp Ala Ile Asp Gly Phe Lys Asp Glu Ile Ser		
	1345	1350	1355
	Ser Ile Arg Asn Ser Asn Asn Tyr Asp Asp Leu Ile Glu Glu Arg Asn		
	1365	1370	1375
20	Arg Leu Glu Glu Ser Phe Asn Ser Leu Lys Asp Asp Phe Ser Lys Ile		
	1380	1385	1390
	Glu Asp Leu Glu Lys Asp Leu His Leu Val Lys Ala Lys Leu Lys Gly		
	1395	1400	1405
	Asp Asp Ser Ser Leu Ile Asp Glu Val Met Arg Leu Ser Asp Glu Leu		
25	1410	1415	1420
	Glu Ile Leu Lys Asp Asn Val Ser Asn Met Asn Asn Thr Asp Asn Asn		
	1425	1430	1435
	Val Asn Asp Asn Asn Asp Ile Asp Ala Ile Tyr Glu Asp Phe Lys Gln		
	1445	1450	1455
30	Leu Asn Glu Ser Leu Glu Ser Phe Lys Glu Thr Val Ile Pro Gln Leu		
	1460	1465	1470
	Ser Thr Phe Ser Lys Leu Glu Asp Lys Ile Ser Glu Asn Arg Glu Glu		
	1475	1480	1485
	Ile Tyr Lys Tyr Ile Asn Ser Ile Met Tyr Ser Leu Pro Glu Ala Tyr		
35	1490	1495	1500
	Ile Ser Arg Glu Glu Ile Ser Asn Leu Glu Asn Lys Leu Tyr Asp Ile		
	1505	1510	1515
			1520

Phe Asn Asn Phe Asn Asp Gly Ile Val Ser Ile Lys Asn Asp Leu Val

1525

1530

1535

Phe Tyr Ile Glu Lys Asp Thr Lys Asp Phe Lys Asp Arg Ile Glu Lys

1540

1545

1550

5 Lys Asn Arg Val Leu

1555

<210> 7

10 <211> 2256

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 7

15 atgaaaaata ctattttaaa aattttaat aaaagagttt taatatttac acttggttt 60
 gaaatcattg ttattgtaat gacatccatg ttgggtgctc aggatatatc attacaaaag 120
 aatattatat caaaaaataa aatcaattat ggtacggcat tagaacttca taatagagga 180
 aaatatttag aggcttataa tcaatttaca aatatcatga atacagaaga tgatatgac 240
 attagagatt atactatata ttacggagct aaaagtgcct tgctaactaa tatgtataat 300
 20 gaagcaatag atttatatgc ctactaatg aaagaatgc cgcggtcatc attatatcct 360
 tatgcagagc aatataaggc tcttctgag ttatatagag atgattatcc tataagcaat 420
 tttttaatg gtaaacttca aaaatggatt aaagaatttg ttggaataag agctttaaga 480
 gatactgatg ataccaataa ggctagaatg atagcttatg aactttaaa cagattcgga 540
 ttaagcgaag ctgctatata ttataataat aatttcctg aagatatttc atctttcca 600
 25 aataatttaa aatttaaaac agcaaccata cttatgaag caggatatag aaaagcatct 660
 ttaaagcatt tcagttatt atagtataat aatgcttata aagcaagtc tacatattat 720
 atggctagaa taaacagaa gtctggagac agaagagatg ctgcggcttt attcgatgag 780
 tatttatcaa atcttaacaa taaatctcat agaagattag gtctttacta ttctgcagat 840
 aattataata gattaacaaa ttatgaaaaa tcaatagaac ttataatac tttttgaaa 900
 30 gaatatccta gagatgatta tgttcctaga atatataata gttttgttac ttgagtttg 960
 aatagaaata atttagttca ggcaaaaact tatcttacta atgtaatgaa gagatttcct 1020
 aaaagcagat atacagagct tgcattaaaa tcatatttaa gaaaggcatt caaattaaat 1080
 aataaaacag aaacttatt tgctactaag gctttagaag caagatatcc tagtttcaga 1140
 catgattttg cattatcttg gaatatgtgg actgctgaag agtttgaga tattgaaaaa 1200
 35 agagatgaat attaatgaa aacacttctt acaagtaaaa gccattattt tataaaaggt 1260
 gctttgagtc ttgccaataa tgaaatgata gctaattgtc agcttagcaa tacttattat 1320
 ttaaatgaag ctaaaagata ttatgctgat tctaatttta cttaatctat gcagatgctt 1380

aataagatac aattttaaa ttatattgct acaggtaaag aagataatat aacaagagag 1440
gctagggcat tggctaaaaa tattcttatg cataatagat ttgtaaaaga ttatatacgc 1500
aatagaagcg aggatgattt atttaatgaa ttatcacttc agactagaag agaagttaat 1560
aaagcaataa tattatacta ttatggcgat tatgataatg catatactga attcgataaa 1620
5 atatttaaaa agacacaggt aacatatacct ttattttatt ttgctgaaaa aatatttaaa 1680
gattcaggaa atacaaaaag gcttatacaa gtatcagcaa atataggaaa atattttgga 1740
tatccttaca gtgataatgt tgatttgctt cctgatgagt ttagaaagag agtttatcct 1800
agatattttg atgaatatgt tgtacctgaa gctaaatatt ataaaataga gcctgctttt 1860
gtatatgcta taatgcgtga agaaagttta ttgataccta aagctaaatc ttgggttgga 1920
10 gctatgggac ttatgcagtt aatgcctaca acagcagcag ctgaaaataa aaaggcaaga 1980
tatagatata atcctttaga ttaacagat cctaagcaga atattaattt aggagtttct 2040
catttaggct gggtattcag cagtcaaaag gctagcaatt atatattagt agcagcaagt 2100
tataatgcag gttcaggacg cggaagaaga tggaaagcag agtatggtac taataatatg 2160
tatcgtacag gaagattcat tgatattgaa gaaactgaat attatgtaga gagagttatt 2220
15 aaaagctatg aatattacag caagtattat aaggac 2256

<210> 8
<211> 752
<212> PRT
20 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 8
Met Lys Asn Thr Ile Leu Lys Ile Phe Asn Lys Arg Val Leu Ile Phe
1 5 10 15
25 Thr Leu Cys Phe Glu Ile Ile Val Ile Val Met Thr Ser Met Leu Gly
20 25 30
Ala Gln Asp Ile Ser Leu Gln Lys Asn Ile Ile Ser Lys Asn Lys Ile
35 40 45
Asn Tyr Gly Thr Ala Leu Glu Leu His Asn Arg Gly Lys Tyr Leu Glu
30 50 55 60
Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Asn Ile Met Asn Thr Glu Asp Asp Met Ile
65 70 75 80
Ile Arg Asp Tyr Thr Ile Tyr Tyr Gly Ala Lys Ser Ala Leu Leu Thr
85 90 95
35 Asn Met Tyr Asn Glu Ala Ile Asp Leu Tyr Ala Leu Leu Met Lys Glu
100 105 110
Tyr Pro Arg Ser Ser Leu Tyr Pro Tyr Ala Glu Gln Tyr Lys Ala Leu

115 120 125
 Ser Glu Phe Tyr Arg Asp Asp Tyr Pro Ile Ser Asn Phe Phe Asn Gly
 130 135 140
 Lys Ser Gln Lys Trp Ile Lys Glu Phe Val Gly Ile Arg Ala Leu Arg
 5 145 150 155 160
 Asp Thr Asp Asp Thr Asn Lys Ala Arg Met Ile Ala Tyr Glu Leu Leu
 165 170 175
 Asn Arg Phe Gly Leu Ser Glu Ala Ala Ile Tyr Tyr Asn Asn Asn Phe
 180 185 190
 10 Pro Glu Asp Ile Ser Ser Phe Pro Asn Asn Leu Lys Phe Lys Thr Ala
 195 200 205
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ala Gly Tyr Arg Lys Ala Ser Leu Lys His Phe
 210 215 220
 Gln Tyr Leu Tyr Asp Asn Asn Ala Tyr Lys Ala Ser Ser Thr Tyr Tyr
 15 225 230 235 240
 Met Ala Arg Ile Lys Gln Lys Ser Gly Asp Arg Arg Asp Ala Ala Ala
 245 250 255
 Leu Phe Asp Glu Tyr Leu Ser Asn Leu Asn Asn Lys Ser His Arg Arg
 260 265 270
 20 Leu Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala Asp Asn Tyr Asn Arg Leu Lys Asn Tyr
 275 280 285
 Glu Lys Ser Ile Glu Leu Tyr Asn Thr Phe Leu Lys Glu Tyr Pro Arg
 290 295 300
 Asp Asp Tyr Val Pro Arg Ile Tyr Asn Ser Phe Val Thr Leu Ser Leu
 25 305 310 315 320
 Asn Arg Asn Asn Leu Val Gln Ala Lys Thr Tyr Leu Thr Asn Val Met
 325 330 335
 Lys Arg Phe Pro Lys Ser Arg Tyr Thr Glu Leu Ala Leu Lys Ser Tyr
 340 345 350
 30 Leu Arg Lys Ala Phe Lys Leu Asn Asn Lys Thr Glu Thr Tyr Phe Ala
 355 360 365
 Thr Lys Ala Leu Glu Ala Arg Tyr Pro Ser Phe Arg His Asp Phe Ala
 370 375 380
 Leu Ser Trp Asn Met Trp Thr Ala Glu Glu Phe Gly Asp Ile Glu Lys
 35 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Tyr Leu Met Lys Thr Leu Leu Thr Ser Lys Ser His Tyr
 405 410 415

Phe Ile Lys Gly Ala Leu Ser Leu Ala Asn Asn Glu Met Ile Ala Asn
 420 425 430
 Val Gln Leu Ser Asn Thr Tyr Tyr Leu Asn Glu Ala Lys Arg Tyr Tyr
 435 440 445
 5 Ala Asp Ser Asn Phe Thr Lys Ser Met Gln Met Leu Asn Lys Ile Gln
 450 455 460
 Phe Leu Asn Tyr Ile Ala Thr Gly Lys Glu Asp Asn Ile Thr Arg Glu
 465 470 475 480
 Ala Arg Ala Leu Ala Lys Asn Ile Leu Met His Asn Arg Phe Val Lys
 10 485 490 495
 Asp Leu Tyr Ala Asn Arg Ser Glu Asp Asp Leu Phe Asn Glu Leu Ser
 500 505 510
 Leu Gln Thr Arg Arg Glu Val Asn Lys Ala Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr
 515 520 525
 15 Gly Asp Tyr Asp Asn Ala Tyr Thr Glu Phe Asp Lys Ile Phe Lys Lys
 530 535 540
 Thr Gln Val Thr Tyr Pro Leu Phe Tyr Phe Ala Glu Lys Ile Phe Lys
 545 550 555 560
 Asp Ser Gly Asn Thr Lys Arg Leu Ile Gln Val Ser Ala Asn Ile Gly
 20 565 570 575
 Lys Tyr Phe Gly Tyr Pro Tyr Ser Asp Asn Val Asp Leu Leu Pro Asp
 580 585 590
 Glu Phe Arg Lys Arg Val Tyr Pro Arg Tyr Phe Asp Glu Tyr Val Val
 595 600 605
 25 Pro Glu Ala Lys Tyr Tyr Lys Ile Glu Pro Ala Phe Val Tyr Ala Ile
 610 615 620
 Met Arg Glu Glu Ser Leu Phe Asp Pro Lys Ala Lys Ser Trp Val Gly
 625 630 635 640
 Ala Met Gly Leu Met Gln Leu Met Pro Thr Thr Ala Ala Ala Glu Asn
 30 645 650 655
 Lys Lys Ala Arg Tyr Arg Tyr Asn Pro Leu Asp Leu Thr Asp Pro Lys
 660 665 670
 Gln Asn Ile Asn Leu Gly Val Ser His Leu Gly Trp Leu Phe Ser Ser
 675 680 685
 35 Gln Lys Ala Ser Asn Tyr Ile Leu Val Ala Ala Ser Tyr Asn Ala Gly
 690 695 700
 Ser Gly Arg Gly Arg Arg Trp Lys Ala Glu Tyr Gly Thr Asn Asn Met

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

30
<210> 11
<211> 3129
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

35
<400> 11
atgattgaag aagaaagaag acaggttgct gaaatgtttg aaagcataca aaatgattct 60

atagatactg atttgagata tcttacagat tcattcagag atgatatcat aaaagtattt 120
 gaagaatcta atgatgagtt cagaaaacgt gtagaagcta gaatagttca tttgaagat 180
 gcttatgctt cacctgatag aataaaagaa ttctataaag atgctatact ttctgaagtg 240
 gacagcttga gaagtgatgc agaacagata cttatagatt taaatgataa ggtagaaaat 300
 5 gcaaaagaac agatagaagt attagaaaat gatagagtaa aagacataat caataaaaata 360
 gatgaagcag aaaatgatat taattcttta ataaatacta taaaagctaa tattaaagaa 420
 caagaaaatg agcttagaat gttgagccaa tctcagaaac atatatctca ggaagtagag 480
 actgttcgca gagagagaga agctcttatg gatatggta aaaactctga tataaatata 540
 agaaacaagc ttgacagttt aacaagtgtc gtatcagaag ctgcagagat tgcttcatct 600
 10 aagatagctg aaaaagaagc agcattcagc agtaaagtta aagaagctga agaatatatt 660
 aattcattgt ctgatagaat tacattagaa aataacagtg ctttagataa agctagagaa 720
 gatattaata atttagttgc ttcttcaat gaatcagtta taaaagagac taatgatttg 780
 gcacctcata taactaatc agttcagaat ttcatata atgaaatgaa aaaatttgat 840
 aaattctcag atgttagaag tgctatagaa ggcattgaga atgatattaa taacaagata 900
 15 actgaagcat tcaataatat gaacaaagaa cttgaagata atattgttga attagaaaag 960
 aaaatagata catatcagga agagttatc agtgaattaa agatgtctgt aaatgtagag 1020
 ggtgaaaaag ctgttgatga aattaagtct ttacataatg atgaagttgc taaattaaaa 1080
 gagatgtatt taactactga aaaattctat acagatagac aagagaaaaa ccatgaagac 1140
 ttctcaaaat tatttgaaga aactataaa gactataatg aaaaaataga atcattatat 1200
 20 gctcaattag atgatactaa acttcaaata agtacttctg ttgaagatgt tgttgctgat 1260
 ttgaagcagg ctttaagcat aaaagatgag ttcttaactt cagttgaaaa taataaagaa 1320
 aaactgaag ctgttgaaga gcaaatgaat aatttacaga atgaattgc tccttcagta 1380
 gaaaaattga aagacataat agaagaaaag gcattagaat tacaagagaa aatcaatgaa 1440
 tacttcaag atatagaact tcaaggagat aagttcaatt ctagattgga agagttatct 1500
 25 aataatgcta aatctactat agaagataag gtaactgaat ttgattctat aatagaaaat 1560
 atttctaata aaatggatac ttattagaa gaaaagaatt cagagttcga tgcattaaaa 1620
 gcacattatg aaggacttgc agaattcattg acagcattga aagatactat atcagaagca 1680
 gttaatgaaa gaatagaaga agcaaatagc attatagagg aaaatgttca gactatagaa 1740
 gaatcagcta atgaaaaata tgaaaaatac atagcaagac ttaattctaa ttagaacaa 1800
 30 acattgtctc tttaaatgaa cgatgctaaa gaacatatat agaaagctaa agatgaaata 1860
 attaaagctc atactgataa tttagatgag tatgatcaga gaattacaaa tatgaaagat 1920
 attgtttcag ctttagaaga agatataact aaatattctt ctgagataga tgcaagactt 1980
 gaaagtatta atttaagcta tgatgaaaaa acaaatgtta tacttaaaga tttgaaaat 2040
 agaactgatg atttgaatt gaaattaaat gatgcactctg aatctattga caaatgctt 2100
 35 gatttaaaaa ctaatgatat ttcttagag tatgaggcta tgaaatcaaa aatagatgat 2160
 atagctaaag atatagaaaa atacatgaat actgttaaag tatttgataa tgctaaagaa 2220
 atggcagatt ctataagaga tgacgtttct aagtgaatg ctttggttga ggatactaaa 2280

gctacaacaa ttgaaatgaa taagactatg tccgaatttg atagcttaaa gaaaatgcat 2340
caggaaatat taggatatgc agaaagtctt aaaaaggaaa aagacagctt gaaagatact 2400
caggaaaaag taaatatgtt aatggaaatg tctggtgaaa ttcaagagag attcgtaat 2460
atagcagaaa\ataatgctat gatagagcat gctgaggaag gaatacaggt tgttatagat 2520
5 atagcatctc aaatagaaaa taaactttca ttcattaagg ataaggaaga gtatgcagat 2580
gatatattac agcaaataag aaaagctgaa gtagaaaccg aaactathtt agaaagagta 2640
gatagtataa aagaagctat ggttgaagtt gaagatacta gaaagaactt tatggataag 2700
atttattctt tagaaagaga tatggctaaa atagataaga atgataaaaa agttcagttg 2760
tttatttcta aattagaaga gataaatgat ataatagatg ccatacagga tcaaagagaa 2820
10 aatcttgttc gtatgaagaa tcagtatgat gattatgata agaacatagt taagaatttg 2880
gaaagagctg aatattttgt aagatattta gagactttac tagataatgc tgataaatat 2940
atgtctgata aaggttctaa gacttctaaa aaaggaacag ctgctaaaat agatagtaag 3000
aaagaagagt ttataattag aatgtataaa gaaggttgga aaccagatga gatagttaaa 3060
aatagttcat attcaagaga tgaagtgaa agaactataa aagcatggaa agataagcaa 3120
15 tccagagga 3129

<210> 12
<211> 1043
<212> PRT
20 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 12
Met Ile Glu Glu Glu Arg Arg Gln Val Ala Glu Met Phe Glu Ser Ile
1 5 10 15
25 Gln Asn Asp Ser Ile Asp Thr Asp Leu Arg Tyr Leu Thr Asp Ser Phe
20 25 30
Arg Asp Asp Ile Ile Lys Val Phe Glu Glu Ser Asn Asp Glu Phe Arg
35 40 45
Lys Arg Val Glu Ala Arg Ile Val His Phe Glu Asp Ala Tyr Ala Ser
30 50 55 60
Pro Asp Arg Ile Lys Glu Phe Tyr Lys Asp Ala Ile Leu Ser Glu Val
65 70 75 80
Asp Ser Leu Arg Ser Asp Ala Glu Gln Ile Leu Ile Asp Leu Asn Asp
85 90 95
35 Lys Val Glu Asn Ala Lys Glu Gln Ile Glu Val Leu Glu Asn Asp Arg
100 105 110
Val Lys Asp Ile Ile Asn Lys Ile Asp Glu Ala Glu Asn Asp Ile Asn

115 120 125
 Ser Leu Ile Asn Thr Ile Lys Ala Asn Ile Lys Glu Gln Glu Asn Glu
 130 135 140
 Leu Arg Met Leu Ser Gln Ser Gln Lys His Ile Ser Gln Glu Val Glu
 5 145 150 155 160
 Thr Val Arg Arg Glu Arg Glu Ala Leu Met Asp Met Val Lys Asn Ser
 165 170 175
 Asp Ile Asn Ile Arg Asn Lys Leu Asp Ser Leu Thr Ser Ala Val Ser
 180 185 190
 10 Glu Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ser Lys Ile Ala Glu Lys Glu Ala Ala
 195 200 205
 Phe Ser Ser Lys Val Lys Glu Ala Glu Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Ser
 210 215 220
 Asp Arg Ile Thr Leu Glu Asn Asn Ser Ala Leu Asp Lys Ala Arg Glu
 15 225 230 235 240
 Asp Ile Asn Asn Leu Val Ala Ser Phe Asn Glu Ser Val Ile Lys Glu
 245 250 255
 Thr Asn Asp Leu Ala Pro His Ile Thr Asn Thr Val Gln Asn Phe Ile
 260 265 270
 20 Asn Asn Glu Met Lys Lys Phe Asp Lys Phe Ser Asp Val Arg Ser Ala
 275 280 285
 Ile Glu Gly Ile Glu Asn Asp Ile Asn Asn Lys Ile Thr Glu Ala Phe
 290 295 300
 Asn Asn Met Asn Lys Glu Leu Glu Asp Asn Ile Val Glu Phe Arg Lys
 25 305 310 315 320
 Lys Ile Asp Thr Tyr Gln Glu Glu Phe Ile Ser Glu Leu Lys Met Ser
 325 330 335
 Val Asn Val Glu Gly Glu Lys Ala Val Asp Glu Ile Lys Ser Leu His
 340 345 350
 30 Asn Asp Glu Val Ala Lys Leu Lys Glu Met Tyr Leu Thr Thr Glu Lys
 355 360 365
 Phe Tyr Thr Asp Arg Gln Glu Lys Asn His Glu Asp Phe Ser Lys Leu
 370 375 380
 Phe Glu Glu Thr Tyr Lys Asp Tyr Asn Glu Lys Ile Glu Ser Leu Tyr
 35 385 390 395 400
 Ala Gln Leu Asp Asp Thr Lys Leu Gln Ile Ser Thr Ser Val Glu Asp
 405 410 415

Val Val Ala Asp Leu Lys Gln Ala Leu Ser Ile Lys Asp Glu Phe Leu
 420 425 430
 Thr Ser Val Glu Asn Asn Lys Glu Lys Leu Glu Ala Val Glu Glu Gln
 435 440 445
 5 Met Asn Asn Leu Gln Asn Glu Phe Ala Pro Ser Val Glu Lys Leu Lys
 450 455 460
 Asp Ile Ile Glu Glu Lys Ala Leu Glu Leu Gln Glu Lys Ile Asn Glu
 465 470 475 480
 Tyr Ser Gln Asp Ile Glu Leu Gln Gly Asp Lys Phe Asn Ser Arg Leu
 10 485 490 495
 Glu Glu Leu Ser Asn Asn Ala Lys Ser Thr Ile Glu Asp Lys Val Thr
 500 505 510
 Glu Phe Asp Ser Ile Ile Glu Asn Ile Ser Asn Lys Met Asp Thr Leu
 515 520 525
 15 Leu Glu Glu Lys Asn Ser Glu Phe Asp Ala Leu Lys Ala His Tyr Glu
 530 535 540
 Gly Leu Ser Glu Ser Leu Thr Ala Leu Lys Asp Thr Ile Ser Glu Ala
 545 550 555 560
 Val Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ala Asn Ser Ile Ile Glu Glu Asn Val
 20 565 570 575
 Gln Thr Ile Glu Glu Ser Ala Asn Glu Lys Tyr Glu Lys Tyr Ile Ala
 580 585 590
 Arg Leu Asn Ser Asn Leu Glu Gln Thr Leu Ser Leu Leu Met Asn Asp
 595 600 605
 25 Ala Lys Glu His Ile Gln Lys Ala Lys Asp Glu Ile Ile Lys Ala His
 610 615 620
 Thr Asp Asn Leu Asp Glu Tyr Asp Gln Arg Ile Thr Asn Met Lys Asp
 625 630 635 640
 Ile Val Ser Ala Leu Glu Glu Asp Ile Thr Lys Tyr Ser Ser Glu Ile
 30 645 650 655
 Asp Ala Arg Leu Glu Ser Ile Asn Leu Ser Tyr Asp Glu Lys Thr Asn
 660 665 670
 Val Ile Leu Lys Asp Phe Glu Asn Arg Thr Asp Asp Leu Lys Leu Lys
 675 680 685
 35 Leu Asn Asp Ala Ser Glu Ser Ile Asp Lys Met Leu Asp Leu Lys Thr
 690 695 700
 Asn Asp Ile Ser Leu Glu Tyr Glu Ala Met Lys Ser Lys Ile Asp Asp

705 710 715 720
 Ile Ala Lys Asp Ile Glu Lys Tyr Met Asn Thr Val Lys Val Phe Asp
 725 730 735
 Asn Ala Lys Glu Met Ala Asp Ser Ile Arg Asp Asp Val Ser Lys Leu
 5 740 745 750
 Asn Ala Leu Val Glu Asp Thr Lys Ala Thr Thr Ile Glu Met Asn Lys
 755 760 765
 Thr Met Ser Glu Phe Asp Ser Leu Lys Lys Met His Gln Glu Ile Leu
 770 775 780
 10 Gly Tyr Ala Glu Ser Leu Lys Lys Glu Lys Asp Ser Leu Lys Asp Thr
 785 790 795 800
 Gln Glu Lys Val Asn Met Leu Met Glu Met Ser Gly Glu Ile Gln Glu
 805 810 815
 Arg Phe Val Asn Ile Ala Glu Asn Asn Ala Met Ile Glu His Ala Glu
 15 820 825 830
 Glu Gly Ile Gln Val Val Ile Asp Ile Ala Ser Gln Ile Glu Asn Lys
 835 840 845
 Leu Ser Phe Ile Lys Asp Lys Glu Glu Tyr Ala Asp Asp Ile Leu Gln
 850 855 860
 20 Gln Ile Arg Lys Ala Glu Val Glu Thr Glu Thr Ile Leu Glu Arg Val
 865 870 875 880
 Asp Ser Ile Lys Glu Ala Met Val Glu Val Glu Asp Thr Arg Lys Asn
 885 890 895
 Phe Met Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Glu Arg Asp Met Ala Lys Ile Asp
 25 900 905 910
 Lys Asn Asp Lys Lys Val Gln Leu Phe Ile Ser Lys Leu Glu Glu Ile
 915 920 925
 Asn Asp Ile Ile Asp Ala Ile Gln Asp Gln Arg Glu Asn Leu Val Arg
 930 935 940
 30 Met Lys Asn Gln Tyr Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Ile Val Lys Asn Leu
 945 950 955 960
 Glu Arg Ala Glu Tyr Phe Val Arg Tyr Leu Glu Thr Leu Leu Asp Asn
 965 970 975
 Ala Asp Lys Tyr Met Ser Asp Lys Gly Ser Lys Thr Ser Lys Lys Gly
 35 980 985 990
 Thr Ala Ala Lys Ile Asp Ser Lys Lys Glu Glu Phe Ile Ile Arg Met
 995 1000 1005

Tyr Lys Glu Gly Trp Lys Pro Asp Glu Ile Val Lys Asn Ser Ser Tyr
1010 1015 1020
Ser Arg Asp Glu Val Glu Arg Thr Ile Lys Ala Trp Lys Asp Lys Gln
1025 1030 1035 1040
5 Ser Arg Gly

<210> 13
10 <211> 729
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 13
15 atgataaaaa aaattttaac ttaatcttt gtattaattt tggcagcttc atgttctact 60
aatgataaac atgttgtagt attagctttt agtaaacagc ttcagtctgt actttataat 120
gataatagtc agtctacaaa aacagcatca aaaacatata tacaaaaaga tgatattaca 180
actgtagcag atcctataaa agaaaaaaaa gaatatataa atactcaagc acaagtaagt 240
aaaaaagcag aagaaaaaaaa agaagaactt acaaataacg atgctttaga agaagaaaaa
20 300
cctcaagtta taaagcaaac tgagggtata cagaaagatg ataatgagat tcttcttact 360
gcaaataata tatcttttga ttttgattct tatgaattaa aaaatgaata taatgaaggg 420
atagatgaaa ttgcaaata ttaaataat aatcgagata ttaatctaata aatagaagga 480
catagcgaca gtatagggga ctcaaattat aatatatatt tatctgaaaa cagagcaaaa 540
25 gcgatatttg ataaattagt agataaagga atagataaag atagacttag atatatagga 600
tatggctcta ctattcatc tgagtataat gataaagaca gaaaatgcc aattgttata 660
ataaataatt cagatgaaga gcaggaatac aaaaaagaaa acgaaactga tattatcaaa 720
ttaaaacaa 729

30 <210> 14
<211> 243
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

35 <400> 14
Met Ile Lys Lys Ile Leu Thr Leu Ile Phe Val Leu Ile Leu Ala Ala
1 5 10 15

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

<210> 15
<211> 2475
35 <212> DNA,
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 15

atgaaattga ataataaagt ttatataaa ttccaatat taatactgt tataatatta 60
 ttatcatgt ctaatagtca ggaagaaata gagcaaaaag aaatagacag aggcggagca 120
 ttaatagata aaataatata tgaagtaaga acagatatga caatagctat taaagatgtg 180
 5 gcagacggca gagcagattt aatggcaagc ggaatagacg gaagtacata ttatcatta 240
 ggcgaaagtg attagagaa acttgatact tatgcagtac cttcaggttc atggtcatta 300
 ttgtttaatc ccgtaccaa taaagctcca tacacagtta caacaagaga cggaaaaact 360
 cattttaatc ctctagctat aaaagaagta agatttgcta tgaacttctt aattgataga 420
 aaaaagcttg ttgatgaaat ttaagaggg gcaggacagc cttcatttac acaagcaaca 480
 10 ccggggcagc cgggtactta tagatataat cttatactt caaaaatggg tatgacagaa 540
 aacggtaatc aggaaaaagc tctaatgat ataaataaag ctatggaaaa agctgcta 600
 ttaccagaga atagaggaaa attagtaaaa gaaaatggat ggtggaaata taatggagaa 660
 gtagtaacta ttaaattgt tataagagtt gatgatccta caggaagact tccagctggt 720
 aatgcaatat ctgattaat agaaaaaaca ggaataaaag ttgagaaatt attgtatgac 780
 15 agaaataaat ctactcaagt tgtatacggg tcagacccaa aagattatga atggaatatt 840
 ataacagagg ctgggggagc aggtgctact cgtgcttggg gggatgttac attaagacag 900
 atgtatgtaa gggaaggcaa ttatatgcct ggtgctaag tatctgagtt ttggaattat 960
 gataataaag aagctcaag aataagcgac aagaattcaa atggctgggt ttgactgcc 1020
 gatgaatatt ggaatggtaa tatgcgttg caggagattg gactgaaga tgctgtcaga 1080
 20 atatatttaa attctcagac tcagttttt gtagcgaata aagaaagatt caatagaaga 1140
 atgctttacg gagtaggtga cggggtaat gattggctta taagaagtgc tgatataaaa 1200
 ccaaatagaa atggtgaaaa agtattaaga gttcttcagc attctgcca aggttcatta 1260
 ttataagtc ctgggatcc tgtaggagta ggaggattt ctgatgccta ttctgctata 1320
 atgataggac ctgttctga tgcaggtgct acatttgaat cgcctccac tgctaagaca 1380
 25 gaattcatalc ttgtgaagc tgacaccaac agtttagaaa taggagtgag agcaggaaat 1440
 aatggaatac ctgttggtac tgtaaatgt cctcaaatg caataatga taatccttat 1500
 actcagaaat gggaagaggg ttaacagtt aaagttaatg ataaaggcga attagtttac 1560
 acaaatcgg ataacttac tgcttatgtg aaatgtgatt ttaagcctag aagttttaa 1620
 tggcatcatg gcatagattc atcttgggt gatttgatgt atggaagcgt attcattgct 1680
 30 aatataataa caaagactaa tgaaaacgat aaatattatg attctgctat ggctggaaga 1740
 tatctttctg ctatggacgg agctgtagga agcattataa atgaggacgg aagttttact 1800
 ttatacggaa attattattg gcctatggat atggacagac aaattgctgt tgctgtgta 1860
 agtcctaaaa taggcaatcc taatagaaat actgttattc ctttcgagat aatgaagct 1920
 ataataaaaa ttgttctga aggctctaaa tctggaaatg ttatactat ttcacaggat 1980
 35 cagtctttaa ctccataga tgtaaaaaat cctacatgtg tatcagatat aaaagaaaaa 2040
 ttaatagaaa tgcgtgattc tcagtatata cctgctggaa tagaagatt tataactaaa 2100
 gaagatgcag taaagagata tcaagctgcc attgattta tagataaata cggacatgct 2160

tatatatcaa atggtccttt ctttatttca agaatagatt caaaggcaaa ttatatagaa 2220
ttaacagctt ttaaagatta tagctatact gctgattatt ggatagatag attatctacc 2280
aaaatgagca gaatagaaga tattgatatg cctgctatag caaacagaaa caatgatatg 2340
aatatagata ttatgtttc ttcatataat tatcctgaca atgcattaga aatgccagat 2400
5 cctaatacaa cagtaaaagt attacttcaa ttacaaatgg agggcgaaaa agaataataat 2460
gcagttttta gaaaa 2475

<210> 16
<211> 825
10 <212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 16
Met Lys Leu Asn Asn Lys Val Leu Tyr Lys Phe Pro Ile Leu Ile Leu
15 1 5 10 15
Phe Ile Ile Leu Leu Ser Cys Ser Asn Ser Gln Glu Glu Ile Glu Gln
20 25 30
Lys Glu Ile Asp Arg Gly Gly Ala Leu Ile Asp Lys Ile Ile Tyr Glu
35 40 45
20 Val Arg Thr Asp Met Thr Ile Ala Ile Lys Asp Val Ala Asp Gly Arg
50 55 60
Ala Asp Leu Met Ala Ser Gly Ile Asp Gly Ser Thr Tyr Leu Ser Leu
65 70 75 80
Gly Glu Ser Asp Leu Glu Lys Leu Asp Thr Tyr Ala Val Pro Ser Gly
25 85 90 95
Ser Trp Ser Leu Leu Phe Asn Pro Val Pro Asn Lys Ala Pro Tyr Thr
100 105 110
Val Thr Thr Arg Asp Gly Lys Thr His Phe Asn Pro Leu Ala Ile Lys
115 120 125
30 Glu Val Arg Phe Ala Met Asn Phe Leu Ile Asp Arg Lys Lys Leu Val
130 135 140
Asp Glu Ile Leu Arg Gly Ala Gly Gln Pro Ser Phe Thr Gln Ala Thr
145 150 155 160
Pro Gly Gln Pro Gly Thr Tyr Arg Tyr Asn Leu Ile Pro Ser Lys Met
35 165 170 175
Gly Met Thr Glu Asn Gly Asn Gln Glu Lys Ala Leu Asn Asp Ile Asn
180 185 190

Lys Ala Met Glu Lys Ala Ala Asn Leu Pro Glu Asn Arg Gly Lys Leu
 195 200 205
 Val Lys Glu Asn Gly Trp Trp Lys Tyr Asn Gly Glu Val Val Thr Ile
 210 215 220
 5 Lys Phe Val Ile Arg Val Asp Asp Pro Thr Gly Arg Leu Pro Ala Gly
 225 230 235 240
 Asn Ala Ile Ser Asp Leu Ile Glu Lys Thr Gly Ile Lys Val Glu Lys
 245 250 255
 Leu Leu Tyr Asp Arg Asn Lys Ser Thr Gln Val Val Tyr Gly Ser Asp
 10 260 265 270
 Pro Lys Asp Tyr Glu Trp Asn Ile Ile Thr Glu Ala Trp Gly Ala Gly
 275 280 285
 Ala Thr Arg Ala Trp Trp Asp Val Thr Leu Arg Gln Met Tyr Val Arg
 290 295 300
 15 Glu Gly Asn Tyr Met Pro Gly Ala Asn Val Ser Glu Phe Trp Asn Tyr
 305 310 315 320
 Asp Asn Lys Glu Ala Ser Arg Ile Ser Asp Lys Asn Ser Asn Gly Trp
 325 330 335
 Phe Leu Thr Ala Asp Glu Tyr Trp Asn Gly Asn Met Arg Leu Gln Glu
 20 340 345 350
 Ile Gly Leu Glu Asp Ala Val Arg Ile Tyr Leu Asn Ser Gln Thr Gln
 355 360 365
 Phe Phe Val Ala Asn Lys Glu Arg Phe Asn Arg Arg Met Leu Tyr Gly
 370 375 380
 25 Val Gly Asp Gly Val Asn Asp Trp Ser Ile Arg Ser Ala Asp Ile Lys
 385 390 395 400
 Pro Asn Arg Asn Gly Glu Lys Val Leu Arg Val Leu Gln His Ser Ala
 405 410 415
 Gln Gly Ser Leu Phe Ile Ser Pro Trp Asp Pro Val Gly Val Gly Gly
 30 420 425 430
 Phe Ser Asp Ala Tyr Ser Ala Ile Met Ile Gly Pro Cys Ser Asp Ala
 435 440 445
 Gly Ala Thr Phe Glu Ser Pro Ser Thr Ala Lys Thr Glu Phe Ile Leu
 450 455 460
 35 Gly Glu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Glu Ile Gly Val Arg Ala Gly Asn
 465 470 475 480
 Asn Gly Ile Pro Val Gly Thr Val Asn Val Pro Gln Asn Ala Ile Met

	485	490	495
	Tyr Asn Pro Tyr Thr Gln Lys Trp Glu Glu Gly Leu Thr Val Lys Val		
	500	505	510
	Asn Asp Lys Gly Glu Leu Val Tyr Thr Lys Ser Asp Asn Leu Thr Ala		
5	515	520	525
	Tyr Val Lys Cys Asp Phe Lys Pro Arg Ser Phe Lys Trp His His Gly		
	530	535	540
	Ile Asp Ser Ser Leu Val Asp Leu Met Tyr Gly Ser Val Phe Ile Ala		
	545	550	555
10	Asn Ile Ile Thr Lys Thr Asn Glu Asn Asp Lys Tyr Tyr Asp Ser Ala		
	565	570	575
	Met Ala Gly Arg Tyr Leu Ser Ala Met Asp Gly Ala Val Gly Ser Ile		
	580	585	590
	Ile Asn Glu Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Gly Asn Tyr Tyr Trp Pro		
15	595	600	605
	Met Asp Met Asp Arg Gln Ile Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Lys Ile		
	610	615	620
	Gly Asn Pro Asn Arg Asn Thr Val Ile Pro Phe Glu Ile Asn Glu Ala		
	625	630	635
20	Ile Met Lys Ile Val Leu Glu Gly Ser Lys Ser Gly Asn Val Tyr Thr		
	645	650	655
	Ile Ser Gln Asp Gln Ser Leu Thr Ser Ile Asp Val Lys Asn Pro Thr		
	660	665	670
	Cys Val Ser Asp Ile Lys Glu Lys Leu Ile Glu Met Arg Asp Ser Gln		
25	675	680	685
	Tyr Ile Pro Ala Gly Ile Glu Asp Phe Ile Thr Lys Glu Asp Ala Val		
	690	695	700
	Lys Arg Tyr Gln Ala Ala Ile Asp Phe Ile Asp Lys Tyr Gly His Ala		
	705	710	715
30	Tyr Ile Ser Asn Gly Pro Phe Phe Ile Ser Arg Ile Asp Ser Lys Ala		
	725	730	735
	Asn Tyr Ile Glu Leu Thr Ala Phe Lys Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Asp		
	740	745	750
	Tyr Trp Ile Asp Arg Leu Ser Thr Lys Met Ser Arg Ile Glu Asp Ile		
35	755	760	765
	Asp Met Pro Ala Ile Ala Asn Arg Asn Asn Asp Met Asn Ile Asp Ile		
	770	775	780

Tyr Val Ser Ser Tyr Asn Tyr Pro Asp Asn Ala Leu Glu Met Pro Asp
785 790 795 800
Pro Asn Thr Thr Val Lys Val Leu Leu Gln Leu Gln Met Glu Gly Glu
 805 810 815
5 Lys Glu Tyr Asn Ala Val Phe Arg Lys
 820 825

<210> 17

10 <211> 1014
 <212> DNA
 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 17

15 gtggtctgca atatgaataa gaagaacatt atattattat tatctattat tatgatgctg 60
 attgtatcat gtgaggaaaa aacagaaagt actgtgacaa tacaaaaata tccaataaga 120
 gttggatata tgccagattt ttctggaagt tctgctgttg ctatagcaaa agaaaaggg 180
 tattttgatg aagaaaattt agatgttaca ttggttgagt ttttagatgg tccttctgaa 240
 gtagaggaga tgcttttaaa aaatttagaa ttgcttata taggacatgg tgcacatgct 300
20 ttagctattg aaggtaaagt taatgtatta ttcctaata gtttaagcag atctgaacaa 360
 attatagtaa gaaatgcttc tcaaatagaa tctattaaag atttaagagg taaaaaagtt 420
 ggaacacaat taggaacttc ttcagaaatt ttactttatt tggctcttca gtcattaggt 480
 attaaagcag aagaagtaga tattataaat atggatggaa atactatagt atcatctata 540
 gctgatggta ctattgatgc tgcttcagtg caagctccat atactttga aatattaaat 600
25 aatactgaaa acaatgtaaa gtctatagct acaactgttg attattctga ttaggttct 660
 tttcctagca gctggatagt tacaccttct tatcaaagta ataatacaga tatagttaat 720
 agattttcaa gagctatact taaagctatg gactatagac aacttaatat gagtgaagct 780
 gtgcaattgg ttgctaacat gaatagtaaa acagttgaag aagttgattt agaaagagaa 840
 acaggagtat ggttttctgg taatgagata aagcaagcat atattaatgg tgatgctgg 900
30 aaatgggata aaacacagca gaatatattt atttatacta aaactattac aaataatatt 960
 gatattaata attatgtgca gttaaaatac atgggtgata atgtatttaa tgaa 1014

<210> 18
<211> 338
35 <212> PRT
 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 18
Val Val Cys Asn Met Asn Lys Lys Asn Ile Ile Leu Leu Leu Ser Ile
1 5 10 15
Ile Met Met Leu Ile Val Ser Cys Glu Glu Lys Thr Glu Ser Thr Val
5 20 25 30
Thr Ile Gln Lys Tyr Pro Ile Arg Val Gly Tyr Met Pro Asp Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Ser Ala Val Ala Ile Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Phe Asp Glu
50 55 60
10 Glu Asn Leu Asp Val Thr Leu Val Glu Phe Leu Asp Gly Pro Ser Glu
65 70 75 80
Val Glu Glu Met Leu Leu Lys Asn Leu Glu Phe Ala Tyr Ile Gly His
85 90 95
Gly Ala His Ala Leu Ala Ile Glu Gly Lys Val Asn Val Leu Phe Pro
15 100 105 110
Asn Gly Leu Ser Arg Ser Glu Gln Ile Ile Val Arg Asn Ala Ser Gln
115 120 125
Ile Glu Ser Ile Lys Asp Leu Arg Gly Lys Lys Val Gly Thr Gln Leu
130 135 140
20 Gly Thr Ser Ser Glu Ile Leu Leu Tyr Leu Ala Leu Gln Ser Leu Gly
145 150 155 160
Ile Lys Ala Glu Glu Val Asp Ile Ile Asn Met Asp Gly Asn Thr Ile
165 170 175
Val Ser Ser Ile Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ala Ala Ser Val Gln Ala
25 180 185 190
Pro Tyr Thr Phe Glu Ile Leu Asn Asn Thr Glu Asn Asn Val Lys Ser
195 200 205
Ile Ala Thr Thr Val Asp Tyr Ser Asp Val Gly Ser Phe Pro Ser Ser
210 215 220
30 Trp Ile Val Thr Pro Ser Tyr Gln Ser Asn Asn Thr Asp Ile Val Asn
225 230 235 240
Arg Phe Ser Arg Ala Ile Leu Lys Ala Met Asp Tyr Arg Gln Leu Asn
245 250 255
Met Ser Glu Ala Val Gln Leu Val Ala Asn Met Asn Ser Lys Thr Val
35 260 265 270
Glu Glu Val Asp Leu Glu Arg Glu Thr Gly Val Trp Phe Ser Gly Asn
275 280 285

Glu Ile Lys Gln Ala Tyr Ile Asn Gly Asp Ala Gly Lys Trp Tyr Lys
290 295 300
Thr Gln Gln Asn Ile Phe Ile Tyr Thr Lys Thr Ile Thr Asn Asn Ile
305 310 315 320
5 Asp Ile Asn Asn Tyr Val Gln Leu Lys Tyr Met Val Asp Asn Val Phe
325 330 335
Asn Glu

10 <210> 19
<211> 981
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

15 <400> 19
atgaaaaaag ttttattagc tgaacattt atttttatat ttagttttt aatatcatgc 60
ggtaagaaaa caaatgaaaa tgcaggtaaa ataagagtag catatcaccc aaatgtagga 120
ggagcttctg caataattac aggtatacag cagaattatt ttaaagatga aggtttggat 180
20 atagaacttg ttaaatttac aagcggacct acagaaatag cagctatggg ttcaggagat 240
atacaaatag gttatatagg tttggagca catacattgg cagcagaagg aaaagttcaa 300
ataatagcta ctgacggaat agctgttgta gaaggtatta gaacattaaa aacttcaggc 360
ataaactctg ttgaaaaatt aaaaggcaga agtttaataa ctcaattagg tacatcagga 420
gaaactatta tagatcaggt attagcagga acaggagtta ataaaacaga tataaatata 480
25 cttaatgctg aagtttcaag tgctgttgca tcattcttgg ctaataaagt tgatgctata 540
tctgtatggc ctccttatac tgttgaaata gataatagaa ttggtataga gaatttgtat 600
attataaaaac ctcaggatgt aggagttgat tctactgcaa gctggatagt aactcctaac 660
tatttgaag ctaatactga tacagttata aaattcacia gagcattata taaatcaatg 720
gattatagaa aatcacattt agatgaagct attacaaatg tatcaaactt tatagggtta 780
30 gatatagcta cagtttcaca agagaaatac agttctgact ggatggattc tcaaacaatg 840
aaaagcagaa taaatgacgg aagcataagt aatatttata aaaaacaaat agactatttt 900
gtacagaata atagattaaa ttctgagcct gttcctgtag acaaatatgt aagaatcgac 960
attatagaaa aagcattaaa t 981

35 <210> 20
<211> 327
<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 20

Met Lys Lys Val Leu Leu Ala Val Thr Phe Ile Phe Ile Phe Ser Phe

5 1 5 10 15

Leu Ile Ser Cys Gly Lys Lys Thr Asn Glu Asn Ala Gly Lys Ile Arg

20 25 30

Val Ala Tyr His Pro Asn Val Gly Gly Ala Ser Ala Ile Ile Thr Gly

35 40 45

10 Ile Gln Gln Asn Tyr Phe Lys Asp Glu Gly Leu Asp Ile Glu Leu Val

50 55 60

Lys Phe Thr Ser Gly Pro Thr Glu Ile Ala Ala Met Val Ser Gly Asp

65 70 75 80

Ile Gln Ile Gly Tyr Ile Gly Phe Gly Ala His Thr Leu Ala Ala Glu

15 85 90 95

Gly Lys Val Gln Ile Ile Ala Thr Asp Gly Ile Ala Val Val Glu Gly

100 105 110

Ile Arg Thr Leu Lys Thr Ser Gly Ile Asn Ser Val Glu Lys Leu Lys

115 120 125

20 Gly Arg Ser Leu Ile Thr Gln Leu Gly Thr Ser Gly Glu Thr Ile Ile

130 135 140

Asp Gln Val Leu Ala Gly Thr Gly Val Asn Lys Thr Asp Ile Asn Ile

145 150 155 160

Leu Asn Ala Glu Val Ser Ser Ala Val Ala Ser Phe Leu Ala Asn Lys

25 165 170 175

Val Asp Ala Ile Ser Val Trp Pro Pro Tyr Thr Val Glu Ile Asp Asn

180 185 190

Arg Ile Gly Ile Glu Asn Leu Tyr Ile Ile Lys Pro Gln Asp Val Gly

195 200 205

30 Val Asp Ser Thr Ala Ser Trp Ile Val Thr Pro Asn Tyr Leu Glu Ala

210 215 220

Asn Thr Asp Thr Val Ile Lys Phe Thr Arg Ala Leu Tyr Lys Ser Met

225 230 235 240

Asp Tyr Arg Lys Ser His Leu Asp Glu Ala Ile Thr Asn Val Ser Asn

35 245 250 255

Leu Ile Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Ser Gln Glu Lys Tyr Ser Ser

260 265 270

Asp Trp Met Asp Ser Gln Thr Met Lys Ser Arg Ile Asn Asp Gly Ser

275

280

285

Ile Ser Asn Ile Tyr Lys Lys Gln Ile Asp Tyr Phe Val Gln Asn Asn

290

295

300

5 Arg Leu Asn Ser Glu Pro Val Pro Val Asp Lys Tyr Val Arg Ile Asp

305

310

315

320

Ile Ile Glu Lys Ala Leu Asn

325

10

<210> 21

<211> 1011

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

15

<400> 21

atgaaaaaaa ctatgtttat ttctatttta tcaatggcag tgatatcttt aataatatcc 60

tggtcaggag gaaataaagc tctgtctgct tcagcagatg gtacacttga taaaataaga 120

gttgcttctc ttgcagattt tgcaggaact tcttctgttg ctatagctca ggaaaaaggt 180

20 tttttaaag aagaaaattt agatgttgaa ttagttaaat ttttaaatgg accttctgaa 240

gttgctgcta tgctctctgg agatatacaa ttgcatata taggacatgg tgcacattct 300

ctagctattc aaggtaaagt taatgtatta ttctctaag gtttaggtaa atctgaagaa 360

attatagttg gtaaatgggc caatgttaat gatttagcag gattaaaagg aaaaactata 420

ggtactcagc ttggtacttc tggagatata gtattggata ttgcattaag aaaagttgga 480

25 ctttccaaag aagatgttaa tgtgtcaat atggatgtaa gcggaatagt atcttctatg 540

attggtaaaa aagtagatgc agtttcttta tgggctcctt atacttttga aataactaaa 600

cagcttgag atgaagctgt tgtaattgct tctattacaa attatttaga tgaagctgta 660

tttctagca gttggatagt tactcctgat tatcaaaata ataataaga catagtgaat 720

agatttctta aagctatatt taaagctatg gattatagaa gtgagaatat ggatgaggct 780

30 gttgaaattg tagctaaatt aaatggaact cctgttgatt ctgttgcttt agaaaaagaa 840

actgctatat ggcttagttc ttctgatata aaaaattctt atactgatgg aacagctgct 900

aaatggtatc aagctcagca gaaaatattt taaactcag aagtagttac tgaagaagta 960

gatgttaata attatgtaca gataaattat ataattgata atgtgcttaa a 1011

35 <210> 22

<211> 337

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 22

Met Lys Lys Thr Met Phe Ile Ser Ile Leu Ser Met Ala Val Ile Ser

5 1 5 10 15

Leu Ile Ile Ser Cys Ser Gly Gly Asn Lys Ala Pro Ala Ala Ser Ala

20 25 30

Asp Gly Thr Leu Asp Lys Ile Arg Val Ala Tyr Leu Ala Asp Phe Ala

35 40 45

10 Gly Thr Ser Ser Val Ala Ile Ala Gln Glu Lys Gly Phe Phe Lys Glu

50 55 60

Glu Asn Leu Asp Val Glu Leu Val Lys Phe Leu Asn Gly Pro Ser Glu

65 70 75 80

Val Ala Ala Met Leu Ser Gly Asp Ile Gln Phe Ala Tyr Ile Gly His

15 85 90 95

Gly Ala His Ser Leu Ala Ile Gln Gly Lys Val Asn Val Leu Phe Pro

100 105 110

Asn Gly Leu Gly Lys Ser Glu Glu Ile Ile Val Gly Lys Trp Ala Asn

115 120 125

20 Val Asn Asp Leu Ala Gly Leu Lys Gly Lys Thr Ile Gly Thr Gln Leu

130 135 140

Gly Thr Ser Gly Asp Ile Val Leu Asp Ile Ala Leu Arg Lys Val Gly

145 150 155 160

Leu Ser Lys Glu Asp Val Asn Val Val Asn Met Asp Val Ser Gly Ile

25 165 170 175

Val Ser Ser Met Ile Gly Lys Lys Val Asp Ala Val Ser Leu Trp Ala

180 185 190

Pro Tyr Thr Phe Glu Ile Thr Lys Gln Leu Gly Asp Glu Ala Val Val

195 200 205

30 Ile Ala Ser Ile Thr Asn Tyr Leu Asp Glu Ala Val Phe Pro Ser Ser

210 215 220

Trp Ile Val Thr Pro Asp Tyr Gln Asn Asn Asn Gln Asp Ile Val Asn

225 230 235 240

Arg Phe Ser Lys Ala Ile Phe Lys Ala Met Asp Tyr Arg Ser Glu Asn

35 245 250 255

Met Asp Glu Ala Val Glu Ile Val Ala Lys Leu Asn Gly Thr Pro Val

260 265 270

Asp Ser Val Ala Leu Glu Lys Glu Thr Ala Ile Trp Leu Ser Ser Ser
275 280 285

Asp Ile Lys Asn Ser Tyr Thr Asp Gly Thr Ala Ala Lys Trp Tyr Gln
290 295 300

5 Ala Gln Gln Lys Ile Phe Leu Asn Ser Glu Val Val Thr Glu Glu Val
305 310 315 320

Asp Val Asn Asn Tyr Val Gln Ile Asn Tyr Ile Ile Asp Asn Val Leu
325 330 335

Lys

10

<210> 23

<211> 615

15 <212> DNA

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 23

atggcaagaa gaaaaaagaa aaaatcatct cctttattaa tactatttat ttattaata 60

20 gcagcaggat actattatta taataatata tataataaaa aagaaatatt aaaaacagaa 120

aagcccaaaa aagaaactat tacaagatac aatagagatg attggggaga ttgggctgat 180

gaagataatg acggacttaa tacaaggcat gaggtattag caagagcatc attagtaaaa 240

cctgtaatat ctaataacag agtaatatca ggaaaatggg atgataagtt tacaggaaaa 300

tattttacta atgcaaaaga ttagatata gatcatttag tgcctttaa aaatgcacat 360

25 atcagcggtg ctagtaattg gagtaaagaa aagaaaaatg aatactacaa ttatatgaaa 420

aacgaaaatc atttgtagc tgtatcaaaa ggtgcaaac gttctaaagg tgataaatcc 480

ccggtagaat ggctccctcc taatgaagaa tatcaatgcg aatatgtaag agaatgggat 540

aaaatcaaaa ccgattgggg gcttacaata gaagaagggt ttgatgaagt tcaaacaga 600

gtatgcaaag gaaaa 615

30

<210> 24

<211> 205

<212> PRT

<213> Brachyspira hyodysenteriae

35

<400> 24

Met Ala Arg Arg Lys Lys Lys Lys Ser Ser Pro Leu Leu Ile Leu Phe

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

<210> 25
<211> 264
30 <212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 25
atgaataaaa tttttatga taaagcttgg gaagattatc ttattttca aaagaatgac 60
35 aaaaaaatat tacagaaaat taatgatttt ataaaagata tagaaagaaa tggcttatta 120
attggtatag gaaaaccaga gagattaaaa ggtgagttaa acggattgta ttcaaggcta 180
ataaatcaag aacatagatt agtatattat attgaagata ataatttatt tatagttgga 240

tgtaaaacac attataaaaa taat 264

<210> 26

<211> 88

5 <212> PRT

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 26

Met Asn Lys Ile Phe Tyr Asp Lys Ala Trp Glu Asp Tyr Leu Tyr Phe

10 1 5 10 15

Gln Lys Asn Asp Lys Lys Ile Leu Gln Lys Ile Asn Asp Phe Ile Lys

20 25 30

Asp Ile Glu Arg Asn Gly Leu Leu Ile Gly Ile Gly Lys Pro Glu Arg

35 40 45

15 Leu Lys Gly Glu Leu Asn Gly Leu Tyr Ser Arg Leu Ile Asn Gln Glu

50 55 60

His Arg Leu Val Tyr Tyr Ile Glu Asp Asn Asn Leu Phe Ile Val Gly

65 70 75 80

Cys Lys Thr His Tyr Lys Asn Asn

20 85

<210> 27

<211> 1503

25 <212> DNA

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 27

gtgtaagga aattgatata tattatffff ttgcattcaa ttctttttaa ttttttatt 60

30 ttgcacaaa ctaatgaatc agctatatta aattacactc aatatatgga aagaataaaa 120

tccataatac cagaaatgaa attaactgca tctcaagaaa gcaatgccta taataattta 180

acaaaagcaa aaagctccgg agacgttaaa ttgatttgc aggctggtgc tataggaatg 240

caaagccatt ttgatgaata caattttta gcaacatcag attttaatta taatggggtt 300

agaatagggtg caggattcag cggacttgta ccatactctg gaactagatg gtctgtagaa 360

35 attaaacatg acagtffff cggcgacttt aatacaggag atatttcatt accggttgat 420

acgcctctag gtagaataaa tggaaaactt ccaaatttaa gtactaatga ttttaaatat 480

tattatccaa gcataaaaaat tcaaatagct cagcctattt taagggtatt ttttggtaaa 540

ttggatagat accctataaa agatgcagaa tatcagctta ccatagcaaa attaaaaaga 600
ataatagacg acaacagcgt attaacatct tatcagaaaa tttattatca atggataatg 660
gcaagaaaaat taatagattt atatgatgat atgataagag aagcaagaag tttgaaaaat 720
caagtataca gaagatatac aagcggagtt atagataatg actcatatca gaatgcaaaa 780
5 agacaaacat taaaatatat agaagcaaga gataaatctg aattaatgct taaaaaata 840
atgagaaata ttcaattctt tatacctgaa gaaaatatac agccaaatga agatgattgg 900
aatcagacat tagaaacctc tataaatgct aaaatagata tagtaccatt ttagaaagt 960
gctcagggac aaatggctta tcaattaaaa ttaagaagcg aatatgctat ttcagtaatg 1020
aaaaataatg ctctgcctga tttatctata gtaggaagcg tatcattatc aagtttagat 1080
10 gacagcggat attttaaate ttttctacc atgactaatg ttgattattt ttagggcctt 1140
atgttttctt accccatagg cggacgtgat gctaaagcta aaatggaaga tgcttatgct 1200
gctttgaatg ctgttacggc tgattttgat aggggtgaaca gagattttga cgttcagata 1260
ggtacttatt atgatgagtt tgaggcatac aaaaaaatgc tagaaaataa aaaattggaa 1320
gttaatgcta tagtatcaag aataaatacg caaatgcta aattcagaca aggaagactc 1380
15 cctatagatg aaataataaa tgcaaggctt gatttagcac aggcaagagc agaacttctt 1440
aatttgcagt attaataat aagcactggt atggattata attctctggt gctgcttaac 1500
aat 1503

<210> 28
20 <211> 501
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 28
25 Val Leu Arg Lys Leu Ile Tyr Ile Ile Phe Leu His Ser Ile Leu Phe
1 5 10 15
Asn Phe Phe Ile Phe Ala Gln Thr Asn Glu Ser Ala Ile Leu Asn Tyr
20 25 30
Thr Gln Tyr Met Glu Arg Ile Lys Ser Ile Ile Pro Glu Met Lys Leu
30 35 40 45
Thr Ala Ser Gln Glu Ser Asn Ala Tyr Asn Asn Leu Thr Lys Ala Lys
50 55 60
Ser Ser Gly Asp Val Lys Phe Asp Leu Gln Ala Gly Ala Ile Gly Met
65 70 75 80
35 Gln Ser His Phe Asp Glu Tyr Asn Phe Leu Ala Thr Ser Asp Phe Asn
85 90 95
Tyr Asn Gly Phe Arg Ile Gly Ala Gly Phe Ser Gly Leu Val Pro Tyr

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

Ala Leu Asn Ala Val Thr Ala Asp Phe Asp Arg Val Asn Arg Asp Phe
405 410 415
Asp Val Gln Ile Gly Thr Tyr Tyr Asp Glu Phe Glu Ala Tyr Lys Lys
420 425 430
5 Met Leu Glu Asn Lys Lys Leu Glu Val Asn Ala Ile Val Ser Arg Ile
435 440 445
Asn Thr Gln Asn Ala Lys Phe Arg Gln Gly Arg Leu Pro Ile Asp Glu
450 455 460
Ile Ile Asn Ala Arg Leu Asp Leu Ala Gln Ala Arg Ala Glu Leu Leu
10 465 470 475 480
Asn Leu Gln Tyr Leu Ile Ile Ser Thr Val Met Asp Tyr Asn Ser Leu
485 490 495
Val Leu Leu Asn Asn
500
15

<210> 29
<211> 1386
<212> DNA
20 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 29
atggaaatac tactagtta ttatttgaa atattataa ttattattct tattatgctc 60
tctgctttat tttctggaag tgagactgca tatacatcta ttgatgatgt tactttaatg 120
25 cgttgggtca gagagaaaaa aatcaaagaa gaagataaaa aatattggga aaagtcaagt 180
tctatgatac ctaccctact tgttggtaat aacatagtta atatacagc aagtccatt 240
ataactgtat ttgctgtaag gcttgctgac attctgccgc atgtatcaac aaatgtgatg 300
gttacaatat caactgccac aataacaata cttattatta tattcggaga aatacttctt 360
aaagtcttaa tgagagttaa tgctgaaaaa atgatgcctt atcttctata tttatgaag 420
30 tttgtcatt ttatattcaa gcctataact ttcttaatgg ataaagtaac tactttata 480
atgaattatt ttgtacctaa aagattaaga gatgctgaaa aaagaagtgc ttatcaagt 540
atggaagata tcactactat aatacatftg gggcataaag aaggaataat aaaagaatat 600
acacatgaaa tgcttacagg agtaatagat ttagaaata aaactgtaga agagataatg 660
acgccccgtg ttgatatggt atgtattgaa gctgaaacag atgtaaatga aataataaaa 720
35 cttactgtag aatcaggact tcaagattt cctgtttatg aggaaacagt agatcatata 780
ataggtatat tccatacaag agctttattt aaagaatatg ttaaaggcgg cggaaagatg 840
aaciaagtaa aaaagaaagc aatagattat ataatgctt cctactttgt acctgaaact 900

aaaactataa gcagcttatt tagtgatatg caaaagaaaa aacttcagat ggtaattact 960
attgatgaat acggcggaac tgccggactt gttactatgg aagatataat agaagagata 1020
atgggtgata tagaagatga aagtgataaa aaagaagctg atgtaataag atttaagggga 1080
aaaagaatta taataaatgg aatgcttct atagaagatg tcaacaaaac tttaaaatta 1140
5 gaattagagc atgaagaata tcaaactata gcaggatatg ttattgatat gcttgatcat 1200
atacctgaaa caaatgagag attcatatta aaaggatata gggtaagaat aatgaaagtt 1260
gaagacagaa gaatagtga aatggaattt actcctataa aatttgcaag aacaaatgaa 1320
agtgataata ttgatataca agagacatct gattcagaaa aaaatgattt agaaatttta 1380
aatgaa 1386

10

<210> 30
<211> 462
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

15

<400> 30
Met Glu Ile Leu Leu Val Tyr Leu Phe Glu Ile Phe Ile Ile Ile Ile
1 5 10 15
Leu Ile Met Leu Ser Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Thr Ala Tyr Thr
20 20 25 30
Ser Ile Asp Asp Val Thr Leu Met Arg Leu Val Arg Glu Lys Lys Ile
35 40 45
Lys Glu Glu Asp Lys Lys Tyr Trp Glu Lys Ser Ser Ser Met Ile Pro
50 55 60
25 Thr Leu Leu Val Gly Asn Asn Ile Val Asn Ile Ser Ala Ser Ser Ile
65 70 75 80
Ile Thr Val Phe Ala Val Arg Leu Ala Asp Ile Leu Pro His Val Ser
85 90 95
Thr Asn Val Met Val Thr Ile Ser Thr Ala Thr Ile Thr Ile Leu Ile
30 100 105 110
Ile Ile Phe Gly Glu Ile Leu Pro Lys Val Leu Met Arg Val Asn Ala
115 120 125
Glu Lys Met Met Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Met Lys Phe Cys His Phe
130 135 140
35 Ile Phe Lys Pro Ile Thr Phe Leu Met Asp Lys Val Thr Thr Phe Ile
145 150 155 160
Met Asn Tyr Phe Val Pro Lys Arg Leu Arg Asp Ala Glu Lys Arg Ser

	165	170	175
	Ala Leu Ser Ser Met Glu Asp Ile Thr Thr Ile Ile His Leu Gly His		
	180	185	190
	Lys Glu Gly Ile Ile Lys Glu Tyr Thr His Glu Met Leu Thr Gly Val		
5	195	200	205
	Ile Asp Phe Arg Asn Lys Thr Val Glu Glu Ile Met Thr Pro Arg Val		
	210	215	220
	Asp Met Val Cys Ile Glu Ala Glu Thr Asp Val Asn Glu Ile Ile Lys		
	225	230	235
10	Leu Thr Val Glu Ser Gly Leu Ser Arg Phe Pro Val Tyr Glu Glu Thr		
	245	250	255
	Val Asp His Ile Ile Gly Ile Phe His Thr Arg Ala Leu Phe Lys Glu		
	260	265	270
	Tyr Val Lys Gly Gly Gly Lys Met Asn Lys Val Lys Lys Lys Ala Ile		
15	275	280	285
	Asp Tyr Ile Met Leu Pro Tyr Phe Val Pro Glu Thr Lys Thr Ile Ser		
	290	295	300
	Ser Leu Phe Ser Asp Met Gln Lys Lys Lys Leu Gln Met Val Ile Thr		
	305	310	315
20	Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Thr Ala Gly Leu Val Thr Met Glu Asp Ile		
	325	330	335
	Ile Glu Glu Ile Met Gly Asp Ile Glu Asp Glu Ser Asp Lys Lys Glu		
	340	345	350
	Ala Asp Val Ile Arg Phe Lys Gly Lys Arg Ile Ile Ile Asn Gly Asn		
25	355	360	365
	Ala Ser Ile Glu Asp Val Asn Lys Thr Leu Lys Leu Glu Leu Glu His		
	370	375	380
	Glu Glu Tyr Gln Thr Ile Ala Gly Tyr Val Ile Asp Met Leu Asp His		
	385	390	395
30	Ile Pro Glu Thr Asn Glu Arg Phe Ile Leu Lys Gly Tyr Arg Val Arg		
	405	410	415
	Ile Met Lys Val Glu Asp Arg Arg Ile Val Glu Met Glu Phe Thr Pro		
	420	425	430
	Ile Lys Phe Ala Arg Thr Asn Glu Ser Asp Asn Ile Asp Ile Gln Glu		
35	435	440	445
	Thr Ser Asp Ser Glu Lys Asn Asp Leu Glu Ile Leu Asn Glu		
	450	455	460

<210> 31

<211> 1080

5 <212> DNA

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 31

atgaaagagt taggaatatc catttacccc ttctactcaa aaatggaaga taataaatat 60
10 tatatagatt tggcttctaa atacggattc gcaagatgtt ttatgtgtct gctttcagtt 120
gatagatcta aagatgaaat aataaatgaa ttttcaacta taataaatta tgctaaagaa 180
aaaggataa aaactacttt agatatatct ccggctgtat tcaaacattt ggatatagat 240
tataaaaatc ttgacttttt tcataaattg ggagcttggg gcgtaagatt agatttaggg 300
tttacaggta atgaagaaag ttaatgaca tataacgaat atgatttgaa aatagaatta 360
15 aatatgagca atgatacaga ttatcttgat aatataatga aatattatcc taatactgat 420
aatttgatag gctgttataa ttctatcct catgcatata caggactaga cagaacactt 480
tttaaagca gcatgaaacg tttaaaaaa tattctataa gtcatctgc attgttaat 540
gccaaagaag ctacttttgg acctggcct gtaagcgatg gtatttgcac attggaagaa 600
catagagata tgcctataga tgcacaggct atggaattat ttgctcttg tggtgactgt 660
20 gtttcattg ctactgtta tgcagatgaa aatactttta aaacattata taatatggat 720
aaaagattaa taacttttaa agtagaatta gttgattcta ttctaaaga agaaaagagt 780
atagtattag atatgcttca tcaaaacaga ttagatgctt ctgctgatgt tataagatct 840
tcagatacaa gagcaaaata taagggacat aatttcaaaa tatttaatgc tgtttccgat 900
ataaaaagag gagatatatt aatagattca tcagaatacg gcagttatac cggagaaatg 960
25 cagatagctt tgaaagattt aaaaaatacc ggaagaacta atgtagtagg cagaattaaa 1020
gatgaatatt tatttctgct agattatata agtccggcta aaagatttat tataagagaa 1080

<210> 32

30 <211> 360

<212> PRT

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 32

35 Met Lys Glu Leu Gly Ile Ser Ile Tyr Pro Phe His Ser Lys Met Glu
1 5 10 15
Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Asp Leu Ala Ser Lys Tyr Gly Phe Ala Arg

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

Gln Ile Ala Leu Lys Asp Leu Lys Asn Thr Gly Arg Thr Asn Val Val
325 330 335
Gly Arg Ile Lys Asp Glu Tyr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Ile Ser Pro
340 345 350
5 Ala Lys Arg Phe Ile Ile Arg Glu
355 360

<210> 33
10 <211> 2574
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 33
15 ttgatgaaga aatacaagcc tgaacaaaa caagaattag aacaattggt atatactgac 60
ggaataaaac tctatgatgt agatacgagt cttataacag atatgagcga gcttttcat 120
aacagcacca gaaaagattt tgaaggcata gaagattggg acgtttctaa tgttgaggat 180
atgtcctata tgtttgcca tatgagttat gatagttatg aaaaccgttc taaagctaag 240
tttaatcata atcttaataa ttggaatgta tctaaagtta agcatatgag ttttatgttt 300
20 tattattgtc aggattttaa tcagccttta gataaatggg acgtttctaa tgttcaggat 360
acatttagaa tgtttgataa ttgtaaaaaa ttcaatcagc ctttaaatag ctggaatgta 420
tctaattgaa caaatatgag cggtatgttt caggtagcag aaagttcaa tcagccttta 480
gacaagtggg acgtttcaaa agttacaact atgagggcta tgtttaatta tgctaaagct 540
tttaatcaag atataagtaa ttggaatgtt agtaaagttg aagatatggg ttatatgttt 600
25 agtatatgcg ttaattttaa tcagcctatt aatgattggg acgtatctaa agtaaaaaact 660
atggaaggta tgtttagaag tgcttttaaa ttcaatcagc ctttagataa atggaatact 720
tcaaagggtg aaaatatgaa tcagatgttt aatgaggcct taaaatttaa tcagccttta 780
aatagctgga atgtttcaa tgtaaaaaact atggaatgta tgttcgcgg tactgaagct 840
tttaatcagc ctttgataa atgggataca aaaaaattaa aaacaatgtt tggaatgttt 900
30 gactttgctg aagggtataa tagtttgac tcattagcaa actgggattt aaataaagta 960
tcagaaatga gtaatttatg ttttaaaagg tatgaagaac ttctttaag aattaaagca 1020
tatcttcagg cttttatgg ttctataaa gattatttaa ctgttacaaa agataatgtc 1080
aaagaaatat atgatcttat tcaaaaagac acaataaaaa aagttttgtc atttaaaaag 1140
agattagaaa gcgagtttag tgaggaactt tcatctgtta cagataatta taatttcaaa 1200
35 tctatagaag aagcagaaaa gtatgttgaa aataattata ataaaaaaga tgataagaaa 1260
gttagcttta taaatgatta taaagttttg ataaaagata aatcaagaga agtgaaaaat 1320
aaagttttaa aatatatata ttggaatat ttgctcctta aaagagatgt taaaaaatta 1380

gtgcagattg ataatatagt taatttactt gataaagaat catttataaa atttattaaa 1440
aatgtttatg atgaaactaa taaagaaaca gccgctttta tttatggcat atacggagga 1500
gatgaggcag taaaaaatat atataaaaaa gaaaaagaca ctaaacttc actattaata 1560
attaaattaa atatagaaag taaatatgca cttagaatat tatatgaaat atattcaaatt 1620
5 acaaaaaaat ctgaagttag ttatgaagct gataaattga ttgatgaagt aatggaaaaa 1680
atggatatta gttataatga attccaatta agatattcat ctgatttagg atttaattct 1740
aaaggtgaaa aagaattgaa taaagattat aaattaattt tgaatagcga ttattcttg 1800
agtccttttg atataaaaaa taataaggaa cttaaaaaag cccctcaaaa tcttaatgaa 1860
gatttaaaag aagaaataac aaaattaaga aaagaaattc cttattttat gaaaaacact 1920
10 gcttctcttt tagctgtttt attagcaagc ggtgaaaaat acagttatga ttattcaaaa 1980
gagattttta ttgataatgc cattatgaat agatttgctt catctttaat atggaatcta 2040
tatgacaaag attctaattt tataacaact ttcagatatt caggcgatgg aagtattca 2100
aactgtgaag atgaagaagt aaaaattaat gataatagtt ttgtaagttt agcaagccct 2160
gtggaaatgg atgatgaaac tatagataaa tggagaaaac agcttgaaga ttatgagata 2220
15 gcacagccaa taagtcaatt aactgtcata aaattagata aagataattt gaaaagcgaa 2280
gtagaaaaaa tagataattt agaaatagct tatggtactt tcaaggcttt cggtgaaaga 2340
tatgaaatgt atagcgagta tataggttat gatgttgta aaagttattc attagaatca 2400
aagaacggag acacttcac tatagacgct gatgttaatt caaaaactga tttcatgac 2460
agagtaaaaa ttaatattaa tttgataat gaaaatgggtg aggaagtaag taaaagattt 2520
20 atttatactt tgtagtatt aatgatttgg gattttagat taacagattt attt 2574

<210> 34
<211> 858
<212> PRT
25 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 34
Leu Met Lys Lys Tyr Lys Pro Glu Thr Lys Gln Glu Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
30 Val Tyr Thr Asp Gly Ile Lys Leu Tyr Asp Val Asp Thr Ser Leu Ile
20 25 30
Thr Asp Met Ser Glu Leu Phe His Asn Ser Thr Arg Lys Asp Phe Glu
35 40 45
Gly Ile Glu Asp Trp Asp Val Ser Asn Val Glu Asp Met Ser Tyr Met
35 50 55 60
Phe Ala His Met Ser Tyr Asp Ser Tyr Glu Asn Arg Ser Lys Ala Lys
65 70 75 80

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

	370	375	380	
	Glu Phe Ser Glu Glu Leu Ser Ser Val Thr Asp Asn Tyr Asn Phe Lys			
	385	390	395	400
	Ser Ile Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Val Glu Asn Asn Tyr Asn Lys Lys			
5	405	410	415	
	Asp Asp Lys Lys Val Ser Phe Ile Asn Asp Tyr Lys Val Leu Ile Lys			
	420	425	430	
	Asp Lys Ser Arg Glu Val Glu Asn Lys Val Leu Lys Tyr Ile Tyr Leu			
	435	440	445	
10	Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Arg Asp Val Lys Lys Leu Val Gln Ile Asp			
	450	455	460	
	Asn Ile Val Asn Leu Leu Asp Lys Glu Ser Phe Ile Lys Phe Ile Lys			
	465	470	475	480
	Asn Val Tyr Asp Glu Thr Asn Lys Glu Thr Ala Ala Phe Ile Tyr Gly			
15	485	490	495	
	Ile Tyr Gly Gly Asp Glu Ala Val Lys Asn Ile Tyr Lys Lys Glu Lys			
	500	505	510	
	Asp Thr Lys Leu Ser Leu Leu Ile Ile Lys Leu Asn Ile Glu Ser Lys			
	515	520	525	
20	Tyr Ala Leu Arg Ile Leu Tyr Glu Ile Tyr Ser Asn Thr Lys Lys Ser			
	530	535	540	
	Glu Val Ser Tyr Glu Ala Asp Lys Leu Ile Asp Glu Val Met Glu Lys			
	545	550	555	560
	Met Asp Ile Ser Tyr Asn Glu Phe Gln Leu Arg Tyr Ser Ser Asp Leu			
25	565	570	575	
	Gly Phe Asn Ser Lys Gly Glu Lys Glu Leu Asn Lys Asp Tyr Lys Leu			
	580	585	590	
	Ile Leu Asn Ser Asp Tyr Ser Leu Ser Leu Phe Asp Ile Lys Asn Asn			
	595	600	605	
30	Lys Glu Leu Lys Lys Ala Pro Gln Asn Leu Asn Glu Asp Leu Lys Glu			
	610	615	620	
	Glu Ile Thr Lys Leu Arg Lys Glu Ile Pro Tyr Phe Met Lys Asn Thr			
	625	630	635	640
	Ala Ser Leu Leu Ala Val Leu Leu Ala Ser Gly Glu Lys Tyr Ser Tyr			
35	645	650	655	
	Asp Leu Phe Lys Glu Ile Phe Ile Asp Asn Ala Ile Met Asn Arg Phe			
	660	665	670	

Ala Ser Ser Leu Ile Trp Asn Leu Tyr Asp Lys Asp Ser Asn Phe Ile
675 680 685
Thr Thr Phe Arg Tyr Ser Gly Asp Gly Ser Tyr Ser Asn Cys Glu Asp
690 695 700
5 Glu Glu Val Lys Ile Asn Asp Asn Ser Phe Val Ser Leu Ala Ser Pro
705 710 715 720
Val Glu Met Asp Asp Glu Thr Ile Asp Lys Trp Arg Lys Gln Leu Glu
725 730 735
Asp Tyr Glu Ile Ala Gln Pro Ile Ser Gln Leu Thr Val Ile Lys Leu
10 740 745 750
Asp Lys Asp Asn Leu Lys Ser Glu Val Glu Lys Ile Asp Asn Leu Glu
755 760 765
Ile Ala Tyr Gly Thr Phe Lys Ala Phe Gly Glu Arg Tyr Glu Met Tyr
770 775 780
15 Ser Glu Tyr Ile Gly Tyr Asp Val Val Lys Ser Tyr Ser Leu Glu Ser
785 790 795 800
Lys Asn Gly Asp Thr Phe Thr Ile Asp Ala Asp Val Asn Ser Lys Thr
805 810 815
Asp Phe His Asp Arg Val Lys Ile Asn Ile Asn Phe Asp Asn Glu Asn
20 820 825 830
Gly Glu Glu Val Ser Lys Arg Phe Ile Tyr Thr Leu Leu Val Leu Met
835 840 845
Ile Trp Asp Phe Arg Leu Thr Asp Leu Phe
850 855
25

<210> 35
<211> 2100
<212> DNA
30 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 35
atgagaataa aacttctagc gggtatagta ttatttttaa tgactataatc gctttcatac 60
actttcgaca aaactccgta ttatgtaaac acagaaactt atgactcata cagagagtta 120
35 ttgagagggg tgcattatta taatcaggaa agatatgatg catccatagc tagttttaga 180
aactctctta atacaaatcc tactgataag ttcataagat attggtatag taagtcttta 240
tacaaagccg gatatatgtc cttagctatt aatgaatggc ttaatattac gagaatgggt 300

tatgaagatc ctataatact ttctaaaatt aataaatatg attctgcaa tgtaaatgaa 360
 gagagagaaa atatttgag taattttatt tattgaaag cattctctac aaatctta 420
 tttagaaaa atattaatca gcctatacaa ataaaagtaa tgtctgatgg aagtttat 480
 gtttgatt atagtattc ttcatlaag aaattgata ttaatggaaa tctaataagg 540
 5 aaaatatccc atggaaaaag attagaaaaa cagcagacta gctggaggag aaatttact 600
 cagttgcag caaaagttta tcctatgaa aaattagaaa atcctagagg ttgatata 660
 gatgcaaacg gatataata tatagccaat actaaaaag ataaatatt aaaatatgat 720
 gctaatacata attatattac aaatattggg gtatccgggtg taagtaatgg tcagcttct 780
 ggacctcat ctgttctgt tgatagagaa ggaaatttat atgtttctga tacaggaaat 840
 10 aatagaatag ttatattga tatagaagga aatttctat atagtttg aaaactggg 900
 gaaaataatg gagagttct ttctctgcg ggcatacggtg ttgatgaaa atattttat 960
 gttgctgata tgggtaataa aagaatacag caatttgatt tgagcggaaa ttatattcag 1020
 agtataaagc ataatttatt taatgagcct agaggtttat ctttgctaa agatggaaat 1080
 ctttatatag ctgatggaag taaggtttt tattataata tagctgaatc agattttaca 1140
 15 atatttaata attccgaaag atatacagta actcctact ctattgctga gggacctgat 1200
 ggaaatata atcttactga ttatgtct ggaagaattg atgtatatac tagaaaagaa 1260
 gaatttaccg ctaattaga tttatttga gacagagaat atttaaatag attccctgt 1320
 gtttagctt ctgttaccg gagagataga gctatgaacc ctgtagtgg attactcct 1380
 gaaaatttct ttgttacaga gaatgcaggt gttgctcata aagttgggtt ttatgatgct 1440
 20 cctgaattgc atgaatatag attcgtgtat ttaatagaag atagtctgc tgctaaacct 1500
 tatgagagca gaattaaaga agagattagt aattttacta tgagctaac taataatgat 1560
 gaagttttag ttatacata taatgatcag gtttacaagt ctgataatta tgatgctaga 1620
 aatttaagaa tactgaaaa tgctaagct ttccattta caggcggaa atctgcttg 1680
 gatgatgctt attatgaagc tataagactc tcaggaaata gtttaagaa aactgctatt 1740
 25 atacatttt cagtaactag tcctgacgac agagtattg atagatgaa cttaatgat 1800
 gtagcaagt ttgctaaaaa caatgcagtt tcattaaacc aagtttatat cggtaaaaat 1860
 aaatctaatt atttctaga ttaatgact gagaatact acggttatat tatagatgct 1920
 gattattcta taaattatac tgctgagctt aatagaatga aaaatataaa ttggaaga 1980
 tattcatat actataacag tttagaaat ttagctcagt caggacagtt tagggcttg 2040
 30 aatgttaagg ttcaatatag agatatgtat ggtgaagaag aagttggta ttagtgcca 2100

<210> 36

<211> 700

35 <212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 36
Met Arg Ile Lys Leu Leu Ala Val Ile Val Leu Phe Leu Met Thr Ile
1 5 10 15
Ser Leu Ser Tyr Thr Phe Asp Lys Thr Pro Tyr Tyr Val Asn Thr Glu
5 20 25 30
Thr Tyr Asp Ser Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Gly Val His Tyr Tyr Asn
35 40 45
Gln Glu Arg Tyr Asp Ala Ser Ile Ala Ser Phe Arg Asn Ser Leu Asn
50 55 60
10 Thr Asn Pro Thr Asp Lys Phe Ile Arg Tyr Trp Tyr Ser Lys Ser Leu
65 70 75 80
Tyr Lys Ala Gly Tyr Met Ser Leu Ala Ile Asn Glu Trp Leu Asn Ile
85 90 95
Thr Arg Met Gly Tyr Glu Asp Pro Ile Ile Leu Ser Lys Ile Asn Lys
15 100 105 110
Tyr Asp Ser Ala Asn Val Asn Glu Glu Arg Glu Asn Ile Leu Ser Asn
115 120 125
Phe Ile Tyr Leu Lys Ala Phe Ser Thr Asn Leu Asn Phe Arg Lys Asn
130 135 140
20 Ile Asn Gln Pro Ile Gln Ile Lys Val Met Ser Asp Gly Ser Leu Tyr
145 150 155 160
Val Leu Asp Tyr Ser Asp Ser Ser Leu Lys Lys Phe Asp Ile Asn Gly
165 170 175
Asn Leu Ile Gly Lys Ile Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Lys Gln Gln
25 180 185 190
Thr Ser Trp Trp Arg Asn Leu Leu Gln Phe Ala Ala Lys Val Tyr Pro
195 200 205
Tyr Glu Lys Leu Glu Asn Pro Arg Gly Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly
210 215 220
30 Tyr Ile Tyr Ile Ala Asn Thr Lys Lys Asp Lys Ile Leu Lys Tyr Asp
225 230 235 240
Ala Asn His Asn Tyr Ile Thr Asn Ile Gly Val Ser Gly Val Ser Asn
245 250 255
Gly Gln Leu Leu Gly Pro Ser Ser Val Ala Val Asp Arg Glu Gly Asn
35 260 265 270
Leu Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asn Asn Arg Ile Val Ile Phe Asp Ile
275 280 285

Glu Gly Asn Phe Leu Tyr Ser Phe Gly Lys Leu Gly Glu Asn Asn Gly
 290 295 300
 Glu Phe Phe Ser Pro Ala Gly Ile Ala Val Asp Asp Lys Tyr Ile Tyr
 305 310 315 320
 5 Val Ala Asp Met Gly Asn Lys Arg Ile Gln Gln Phe Asp Leu Ser Gly
 325 330 335
 Asn Tyr Ile Gln Ser Ile Lys His Asn Leu Phe Asn Glu Pro Arg Gly
 340 345 350
 Leu Ser Phe Ala Lys Asp Gly Asn Leu Tyr Ile Ala Asp Gly Ser Lys
 10 355 360 365
 Val Phe Tyr Tyr Asn Ile Ala Glu Ser Asp Phe Thr Ile Phe Asn Asn
 370 375 380
 Ser Glu Arg Tyr Thr Val Thr Pro Thr Ser Ile Ala Glu Gly Pro Asp
 385 390 395 400
 15 Gly Asn Ile Tyr Leu Thr Asp Phe Met Ser Gly Arg Ile Asp Val Tyr
 405 410 415
 Thr Arg Lys Glu Glu Tyr Tyr Ala Asn Leu Asp Val Phe Val Asp Arg
 420 425 430
 Glu Tyr Leu Asn Arg Phe Pro Val Val Val Ala Ser Val Thr Val Arg
 20 435 440 445
 Asp Arg Ala Met Asn Pro Val Val Gly Leu Thr Pro Glu Asn Phe Phe
 450 455 460
 Val Thr Glu Asn Ala Gly Val Ala His Lys Val Gly Phe Tyr Asp Ala
 465 470 475 480
 25 Pro Glu Leu His Glu Tyr Arg Phe Val Tyr Leu Ile Glu Asp Ser Leu
 485 490 495
 Ala Ala Lys Pro Tyr Glu Ser Arg Ile Lys Glu Glu Ile Ser Asn Phe
 500 505 510
 Thr Met Ser Leu Thr Asn Asn Asp Glu Val Leu Val Ile His Tyr Asn
 30 515 520 525
 Asp Gln Val Tyr Lys Ser Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asn Leu Arg Ile
 530 535 540
 Leu Glu Asn Ala Asn Ala Phe His Phe Thr Gly Gly Ile Ser Ala Leu
 545 550 555 560
 35 Asp Asp Ala Tyr Tyr Glu Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Ser Phe Lys
 565 570 575
 Lys Thr Ala Ile Ile His Phe Ser Val Thr Ser Pro Asp Asp Arg Val

580 585 590
Phe Asp Met Met Asn Phe Asn Asp Val Ala Ser Phe Ala Lys Asn Asn
595 600 605
Ala Val Ser Leu Asn Gln Val Tyr Ile Gly Thr Asn Lys Ser Asn Tyr
5 610 615 620
Phe Leu Asp Leu Met Thr Glu Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Ile Asp Ala
625 630 635 640
Asp Tyr Ser Ile Asn Tyr Thr Ala Glu Leu Asn Arg Met Lys Asn Ile
645 650 655
10 Asn Phe Gly Arg Tyr Phe Ile Tyr Tyr Asn Ser Phe Arg Asn Leu Ala
660 665 670
Gln Ser Gly Gln Phe Arg Ala Leu Asn Val Lys Val Gln Tyr Arg Asp
675 680 685
Met Tyr Gly Glu Glu Glu Val Gly Tyr Val Val Pro
15 690 695 700

<210> 37
<211> 711
20 <212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 37
atgatagaat caatacaaag aatacatgcc agaataggcg agattcagga tacttttaat 60
25 aaattaggtt ttgctcctat taatactcag attcctacta aaccttttgc tgaacattta 120
aatgaagcta tggcagaaaa caaagtcaat aatattgatg gttctatagt taatgataca 180
aataaaaaagt tagataatgg aaaagtaatt aatggagata cttcttctga tgctttcaaa 240
ggaaatatat catttggtgt ttatgatagt aatacaaata atttgctaa agctataaat 300
gcttataaaa aagcttcagt agaaagtttc cctactaaat atgatgatat aattaaagag 360
30 gcagcagaga aatattcttt gcctgaaaat ttaataaaag cgggtataaa gcaggaatca 420
aactatgtgc ctaatgctgt aagtcataaa ggtgctgttg gtttgatgca gataatgccg 480
caaacaggtg ttggcttagg tattactgat acagaaatgc ttaaagatcc atacactaat 540
ataatggctg gaagcagata ttatcacag atgttaaaca gatatgatgg aagacttgat 600
ttatctttat ctgcttataa tgccggacct gctttggtag acagattaca gagaatccct 660
35 aatatagagg aaactcaaaa ctatgttaaa aacattatag gatataataa g 711

<210> 38

<211> 237
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

5 <400> 38
Met Ile Glu Ser Ile Gln Arg Ile His Ala Arg Ile Gly Glu Ile Gln
1 5 10 15
Asp Thr Phe Asn Lys Leu Gly Phe Ala Pro Ile Asn Thr Gln Ile Pro
20 25 30
10 Thr Lys Pro Phe Ala Glu His Leu Asn Glu Ala Met Ala Glu Asn Lys
35 40 45
Val Asn Asn Ile Asp Gly Ser Ile Val Asn Asp Thr Asn Lys Lys Leu
50 55 60
Asp Asn Gly Lys Val Ile Asn Gly Asp Thr Ser Ser Asp Ala Phe Lys
15 65 70 75 80
Gly Asn Ile Ser Phe Gly Val Tyr Asp Ser Asn Thr Asn Asn Phe Ala
85 90 95
Lys Ala Ile Asn Ala Tyr Lys Lys Ala Ser Val Glu Ser Phe Pro Thr
100 105 110
20 Lys Tyr Asp Asp Ile Ile Lys Glu Ala Ala Glu Lys Tyr Ser Leu Pro
115 120 125
Glu Asn Leu Ile Lys Ala Val Ile Lys Gln Glu Ser Asn Tyr Val Pro
130 135 140
Asn Ala Val Ser His Lys Gly Ala Val Gly Leu Met Gln Ile Met Pro
25 145 150 155 160
Gln Thr Gly Val Gly Leu Gly Ile Thr Asp Thr Glu Met Leu Lys Asp
165 170 175
Pro Tyr Thr Asn Ile Met Ala Gly Ser Arg Tyr Leu Ser Gln Met Leu
180 185 190
30 Asn Arg Tyr Asp Gly Arg Leu Asp Leu Ser Leu Ser Ala Tyr Asn Ala
195 200 205
Gly Pro Ala Leu Val Asp Arg Leu Gln Arg Ile Pro Asn Ile Glu Glu
210 215 220
Thr Gln Asn Tyr Val Lys Asn Ile Ile Gly Tyr Ile Lys
35 225 230 235

<210> 39
<211> 258
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

5

<400> 39
atgaaaatag ttttaatga aagagcttgg caggaatata tagagtgggt atcagaagat 60
aaaaaaatag taaaaaaaaa taacgacttg attaaagata taataagaaa tccttgtgat 120
ggaataggaa aagcagaaaa attaaaatat gataaaaaag atctttactc tagaagaata 180
10 aataaagaac atagattagt atatcatata gaaaataatc aattaataat aacatcttgt 240
aaataccatt atgataag 258

<210> 40
<211> 86
15 <212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 40
Met Lys Ile Val Phe Asn Glu Arg Ala Trp Gln Glu Tyr Ile Glu Trp
20 1 5 10 15
Val Ser Glu Asp Lys Lys Ile Val Lys Lys Ile Asn Asp Leu Ile Lys
20 25 30
Asp Ile Ile Arg Asn Pro Cys Asp Gly Ile Gly Lys Ala Glu Lys Leu
35 40 45
25 Lys Tyr Asp Lys Lys Asp Leu Tyr Ser Arg Arg Ile Asn Lys Glu His
50 55 60
Arg Leu Val Tyr His Ile Glu Asn Asn Gln Leu Ile Ile Thr Ser Cys
65 70 75 80
Lys Tyr His Tyr Asp Lys
30 85

<210> 41
<211> 2646
35 <212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 41

gtggagattt tagtgaattt tattaagaaa aattgtatta ttttatttc atttcttta 60
 ctgctgcag ctttattaat atctgcagag agtgacttg aaaattaca aacagcaaga 120
 aatatagctg tatatgaagg gcttacaata aaccgtatag atgttacagg tgaagtaagg 180
 5 cttacaaagg aacaaataat aaacaattt cctataaaag ccggcagtaa atttcaaaga 240
 acagaaataa atgcagccat aaaaaacta ttgatacgc agttattcga tagagtggca 300
 atagatgcaa acagagaaga tgacggagta gttttaaata ttgtagtagc tgaaagattc 360
 ataataaaag atatagaata tataggaaat aaaagattaa gcagaacagc acttaatgat 420
 gccgtaaaac caattatgaa agcaggtgat ccttatatac ctcaaaaatt aaatgatgct 480
 10 gttaatgcta taataacaaa ttatcaagat aaaggatatt tgaaagctta tgttgagcct 540
 aaagtaatag aaaataaaga tacttctgat gtttataac aaatgaacat agtagaaggt 600
 aatgaagtta aggttgctaa tataagattc catggtaata cacattttac tgataatgaa 660
 cttaaagac agatgtcaac aaaagaaaat ggatttatga ctctggaaa atttaatgag 720
 ttacatttg atggagacaa agataaaatt gttaaatact atgcagatag aggttactat 780
 15 agagccaaag ttgataatgt aaagttcaca tatcaatgga gaaatctga aataaaaaat 840
 gaacaggatt taataataga tatatatgtt acagagggag ataaatatta ttccggagat 900
 ataggattta aaggaaactt tataatacct tctgaaaata taaaaaaga tataaaatca 960
 aaaaaaggtg ctttatataa ttacacatat catatggcag actatcaggg tatacaaaat 1020
 aaatattctg aaagaggtta tatattcaga caagttatac ctgtaattac agtaaatgaa 1080
 20 gaaaataaaa tagtaaataat aatgtatgat attgttgaag atgataaagt gcatatagaa 1140
 aatattacta tagcaggaaa taaaaaact aaagattttg ttatagaaag atatatagat 1200
 ataaaaccg gagaagtatt caatactgca aaaatacaaa gagttcaaga gagattatat 1260
 aatactcaat tcttgataa tattaattta ggagtaaac ctggttctgc tgaaggactt 1320
 atggaattaa atttaagtgt aactgaagga agaacagcta tggatcagg aggaggcgg 1380
 25 ttctccactg gtccggatt taaggattt gcttctatta gagaaaataa ctcttagga 1440
 agaggattgc agttaggatt aagcggagaa ttggagagc agcagaaacg tatagctgtt 1500
 aactttgctg agccttatt acttaactg cctatatatt tgggtgtgga ttatcatac 1560
 ttcaatgaag gtgtaaacac tggttatcaa ataggaaccg atggttaatt tggatacct 1620
 aaatactcat actatactag acatggtttt gaaggtatag taagactagg ttattactt 1680
 30 gctgattatt attctacatt cataacattt gataccatag tacagcagta tcagcaatgg 1740
 catgaccaag gagctactgc tgccggctct aattatgtt ttagtgatat aaaaaaatat 1800
 ttaactcata gagttaataa aaaagatgga tcattccaaa gatgggaaag tgattggtt 1860
 acaacattca ttgttcata ttcttactt agagatagca gaaacgatta ttgaaccct 1920
 actagaggaa gttcttgag aggtatggtta gatttctatt ttggacacac ccagcttaca 1980
 35 agattgagtg ctacaggatt ctggctgta cctgtacag aatggctgtc attgcattc 2040
 tatggagaat taggacaaat aattgctact cctggacttg ctttgcaaaa tgatgctgat 2100
 gttcttatt atcttaacc attgaagat gtaaggggat gggatactc caaatatact 2160

atatttaaga aaaacagagg attatcaact tatgatatgt taggagccaa cggtcagac 2220
ggtaaaccta ctactgactc ttggagttac ggtagagcaa aagtaagatt ctttgctgaa 2280
cttcgtatac ctataatacc taaaactcct ggattcgtta ctttccttga tgcaggacaa 2340
ttatggatgc catacagtac aggttggaat caggacggag atgctcattc ataccttct 2400
5 caatttatga atattaaaga tatattgat ccttctcaat atatatattc ttaggaata 2460
ggattcagac ttacaatacc tatattcaat ataagattct atattgctaa aagattcgtt 2520
tacaataaag aagatgttgg atttggtaaa ggatttcaag atttgaagg agatacttc 2580
actcctcttg gtgcttggtt cggaagagga tggggaattg catttactat gaaccaccca 2640
ttctat 2646

10

<210> 42
<211> 882
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

15

<400> 42
Val Glu Ile Leu Val Asn Phe Ile Lys Lys Asn Cys Ile Ile Leu Phe
1 5 10 15
Ser Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ile Ser Ala Glu Ser Asp
20 20 25 30
Phe Glu Asn Leu Gln Thr Ala Arg Asn Ile Ala Val Tyr Glu Gly Leu
35 40 45
Thr Ile Asn Arg Ile Asp Val Thr Gly Glu Val Arg Leu Thr Lys Glu
50 55 60
25 Gln Ile Ile Asn Asn Phe Pro Ile Lys Ala Gly Ser Lys Phe Gln Arg
65 70 75 80
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Ile Lys Lys Leu Phe Asp Thr Gln Leu Phe
85 90 95
Asp Arg Val Ala Ile Asp Ala Asn Arg Glu Asp Asp Gly Val Val Leu
30 100 105 110
Asn Ile Val Val Ala Glu Arg Phe Ile Ile Lys Asp Ile Glu Tyr Ile
115 120 125
Gly Asn Lys Arg Leu Ser Arg Thr Ala Leu Asn Asp Ala Val Lys Pro
130 135 140
35 Ile Met Lys Ala Gly Asp Pro Tyr Ile Pro Gln Lys Leu Asn Asp Ala
145 150 155 160
Val Asn Ala Ile Ile Thr Asn Tyr Gln Asp Lys Gly Tyr Leu Lys Ala

	165	170	175	
	Tyr Val Glu Pro Lys Val Ile Glu Asn Lys Asp Thr Ser Asp Val Leu			
	180	185	190	
	Ile Gln Met Asn Ile Val Glu Gly Asn Glu Val Lys Val Ala Asn Ile			
5	195	200	205	
	Arg Phe His Gly Asn Thr His Phe Thr Asp Asn Glu Leu Lys Arg Gln			
	210	215	220	
	Met Ser Thr Lys Glu Asn Gly Phe Met Thr Leu Gly Lys Phe Asn Glu			
	225	230	235	240
10	Phe Thr Phe Asp Gly Asp Lys Asp Lys Ile Val Lys Tyr Tyr Ala Asp			
	245	250	255	
	Arg Gly Tyr Tyr Arg Ala Lys Val Asp Asn Val Lys Phe Thr Tyr Gln			
	260	265	270	
	Trp Arg Asn Pro Glu Ile Lys Asn Glu Gln Asp Leu Ile Ile Asp Ile			
15	275	280	285	
	Tyr Val Thr Glu Gly Asp Lys Tyr Tyr Phe Gly Asp Ile Gly Phe Lys			
	290	295	300	
	Gly Asn Phe Ile Ile Pro Ser Glu Asn Ile Gln Lys Asp Ile Lys Ser			
	305	310	315	320
20	Lys Lys Gly Ala Leu Tyr Asn Tyr Thr Tyr His Met Ala Asp Tyr Gln			
	325	330	335	
	Gly Ile Gln Asn Lys Tyr Ser Glu Arg Gly Tyr Ile Phe Arg Gln Val			
	340	345	350	
	Ile Pro Val Ile Thr Val Asn Glu Glu Asn Lys Ile Val Asn Ile Met			
25	355	360	365	
	Tyr Asp Ile Val Glu Asn Asp Lys Val His Ile Glu Asn Ile Thr Ile			
	370	375	380	
	Ala Gly Asn Thr Lys Thr Lys Asp Phe Val Ile Glu Arg Tyr Ile Asp			
	385	390	395	400
30	Ile Lys Pro Gly Glu Val Phe Asn Thr Ala Lys Ile Gln Arg Val Gln			
	405	410	415	
	Glu Arg Leu Tyr Asn Thr Gln Phe Phe Asp Asn Ile Asn Leu Gly Val			
	420	425	430	
	Lys Pro Gly Ser Ala Glu Gly Leu Met Glu Leu Asn Leu Ser Val Thr			
35	435	440	445	
	Glu Gly Arg Thr Ala Met Val Ser Gly Gly Gly Gly Phe Ser Thr Gly			
	450	455	460	

Ser Gly Phe Lys Val Phe Ala Ser Ile Arg Glu Asn Asn Phe Leu Gly
 465 470 475 480
 Arg Gly Leu Gln Leu Gly Leu Ser Gly Glu Phe Gly Glu Gln Gln Lys
 485 490 495
 5 Arg Ile Ala Val Asn Phe Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Leu Pro Ile
 500 505 510
 Tyr Leu Gly Val Asp Leu Ser Tyr Phe Asn Glu Gly Val Asn Thr Gly
 515 520 525
 Tyr Gln Ile Gly Thr Asp Gly Asn Phe Gly Ile Pro Lys Tyr Ser Tyr
 10 530 535 540
 Tyr Thr Arg His Gly Phe Glu Gly Ile Val Arg Leu Gly Tyr Tyr Phe
 545 550 555 560
 Ala Asp Tyr Tyr Ser Thr Phe Ile Thr Phe Asp Thr Ile Val Gln Gln
 565 570 575
 15 Tyr Gln Gln Trp His Asp Gln Gly Ala Thr Ala Ala Gly Pro Asn Tyr
 580 585 590
 Val Leu Ser Asp Ile Lys Lys Tyr Leu Thr His Arg Val Asn Lys Lys
 595 600 605
 Asp Gly Ser Phe Gln Arg Trp Glu Ser Asp Trp Phe Thr Thr Phe Ile
 20 610 615 620
 Val Ser Tyr Ser Leu Leu Arg Asp Ser Arg Asn Asp Tyr Leu Asn Pro
 625 630 635 640
 Thr Arg Gly Ser Phe Leu Arg Gly Met Val Asp Phe Tyr Phe Gly His
 645 650 655
 25 Thr Gln Leu Thr Arg Leu Ser Ala Thr Gly Phe Leu Ala Val Pro Ala
 660 665 670
 Thr Glu Trp Leu Ser Phe Ala Phe Tyr Gly Glu Leu Gly Gln Ile Ile
 675 680 685
 Ala Thr Pro Gly Leu Ala Leu Gln Asn Asp Ala Asp Val Leu Tyr Tyr
 30 690 695 700
 Leu Asn Pro Phe Glu Asp Val Arg Gly Trp Asp Thr Ser Lys Tyr Thr
 705 710 715 720
 Ile Phe Lys Lys Asn Arg Gly Leu Ser Thr Tyr Asp Met Leu Gly Ala
 725 730 735
 35 Asn Gly Ser Asp Gly Lys Pro Thr Thr Asp Ser Trp Ser Tyr Gly Arg
 740 745 750
 Ala Lys Val Arg Phe Phe Ala Glu Leu Arg Ile Pro Ile Ile Pro Lys

755 760 765
Thr Leu Gly Phe Val Thr Phe Leu Asp Ala Gly Gln Leu Trp Met Pro
770 775 780
Tyr Ser Thr Gly Trp Asn Gln Asp Gly Asp Ala His Ser Tyr Pro Ser
5 785 790 795 800
Gln Phe Met Asn Ile Lys Asp Ile Phe Asp Pro Ser Gln Tyr Ile Tyr
805 810 815
Ser Val Gly Ile Gly Phe Arg Leu Thr Ile Pro Ile Phe Asn Ile Arg
820 825 830
10 Phe Tyr Ile Ala Lys Arg Phe Val Tyr Asn Lys Glu Asp Val Gly Phe
835 840 845
Gly Lys Gly Phe Gln Asp Phe Glu Gly Asp Thr Phe Thr Pro Leu Gly
850 855 860
Ala Trp Phe Gly Arg Gly Trp Gly Ile Ala Phe Thr Met Asn His Pro
15 865 870 875 880
Phe Tyr

20 <210> 43
<211> 1308
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

25 <400> 43
atgaaacgtt tatattttat ttatcagct ttattaataa ctgcttatag tgcatttagt 60
tatactgttg tagaagattt caatgatttt ttagttgatg aaaatcaatt aagaataagg 120
cttgacagat tcggagtatt ggcaggaaca gagaatttaa gatttatggt tggagtatca 180
ggagaaactg caggagtatt gcttgataat ttagacagag gtactaaagg aggaataaat 240
30 acattcagac cggcagcaat agcaggattt ggatataaaa cagaaagttt tggtataggt 300
gtaggttatc agtttaaata tatatcagga agctggcagt cgcatactcc tataataaca 360
gcaacagctt tgaatgataa cttgagaatc aatgtacctg ttacaatagg agtaggaagc 420
ggaaatgtta atgacggaga tatagcagtt tcaacagata ctagaataga atattataca 480
ggaaacaata tattcagcag aataagagtt aatcttaaat atggtatgta tagattaaaa 540
35 gctaataaaa gcagaagcgg agatttgaca ggaagcggaa atataaatat gggtactgta 600
agtggaaactg taggcgagaa tggtaaataat ggatttctta aagatactac agcacattct 660
ataggaatag atgtaagagg ttattttata gcggcaacag atcctgtatt agtagagcct 720

cagataagag tattatatca aggttctata gcggatttta caggacttc atataaagta 780
acaacaccca ctggaactaa agaaggagga gcaggattcg gactctataa tatagatgct 840
tcaaactcta taggtgcttt ttcaataggt gatacagggt caatacaatc agtgccttat 900
tatgatttta ctgctcataa tataatgttt acagggtgaag gagcttcaat agagatagga 960
5 ggtacagaat attatcttac aaagccgcag ttttaggaa tatccgttcc tgtgggggtt 1020
actgctgaaa gtgagtttat tacattgtat ttggagcctg ctttatcatt ctctatgatt 1080
acaggaggaa ttaattctta tgcaagcagt gctaagcctg taagaatacc gcctttattt 1140
tattcggttg gatatttggat atatggagaa ttatatataa ctcctaaacc taatttagaa 1200
tggtattttg aggctcagat tggaagtgtc acaactattg atagtatagg agatagtaaa 1260
10 cagggaggtt tagcttcaa tggaagtacc ggtatcactt ggaagttt 1308

<210> 44
<211> 436
<212> PRT
15 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 44
Met Lys Arg Leu Tyr Phe Ile Leu Ser Ala Leu Leu Ile Thr Ala Tyr
1 5 10 15
20 Ser Ala Phe Ser Tyr Thr Val Val Glu Asp Phe Asn Asp Phe Leu Val
20 25 30
Asp Glu Asn Gln Leu Arg Ile Arg Leu Asp Arg Phe Gly Val Leu Ala
35 40 45
Gly Thr Glu Asn Leu Arg Phe Met Val Gly Val Ser Gly Glu Thr Ala
25 50 55 60
Gly Val Leu Leu Asp Asn Leu Asp Arg Gly Thr Lys Gly Gly Ile Asn
65 70 75 80
Thr Phe Arg Pro Ala Ala Ile Ala Gly Phe Gly Tyr Lys Thr Glu Ser
85 90 95
30 Phe Gly Ile Gly Val Gly Tyr Gln Phe Lys Tyr Ile Ser Gly Ser Trp
100 105 110
Gln Ser His Thr Pro Ile Ile Thr Ala Thr Ala Leu Asn Asp Asn Leu
115 120 125
Arg Ile Asn Val Pro Val Thr Ile Gly Val Gly Ser Gly Asn Val Asn
35 130 135 140
Asp Gly Asp Ile Ala Val Ser Thr Asp Thr Arg Ile Glu Tyr Tyr Thr
145 150 155 160

Gly Asn Asn Ile Phe Ser Arg Ile Arg Val Asn Leu Lys Tyr Gly Met
 165 170 175
 Tyr Arg Leu Lys Ala Asn Glu Ser Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Ser
 180 185 190
 5 Gly Asn Ile Asn Met Gly Thr Val Ser Gly Thr Val Gly Glu Asn Gly
 195 200 205
 Lys Tyr Gly Phe Leu Lys Asp Thr Thr Ala His Ser Ile Gly Ile Asp
 210 215 220
 Val Arg Gly Tyr Phe Ile Ala Ala Thr Asp Pro Val Leu Val Glu Pro
 10 225 230 235 240
 Gln Ile Arg Val Leu Tyr Gln Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly Thr
 245 250 255
 Ser Tyr Lys Val Thr Thr Pro Thr Gly Thr Lys Glu Gly Gly Ala Gly
 260 265 270
 15 Phe Gly Leu Tyr Asn Ile Asp Ala Ser Asn Pro Ile Gly Ala Phe Ser
 275 280 285
 Ile Gly Asp Thr Gly Ser Ile Gln Ser Val Pro Tyr Tyr Asp Phe Thr
 290 295 300
 Ala His Asn Ile Met Phe Thr Gly Glu Gly Ala Ser Ile Glu Ile Gly
 20 305 310 315 320
 Gly Thr Glu Tyr Tyr Leu Thr Lys Pro Gln Phe Leu Gly Ile Ser Val
 325 330 335
 Pro Val Gly Phe Thr Ala Glu Ser Glu Phe Ile Thr Leu Tyr Leu Glu
 340 345 350
 25 Pro Ala Leu Ser Phe Ser Met Ile Thr Gly Gly Ile Asn Ser Tyr Ala
 355 360 365
 Ser Ser Ala Lys Pro Val Arg Ile Pro Pro Leu Phe Tyr Ser Val Gly
 370 375 380
 Tyr Leu Val Tyr Gly Glu Leu Tyr Ile Thr Pro Lys Pro Asn Leu Glu
 30 385 390 395 400
 Trp Tyr Phe Glu Ala Gln Ile Gly Ser Ala Thr Thr Ile Asp Ser Ile
 405 410 415
 Gly Asp Ser Lys Gln Gly Gly Leu Ala Phe Asn Gly Ser Thr Gly Ile
 420 425 430
 35 Thr Trp Lys Phe
 435

<210> 45

<211> 2367

<212> DNA

5 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 45

atgaaatata aacctacaag caggaaagaa ttaaagatt tagtaacaga tgaaagtatt 60
tattgggtg atattgatac tagcttaata actgatatgt caaacttatt tgatttttt 120
10 aatagagata attatgacgg tatagaaaat tgggatactt ctaatgtaga aaatatggct 180
ggtatgttt ctgctaatag gaattttaat aaagatatta gtaaattggaa tgtatctaaa 240
gtgaaaaata cagcttatat gttttcttg gctgaaaaat ttaatcagcc ttgaatgat 300
tgggacgtta gtaatgtaat aaatatgaat agcatgttta tgaatgctaa aagttttaat 360
cagcctatta ataattggaa tgtaagtaaa gtcaaagta tgagcaatat gtttaatcgt 420
15 gccgaaagtt ttaatcaaaa tataaatgat tggaatgtaa gtaatgtaga aaatatgaat 480
catatgttt catctgccta taaattcaat cagcctttat ttaaatggga tacttctaaa 540
gtaaaagaga tggctggtat gtttcatta gcttatgcat ttaatcagcc tottaacaat 600
tggaatgtaa gcaatgttac taatatgagg tgcattgta tgttgcaag agattttaat 660
aagcctatta ataattggaa tacaaaaaaa ttaaagatg caggaagtat gtctcaaat 720
20 acatcggcat tcaatcagaa ttagatgat tggaatattg ataactttc agatatgagt 780
aattttaata aagattctaa attagaatta acatttaaatt caaaaattta ttatatgct 840
ttaactttag aaaaagaaga aaaaaataat ttacatgatt ttataaaaaa caatgtaaaa 900
aagatatatg aaattataga aaatcataaa aacaagaagg ttaactttct taaagatat 960
ttaataaata attttatag tgaattaaaa gaattaatac cagattatat tgaaagttt 1020
25 aatagcatag aagaagtta taattatata gacaaaaatt ataataaaaa agatgataaa 1080
aaagtaaaat ttatagatga tataaaaaatt gaaaatatag ataaaagaat aataaaatat 1140
atttacttat catatttaga attaaaaaga gaagcctaca gaataaagca aatagattat 1200
attataaatt taattgataa aaaactttt ataaatgcaa taaaacgat atacacaagc 1260
accaataaag aaacatctct aattatgtac ggaatatacg gaggagatga ggcattaaga 1320
30 gagatttaca aaaaagaaaa agattcaaaa ttatgtttac ttgtatttc tatcaataaa 1380
aacagtaaatt atgctattaa tatgctttat aatgtattta agaaaagtaa aaaatatgaa 1440
gtaaaagaga cagcagaaaa aattattgag gatatagcaa aagaaaataa ttgagcgtt 1500
tatgaatttg gattaaaaac tataccaaat ttggattca atataaacgg tgaaaaaata 1560
ataaataata atcaatataa aataatttg aaaaacgatt atactataga gtttttgat 1620
35 atcaaagaaa ataaaatatt aaagcaaata cctaaatatt ttgataatag taccaaagaa 1680
gaaattaaat atataaaaac agaaattcca aatattataa aaaatcaaag cagaaattta 1740
ataaaaattt tattaacagg taaaagtac tatttcaatt ttttaaga aatatttatt 1800

gataatccaa taatgaataa atttgaatt aatttagttt ggaatttatt tgatgaaaat 1860
aacaatttta taacgacatt taggtattca ggcgacggaa gttatacaaa ctacgatgat 1920
aatacagtga atataaatga taattatttt gtaagtttat caagccctat agaaatggaa 1980
gaaaaaatta tatcaaaatg gaaaaaacat ctgaagatt atgaattatc acagcctata 2040
5 atgcagttta caaatataaa aataaataat ttagaagaag cattaaaaaa attagaaaat 2100
atagaaataa gctacggtac aataaaagca ttttctcaaa agtatgatat gaatactgaa 2160
tgtaaaagct attacgaaat taacggatat tcatttgaag actcatacaa taatcaagat 2220
tttatataa gaacaaaaat tatcaatact gaaaccaatt ataataataa aataaaaaatt 2280
aatatagagt ttaacaatgc tagcaacaga ttatatata ctggccttat actttaata 2340
10 tgggatttta gattaactga aatattt 2367

<210> 46
<211> 789
<212> PRT
15 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 46
Met Lys Tyr Lys Pro Thr Ser Arg Lys Glu Leu Lys Asp Leu Val Thr
1 5 10 15
20 Asp Glu Ser Ile Tyr Leu Gly Asp Ile Asp Thr Ser Leu Ile Thr Asp
20 25 30
Met Ser Asn Leu Phe Asp Phe Phe Asn Arg Asp Asn Tyr Asp Gly Ile
35 40 45
Glu Asn Trp Asp Thr Ser Asn Val Glu Asn Met Ala Gly Met Phe Ser
25 50 55 60
Ala Asn Arg Asn Phe Asn Lys Asp Ile Ser Lys Trp Asn Val Ser Lys
65 70 75 80
Val Lys Asn Thr Ala Tyr Met Phe Phe Leu Ala Glu Lys Phe Asn Gln
85 90 95
30 Pro Leu Asn Asp Trp Asp Val Ser Asn Val Ile Asn Met Asn Ser Met
100 105 110
Phe Met Asn Ala Lys Ser Phe Asn Gln Pro Ile Asn Asn Trp Asn Val
115 120 125
Ser Lys Val Gln Ser Met Ser Asn Met Phe Asn Arg Ala Glu Ser Phe
35 130 135 140
Asn Gln Asn Ile Asn Asp Trp Asn Val Ser Asn Val Glu Asn Met Asn
145 150 155 160

His Met Phe Ser Ser Ala Tyr Lys Phe Asn Gln Pro Leu Phe Lys Trp
 165 170 175
 Asp Thr Ser Lys Val Lys Glu Met Ala Gly Met Phe Ser Leu Ala Tyr
 180 185 190
 5 Ala Phe Asn Gln Pro Leu Asn Asn Trp Asn Val Ser Asn Val Thr Asn
 195 200 205
 Met Arg Cys Met Phe Met Phe Ala Arg Asp Phe Asn Lys Pro Ile Asn
 210 215 220
 Asn Trp Asn Thr Lys Lys Leu Lys Asp Ala Gly Ser Met Phe Ser Asn
 10 225 230 235 240
 Thr Ser Ala Phe Asn Gln Asn Leu Asp Asp Trp Asn Ile Asp Asn Leu
 245 250 255
 Ser Asp Met Ser Asn Phe Asn Lys Asp Ser Lys Leu Glu Leu Thr Phe
 260 265 270
 15 Lys Phe Lys Ile Tyr Leu Tyr Ala Leu Thr Leu Glu Lys Glu Glu Lys
 275 280 285
 Asn Asn Leu His Asp Phe Ile Lys Asn Asn Val Lys Lys Ile Tyr Glu
 290 295 300
 Ile Ile Glu Asn His Lys Asn Lys Lys Val Asn Leu Leu Lys Arg Tyr
 20 305 310 315 320
 Leu Ile Asn Asn Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Glu Leu Ile Pro Asp Tyr
 325 330 335
 Ile Glu Ser Phe Asn Ser Ile Glu Glu Val Tyr Asn Tyr Ile Asp Lys
 340 345 350
 25 Asn Tyr Asn Lys Lys Asp Asp Lys Lys Val Lys Phe Ile Asp Asp Ile
 355 360 365
 Lys Ile Glu Asn Ile Asp Lys Arg Ile Ile Lys Tyr Ile Tyr Leu Ser
 370 375 380
 Tyr Leu Glu Leu Lys Arg Glu Ala Tyr Arg Ile Lys Gln Ile Asp Tyr
 30 385 390 395 400
 Ile Ile Asn Leu Ile Asp Lys Lys Ser Phe Ile Asn Ala Ile Lys Thr
 405 410 415
 Ile Tyr Thr Ser Thr Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Met Tyr Gly Ile
 420 425 430
 35 Tyr Gly Gly Asp Glu Ala Leu Arg Glu Ile Tyr Lys Lys Glu Lys Asp
 435 440 445
 Ser Lys Leu Cys Leu Leu Val Phe Ser Ile Asn Lys Asn Ser Lys Tyr

450 455 460
 Ala Ile Asn Met Leu Tyr Asn Val Phe Lys Lys Ser Lys Lys Tyr Glu
 465 470 475 480
 Val Lys Glu Thr Ala Glu Lys Ile Ile Glu Asp Ile Ala Lys Glu Asn
 5 485 490 495
 Asn Leu Ser Val Tyr Glu Phe Gly Leu Lys Thr Ile Pro Asn Phe Gly
 500 505 510
 Phe Asn Ile Asn Gly Glu Lys Ile Ile Asn Asn Asn Gln Tyr Lys Ile
 515 520 525
 10 Ile Leu Lys Asn Asp Tyr Thr Ile Glu Phe Phe Asp Ile Lys Glu Asn
 530 535 540
 Lys Ile Leu Lys Gln Ile Pro Lys Tyr Phe Asp Asn Ser Thr Lys Glu
 545 550 555 560
 Glu Ile Lys Tyr Ile Lys Thr Glu Ile Pro Asn Ile Ile Lys Asn Gln
 15 565 570 575
 Ser Arg Asn Leu Ile Lys Ile Leu Leu Thr Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe
 580 585 590
 Asn Phe Phe Lys Glu Ile Phe Ile Asp Asn Pro Ile Met Asn Lys Phe
 595 600 605
 20 Ala Ile Asn Leu Val Trp Asn Leu Phe Asp Glu Asn Asn Asn Phe Ile
 610 615 620
 Thr Thr Phe Arg Tyr Ser Gly Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Asp Asp
 625 630 635 640
 Asn Thr Val Asn Ile Asn Asp Asn Tyr Phe Val Ser Leu Ser Ser Pro
 25 645 650 655
 Ile Glu Met Glu Glu Lys Ile Ile Ser Lys Trp Lys Lys His Leu Glu
 660 665 670
 Asp Tyr Glu Leu Ser Gln Pro Ile Met Gln Phe Thr Asn Ile Lys Ile
 675 680 685
 30 Asn Asn Leu Glu Glu Ala Leu Lys Lys Leu Glu Asn Ile Glu Ile Ser
 690 695 700
 Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Phe Ser Gln Lys Tyr Asp Met Asn Thr Glu
 705 710 715 720
 Cys Lys Ser Tyr Tyr Glu Ile Asn Gly Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Tyr
 35 725 730 735
 Asn Asn Gln Asp Phe Tyr Ile Arg Thr Lys Ile Ile Asn Thr Glu Thr
 740 745 750

Asn Tyr Asn Asp Lys Ile Lys Ile Asn Ile Glu Phe Asn Asn Ala Ser
755 760 765
Asn Arg Phe Ile Tyr Thr Trp Leu Ile Leu Leu Ile Trp Asp Phe Arg
770 775 780
5 Leu Thr Glu Ile Phe
785

<210> 47
10 <211> 729
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 47
15 atgataaaaa aaattttaac ttaatcttt gtattaattt tggcagcttc atgttctact 60
aatgataaac atgttgtagt attagctttt agtaaacagc ttcagtctgt actttataat 120
gataatagtc agtctacaaa aacagcatca aaaacatata tacaaaaaga tgatattaca 180
actgtagcag atcctataaa agaaaaaaaa gaatatataa atactcaagc acaagtaagt 240
aaaaaagcag aagaaaaaaaa agaagaactt acaaataacg atgctttaga agaagaaaaa
20 300
cctcaagtta taaagcaaac tgagggtata cagaaagatg ataatgagat tcttcttact 360
gcaaataata tatcttttga ttttgattct tatgaattaa aaaatgaata taatgaaggg 420
atagatgaaa ttgcaaata tttaaataat aatcgagata ttaatctaata aatagaagga 480
catagcgaca gtatagggga ctcaaattat aatatatatt tatctgaaaa cagagcaaaa 540
25 gcgatatttg ataaattagt agataaagga atagataaag atagacttag atatatagga 600
tatggctcta ctcatcctc tgagtataat gataaagaca gaaaatgcca atttggtata 660
ataaataatt cagatgaaga gcaggaatac aaaaaagaaa acgaaactga tattatcaaa 720
ttaaaacaa 729

30 <210> 48
<211> 243
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

35 <400> 48
Met Ile Lys Lys Ile Leu Thr Leu Ile Phe Val Leu Ile Leu Ala Ala
1 5 10 15

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

<210> 49
<211> 969
35 <212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 49
atgaaaaaaaa ttattttatt aatatttata ttattaaata tatcatgcag aaatatcatt 60
acaatagcag aaaataaaaa aaatatagat aatgtaaata atgtacatat agaagaaaat 120
gaatacttat atgctcttga aatagataaa gccaatcctc aaaatatgga agaagcatta 180
5 aaaagatatg cagcagatca taatggaaaa tataaattaa tattcacagg tacatcaaca 240
aaaaaatatg atgtttggac ttcaataagt caaatgcttg aagatatttc tttaaaaaac 300
ataaaaaatag aaatatcgat tgtaaagtga atttttccaa atggtaaaat acctgatttt 360
ttatttgag gaaatgctgt aaataaatca atagtaaaaa taacatttcc aaatagcata 420
actgaaatag gcgaatacag tattttttgt ccagaattaa cggaataaac acttccaagt 480
10 aatttaagaa caataggcag aagaggatta ataggatgcg aaagtttaaa aatactgaaa 540
cttcctaatt cattaaaaac aataggagaa ttatcattaa atggatgcgg atttgccagt 600
attgtaattc ctgattctgt aacttctata ggtaaaaagt cttttgccga ttgtgagaat 660
ttagtaata taaaattacc aaataattta gaaacaatac ctgatagtat gcttgaaagc 720
tgcggatcca ttaatacaat aactatacca gcactgttaa aaaaaataga aaattctgta 780
15 ttttttact gcaaaaactt tgaaaacatt agatttttaa atggtaatct tcaatcaatg 840
acagtaggaa aagatatatt tgcaggctgc ctttaaaaa atgtttatat acctaaaaac 900
agcagtgcac cagatgaaga atggagaaat actttaggca ttaatcaac tgtaaagatt 960
ataagagaa 969

20 <210> 50
<211> 323
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

25 <400> 50
Met Lys Lys Ile Ile Leu Leu Ile Phe Ile Leu Leu Asn Ile Ser Cys
1 5 10 15
Arg Asn Ile Ile Thr Ile Ala Glu Asn Lys Lys Asn Ile Asp Asn Val
20 25 30
30 Asn Asn Val His Ile Glu Glu Asn Glu Tyr Leu Tyr Ala Leu Glu Ile
35 40 45
Asp Lys Ala Asn Pro Gln Asn Met Glu Glu Ala Leu Lys Arg Tyr Ala
50 55 60
Ala Asp His Asn Gly Lys Tyr Lys Leu Ile Phe Thr Gly Thr Ser Thr
35 65 70 75 80
Lys Lys Tyr Asp Val Trp Thr Ser Ile Ser Gln Met Leu Glu Asp Ile
85 90 95

Ser Leu Lys Asn Ile Lys Ile Glu Ile Ser Ile Val Asn Val Ile Phe
100 105 110
Pro Asn Gly Lys Ile Pro Asp Phe Leu Phe Gly Gly Asn Ala Val Asn
115 120 125
5 Lys Ser Ile Val Lys Ile Thr Phe Pro Asn Ser Ile Thr Glu Ile Gly
130 135 140
Glu Tyr Ser Ile Phe Cys Pro Glu Leu Thr Glu Ile Thr Leu Pro Ser
145 150 155 160
Asn Leu Arg Thr Ile Gly Arg Arg Gly Leu Ile Gly Cys Glu Ser Leu
10 165 170 175
Lys Ile Leu Lys Leu Pro Asn Ser Leu Lys Thr Ile Gly Glu Leu Ser
180 185 190
Leu Asn Gly Cys Gly Phe Ala Ser Ile Val Ile Pro Asp Ser Val Thr
195 200 205
15 Ser Ile Gly Lys Ser Ala Phe Ala Asp Cys Glu Asn Leu Val Asn Ile
210 215 220
Lys Leu Pro Asn Asn Leu Glu Thr Ile Pro Asp Ser Met Leu Glu Ser
225 230 235 240
Cys Gly Ser Ile Asn Thr Ile Thr Ile Pro Ala Ser Val Lys Lys Ile
20 245 250 255
Glu Asn Ser Val Phe Phe Tyr Cys Lys Asn Phe Glu Asn Ile Arg Phe
260 265 270
Leu Asn Gly Asn Leu Gln Ser Met Thr Val Gly Lys Asp Ile Phe Ala
275 280 285
25 Gly Cys Pro Leu Lys Asn Val Tyr Ile Pro Lys Asn Ser Ser Ala Ser
290 295 300
Asp Glu Glu Trp Arg Asn Thr Leu Gly Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile
305 310 315 320
Ile Arg Glu
30

- <210> 51
- <211> 564
- 35 <212> DNA
- <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 51
atgcatattt ctggtgattc tcctttagat aggaaagttg gagatgctag ttattatttt 60
gctactgttc aacattgctg ggggtgggct acttggaata gagcttgga atattttgat 120
gtaactatgg aaagtataaa tttgaagat gtaaaaaaaaa caattagaaa aagatacaaa 180
5 gattttaata taaaagatta ctggcaaaga tggtttcta gaataaaaaa agagcattct 240
tctgtatggg attatcaatg gactactgt attatctcaa aaaatggaat atgcattaat 300
ccaagtataa atttaacttc taatatagga ttggagaag attctacca cactacaaat 360
gaaaatgatg aaaatataaa tagtaaaaca taccctatgg atactgaaaa tattattcat 420
cctaaagaaa taaaatgtga tgaaagagct gattttgaaa tagctattaa aagatttaat 480
10 ataaaacctt tctcttaac atctaata accagagaag taaaagaat tataaaacaa 540
ataaaaaact tatttatcaa aaaa 564

<210> 52
<211> 188
15 <212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 52
Met His Ile Ser Gly Asp Ser Pro Leu Asp Arg Lys Val Gly Asp Ala
20 1 5 10 15
Ser Tyr Tyr Phe Ala Thr Val Gln His Cys Trp Gly Trp Ala Thr Trp
20 25 30
Lys Arg Ala Trp Lys Tyr Phe Asp Val Thr Met Glu Ser Ile Asn Phe
35 40 45
25 Glu Asp Val Lys Lys Thr Ile Arg Lys Arg Tyr Lys Asp Phe Asn Ile
50 55 60
Lys Asp Tyr Trp Gln Arg Trp Phe Pro Arg Ile Lys Lys Glu His Ser
65 70 75 80
Ser Val Trp Asp Tyr Gln Trp Thr Tyr Cys Ile Ile Ser Lys Asn Gly
30 85 90 95
Ile Cys Ile Asn Pro Ser Ile Asn Leu Thr Ser Asn Ile Gly Phe Gly
100 105 110
Glu Asp Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Asn Asp Glu Asn Ile Asn Ser
115 120 125
35 Lys Thr Tyr Pro Met Asp Thr Glu Asn Ile Ile His Pro Lys Glu Ile
130 135 140
Lys Cys Asp Glu Arg Ala Asp Phe Glu Ile Ala Ile Lys Arg Phe Asn

145 150 155 160
Ile Lys Pro Phe Ser Leu Thr Ser Asn Ile Thr Arg Glu Val Lys Arg
 165 170 175
Ile Ile Lys Gln Ile Lys Asn Leu Phe Ile Lys Lys
5 180 185

<210> 53
<211> 396
10 <212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 53
atgtttaata ctctatatt attaattatt tttaaaagaa aatatactgc attaaaagtt 60
15 ttagatacaa taagaaatgt aaaacccaaa aaattatata tagcagctga tggctggaga 120
aatgaagaag aaaaaacaaa atgtattgat acaagagaag ctgtattaga agctgtagat 180
tgggaatgcg aagtaaaaac ttatttcaa gataaaaatt taggatgctg ttatggctct 240
gtaaattgctg taaattggtt attgaaaat gaagaacaag gaataatact tgaagatgat 300
gttatagctg aaacttcttt ttattatt gcgagaaatt acttaactat tataaagata 360
20 atgaaaaaat tatgcatatt tctggtgatt ctcctt 396

<210> 54
<211> 132
<212> PRT
25 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 54
Met Phe Asn Thr Pro Ile Leu Leu Ile Ile Phe Lys Arg Lys Tyr Thr
1 5 10 15
30 Ala Leu Lys Val Leu Asp Thr Ile Arg Asn Val Lys Pro Lys Lys Leu
 20 25 30
Tyr Ile Ala Ala Asp Gly Trp Arg Asn Glu Glu Glu Lys Thr Lys Cys
 35 40 45
Ile Asp Thr Arg Glu Ala Val Leu Glu Ala Val Asp Trp Glu Cys Glu
35 50 55 60
Val Lys Thr Leu Phe Gln Asp Lys Asn Leu Gly Cys Cys Tyr Gly Pro
65 70 75 80

Val Asn Ala Val Asn Trp Leu Phe Glu Asn Glu Glu Gln Gly Ile Ile
85 90 95
Leu Glu Asp Asp Val Ile Ala Glu Thr Ser Phe Phe Ile Ile Ala Arg
100 105 110
5 Asn Tyr Leu Thr Ile Ile Lys Ile Met Lys Lys Leu Cys Ile Phe Leu
115 120 125
Val Ile Leu Leu
130

10
<210> 55
<211> 825
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

15
<400> 55
atgaatgata ttattaaagt gataaatata ttaaacgata taccagaacc ttttctgta 60
gatggaataa taaaaacttt tgaagcaagc tctaaagatt ttataaaaag ttttgctgtt 120
tattttata aggaaggcag tgaagaagca agattatggt atacatctaa aaataaatta 180
20 gttattaatg ataaaaaaaa taatagagaa tatactctat ttgccagagg taataaattt 240
ggttatataa tagttaatgc agataaaaat aaagatgaaa tggaagtact tattaattat 300
ctatcaataa tattatatag tgaaaaactt tcatttttgg caaatagaga caaacttaca 360
ggtttataca atcgcgata tataataaaa tatttgcagg agaaagaaac tacaatatgaa 420
atatattcta tagtaatagt agatttagat aaattcaaac attataatga tacttacgga 480
25 cataatatag gagatcatgt attaaaatta atttcaaagg taatgaaaga ttctttaaaa 540
aatataaaat ataaatctgt attggcaaga tatggaggag aagaatttat tatagtaatt 600
gatgtaata ataaaaatga tcttttaat gctatggaag aaataagaaa ctcaataata 660
gaaactgatt tatctacaga agaataattct ctaaaagcaa cagcatcttt aggaggtgct 720
ataaaagagg aaaatacaac ttaagaact ttataaata aagcagatca atcattatat 780
30 aatgccaaag aaacaggaag aaataaatcc gttatattag atttt 825

<210> 56
<211> 275
<212> PRT
35 <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 56

Met Asn Asp Ile Ile Lys Val Ile Asn Ile Leu Asn Asp Ile Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Phe Ser Val Asp Gly Ile Ile Lys Thr Phe Glu Ala Ser Ser Lys
 20 25 30
 5 Asp Phe Ile Lys Ser Phe Ala Val Tyr Phe Tyr Lys Glu Gly Ser Glu
 35 40 45
 Glu Ala Arg Leu Trp Tyr Thr Ser Lys Asn Lys Leu Val Ile Asn Asp
 50 55 60
 Lys Lys Asn Asn Arg Glu Tyr Thr Leu Phe Ala Arg Gly Asn Lys Phe
 10 65 70 75 80
 Gly Tyr Ile Ile Val Asn Ala Asp Lys Asn Lys Asp Glu Met Glu Val
 85 90 95
 Leu Ile Asn Tyr Leu Ser Ile Ile Leu Tyr Ser Glu Lys Leu Ser Phe
 100 105 110
 15 Leu Ala Asn Arg Asp Lys Leu Thr Gly Leu Tyr Asn Arg Gly Tyr Ile
 115 120 125
 Ile Lys Tyr Leu Gln Glu Lys Glu Thr Thr Asn Glu Ile Tyr Ser Ile
 130 135 140
 Val Ile Val Asp Leu Asp Lys Phe Lys His Tyr Asn Asp Thr Tyr Gly
 20 145 150 155 160
 His Asn Ile Gly Asp His Val Leu Lys Leu Ile Ser Lys Val Met Lys
 165 170 175
 Asp Ser Leu Lys Asn Ile Lys Tyr Lys Ser Val Leu Ala Arg Tyr Gly
 180 185 190
 25 Gly Glu Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Val Asn Asn Lys Asn Asp Leu
 195 200 205
 Phe Asn Ala Met Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ile Glu Thr Asp Leu
 210 215 220
 Ser Thr Glu Glu Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Ala Ser Leu Gly Gly Ala
 30 225 230 235 240
 Ile Lys Glu Glu Asn Thr Thr Leu Arg Thr Phe Ile Asn Lys Ala Asp
 245 250 255
 Gln Ser Leu Tyr Asn Ala Lys Glu Thr Gly Arg Asn Lys Ser Val Ile
 260 265 270
 35 Leu Asp Phe
 275

<210> 57

<211> 1815

<212> DNA

5 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 57

atgaaaaata ttttaaata tgcttcatt ataggatgca ctttgcctc gcttaatttt 60
 gcggctgatt atatagatta taaagtaaaa aacggcgata ctttatttgg aatagcttcc 120
 10 gctcatgata tgagtgcaaa tgaattttta aaagttaata atataaaaga tcctgataaa 180
 tataatctta gagtaggaga aactttaaaa gtaaaagata aaggttatac tctgtatat 240
 gactctgata ataaagtttt cggcttgaaa ggagaagaag gaaactcata caaagattat 300
 aaagtaaaaa acgggggatac ttattttggt atagcatttg cccatggaat gactgcta 360
 gaatttctag ctataaataa tattaaagat gccataaat ataacttag agtaggacaa 420
 15 actcttaaag tagcaaataa tcaaaaagaa aataatgctt ctcaaataa tataaataat 480
 agtgataata cagaaaatta tgatactat aaagtgcaaa gcggtgatac ttatacggg 540
 atagctttct ctcatggtat gacagcaagc gaattttta agattaataa tatagatgat 600
 cctgataaat ataaactata ttaggttaa actatgtatg ttaaatcatc taaaaagaa 660
 aataatttaa acacaaataa tgaaaaagat acaggaaaag aaatagaata ctatactgta 720
 20 aaaagcggcg ataccttata cggaatagct ttcaaaatg atattagcgt aaatgatttt 780
 ctaagaatta acaatataga tgatccttta aaatacaaat taagaacagg cgaaaaatta 840
 aaaatatatg caagagaaaa tgctcaaat acacaaagca aaactataaa aacatataga 900
 gtaaaaaacg gagatactct tggagagata gcattaagaa attctatgtc ttgaaagat 960
 cttcttcaat taaataatct aaaaaataat tatgtgctta aagtaggaga tactttaaaa 1020
 25 atatatgata atattaatat aacaagttct tcaacatcaa caacatacag aacttggaa 1080
 aattataaag taaaagcgg tgatacttta agcgggaatag ctctagcaag aggaatggat 1140
 ctagtagaat tatactccat aaataatata aatgacaaat atatttgaa agttggagat 1200
 aatcttaaag tatatgctaa ccctaaaaaa acaactactt tagtaatatc aaattataaa 1260
 gttcaaagcg gagatagttt atactcaata gcaaaaaaac ataaatgga ttaagagat 1320
 30 ttaatgcagc ttaataatat aaaaatgct aatgaatata aattatatgt cggcgccaat 1380
 ctaaaagtaa aaacagcaaa aatggtgcct tattctttta atgatgattc tatattacct 1440
 gacagctctt ttatatggcc ttataaagga ataataattt caggatatgg agtagcttct 1500
 gataaacttg caaacagagg tgtgaatata ttaggagatg taggagacaa agttgtagct 1560
 tctgatgacg gaatcgtaga atatgctgat aatataagag gattcgggtac tgttataata 1620
 35 cttaaacata aaaacggata taatacttct tatgctcatc ttctaagat aaatgttaaa 1680
 cttggagata tagtaaagaa aggagattat ataggagaca ttggcgatac tggtatgata 1740
 gatagaagcg aactatattt taagatttct ttcaggga gatcaataga tcctgttaaa 1800

cttcttccta aaagt 1815

<210> 58

<211> 605

5 <212> PRT

<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 58

Met Lys Asn Ile Phe Lys Tyr Ala Ser Ile Ile Gly Cys Thr Phe Ala

10 1 5 10 15

Ser Leu Asn Phe Ala Ala Asp Tyr Ile Asp Tyr Lys Val Lys Asn Gly

20 25 30

Asp Thr Leu Phe Gly Ile Ala Phe Ala His Asp Met Ser Ala Asn Glu

35 40 45

15 Phe Leu Lys Val Asn Asn Ile Lys Asp Pro Asp Lys Tyr Asn Leu Arg

50 55 60

Val Gly Glu Thr Leu Lys Val Lys Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Val Tyr

65 70 75 80

Asp Ser Asp Asn Lys Val Phe Gly Leu Lys Gly Glu Glu Gly Asn Ser

20 85 90 95

Tyr Lys Asp Tyr Lys Val Lys Asn Gly Asp Thr Leu Phe Gly Ile Ala

100 105 110

Phe Ala His Gly Met Thr Ala Asn Glu Phe Leu Ala Ile Asn Asn Ile

115 120 125

25 Lys Asp Ala Asn Lys Tyr Asn Leu Arg Val Gly Gln Thr Leu Lys Val

130 135 140

Ala Asn Asn Gln Lys Glu Asn Asn Ala Ser Ser Asn Asn Ile Asn Asn

145 150 155 160

Ser Asp Asn Thr Glu Asn Tyr Asp Thr Tyr Lys Val Gln Ser Gly Asp

30 165 170 175

Thr Leu Tyr Gly Ile Ala Phe Ser His Gly Met Thr Ala Ser Glu Phe

180 185 190

Leu Lys Ile Asn Asn Ile Asp Asp Pro Asp Lys Tyr Lys Leu Tyr Val

195 200 205

35 Gly Lys Thr Met Tyr Val Lys Ser Ser Lys Lys Glu Asn Asn Leu Asn

210 215 220

Thr Asn Asn Glu Lys Asp Thr Gly Lys Glu Ile Glu Tyr Tyr Thr Val

225 230 235 240
 Lys Ser Gly Asp Thr Leu Tyr Gly Ile Ala Phe Gln Asn Asp Ile Ser
 245 250 255
 Val Asn Asp Phe Leu Arg Ile Asn Asn Ile Asp Asp Pro Leu Lys Tyr
 5 260 265 270
 Lys Leu Arg Thr Gly Glu Lys Leu Lys Ile Tyr Ala Arg Glu Asn Ala
 275 280 285
 Ser Asn Thr Gln Ser Lys Thr Ile Lys Thr Tyr Arg Val Lys Asn Gly
 290 295 300
 10 Asp Thr Leu Gly Glu Ile Ala Leu Arg Asn Ser Met Ser Leu Lys Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Gln Leu Asn Asn Leu Lys Asn Asn Tyr Val Leu Lys Val Gly
 325 330 335
 Asp Thr Leu Lys Ile Tyr Asp Asn Ile Asn Ile Thr Ser Ser Ser Thr
 15 340 345 350
 Ser Thr Thr Tyr Arg Thr Leu Glu Asn Tyr Lys Val Lys Ser Gly Asp
 355 360 365
 Thr Leu Ser Gly Ile Ala Leu Ala Arg Gly Met Asp Leu Val Glu Leu
 370 375 380
 20 Tyr Ser Ile Asn Asn Ile Asn Asp Lys Tyr Ile Leu Lys Val Gly Asp
 385 390 395 400
 Asn Leu Lys Val Tyr Ala Asn Pro Lys Lys Thr Thr Thr Leu Val Ile
 405 410 415
 Ser Asn Tyr Lys Val Gln Ser Gly Asp Ser Leu Tyr Ser Ile Ala Lys
 25 420 425 430
 Lys His Lys Met Asp Leu Arg Asp Leu Met Gln Leu Asn Asn Ile Lys
 435 440 445
 Asn Ala Asn Glu Tyr Lys Leu Tyr Val Gly Ala Asn Leu Lys Val Lys
 450 455 460
 30 Thr Ala Lys Met Val Pro Tyr Ser Phe Asn Asp Asp Ser Ile Leu Pro
 465 470 475 480
 Asp Ser Ser Phe Ile Trp Pro Tyr Lys Gly Ile Ile Ile Ser Gly Tyr
 485 490 495
 Gly Val Ala Ser Asp Lys Leu Ala Asn Arg Gly Val Asn Ile Leu Gly
 35 500 505 510
 Asp Val Gly Asp Lys Val Val Ala Ser Asp Asp Gly Ile Val Glu Tyr
 515 520 525

Ala Asp Asn Ile Arg Gly Phe Gly Thr Val Ile Ile Leu Lys His Lys
530 535 540
Asn Gly Tyr Asn Thr Ser Tyr Ala His Leu Ser Lys Ile Asn Val Lys
545 550 555 560
5 Leu Gly Asp Ile Val Lys Lys Gly Asp Tyr Ile Gly Asp Ile Gly Asp
565 570 575
Thr Gly Met Ile Asp Arg Ser Glu Leu Tyr Phe Lys Ile Ser Tyr Gln
580 585 590
Gly Arg Ser Ile Asp Pro Val Lys Leu Leu Pro Lys Ser
10 595 600 605

- <210> 59
- <211> 1068
- 15 <212> DNA
- <213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 59
atgattagaa atattaaata tattttcatt atatatttat tagctatttc ctgctctaata 60
20 tatagagtta ctgatccatt ctccattcaa aataatagta ataataacat aagcattata 120
cctgaatatg tagatgctca atatttcac aaagcagatt aactgaaca gcaaatagaa 180
gaaataatga ataaatat ttccagaattt ggagaatata taatatattt aatgataact 240
aaagataata tagataaaaa taaaacaata gaaacaataa ataaagtagt taataaacct 300
gcttatttac ataacggagc tgctgttgat ttaagcagaa ctgatataac agaaatagca 360
25 caaagtgcatt ttaatgcaaa taaaattta atagaagta agcttcctaa ctcatataaa 420
actataaatt catcagcatt tcaatcatgc gaaagattaa aatatataaa tctagtaagc 480
tctataaccg atatacaatc tgctgcattt caagactgta tgcctttaga aattattaat 540
ataacatcaa aagtaaaaac tatagctaata atgcattta aaaatttgtt tactttaaga 600
gaagtaatac ttctgaagg attaacttca atagcagatg gagcattcaa ttactgtaca 660
30 tcattagaat caattaattt tccatcaact ttacaaacta taggcacagc agcattttac 720
agctgtaaat cattaaaaag tataaaatta aatcaaggat taactacat aatgataat 780
gcttttaac ttgctcatc attaacagct ataagcttac ctaatagtat aacaagcctt 840
ttaaatcctt cagaaggtaa ggtttttct gattgtaaaa tgcttaaaaa tgttgaatat 900
cttgatacag atcccgtaaa aatacttaaa gaaatgata cattcagagg ttacacctga 960
35 accgatttat accttcctaa tgtggcagaa gatcctaaaa atggaagctg ggataatttt 1020
ttaggtgttg cttggacaac tattcattat ggaaaatcta tgcttagg 1068

<210> 60
<211> 356
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

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

245 250 255
Ile Asn Asp Asn Ala Phe Asn Leu Cys Ser Ser Leu Thr Ala Ile Ser
260 265 270
Leu Pro Asn Ser Ile Thr Ser Leu Leu Asn Pro Ser Glu Gly Lys Val
5 275 280 285
Phe Ser Asp Cys Lys Met Leu Lys Asn Val Glu Tyr Leu Asp Thr Asp
290 295 300
Pro Val Lys Ile Leu Lys Glu Asn Asp Thr Phe Arg Gly Ser Pro Val
305 310 315 320
10 Thr Asp Leu Tyr Leu Pro Asn Val Ala Glu Asp Pro Lys Asn Gly Ser
325 330 335
Trp Asp Asn Phe Leu Gly Val Ala Trp Thr Thr Ile His Tyr Gly Lys
340 345 350
Ser Met Pro Arg
15 355

<210> 61
<211> 1296
20 <212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 61
atggatataa ttataataat agtgtaata ctttaaatg gtattttgc catgtcggaa 60
25 attgcagtaa ttctgctag aaaatcttct cttatgaaag acagcaaaga aggaaataaa 120
ggtgcaaaga ctgcattagc tttagcagat aatcctgaca aattttatc tacaatacaa 180
ataggtataa cttaatagg tatattaaca ggtatttact caggcgatac agttgccaaa 240
gaagtttcaa atttacttgt aaaaataaat gtaccattaa attatgcttc ttaatagct 300
caggtattgg tggtagcatt ggtaacatat ctacattga tattcggaga gcttgtgcct 360
30 aaaagaatag gaatggtaat gcctgaaaga atagcaaaag tggttgcagc tcctatgaca 420
atacttgcaa agatagggtgc tccttttgtg tggatattat caaatagcgc attgcttgtt 480
tcaagagttt tgggtataaa agatgataaa agtcctgtta ctgaagagga aataaaatct 540
atgatagaag agggcagaca agggggagaa gtaaggaga tagaacagaa tattatagag 600
agggctttct tttgggaga tagaaaaata gaatctataa tgacacatag aaatgatatg 660
35 gtatttttag atataaatat gagtaatgat gagataaaaa agatagtatc aaaacattct 720
tttctgctt atcctgttgt tgataaaaat ttggataata tttaggagt tgtaagagta 780
actgatatat tcgataaatt aaatacttca aaggctaaaa tagaaaagtt tgtgaagaaa 840

gctaattact ttcataacaa tatggaagtt tatttgggtc ttgaagagat gaaaaagaat 900
aataactaaaa taggtcttgt atcagatgag ttgggaata tagacggaat gattactcaa 960
agcgatatat tcgaggcttt agtgggttct gtaacagaag gaaaagacag taaggatatt 1020
agaaagagaa agagcggaag ttggttgta gatggtcaat gtcctatgta tgatttotta 1080
5 gagtatttg aaatagaaga tgaaaatgct tctaataatt ataatactat aagcggtttg 1140
atttagaat tattacagca tgtacctagt gaaggagaat cttagaatg gaagaattta 1200
aattagaag ttgtgatat ggacggtgct agaatagata aggttatagt aaataaaata 1260
gaaaaaactg atgaaaagaa tgattcagac actgaa 1296

10 <210> 62
<211> 432
<212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

15 <400> 62
Met Asp Ile Ile Ile Ile Val Leu Ile Leu Leu Asn Gly Ile Phe
1 5 10 15
Ala Met Ser Glu Ile Ala Val Ile Ser Ala Arg Lys Ser Ser Leu Met
20 25 30
20 Lys Asp Ser Lys Glu Gly Asn Lys Gly Ala Lys Thr Ala Leu Ala Leu
35 40 45
Ala Asp Asn Pro Asp Lys Phe Leu Ser Thr Ile Gln Ile Gly Ile Thr
50 55 60
Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Ile Tyr Ser Gly Asp Thr Val Ala Lys
25 65 70 75 80
Glu Val Ser Asn Leu Leu Val Lys Ile Asn Val Pro Leu Asn Tyr Ala
85 90 95
Ser Leu Ile Ala Gln Val Leu Val Val Ala Leu Val Thr Tyr Leu Thr
100 105 110
30 Leu Ile Phe Gly Glu Leu Val Pro Lys Arg Ile Gly Met Val Met Pro
115 120 125
Glu Arg Ile Ala Lys Val Val Ala Ala Pro Met Thr Ile Leu Ala Lys
130 135 140
Ile Gly Ala Pro Phe Val Trp Ile Leu Ser Asn Ser Ala Leu Leu Val
35 145 150 155 160
Ser Arg Val Leu Gly Ile Lys Asp Asp Lys Ser Pro Val Thr Glu Glu
165 170 175

Glu Ile Lys Ser Met Ile Glu Glu Gly Arg Gln Gly Gly Glu Val Lys
 180 185 190
 Glu Ile Glu Gln Asn Ile Ile Glu Arg Ala Phe Phe Leu Gly Asp Arg
 195 200 205
 5 Lys Ile Glu Ser Ile Met Thr His Arg Asn Asp Met Val Phe Leu Asp
 210 215 220
 Ile Asn Met Ser Asn Asp Glu Ile Lys Lys Ile Val Ser Lys His Ser
 225 230 235 240
 Phe Ser Ala Tyr Pro Val Val Asp Lys Asn Leu Asp Asn Ile Val Gly
 10 245 250 255
 Val Val Arg Val Thr Asp Ile Phe Asp Lys Leu Asn Thr Ser Lys Ala
 260 265 270
 Lys Ile Glu Lys Phe Val Lys Lys Ala Asn Tyr Phe His Asn Asn Met
 275 280 285
 15 Glu Val Tyr Leu Val Leu Glu Glu Met Lys Lys Asn Asn Thr Lys Ile
 290 295 300
 Gly Leu Val Ser Asp Glu Phe Gly Asn Ile Asp Gly Met Ile Thr Gln
 305 310 315 320
 Ser Asp Ile Phe Glu Ala Leu Val Gly Ser Val Thr Glu Gly Lys Asp
 20 325 330 335
 Ser Lys Asp Ile Arg Lys Arg Lys Ser Gly Ser Trp Phe Val Asp Gly
 340 345 350
 Gln Cys Pro Met Tyr Asp Phe Leu Glu Tyr Phe Glu Ile Glu Asp Glu
 355 360 365
 25 Asn Ala Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Leu Ile Leu Glu Leu
 370 375 380
 Leu Gln His Val Pro Ser Glu Gly Glu Ser Leu Glu Trp Lys Asn Leu
 385 390 395 400
 Asn Leu Glu Val Val Asp Met Asp Gly Ala Arg Ile Asp Lys Val Ile
 30 405 410 415
 Val Asn Lys Ile Glu Lys Thr Asp Glu Lys Asn Asp Ser Asp Thr Glu
 420 425 430

 35 <210> 63
 <211> 2940
 <212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 63

atgcgaatct ttatcttgtt attatttaca ttgattttta atgtatgttt atatgctcag 60
 5 gataactaatg taaataatac agcagcaaca aataatacta ctgcagcaac caataatgta 120
 ggcgaaagtg caataatgca gataaataga ttgatgcta aaagaaatcc tgtatcattt 180
 attaatftag ttaattttac accatattat gtattgcagg aatatgctag ggtaataat 240
 atagaaattt atccctatga tactgaaagt acattaagag caagaatcat tgaagacaa 300
 gtaaataata aacaggaagt tattaataat aaagatgaaa tacggaagt agcaagaaca 360
 10 actataaata gaggcgggtgc tcaggtagaa cttatagggtg cagattttgc tgaagatat 420
 accatagatg aagcagggtga agagcttata tcattatatg gtaatgttac catgaaaatg 480
 tataataata cattagtgc tgataagggt gtttatagct taaaacagg agaagtttt 540
 gcttcaggaa atttaactgt agcatctgaa ggaagtactt tcaaagggtga atggtttatg 600
 cttaatagag aaagtaaaag aggcatacta ttgcggcgaa atacgaaatt catgagtttt 660
 15 acagttgaag ggcgtataat taaatttaac gaccaagatt ttttgctga aaacagcagt 720
 gtgagtttt cactcttac tcctatagcg catgatttt tagcgagtag agtttatctt 780
 tgggatacta aaaagatgat ggtttcaat agtatctata gggtaggaag acagcctgta 840
 tttattttc cattatttat acagaataat ttgggtactg gtataatc ttctttggg 900
 cagtctttga gagaagggtt ttatatcaa aattataaga tatttaattt atatgggtgtg 960
 20 cagcataaga taagattcga tgcctatcag aaattagggt tttattagg agatgaaata 1020
 aggtatacaa gtcagtatca ggatttagca cttgatgcta tgtttgcttt tggaaggcag 1080
 tattatttat ttgattccta tattacttca agttaggat ttggtacaag gtatgttaac 1140
 tattttggat cagggtgaagg cggaaagtt gtaccaagat ataaatttca atatgatcat 1200
 accattcaat tatataatag tcaaaatata aatagttata ttacaggaaa gttaaattta 1260
 25 aatagcgact tatatttcag atctgatttt tacaatcaaa gaggacagtt tgatatatta 1320
 acattttta catcacttac aggaaatttg caggacatag gagattctta tcctgaaaat 1380
 tatattgaaa attctgttta tcttaataat aatatttacg gacttaattt aaaagttggt 1440
 gcagaatggg atttagaatc tgttagaaat atatcggttg atgttaatac taatttcgac 1500
 tattatatgc cttaaaccata taaacttgta cttccttctg tagaagctag ttacaattct 1560
 30 atatttgga atgagacatc ttattacttt ccaaacttta acattaacta taatttaaga 1620
 gctaattata atcactat aaattataag acttctgaag gtattgcttt ttataacaat 1680
 cctatgcttg actcacaatt aaatgataaa cttgctgaaa gagataatct taatttcat 1740
 ggtgatatat caagagcttt tactaatgat ttttaagat ttgtacctag ctttaatatg 1800
 gaatactcat atcaaaatag tatagatcct aaagcagaag atttgattta tgataaagat 1860
 35 aatacttact ttggtatagg cacaggaatg aatttttcta tgttttacc ttacagtata 1920
 ttgccatatg attcacaag atattttgaa cctactgtta gatgggatac aacatatata 1980
 ttgggatata gatttaaga aaaatacatt gatacagatt ataaagattc tcaattcgg 2040

gaatttaata atcatagctt tacaactaga ttttctatgg gcggaaccgg atacagctta 2100
ttttatttgc ctgatttgaa tctcaatatg gaaacattta taactacagg ttatgatttt 2160
atacctagtt ataattcaga aacaagaact tatcaagtg aattttctac aaataaaatg 2220
cttacaactg aagtaggtgc ttcagcaaga cttttatata atcaatctta tgtttcttat 2280
5 gatataacta gaaatttatt aggaactaat ttaacagcaa atagaataaa tgcataattt 2340
cactttccta tacctttagg taaaattaca gattggattt taataaaaaa caataaaaga 2400
cctttcttgg atggtatagt taatgatttt aatttatatt ttggttttgc ctttactcat 2460
gattttataa attatagata taatactacc gcatttacct ttggtataga gcttcagggt 2520
ttggaacaat ggaaatttag aatagcaact actagtgcga atgagaatgc atatagatat 2580
10 ataaaatctt atgcagaaaa agaaaatcaa acttgggtta atccttttgg ggatatcata 2640
aattcattca atttctctga cagtaaaaaa agaactgaaa gtttatttaa attaaaatct 2700
atagaagcta gtgtttggca tgaattagac ggatggcaga ttcaggctac atttgctgta 2760
agaccttcta ctctcccttc tgatattact tcagggtcag taaaaggagt ttattggaac 2820
aaggagtttt ggattgaatt tactcttaca gacttccta atgttggatt gcctaagaaa 2880
15 gaatataatc ttaatagtac tattaccgat ttacaagata gtgctgctgt tactactcca 2940

<210> 64
<211> 980
20 <212> PRT
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 64
Met Arg Ile Phe Ile Leu Leu Leu Phe Thr Leu Ile Phe Asn Val Cys
25 1 5 10 15
Leu Tyr Ala Gln Asp Thr Asn Val Asn Asn Thr Ala Ala Thr Asn Asn
20 25 30
Thr Thr Ala Ala Thr Asn Asn Val Gly Glu Ser Ala Ile Met Gln Ile
35 40 45
30 Asn Arg Phe Asp Ala Lys Arg Asn Pro Val Ser Phe Ile Asn Leu Val
50 55 60
Asn Phe Thr Pro Tyr Tyr Val Leu Gln Glu Tyr Ala Arg Val Asn Asn
65 70 75 80
Ile Glu Ile Tyr Pro Tyr Asp Thr Glu Ser Thr Leu Arg Ala Arg Ile
35 85 90 95
Ile Glu Arg Gln Val Asn Ile Lys Gln Glu Val Ile Asn Asn Lys Asp
100 105 110

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

405 410 415
 Lys Leu Asn Leu Asn Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Ser Asp Phe Tyr Asn
 420 425 430
 Gln Arg Gly Gln Phe Asp Ile Leu Thr Phe Phe Thr Ser Leu Thr Gly
 5 435 440 445
 Asn Leu Gln Asp Ile Gly Asp Ser Tyr Pro Glu Asn Tyr Ile Glu Asn
 450 455 460
 Ser Val Tyr Leu Asn Asn Asn Ile Tyr Gly Leu Asn Leu Lys Val Gly
 465 470 475 480
 10 Ala Glu Trp Asp Leu Glu Ser Val Arg Asn Ile Ser Val Asp Val Asn
 485 490 495
 Thr Asn Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Lys Pro Tyr Lys Leu Val Leu Pro
 500 505 510
 Ser Val Glu Ala Ser Tyr Asn Ser Ile Phe Gly Asn Glu Thr Ser Tyr
 15 515 520 525
 Tyr Phe Pro Asn Leu Asn Ile Asn Tyr Asn Leu Arg Ala Asn Tyr Asn
 530 535 540
 His Thr Ile Asn Tyr Lys Thr Ser Glu Gly Ile Ala Phe Tyr Asn Asn
 545 550 555 560
 20 Pro Met Leu Asp Ser Gln Leu Asn Asp Lys Leu Ala Glu Arg Asp Asn
 565 570 575
 Leu Asn Leu His Gly Asp Ile Ser Arg Ala Phe Thr Asn Asp Phe Leu
 580 585 590
 Arg Phe Val Pro Ser Phe Asn Met Glu Tyr Ser Tyr Gln Asn Ser Ile
 25 595 600 605
 Asp Pro Lys Ala Glu Asp Leu Ile Tyr Asp Lys Asp Asn Thr Tyr Phe
 610 615 620
 Gly Ile Gly Thr Gly Met Asn Phe Ser Met Phe Leu Pro Tyr Ser Ile
 625 630 635 640
 30 Leu Pro Tyr Asp Phe Thr Arg Tyr Phe Glu Pro Thr Val Arg Trp Asp
 645 650 655
 Thr Thr Tyr Thr Leu Gly Tyr Arg Phe Lys Glu Lys Tyr Ile Asp Thr
 660 665 670
 Asp Tyr Lys Asp Ser Gln Phe Gly Glu Phe Asn Asn His Ser Phe Thr
 35 675 680 685
 Thr Arg Phe Ser Met Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Leu Phe Tyr Leu Pro
 690 695 700

Asp Leu Asn Leu Asn Met Glu Thr Phe Ile Thr Thr Gly Tyr Asp Phe
 705 710 715 720
 Ile Pro Ser Tyr Asn Ser Glu Thr Arg Thr Tyr Gln Val Glu Phe Ser
 725 730 735
 5 Thr Asn Lys Met Leu Thr Thr Glu Val Gly Ala Ser Ala Arg Leu Leu
 740 745 750
 Tyr Asn Gln Ser Tyr Val Ser Tyr Asp Ile Thr Arg Asn Leu Leu Gly
 755 760 765
 Thr Asn Leu Thr Ala Asn Arg Ile Asn Ala Tyr Phe His Phe Pro Ile
 10 770 775 780
 Pro Leu Gly Lys Ile Thr Asp Trp Ile Leu Ile Lys Asn Asn Lys Arg
 785 790 795 800
 Pro Phe Phe Asp Gly Ile Val Asn Asp Phe Asn Leu Tyr Phe Gly Phe
 805 810 815
 15 Ala Phe Thr His Asp Phe Ile Asn Tyr Arg Tyr Asn Thr Thr Ala Phe
 820 825 830
 Thr Phe Gly Ile Glu Leu Gln Val Leu Glu Gln Trp Lys Phe Arg Ile
 835 840 845
 Ala Thr Thr Ser Ala Asn Glu Asn Ala Tyr Arg Tyr Ile Lys Ser Tyr
 20 850 855 860
 Ala Glu Lys Glu Asn Gln Thr Trp Val Asn Pro Phe Trp Asp Ile Ile
 865 870 875 880
 Asn Ser Phe Asn Phe Ser Asp Ser Lys Lys Arg Thr Glu Ser Leu Phe
 885 890 895
 25 Lys Leu Lys Ser Ile Glu Ala Ser Val Trp His Glu Leu Asp Gly Trp
 900 905 910
 Gln Ile Gln Ala Thr Phe Ala Val Arg Pro Ser Thr Leu Pro Ser Asp
 915 920 925
 Ile Thr Ser Gly Ser Val Lys Gly Val Tyr Trp Asn Lys Glu Phe Trp
 30 930 935 940
 Ile Glu Phe Thr Leu Thr Asp Phe Pro Asn Val Gly Leu Pro Lys Lys
 945 950 955 960
 Glu Tyr Asn Leu Asn Ser Thr Ile Thr Asp Leu Gln Asp Ser Ala Ala
 965 970 975
 35 Val Thr Thr Pro
 980

<210> 65

<211> 1611

<212> DNA

5 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 65

atgtcagaga ataaaacagt aagtaaagaa aagatagcta aatcatcatt aaaaatgtca 60
 ttgtaacta ctgtaagcag agtattcgga ctgtaagag atcaaataca ggcggctttg 120
 10 ctgggtacta cattcatagc agatgctttt gcaataggat ttatactcc aaatttattg 180
 aggcgattat ttgctgaagg caatatgggt gcaagcttta tacctgtatt tacagagctt 240
 gaaaaagaaa aaggattga agaatacaag aaattttta ggcagttt tacattattg 300
 ggattaatac ttatagtagt ttaggcacg ggaataataa tatctcctt gctgtaaaa 360
 atactttata aatctgcaca taataatata gaagcactta attggcacg ggatctatca 420
 15 agaataatgt ttccttatct tctatttata tcttggcag cttgatgca ggcgtactt 480
 aatataagag gctattattc aatatcagct gcaagtccta tactttaaa tactgtaatt 540
 atatctatgg cttgttctt taaattctt ttacctaat ttttaataa tatggcttat 600
 gtattgcat ttgctgtgct gctgggtgga ttgctacagt ttgcctatca aatgccttt 660
 gtacataaac aaggtttag ttcaagcct tatttctatt taaagaacc ctatgtcata 720
 20 aagatgataa aattatttgc tctggtatt ttggagcta gtatatatca gataaattg 780
 ctgtttcta ctgcatttgc tggagctatt ggagaggga gggtttcagc tgttacttt 840
 gctactagaa tacatgaatt tgtttgggc gttttgctg tgagtgtggc aactgttatg 900
 cttcctactt taagtaaatt aatagctgat aataaaaaag atgaagctgt tgaaaattta 960
 ggatattctt taaggcttgt tgcttagtt actattcctg ctacttcgg attgttgga 1020
 25 ctggcagag aaattgtaag aatgatattt gaatatggag cttttcttc aaaatctaca 1080
 tatttagtat cgagtgttt aagatattta tccatctct tattcttgt ggcaagctat 1140
 agaatacttg tacagtcatt ttatgctatg aaagatatga aaactcctgt atatgtggca 1200
 tttttacct ttattataa tgctgttagt aattatttat gtgtttatat atttaaattc 1260
 gatattatag gaatatctat atcaagtgtt gtgcaaata ttgtatctt ttgtatacta 1320
 30 tatatattgc ttataaagag aatggcagtg aaatcgataa taaataaaaa aattgaggtt 1380
 gtaaagacat tggctgctag ttatttatg gctgctctg tctatggaat gaaatattat 1440
 ttattataca gcaatgccga ttctaggata attttataa ttaaagtatt tatagtata 1500
 ttattaggag ttgtgttta ttctataatg aacattatat taagaaatga tgatttgtt 1560
 tcctttatta gtatgtttaa aggcagatta tcaagaaagt ttctgaaaaa a 1611

35

<210> 66

<211> 537

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 66

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

260 265 270
 Gly Arg Val Ser Ala Val Thr Phe Ala Thr Arg Ile His Glu Phe Val
 275 280 285
 Leu Gly Val Phe Ala Val Ser Val Ala Thr Val Met Leu Pro Thr Leu
 5 290 295 300
 Ser Lys Leu Ile Ala Asp Asn Lys Lys Asp Glu Ala Val Glu Asn Leu
 305 310 315 320
 Gly Tyr Ser Leu Arg Leu Val Ala Leu Val Thr Ile Pro Ala Thr Phe
 325 330 335
 10 Gly Phe Val Val Leu Gly Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Phe Glu Tyr
 340 345 350
 Gly Ala Phe Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Leu Val Ser Ser Ala Leu Arg
 355 360 365
 Tyr Leu Ser Ile Ser Leu Phe Phe Val Ala Ser Tyr Arg Ile Leu Val
 15 370 375 380
 Gln Ser Phe Tyr Ala Met Lys Asp Met Lys Thr Pro Val Tyr Val Ala
 385 390 395 400
 Phe Phe Thr Phe Ile Ile Asn Ala Val Ser Asn Tyr Leu Cys Val Tyr
 405 410 415
 20 Ile Phe Lys Phe Asp Ile Ile Gly Ile Ser Ile Ser Ser Val Val Ala
 420 425 430
 Asn Ile Val Ser Phe Cys Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ile Lys Arg Met
 435 440 445
 Ala Val Lys Ser Ile Ile Asn Lys Lys Ile Glu Val Val Lys Thr Leu
 25 450 455 460
 Ala Ala Ser Leu Phe Met Ala Ala Ser Val Tyr Gly Met Lys Tyr Tyr
 465 470 475 480
 Leu Leu Tyr Ser Asn Ala Asp Ser Arg Ile Ile Phe Ile Ile Lys Val
 485 490 495
 30 Phe Ile Val Ile Leu Leu Gly Val Val Val Tyr Ser Ile Met Asn Ile
 500 505 510
 Ile Leu Arg Asn Asp Asp Phe Val Ser Phe Ile Ser Met Phe Lys Gly
 515 520 525
 Arg Leu Ser Arg Lys Phe Leu Lys Lys
 35 530 535

	<210> 67	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
5		
	<400> 67	
	aaacgtttat atttatttt atc	23
	<210> 68	
10	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 68	
15	aaacttccaa gtgataacc	18
	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 69	
	aaatataaac ctacaagcag	20
25	<210> 70	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
30	<400> 70	
	aatatttcag ttaatctaaa atc	23
	<210> 71	
	<211> 24	
35	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	

	<400> 71	
	actttaatct ttgtattaat ttg	24
	<210> 72	
5	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 72	
10	ttgtttaat ttgataatat cag	23
	<210> 73	
	<211> 29	
	<212> DNA	
15	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 73	
	aaaaaaatta tttattaat atttatatt	29
20	<210> 74	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
25	<400> 74	
	ttctttata atctttacag ttg	23
	<210> 75	
	<211> 19	
30	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 75	
35	catatttctg gtgattctc	19
	<210> 76	
	<211> 27	

	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 76	
5	tttttgata aataagttt ttattg	27
	<210> 77	
	<211> 28	
	<212> DNA	
10	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 77	
	tttaatactc ctatattatt aattatt	28
15	<210> 78	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
20	<400> 78	
	aaggagaatc accagaaa	18
	<210> 79	
	<211> 23	
25	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 79	
	aatgatatta ttaaagtgat aaa	23
30		
	<210> 80	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
35		
	<400> 80	
	aaaatctaataaacggatt	20

	<210> 81	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 81	
	aaatatgctt ccattatagg	20
10	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
15	<400> 82	
	acttttagga agaagtttaa c	21
	<210> 83	
	<211> 25	
20	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 83	
	tatattttca ttatatattt attag	25
25		
	<210> 84	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
30		
	<400> 84	
	ctaggcatag attttcca	18
	<210> 85	
35	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	

	<400> 85	
	tttgccatgt cggaaattgc ag	22
5	<210> 86	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
10	<400> 86	
	tattctagca ccgtccatat c	21
	<210> 87	
	<211> 23	
15	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 87	
	gtatgtttat atgctcagga tac	23
20	<210> 88	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
25	<400> 88	
	aacagcagca ctatcttgta a	21
	<210> 89	
30	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 89	
35	cagcagcaac aaataatact actg	24
	<210> 90	

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
5	<400> 90	
	tgaatataaa caccttctct caaag	25
	<210> 91	
	<211> 26	
10	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 91	
	aaaatgtcat tggtaactac tgtaag	26
15	<210> 92	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
20	<400> 92	
	cttgataatc tgcctttaa catac	25
	<210> 93	
25	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 93	
30	atgtgaggaa aaaacagaaa g	21
	<210> 94	
	<211> 22	
	<212> DNA	
35	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 94	

	tcattaccag aaaaccatac tc	22
	<210> 95	
	<211> 27	
5	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 95	
10	aggaaataaa gctcctgctg cttcagc	27
	<210> 96	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
15	<400> 96	
	gcatagcagc aacttcagaa ggtcca	26
	<210> 97	
20	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 97	
25	cttattaatt ggtataggaa aacc	24
	<210> 98	
	<211> 25	
	<212> DNA	
30	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 98	
	aatctatggt cttgatttat tagcc	25
35	<210> 99	
	<211> 27	
	<212> DNA	

	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 99	
	agaagctact ttggacctt GGCCTGT	27
5		
	<210> 100	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
10		
	<400> 100	
	acacagtcaa caccaagagc	20
	<210> 101	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 101	
20	aaacagcaga ctagctggtg	20
	<210> 102	
	<211> 27	
	<212> DNA	
25	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 102	
	tgaccattac ttacaccgga tacccca	27
30	<210> 103	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
35	<400> 103	
	ttaatgacta tatcgcttgc atacacttc	30

	<210> 104	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
5		
	<400> 104	
	tcaattcttc cagacataaa atcagtaag	29
	<210> 105	
10	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 105	
15	tatatagagt gggtatcaga ag	22
	<210> 106	
	<211> 22	
	<212> DNA	
20	<213> Brachyspira hyodysenteriae	
	<400> 106	
	tcataatggt attacaaga tg	22
25	<210> 107	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> pTrcHis-F primer	
	<400> 107	
	caatttatca gacaatctgt gtg	23
35		
	<210> 108	
	<211> 23	

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> pTrcHis-R primer

<400> 108

tgccctggcag ttccctactc tcg 23

10

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2008 (14.02.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/017636 A2

(51) International Patent Classification:

C07K 14/20 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01) *G01N 33/46* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)

(74) Agent: **KAMIBAYASHI, Lynne**; Novartis Animal Health, Inc., Patent and Trademark Group, Werk Rosental, Postfach, CH-4002 Basel (CH).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/058049

(22) International Filing Date: 3 August 2007 (03.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

2006904311 9 August 2006 (09.08.2006) AU

(71) Applicants (*for all designated States except US*): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH). **MURDOCH UNIVERSITY** [AU/AU]; South Street, Murdoch, Western Australia 6150 (AU).

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **BELLGARD, Matthew** [AU/AU]; 20 Campion Crescent, Attadale, Western Australia 6156 (AU). **HAMPSON, David John** [AU/AU]; 416 Carradine Road, Bedfordale, Western Australia 6112 (AU). **LA, Tom** [AU/AU]; 49 Abercairn Way, Parkwood, Western Australia 6149 (AU).

Declaration under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

(54) Title: NOVEL GENES AND PROTEINS OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE AND USES THEREOF

(57) Abstract: Novel polynucleotide and amino acids of *Brachyspira hyodysenteriae* are described. These sequences are useful for diagnosis of *B. hyodysenteriae* disease in animals and as a therapeutic treatment or prophylactic treatment of *B. hyodysenteriae* disease in animals. These sequences may also be useful for diagnostic and therapeutic and/or prophylactic treatment of diseases in animals caused by other *Brachyspira* species, including *B. intermedia*, *B. suantatina*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*.



WO 2008/017636 A2

Novel Genes and Proteins of *Brachyspira hyodysenteriae* and Uses Thereof

Field of Invention

This invention relates to novel genes in *Brachyspira hyodysenteriae* and the proteins encoded therein. This invention further relates to use of these novel genes and proteins for diagnosis of *B. hyodysenteriae* disease, vaccines against *B. hyodysenteriae* and for screening for compounds that kill *B. hyodysenteriae* or block the pathogenic effects of *B. hyodysenteriae*. These sequences may also be useful for diagnostic and therapeutic and/or prophylactic treatment of diseases in animals caused by other *Brachyspira* species, including *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*.

Background of Invention

Swine dysentery is a significant endemic disease of pigs in Australia and worldwide. Swine dysentery is a contagious mucohaemorrhagic diarrhoeal disease, characterised by extensive inflammation and necrosis of the epithelial surface of the large intestine. Economic losses due to swine dysentery result mainly from growth retardation, costs of medication and mortality. The causative agent of swine dysentery was first identified as an anaerobic spirochaete (*Treponema hyodysenteriae*) in 1971, and was recently reassigned to the genus *Brachyspira* as *B. hyodysenteriae*. Where swine dysentery is established in a piggery, the disease spectrum can vary from being mild, transient or unapparent, to being severe and even fatal. Medication strategies on individual piggeries may mask clinical signs and on some piggeries the disease may go unnoticed, or may only be suspected. Whether or not obvious disease occurs, *B. hyodysenteriae* may persist in infected pigs, or in other reservoir hosts such as rodents, or in the environment. All these sources pose potential for transmission of the disease to uninfected herds. Commercial poultry may also be colonized by *B. hyodysenteriae*, although it is not clear how commonly this occurs under field conditions.

Colonisation by *B. hyodysenteriae* elicits a strong immunological response against the spirochaete, hence indirect evidence of exposure to the spirochaete can be obtained by measuring circulating antibody titres in the blood of infected animals. These antibody titres have been reported to be maintained at low levels, even in animals that have recovered from swine dysentery. Serological tests for detection of antibodies therefore have considerable potential for detecting subclinical infections and recovered carrier pigs that have undetectable

numbers of spirochaetes in their large intestines. These tests would be particularly valuable in an easy to use kit form, such as an enzyme-linked immunosorbent assay. A variety of techniques have been developed to demonstrate the presence of circulating antibodies against *B. hyodysenteriae*, including indirect fluorescent antibody tests, haemagglutination tests, microtitration agglutination tests, complement fixation tests, and ELISA using either lipopolysaccharide or whole sonicated spirochaetes as antigen. All these tests have suffered from problems of specificity, as related non-pathogenic intestinal spirochaetes can induce cross-reactive antibodies. These tests are useful for detecting herds where there is obvious disease and high circulating antibody titres, but they are problematic for identifying sub-clinically infected herds and individual infected pigs. Consequently, to date, no completely sensitive and specific assays are available for the detection of antibodies against *B. hyodysenteriae*. The lack of suitable diagnostic tests has hampered control of swine dysentery.

A number of methods are employed to control swine dysentery, varying from the prophylactic use of antimicrobial agents, to complete destocking of infected herds and prevention of re-entry of infected carrier pigs. All these options are expensive and, if they are to be fully effective, they require the use of sophisticated diagnostic tests to monitor progress. Currently, detection of swine dysentery in herds with sub-clinical infections, and individual healthy carrier animals, remains a major problem and is hampering implementation of effective control measures. A definitive diagnosis of swine dysentery traditionally has required the isolation and identification of *B. hyodysenteriae* from the faeces or mucosa of diseased pigs. Major problems involved include the slow growth and fastidious nutritional requirements of these anaerobic bacteria and confusion due to the presence of morphologically similar spirochaetes in the normal flora of the pig intestine. A significant improvement in the diagnosis of individual affected pigs was achieved with the development of polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of spirochaetes from faeces. Unfortunately in practical applications the limit of detection of PCRs rendered it unable to detect carrier animals with subclinical infections. As a consequence of these diagnostic problems, there is a clear need to develop a simple and effective diagnostic tool capable of detecting *B. hyodysenteriae* infection at the herd and individual pig level.

A strong immunological response is induced against the spirochaete following colonization with *B. hyodysenteriae*, and pigs recovered from swine dysentery are protected from re-infection. Despite this, attempts to develop vaccines to control swine dysentery have met with very limited success, either because they have provided inadequate protection on a

herd basis, or they have been too costly and difficult to produce to make them commercially viable. Bacterin vaccines provide some level of protection, but they tend to be lipopolysaccharide serogroup-specific, which then requires the use of multivalent bacterins. Furthermore they are difficult and costly to produce on a large scale because of the fastidious anaerobic growth requirements of the spirochaete.

Several attempts have been made to develop attenuated live vaccines for swine dysentery. This approach has the disadvantage that attenuated strains show reduced colonisation, and hence cause reduced immune stimulation. There also is reluctance on the part of producers and veterinarians to use live vaccines for swine dysentery because of the possibility of reversion to virulence, especially as very little is known about genetic regulation and organization in *B. hyodysenteriae*.

The use of recombinant subunit vaccines is an attractive alternative, since the products would be well-defined (essential for registration purposes), and relatively easy to produce on a large scale. To date the first reported use of a recombinant protein from *B. hyodysenteriae* as a vaccine candidate (a 38-kilodalton flagellar protein) failed to prevent colonisation in pigs. This failure is likely to relate specifically to the particular recombinant protein used, as well as to other more down-stream issues of delivery systems and routes, dose rates, choice of adjuvants etc. (Gabe, JD, Chang, RJ, Slomiany, R, Andrews, WH and McCaman, MT (1995) Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the *flaB1* gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. Infection and Immunity 63:142-148). The first reported partially protective recombinant *B. hyodysenteriae* protein used for vaccination was a 29.7 kDa outer membrane lipoprotein (Bhlp29.7, also referred to as BmpB and BlpA) which had homology with the methionine-binding lipoproteins of various pathogenic bacteria. The use of the his-tagged recombinant Bhlp29.7 protein for vaccination of pigs, followed by experimental challenge with *B. hyodysenteriae*, resulted in 17-40% of vaccinated pigs developing disease compared to 50-70% of the unvaccinated control pigs developing disease. Since the incidence of disease for the Bhlp29.7 vaccinated pigs was significantly ($P=0.047$) less than for the control pigs, Bhlp29.7 appeared to have potential as a swine dysentery vaccine component (La, T, Phillips, ND, Reichel, MP and Hampson, DJ (2004). Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. Veterinary Microbiology 102:97-109). A number of other attempts have been made to identify outer envelop proteins from *B. hyodysenteriae* that could be used as recombinant vaccine components, but again no successful vaccine has yet been made. A

herd basis, or they have been too costly and difficult to produce to make them commercially viable. Bacterin vaccines provide some level of protection, but they tend to be lipopolysaccharide serogroup-specific, which then requires the use of multivalent bacterins. Furthermore they are difficult and costly to produce on a large scale because of the fastidious anaerobic growth requirements of the spirochaete.

Several attempts have been made to develop attenuated live vaccines for swine dysentery. This approach has the disadvantage that attenuated strains show reduced colonisation, and hence cause reduced immune stimulation. There also is reluctance on the part of producers and veterinarians to use live vaccines for swine dysentery because of the possibility of reversion to virulence, especially as very little is known about genetic regulation and organization in *B. hyodysenteriae*.

The use of recombinant subunit vaccines is an attractive alternative, since the products would be well-defined (essential for registration purposes), and relatively easy to produce on a large scale. To date the first reported use of a recombinant protein from *B. hyodysenteriae* as a vaccine candidate (a 38-kilodalton flagellar protein) failed to prevent colonisation in pigs. This failure is likely to relate specifically to the particular recombinant protein used, as well as to other more down-stream issues of delivery systems and routes, dose rates, choice of adjuvants etc. (Gabe, JD, Chang, RJ, Slomiany, R, Andrews, WH and McCaman, MT (1995) Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the *flaB1* gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. Infection and Immunity 63:142-148). The first reported partially protective recombinant *B. hyodysenteriae* protein used for vaccination was a 29.7 kDa outer membrane lipoprotein (Bhlp29.7, also referred to as BmpB and BlpA) which had homology with the methionine-binding lipoproteins of various pathogenic bacteria. The use of the his-tagged recombinant Bhlp29.7 protein for vaccination of pigs, followed by experimental challenge with *B. hyodysenteriae*, resulted in 17-40% of vaccinated pigs developing disease compared to 50-70% of the unvaccinated control pigs developing disease. Since the incidence of disease for the Bhlp29.7 vaccinated pigs was significantly ($P=0.047$) less than for the control pigs, Bhlp29.7 appeared to have potential as a swine dysentery vaccine component (La, T, Phillips, ND, Reichel, MP and Hampson, DJ (2004). Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. Veterinary Microbiology 102:97-109). A number of other attempts have been made to identify outer envelop proteins from *B. hyodysenteriae* that could be used as recombinant vaccine components, but again no successful vaccine has yet been made. A

much more global approach is needed to the identification of potentially useful immunogenic recombinant proteins from *B. hyodysenteriae* is needed.

To date, only one study using DNA for vaccination has been reported. In this study, the *B. hyodysenteriae* *fna* gene, encoding a putative ferritin, was cloned into an *E. coli* plasmid and the plasmid DNA used to coat gold beads for ballistic vaccination. A murine model for swine dysentery was used to determine the protective nature of vaccination with DNA and/or recombinant protein. Vaccination with recombinant protein induced a good systemic response against ferritin however vaccination with DNA induced only a detectable systemic response. Vaccination with DNA followed a boost with recombinant protein induced a systemic immune response to ferritin only after boosting with protein. However, none of the vaccination regimes tested was able to provide the mice with protection against *B. hyodysenteriae* colonisation and the associated lesions. Interestingly, vaccination of the mice with DNA alone resulted in significant exacerbation of disease (Davis, A.J., Smith, S.C. and Moore, R.J. (2005). The *Brachyspira hyodysenteriae* *fna* gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. Current Microbiology 50: 285-291).

Brief Summary of Invention

It is an object of this invention to have novel genes from *B. hyodysenteriae* and the proteins encoded by those genes. It is a further object of this invention that the novel genes and the proteins encoded by those genes can be used for therapeutic and diagnostic purposes. One can use the genes and/or the proteins in a vaccine against *B. hyodysenteriae* and to diagnose *B. hyodysenteriae* infections.

It is an object of this invention to have novel *B. hyodysenteriae* genes having the nucleotide sequence contained in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65. It is also an object of this invention to have nucleotide sequences that are identical to SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65 where the percentage identity can be at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% (and every integer from 100 to 70). This invention also includes a DNA vaccine or DNA immunogenic composition containing the nucleotide sequence of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65 and sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% identical (and every integer from 100 to 70) to these sequences. This invention

further includes a diagnostic assay containing DNA having the nucleotide sequence of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65 and sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% identical (and every integer from 100 to 70) to these sequences.

5 It is also an object of this invention to have plasmids containing DNA having the sequence of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65; prokaryotic and/or eukaryotic expression vectors containing DNA having the sequence of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65; and a cell containing the plasmids which contain DNA having the sequence of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65.

15 It is an object of this invention to have novel *B. hyodysenteriae* proteins having the amino acid sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. It is another object of this invention to have proteins that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. It is also an object of this invention for a vaccine or 20 immunogenic composition to contain the proteins having the amino acid sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66, or amino acid sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. It is a further aspect of this invention to have a diagnostic kit containing one or more proteins having a sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66 or that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. 25 30

It is another aspect of this invention to have nucleotide sequences which encode the proteins having the amino acid sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and

66, and encode the amino acid sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. The invention also covers plasmids, eukaryotic and prokaryotic expression vectors, and DNA vaccines which contain DNA having a sequence which encodes a protein having the amino acid sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66, and encode amino acid sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. Cells which contain these plasmids and expression vectors are included in this invention.

This invention includes monoclonal antibodies that bind to proteins having an amino acid sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66 or bind to proteins that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66. Diagnostic kits containing the monoclonal antibodies that bind to proteins having an amino acid sequence contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66 or bind to proteins that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to the sequences contained in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66 are included in this invention. These diagnostic kits can detect the presence of *B. hyodysenteriae* in an animal. The animal is preferably any mammal and bird; more preferably, chicken, goose, duck, turkey, parakeet, dog, cat, hamster, gerbil, rabbit, ferret, horse, cow, sheep, pig, monkey, and human.

The invention also contemplates the method of preventing or treating an infection of *B. hyodysenteriae* in an animal by administering to an animal a DNA vaccine containing one or more nucleotide sequences listed in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65 or sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% identical (and every integer from 100 to 70) to these sequences. This invention also covers a method of preventing or

treating an infection of *B. hyodysenteriae* in an animal by administering to an animal a vaccine containing one or more proteins having the amino acid sequence containing in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66 or sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to these sequences. The animal is preferably any mammal and bird; more preferably, chicken, goose, duck, turkey, parakeet, dog, cat, hamster, gerbil, rabbit, ferret, horse, cow, sheep, pig, monkey, and human.

The invention also contemplates the method of generating an immune response in an animal by administering to an animal an immunogenic composition containing one or more nucleotide sequences listed in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65 or sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% identical (and every integer from 100 to 70) to these sequences. This invention also covers a method of generating an immune response in an animal by administering to an animal an immunogenic composition containing one or more proteins having the amino acid sequence containing in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66 or sequences that are at least 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous (and every integer from 100 to 70) to these sequences. The animal is preferably any mammal and bird; more preferably, chicken, goose, duck, turkey, parakeet, dog, cat, hamster, gerbil, rabbit, ferret, horse, cow, sheep, pig, monkey, and human.

Detailed Summary of Invention

The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (i.e., to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an element" means one element or more than one element.

The term "amino acid" is intended to embrace all molecules, whether natural or synthetic, which include both an amino functionality and an acid functionality and capable of being included in a polymer of naturally-occurring amino acids. Exemplary amino acids include naturally-occurring amino acids; analogs, derivatives and congeners thereof; amino acid analogs having variant side chains; and all stereoisomers of any of any of the foregoing.

An animal can be any mammal or bird. Examples of mammals include dog, cat, hamster, gerbil, rabbit, ferret, horse, cow, sheep, pig, monkey, and human. Examples of birds include chicken, goose, duck, turkey, and parakeet.

The term "conserved residue" refers to an amino acid that is a member of a group of amino acids having certain common properties. The term "conservative amino acid substitution" refers to the substitution (conceptually or otherwise) of an amino acid from one such group with a different amino acid from the same group. A functional way to define common properties between individual amino acids is to analyze the normalized frequencies of amino acid changes between corresponding proteins of homologous organisms (Schulz, G. E. and R. H. Schinner., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). According to such analyses, groups of amino acids may be defined where amino acids within a group exchange preferentially with each other, and therefore resemble each other most in their impact on the overall protein structure (Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Examples of amino acid groups defined in this manner include: (i) a positively-charged group containing Lys, Arg and His, (ii) a negatively-charged group containing Glu and Asp, (iii) an aromatic group containing Phe, Tyr and Trp, (iv) a nitrogen ring group containing His and Trp, (v) a large aliphatic nonpolar group containing Val, Leu and De, (vi) a slightly-polar group containing Met and Cys, (vii) a small-residue group containing Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln and Pro, (viii) an aliphatic group containing Val, Leu, De, Met and Cys, and (ix) a small, hydroxyl group containing Ser and Thr.

A "fusion protein" or "fusion polypeptide" refers to a chimeric protein as that term is known in the art and may be constructed using methods known in the art. In many examples of fusion proteins, there are two different polypeptide sequences, and in certain cases, there may be more. The polynucleotide sequences encoding the fusion protein may be operably linked in frame so that the fusion protein may be translated correctly. A fusion protein may include polypeptide sequences from the same species or from different species. In various embodiments, the fusion polypeptide may contain one or more amino acid sequences linked to a first polypeptide. In the case where more than one amino acid sequence is fused to a first polypeptide, the fusion sequences may be multiple copies of the same sequence, or alternatively, may be different amino acid sequences. The fusion polypeptides may be fused to the N-terminus, the C-terminus, or the N- and C-terminus of the first polypeptide. Exemplary fusion proteins include polypeptides containing a glutathione S-transferase tag (GST-tag), histidine tag (His-tag), an immunoglobulin domain or an immunoglobulin binding domain.

The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide, in certain embodiments prepared from recombinant DNA or RNA, or of synthetic origin or natural origin, or some

combination thereof, which (1) is not associated with proteins that it is normally found with in nature, (2) is separated from the cell in which it normally occurs, (3) is free of other proteins from the same cellular source, (4) is expressed by a cell from a different species, or (5) does not occur in nature. It is possible for an isolated polypeptide exist but not qualify as a purified polypeptide.

The term "isolated nucleic acid" and "isolated polynucleotide" refers to a polynucleotide whether genomic DNA, cDNA, mRNA, tRNA, rRNA, iRNA, or a polynucleotide obtained from a cellular organelle (such as mitochondria and chloroplast), or whether from synthetic origin, which (1) is not associated with the cell in which the "isolated nucleic acid" is found in nature, or (2) is operably linked to a polynucleotide to which it is not linked in nature. It is possible for an isolated polynucleotide exist but not qualify as a purified polynucleotide.

The term "nucleic acid" and "polynucleotide" refers to a polymeric form of nucleotides, either ribonucleotides or deoxyribonucleotides or a modified form of either type of nucleotide. The terms should also be understood to include, as equivalents, analogs of either RNA or DNA made from nucleotide analogs, and, as applicable to the embodiment being described, single-stranded (such as sense or antisense) and double-stranded polynucleotides.

The term "nucleic acid of the invention" and "polynucleotide of the invention" refers to a nucleic acid encoding a polypeptide of the invention. A polynucleotide of the invention may comprise all, or a portion of, a subject nucleic acid sequence; a nucleotide sequence at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to a subject nucleic acid sequence (and every integer between 60 and 100); a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to a subject nucleic acid sequence; nucleotide sequences encoding polypeptides that are functionally equivalent to polypeptides of the invention; nucleotide sequences encoding polypeptides at least about 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homologous or identical with a subject amino acid sequence (and every integer between 60 and 100); nucleotide sequences encoding polypeptides having an activity of a polypeptide of the invention and having at least about 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% or more homology or identity with a subject amino acid sequence (and every integer between 60 and 100); nucleotide sequences that differ by 1 to about 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 or more nucleotide substitutions, additions or deletions, such as allelic variants, of a subject nucleic acid sequence; nucleic acids derived from and evolutionarily related to a subject nucleic acid sequence; and complements of, and nucleotide sequences resulting from the degeneracy of

the genetic code, for all of the foregoing and other nucleic acids of the invention. Nucleic acids of the invention also include homologs, *e.g.*, orthologs and paralogs, of a subject nucleic acid sequence and also variants of a subject nucleic acid sequence which have been codon optimized for expression in a particular organism (*e.g.*, host cell).

5 The term "operably linked", when describing the relationship between two nucleic acid regions, refers to a juxtaposition wherein the regions are in a relationship permitting them to function in their intended manner. For example, a control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences, such as when the
10 appropriate molecules (*e.g.*, inducers and polymerases) are bound to the control or regulatory sequence(s).

 The term "polypeptide", and the terms "protein" and "peptide" which are used interchangeably herein, refers to a polymer of amino acids. Exemplary polypeptides include gene products, naturally-occurring proteins, homologs, orthologs, paralogs, fragments, and
15 other equivalents, variants and analogs of the foregoing.

 The terms "polypeptide fragment" or "fragment", when used in reference to a reference polypeptide, refers to a polypeptide in which amino acid residues are deleted as compared to the reference polypeptide itself, but where the remaining amino acid sequence is usually identical to the corresponding positions in the reference polypeptide. Such deletions
20 may occur at the amino-terminus or carboxy-terminus of the reference polypeptide, or alternatively both. Fragments typically are at least 5, 6, 8 or 10 amino acids long, at least 14 amino acids long, at least 20, 30, 40 or 50 amino acids long, at least 75 amino acids long, or at least 100, 150, 200, 300, 500 or more amino acids long. A fragment can retain one or more of the biological activities of the reference polypeptide. In certain embodiments, a fragment
25 may comprise a domain having the desired biological activity, and optionally additional amino acids on one or both sides of the domain, which additional amino acids may number from 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, or up to 100 or more residues. Further, fragments can include a sub-fragment of a specific region, which sub-fragment retains a function of the region from which it is derived. In another embodiment, a fragment may have immunogenic properties.

30 The term "polypeptide of the invention" refers to a polypeptide containing a subject amino acid sequence, or an equivalent or fragment thereof. Polypeptides of the invention include polypeptides containing all or a portion of a subject amino acid sequence; a subject amino acid sequence with 1 to about 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 or more conservative amino acid substitutions; an amino acid sequence that is at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, or 99% homologous to a subject amino acid sequence (and every integer between 60 and 100); and functional fragments thereof. Polypeptides of the invention also include homologs, *e.g.*, orthologs and paralogs, of a subject amino acid sequence.

It is also possible to modify the structure of the polypeptides of the invention for such purposes as enhancing therapeutic or prophylactic efficacy, or stability (*e.g.*, *ex vivo* shelf life, resistance to proteolytic degradation *in vivo*, *etc.*). Such modified polypeptides, when designed to retain at least one activity of the naturally-occurring form of the protein, are considered "functional equivalents" of the polypeptides described in more detail herein. Such modified polypeptides may be produced, for instance, by amino acid substitution, deletion, or addition, which substitutions may consist in whole or part by conservative amino acid substitutions.

For instance, it is reasonable to expect that an isolated conservative amino acid substitution, such as replacement of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, a threonine with a serine, will not have a major affect on the biological activity of the resulting molecule. Whether a change in the amino acid sequence of a polypeptide results in a functional homolog may be readily determined by assessing the ability of the variant polypeptide to produce a response similar to that of the wild-type protein. Polypeptides in which more than one replacement has taken place may readily be tested in the same manner.

The term "purified" refers to an object species that is the predominant species present (*i.e.*, on a molar basis it is more abundant than any other individual species in the composition). A "purified fraction" is a composition wherein the object species is at least about 50 percent (on a molar basis) of all species present. In making the determination of the purity or a species in solution or dispersion, the solvent or matrix in which the species is dissolved or dispersed is usually not included in such determination; instead, only the species (including the one of interest) dissolved or dispersed are taken into account. Generally, a purified composition will have one species that is more than about 80% of all species present in the composition, more than about 85%, 90%, 95%, 99% or more of all species present. The object species may be purified to essential homogeneity (contaminant species cannot be detected in the composition by conventional detection methods) wherein the composition is essentially a single species. A skilled artisan may purify a polypeptide of the invention using standard techniques for protein purification in light of the teachings herein. Purity of a polypeptide may be determined by a number of methods known to those of skill in the art, including for example, amino-terminal amino acid sequence analysis, gel electrophoresis, mass-spectrometry analysis and the methods described herein.

The terms "recombinant protein" or "recombinant polypeptide" refer to a polypeptide which is produced by recombinant DNA techniques. An example of such techniques includes the case when DNA encoding the expressed protein is inserted into a suitable expression vector which is in turn used to transform a host cell to produce the protein or polypeptide encoded by the DNA.

The term "regulatory sequence" is a generic term used throughout the specification to refer to polynucleotide sequences, such as initiation signals, enhancers, regulators and promoters, that are necessary or desirable to affect the expression of coding and non-coding sequences to which they are operably linked. Exemplary regulatory sequences are described in Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990), and include, for example, the early and late promoters of SV40, adenovirus or cytomegalovirus immediate early promoter, the lac system, the trp system, the TAC or TRC system, T7 promoter whose expression is directed by T7 RNA polymerase, the major operator and promoter regions of phage lambda, the control regions for fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, the promoters of acid phosphatase (*e.g.*, Pho5), the promoters of the yeast α -mating factors, the polyhedron promoter of the baculovirus system and other sequences known to control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses, and various combinations thereof. The nature and use of such control sequences may differ depending upon the host organism.

In prokaryotes, such regulatory sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequences. The term "regulatory sequence" is intended to include, at a minimum, components whose presence may influence expression, and may also include additional components whose presence is advantageous, for example, leader sequences and fusion partner sequences. In certain embodiments, transcription of a polynucleotide sequence is under the control of a promoter sequence (or other regulatory sequence) which controls the expression of the polynucleotide in a cell-type in which expression is intended. It will also be understood that the polynucleotide can be under the control of regulatory sequences which are the same or different from those sequences which control expression of the naturally-occurring form of the polynucleotide.

The term "sequence homology" refers to the proportion of base matches between two nucleic acid sequences or the proportion of amino acid matches between two amino acid sequences. When sequence homology is expressed as a percentage, *e.g.*, 50%, the percentage denotes the proportion of matches over the length of sequence from a desired sequence that is compared to some other sequence. Gaps (in either of the two sequences) are permitted to

The terms "recombinant protein" or "recombinant polypeptide" refer to a polypeptide which is produced by recombinant DNA techniques. An example of such techniques includes the case when DNA encoding the expressed protein is inserted into a suitable expression vector which is in turn used to transform a host cell to produce the protein or polypeptide encoded by the DNA.

The term "regulatory sequence" is a generic term used throughout the specification to refer to polynucleotide sequences, such as initiation signals, enhancers, regulators and promoters, that are necessary or desirable to affect the expression of coding and non-coding sequences to which they are operably linked. Exemplary regulatory sequences are described in Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990), and include, for example, the early and late promoters of SV40, adenovirus or cytomegalovirus immediate early promoter, the lac system, the trp system, the TAC or TRC system, T7 promoter whose expression is directed by T7 RNA polymerase, the major operator and promoter regions of phage lambda, the control regions for fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, the promoters of acid phosphatase (*e.g.*, Pho5), the promoters of the yeast α -mating factors, the polyhedron promoter of the baculovirus system and other sequences known to control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses, and various combinations thereof. The nature and use of such control sequences may differ depending upon the host organism. In prokaryotes, such regulatory sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequences. The term "regulatory sequence" is intended to include, at a minimum, components whose presence may influence expression, and may also include additional components whose presence is advantageous, for example, leader sequences and fusion partner sequences. In certain embodiments, transcription of a polynucleotide sequence is under the control of a promoter sequence (or other regulatory sequence) which controls the expression of the polynucleotide in a cell-type in which expression is intended. It will also be understood that the polynucleotide can be under the control of regulatory sequences which are the same or different from those sequences which control expression of the naturally-occurring form of the polynucleotide.

The term "sequence homology" refers to the proportion of base matches between two nucleic acid sequences or the proportion of amino acid matches between two amino acid sequences. When sequence homology is expressed as a percentage, *e.g.*, 50%, the percentage denotes the proportion of matches over the length of sequence from a desired sequence that is compared to some other sequence. Gaps (in either of the two sequences) are permitted to

maximize matching; gap lengths of 15 bases or less are usually used, 6 bases or less are used more frequently, with 2 bases or less used even more frequently. The term "sequence identity" means that sequences are identical (*i.e.*, on a nucleotide-by-nucleotide basis for nucleic acids or amino acid-by-amino acid basis for polypeptides) over a window of comparison. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over the comparison window, determining the number of positions at which the identical amino acids or nucleotides occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the comparison window, and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. Methods to calculate sequence identity are known to those of skill in the art and described in further detail below.

The term "soluble" as used herein with reference to a polypeptide of the invention or other protein, means that upon expression in cell culture, at least some portion of the polypeptide or protein expressed remains in the cytoplasmic fraction of the cell and does not fractionate with the cellular debris upon lysis and centrifugation of the lysate. Solubility of a polypeptide may be increased by a variety of art recognized methods, including fusion to a heterologous amino acid sequence, deletion of amino acid residues, amino acid substitution (*e.g.*, enriching the sequence with amino acid residues having hydrophilic side chains), and chemical modification (*e.g.*, addition of hydrophilic groups).

The solubility of polypeptides may be measured using a variety of art recognized techniques, including, dynamic light scattering to determine aggregation state, UV absorption, centrifugation to separate aggregated from non-aggregated material, and SDS gel electrophoresis (*e.g.*, the amount of protein in the soluble fraction is compared to the amount of protein in the soluble and insoluble fractions combined). When expressed in a host cell, the polypeptides of the invention may be at least about 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more soluble, *e.g.*, at least about 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more of the total amount of protein expressed in the cell is found in the cytoplasmic fraction. In certain embodiments, a one liter culture of cells expressing a polypeptide of the invention will produce at least about 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 milligrams of more of soluble protein. In an exemplary embodiment, a polypeptide of the invention is at least about 10% soluble and will produce at least about 1 milligram of protein from a one liter cell culture.

The term "specifically hybridizes" refers to detectable and specific nucleic acid binding. Polynucleotides, oligonucleotides and nucleic acids of the invention selectively

hybridize to nucleic acid strands under hybridization and wash conditions that minimize appreciable amounts of detectable binding to nonspecific nucleic acids. Stringent conditions may be used to achieve selective hybridization conditions as known in the art and discussed herein. Generally, the nucleic acid sequence identity between the polynucleotides,

5 oligonucleotides, and nucleic acids of the invention and a nucleic acid sequence of interest will be at least 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, or more (and every integer between 30 and 100). In certain instances, hybridization and washing conditions are performed under stringent conditions according to conventional hybridization procedures and as described further herein.

10 The terms "stringent conditions" or "stringent hybridization conditions" refer to conditions which promote specific hybridization between two complementary polynucleotide strands so as to form a duplex. Stringent conditions may be selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (T_m) for a given polynucleotide duplex at a defined ionic strength and pH. The length of the complementary polynucleotide strands and their GC
15 content will determine the T_m of the duplex, and thus the hybridization conditions necessary for obtaining a desired specificity of hybridization. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of a polynucleotide sequence hybridizes to a perfectly matched complementary strand. In certain cases it may be desirable to increase the stringency of the hybridization conditions to be about equal to the T_m for a particular duplex.

20 A variety of techniques for estimating the T_m are available. Typically, G-C base pairs in a duplex are estimated to contribute about 3°C to the T_m, while A-T base pairs are estimated to contribute about 2°C, up to a theoretical maximum of about 80-100°C.

However, more sophisticated models of T_m are available in which G-C stacking interactions, solvent effects, the desired assay temperature and the like are taken into account.

25 For example, probes can be designed to have a dissociation temperature (T_d) of approximately 60°C, using the formula: $T_d = (((3 \times \#GC) + (2 \times \#AT)) \times 37) - 562) / \#bp - 5$; where #GC, #AT, and #bp are the number of guanine-cytosine base pairs, the number of adenine-thymine base pairs, and the number of total base pairs, respectively, involved in the formation of the duplex.

30 Hybridization may be carried out in 5x SSC, 4x SSC, 3x SSC, 2x SSC, 1x SSC or 0.2x SSC for at least about 1 hour, 2 hours, 5 hours, 12 hours, or 24 hours. The temperature of the hybridization may be increased to adjust the stringency of the reaction, for example, from about 25°C (room temperature), to about 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, or 65°C. The hybridization reaction may also include another agent affecting the stringency, for example,

hybridization conducted in the presence of 50% formamide increases the stringency of hybridization at a defined temperature.

The hybridization reaction may be followed by a single wash step, or two or more wash steps, which may be at the same or a different salinity and temperature. For example, the temperature of the wash may be increased to adjust the stringency from about 25°C (room temperature), to about 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, or higher. The wash step may be conducted in the presence of a detergent, *e.g.*, 0.1 or 0.2% SDS. For example, hybridization may be followed by two wash steps at 65°C each for about 20 minutes in 2x SSC, 0.1% SDS, and optionally two additional wash steps at 65°C each for about 20 minutes in 0.2x SSC, 0.1% SDS.

Exemplary stringent hybridization conditions include overnight hybridization at 65°C in a solution containing 50% formamide, 10x Denhardt (0.2% Ficoll, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin) and 200 µg/ml of denatured carrier DNA, *e.g.*, sheared salmon sperm DNA, followed by two wash steps at 65°C each for about 20 minutes in 2x SSC, 0.1% SDS, and two wash steps at 65°C each for about 20 minutes in 0.2x SSC, 0.1% SDS.

Hybridization may consist of hybridizing two nucleic acids in solution, or a nucleic acid in solution to a nucleic acid attached to a solid support, *e.g.*, a filter. When one nucleic acid is on a solid support, a prehybridization step may be conducted prior to hybridization. Prehybridization may be carried out for at least about 1 hour, 3 hours or 10 hours in the same solution and at the same temperature as the hybridization solution (without the complementary polynucleotide strand).

Appropriate stringency conditions are known to those skilled in the art or may be determined experimentally by the skilled artisan. See, for example, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-12.3.6; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; S. Agrawal (ed.) Methods in Molecular Biology, volume 20; Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -- Hybridization With Nucleic Acid Probes, *e.g.*, part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York; and Tibanyenda, N. et al., Eur. J. Biochem. 139:19 (1984) and Ebel, S. et al., Biochem. 31:12083 (1992).

The term "vector" refers to a nucleic acid capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector which may be used in accord with the invention is an episome, *i.e.*, a nucleic acid capable of extra-chromosomal replication. Other

vectors include those capable of autonomous replication and expression of nucleic acids to which they are linked. Vectors capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of "plasmids" which refer to circular double stranded DNA molecules which, in their vector form are not bound to the chromosome. In the present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors which serve equivalent functions and which become known in the art subsequently hereto.

The nucleic acids of the invention may be used as diagnostic reagents to detect the presence or absence of the target DNA or RNA sequences to which they specifically bind, such as for determining the level of expression of a nucleic acid of the invention. In one aspect, the present invention contemplates a method for detecting the presence of a nucleic acid of the invention or a portion thereof in a sample, the method of the steps of: (a) providing an oligonucleotide at least eight nucleotides in length, the oligonucleotide being complementary to a portion of a nucleic acid of the invention; (b) contacting the oligonucleotide with a sample containing at least one nucleic acid under conditions that permit hybridization of the oligonucleotide with a nucleic acid of the invention or a portion thereof; and (c) detecting hybridization of the oligonucleotide to a nucleic acid in the sample, thereby detecting the presence of a nucleic acid of the invention or a portion thereof in the sample. In another aspect, the present invention contemplates a method for detecting the presence of a nucleic acid of the invention or a portion thereof in a sample, by (a) providing a pair of single stranded oligonucleotides, each of which is at least eight nucleotides in length, complementary to sequences of a nucleic acid of the invention, and wherein the sequences to which the oligonucleotides are complementary are at least ten nucleotides apart; and (b) contacting the oligonucleotides with a sample containing at least one nucleic acid under hybridization conditions; (c) amplifying the nucleotide sequence between the two oligonucleotide primers; and (d) detecting the presence of the amplified sequence, thereby detecting the presence of a nucleic acid of the invention or a portion thereof in the sample.

In another aspect of the invention, the polynucleotide of the invention is provided in an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a polypeptide of the invention and operably linked to at least one regulatory sequence. It should be understood that the design of the expression vector may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed and/or the type of protein desired to be expressed. The vector's copy

number, the ability to control that copy number and the expression of any other protein encoded by the vector, such as antibiotic markers, should be considered.

An expression vector containing the polynucleotide of the invention can then be used as a pharmaceutical agent to treat an animal infected with *B. hyodysenteriae* or as a vaccine
5 (also a pharmaceutical agent) to prevent an animal from being infected with *B.*

hyodysenteriae, or to reduce the symptoms and course of the disease if the animal does become infected. One manner of using an expression vector as a pharmaceutical agent is to administer a nucleic acid vaccine to the animal at risk of being infected or to the animal after
10 being infected. Nucleic acid vaccine technology is well-described in the art. Some

descriptions can be found in U.S. Patent 6,562,376 (Hooper et al.); U.S. Patent 5,589,466 (Felgner, et al.); U.S. Patent 6,673,776 (Felgner, et al.); and U.S. Patent 6,710,035 (Felgner, et al.). Nucleic acid vaccines can be injected into muscle or intradermally, can be electroporated into the animal (see WO 01/23537, King et al.; and WO 01/68889, Malone et al.), via lipid compositions (see U.S. Patent 5,703,055, Felgner, et al), or other mechanisms
15 known in the art field.

Expression vectors can also be transfected into bacteria which can be administered to the target animal to induce an immune response to the protein encoded by the nucleotides of this invention contained on the expression vector. The expression vector can contain eukaryotic expression sequences such that the nucleotides of this invention are transcribed
20 and translated in the host animal. Alternatively, the expression vector can be transcribed in the bacteria and then translated in the host animal. The bacteria used as a carrier of the expression vector should be attenuated but still invasive. One can use *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia spp.*, and *Aeromonas spp.*, just to name a few, that have been attenuated but still invasive. Examples of these methods can be found in U.S. Patent
25 5,824,538 (Branstrom et al); U.S. Patent 5,877,159 (Powell, et al.); U.S. Patent 6,150,170 (Powell, et al.); U.S. Patent 6,500,419 (Hone, et al.); and U.S. Patent 6,682,729 (Powell, et al.).

Alternatively, the polynucleotides of this invention can be placed in certain viruses which act a vector. Viral vectors can either express the proteins of this invention on the
30 surface of the virus, or carry polynucleotides of this invention into an animal cell where the polynucleotide is transcribed and translated into a protein. The animal infected with the viral vectors can develop an immune response to the proteins encoded by the polynucleotides of this invention. Thereby one can alleviate or prevent an infection by *B. hyodysenteriae* in the animal which received the viral vectors. Examples of viral vectors can be found U.S. Patent

5,283,191 (Morgan et al.); U.S. Patent 5,554,525 (Sondermeijer et al) and U.S. Patent 5,712,118 (Murphy).

The polynucleotide of the invention may be used to cause expression and over-expression of a polypeptide of the invention in cells propagated in culture, *e.g.* to produce proteins or polypeptides, including fusion proteins or polypeptides.

This invention pertains to a host cell transfected with a recombinant gene in order to express a polypeptide of the invention. The host cell may be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a polypeptide of the invention may be expressed in bacterial cells, such as *E. coli*, insect cells (baculovirus), yeast, plant, or mammalian cells. In those instances when the host cell is human, it may or may not be in a live subject. Other suitable host cells are known to those skilled in the art. Additionally, the host cell may be supplemented with tRNA molecules not typically found in the host so as to optimize expression of the polypeptide. Alternatively, the nucleotide sequence may be altered to optimize expression in the host cell, yet the protein produced would have high homology to the originally encoded protein. Other methods suitable for maximizing expression of the polypeptide will be known to those in the art.

The present invention further pertains to methods of producing the polypeptides of the invention. For example, a host cell transfected with an expression vector encoding a polypeptide of the invention may be cultured under appropriate conditions to allow expression of the polypeptide to occur. The polypeptide may be secreted and isolated from a mixture of cells and medium containing the polypeptide. Alternatively, the polypeptide may be retained cytoplasmically and the cells harvested, lysed and the protein isolated.

A cell culture includes host cells, media and other byproducts. Suitable media for cell culture are well known in the art. The polypeptide may be isolated from cell culture medium, host cells, or both using techniques known in the art for purifying proteins, including ion-exchange chromatography, gel filtration chromatography, ultrafiltration, electrophoresis, and immunoaffinity purification with antibodies specific for particular epitopes of a polypeptide of the invention.

Thus, a nucleotide sequence encoding all or a selected portion of polypeptide of the invention, may be used to produce a recombinant form of the protein via microbial or eukaryotic cellular processes. Ligating the sequence into a polynucleotide construct, such as an expression vector, and transforming or transfecting into hosts, either eukaryotic (yeast, avian, insect or mammalian) or prokaryotic (bacterial cells), are standard procedures. Similar

procedures, or modifications thereof, may be employed to prepare recombinant polypeptides of the invention by microbial means or tissue-culture technology.

Suitable vectors for the expression of a polypeptide of the invention include plasmids of the types: pTrcHis-derived plasmids, pET-derived plasmids, pBR322-derived plasmids, pEMBL-derived plasmids, pEX-derived plasmids, pBTac-derived plasmids and pUC-derived plasmids for expression in prokaryotic cells, such as *E. coli*. The various methods employed in the preparation of the plasmids and transformation of host organisms are well known in the art. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells, as well as general recombinant procedures, see *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 and 17.

Coding sequences for a polypeptide of interest may be incorporated as a part of a fusion gene including a nucleotide sequence encoding a different polypeptide. The present invention contemplates an isolated polynucleotide containing a nucleic acid of the invention and at least one heterologous sequence encoding a heterologous peptide linked in frame to the nucleotide sequence of the nucleic acid of the invention so as to encode a fusion protein containing the heterologous polypeptide. The heterologous polypeptide may be fused to (a) the C-terminus of the polypeptide of the invention, (b) the N-terminus of the polypeptide of the invention, or (c) the C-terminus and the N-terminus of the polypeptide of the invention. In certain instances, the heterologous sequence encodes a polypeptide permitting the detection, isolation, solubilization and/or stabilization of the polypeptide to which it is fused. In still other embodiments, the heterologous sequence encodes a polypeptide such as a poly His tag, myc, HA, GST, protein A, protein G, calmodulin-binding peptide, thioredoxin, maltose-binding protein, poly arginine, poly His-Asp, FLAG, a portion of an immunoglobulin protein, and a transcytosis peptide.

Fusion expression systems can be useful when it is desirable to produce an immunogenic fragment of a polypeptide of the invention. For example, the VP6 capsid protein of rotavirus may be used as an immunologic carrier protein for portions of polypeptide, either in the monomeric form or in the form of a viral particle. The nucleic acid sequences corresponding to the portion of a polypeptide of the invention to which antibodies are to be raised may be incorporated into a fusion gene construct which includes coding sequences for a late vaccinia virus structural protein to produce a set of recombinant viruses expressing fusion proteins comprising a portion of the protein as part of the virion. The Hepatitis B surface antigen may also be utilized in this role as well. Similarly, chimeric

constructs coding for fusion proteins containing a portion of a polypeptide of the invention and the poliovirus capsid protein may be created to enhance immunogenicity (see, for example, EP Publication NO: 0259149; and Evans et al., (1989) *Nature* 339:385; Huang et al., (1988) *J. Virol.* 62:3855; and Schlienger et al., (1992) *J. Virol.* 66:2).

5 Fusion proteins may facilitate the expression and/or purification of proteins. For example, a polypeptide of the invention may be generated as a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein. Such GST fusion proteins may be used to simplify purification of a polypeptide of the invention, such as through the use of glutathione-derivatized matrices (see, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)). In another embodiment, a fusion gene coding for a purification leader
10 sequence, such as a poly-(His)/enterokinase cleavage site sequence at the N-terminus of the desired portion of the recombinant protein, may allow purification of the expressed fusion protein by affinity chromatography using a Ni²⁺ metal resin. The purification leader sequence may then be subsequently removed by treatment with enterokinase to provide the
15 purified protein (e.g., see Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; and Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Techniques for making fusion genes are well known. Essentially, the joining of various DNA fragments coding for different polypeptide sequences is performed in accordance with conventional techniques, employing blunt-ended or stagger-ended termini
20 for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene may be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR
amplification of gene fragments may be carried out using anchor primers which give rise to
25 complementary overhangs between two consecutive gene fragments which may subsequently be annealed to generate a chimeric gene sequence (see, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

In other embodiments, the invention provides for nucleic acids of the invention immobilized onto a solid surface, including, plates, microtiter plates, slides, beads, particles,
30 spheres, films, strands, precipitates, gels, sheets, tubing, containers, capillaries, pads, slices, etc. The nucleic acids of the invention may be immobilized onto a chip as part of an array. The array may contain one or more polynucleotides of the invention as described herein. In one embodiment, the chip contains one or more polynucleotides of the invention as part of an

array of polynucleotide sequences from the same pathogenic species as such polynucleotide(s).

In a preferred form of the invention there is provided isolated *B. hyodysenteriae* polypeptides as herein described, and also the polynucleotide sequences encoding these polypeptides. More desirably the *B. hyodysenteriae* polypeptides are provided in substantially purified form.

Preferred polypeptides of the invention will have one or more biological properties (e.g., *in vivo*, *in vitro* or immunological properties) of the native full-length polypeptide. Non-functional polypeptides are also included within the scope of the invention because they may be useful, for example, as antagonists of the functional polypeptides. The biological properties of analogues, fragments, or derivatives relative to wild type may be determined, for example, by means of biological assays.

Polypeptides, including analogues, fragments and derivatives, can be prepared synthetically (e.g., using the well known techniques of solid phase or solution phase peptide synthesis). Preferably, solid phase synthetic techniques are employed. Alternatively, the polypeptides of the invention can be prepared using well known genetic engineering techniques, as described *infra*. In yet another embodiment, the polypeptides can be purified (e.g., by immunoaffinity purification) from a biological fluid, such as but not limited to plasma, faeces, serum, or urine from animals, including, but not limited to, pig, chicken, goose, duck, turkey, parakeet, human, monkey, dog, cat, horse, hamster, gerbil, rabbit, ferret, horse, cattle, and sheep. An animal can be any mammal or bird.

The *B. hyodysenteriae* polypeptide analogues include those polypeptides having the amino acid sequence, wherein one or more of the amino acids are substituted with another amino acid which substitutions do not substantially alter the biological activity of the molecule.

According to the invention, the polypeptides of the invention produced recombinantly or by chemical synthesis and fragments or other derivatives or analogues thereof, including fusion proteins, may be used as an immunogen to generate antibodies that recognize the polypeptides.

A molecule is "antigenic" when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. An antigenic amino acid sequence contains at least about 5, and preferably at least about 10, amino acids. An antigenic portion of a molecule can be the portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to

generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier molecule for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, *i.e.*, capable of eliciting an immune response without a carrier.

An "antibody" is any immunoglobulin, including antibodies and fragments thereof, that binds a specific epitope. The term encompasses polyclonal, monoclonal, and chimeric antibodies, the last mentioned described in further detail in U.S. Patent Nos. 4,816,397 and 4,816,567, as well as antigen binding portions of antibodies, including Fab, F(ab')₂ and F(v) (including single chain antibodies). Accordingly, the phrase "antibody molecule" in its various grammatical forms as used herein contemplates both an intact immunoglobulin molecule and an immunologically active portion of an immunoglobulin molecule containing the antibody combining site. An "antibody combining site" is that structural portion of an antibody molecule comprised of heavy and light chain variable and hypervariable regions that specifically binds an antigen.

Exemplary antibody molecules are intact immunoglobulin molecules, substantially intact immunoglobulin molecules and those portions of an immunoglobulin molecule that contain the paratope, including those portions known in the art as Fab, Fab', F(ab')₂ and F(v), which portions are preferred for use in the therapeutic methods described herein.

Fab and F(ab')₂ portions of antibody molecules are prepared by the proteolytic reaction of papain and pepsin, respectively, on substantially intact antibody molecules by methods that are well-known. See for example, U.S. Patent No. 4,342,566 to Theofilopolous *et al.* Fab' antibody molecule portions are also well-known and are produced from F(ab')₂ portions followed by reduction with mercaptoethanol of the disulfide bonds linking the two heavy chain portions, and followed by alkylation of the resulting protein mercaptan with a reagent such as iodoacetamide. An antibody containing intact antibody molecules is preferred herein.

The phrase "monoclonal antibody" in its various grammatical forms refers to an antibody having only one species of antibody combining site capable of immunoreacting with a particular antigen. A monoclonal antibody thus typically displays a single binding affinity for any antigen with which it immunoreacts. A monoclonal antibody may therefore contain an antibody molecule having a plurality of antibody combining sites, each immunospecific for a different antigen; *e.g.*, a bispecific (chimeric) monoclonal antibody.

The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune

response [Hood *et al.*, in *Immunology*, p. 384, Second Ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)]. Often, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, will fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, saponin, mineral gels such as aluminium hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Preferably, the adjuvant is pharmaceutically acceptable.

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to the polypeptides of the invention. For the production of antibody, various host animals can be immunised by injection with the polypeptide of the invention, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, *etc.* In one embodiment, a polypeptide of the invention can be conjugated to an immunogenic carrier, *e.g.*, bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*.

For preparation of monoclonal antibodies directed toward a polypeptide of the invention, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler *et al.*, (1975) *Nature*, 256:495-497, the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique [Kozbor *et al.*, (1983) *Immunology Today*, 4:72], and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies [Cole *et al.*, (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc.]. Immortal, antibody-producing cell lines can be created by techniques other than fusion, such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. *See, e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; and 4,493,890.

In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals utilising recent technology. According to the invention, chicken or swine antibodies may be used and can be obtained by using chicken or swine hybridomas or

by transforming B cells with EBV virus *in vitro*. In fact, according to the invention, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" [Morrison *et al.*, (1984) *J. Bacteriol.*, 159:870; Neuberger *et al.*, (1984) *Nature*, 312:604-608; Takeda *et al.*, (1985) *Nature*, 314:452-454] by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for a polypeptide of the invention together with genes from an antibody molecule of appropriate biological activity can be used; such antibodies are within the scope of this invention. Such chimeric antibodies are preferred for use in therapy of intestinal diseases or disorders (described *infra*), since the antibodies are much less likely than xenogenic antibodies to induce an immune response, in particular an allergic response, themselves.

According to the invention, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent 4,946,778) can be adapted to produce single chain antibodies specific for an polypeptide of the invention. An additional embodiment of the invention utilises the techniques described for the construction of Fab expression libraries [Huse *et al.*, (1989) *Science*, 246:1275-1281] to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for a polypeptide of the invention.

Antibody fragments, which contain the idiotype of the antibody molecule, can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, *e.g.*, radioimmunoassay, ELISA, "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), Western blots, precipitation reactions, agglutination assays (*e.g.*, gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, immunoelectrophoresis assays, *etc.* In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labelled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select antibodies that recognise a specific epitope of a polypeptide of the invention, one may assay

generated hybridomas for a product that binds to a fragment of a polypeptide of the invention containing such epitope.

The invention also covers diagnostic and prognostic methods to detect the presence of *B. hyodysenteriae* using a polypeptide of the invention and/or antibodies which bind to the polypeptide of the invention and kits useful for diagnosis and prognosis of *B. hyodysenteriae* infections.

Diagnostic and prognostic methods will generally be conducted using a biological sample obtained from an animal, such as chicken or swine. A "sample" refers to an animal's tissue or fluid suspected of containing a *Brachyspira* species, such as *B. hyodysenteriae*, or its polynucleotides or its polypeptides. Examples of such tissue or fluids include, but not limited to, plasma, serum, faecal material, urine, lung, heart, skeletal muscle, stomach, intestines, and *in vitro* cell culture constituents.

The invention provides methods for detecting the presence of a polypeptide of the invention in a sample, with the following steps: (a) contacting a sample suspected of containing a polypeptide of the invention with an antibody (preferably bound to a solid support) that specifically binds to the polypeptide of the invention under conditions which allow for the formation of reaction complexes comprising the antibody and the polypeptide of the invention; and (b) detecting the formation of reaction complexes comprising the antibody and polypeptide of the invention in the sample, wherein detection of the formation of reaction complexes indicates the presence of the polypeptide of the invention in the sample.

Preferably, the antibody used in this method is derived from an affinity-purified polyclonal antibody, and more preferably a monoclonal antibody. In addition, it is preferable for the antibody molecules used herein be in the form of Fab, Fab', F(ab')₂ or F(v) portions or whole antibody molecules.

Particularly preferred methods for detecting *B. hyodysenteriae* based on the above method include enzyme linked immunosorbent assays, radioimmunoassays, immunoradiometric assays and immunoenzymatic assays, including sandwich assays using monoclonal and/or polyclonal antibodies.

Three such procedures that are especially useful utilise either polypeptide of the invention (or a fragment thereof) labelled with a detectable label, antibody Ab₁ labelled with a detectable label, or antibody Ab₂ labelled with a detectable label. The procedures may be summarized by the following equations wherein the asterisk indicates that the particle is labelled and "AA" stands for the polypeptide of the invention:



B. $AA + Ab^*_1 = AA Ab_1^*$

C. $AA + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1 AA Ab_2^*$

The procedures and their application are all familiar to those skilled in the art and accordingly may be utilised within the scope of the present invention. The "competitive"

5 procedure, Procedure A, is described in U.S. Patent Nos. 3,654,090 and 3,850,752.

Procedure B is representative of well-known competitive assay techniques. Procedure C, the "sandwich" procedure, is described in U.S. Patent Nos. RE 31,006 and 4,016,043. Still other procedures are known, such as the "double antibody" or "DASP" procedure, and can be used.

10 In each instance, the polypeptide of the invention form complexes with one or more antibody(ies) or binding partners and one member of the complex is labelled with a detectable label. The fact that a complex has formed and, if desired, the amount thereof, can be determined by known methods applicable to the detection of labels.

It will be seen from the above, that a characteristic property of Ab_2 is that it will react with Ab_1 . This reaction is because Ab_1 , raised in one mammalian species, has been used in
15 another species as an antigen to raise the antibody, Ab_2 . For example, Ab_2 may be raised in goats using rabbit antibodies as antigens. Ab_2 therefore would be anti-rabbit antibody raised in goats. For purposes of this description and claims, Ab_1 will be referred to as a primary antibody, and Ab_2 will be referred to as a secondary or anti- Ab_1 antibody.

The labels most commonly employed for these studies are radioactive elements,
20 enzymes, chemicals that fluoresce when exposed to ultraviolet light, and others. Examples of fluorescent materials capable of being utilised as labels include fluorescein, rhodamine and auramine. A particular detecting material is anti-rabbit antibody prepared in goats and conjugated with fluorescein through an isothiocyanate. Examples of preferred isotope include ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , and ^{186}Re . The radioactive
25 label can be detected by any of the currently available counting procedures. While many enzymes can be used, examples of preferred enzymes are peroxidase, β -glucuronidase, β -D-glucosidase, β -D-galactosidase, urease, glucose oxidase plus peroxidase and alkaline phosphatase. Enzyme are conjugated to the selected particle by reaction with bridging molecules such as carbodiimides, diisocyanates, glutaraldehyde and the like. Enzyme labels
30 can be detected by any of the presently utilized colorimetric, spectrophotometric, fluorospectrophotometric, amperometric or gasometric techniques. U.S. Patent Nos. 3,654,090; 3,850,752; and 4,016,043 are referred to by way of example for their disclosure of alternate labelling material and methods.

The invention also provides a method of detecting antibodies to a polypeptide of the invention in biological samples, using the following steps: (a) providing a polypeptide of the invention or a fragment thereof; (b) incubating a biological sample with said polypeptide of the invention under conditions which allow for the formation of an antibody-antigen
5 complex; and (c) determining whether an antibody-antigen complex with the polypeptide of the invention is formed.

In another embodiment of the invention there are provided *in vitro* methods for evaluating the level of antibodies to a polypeptide of the invention in a biological sample using the following steps: (a) detecting the formation of reaction complexes in a biological
10 sample according to the method noted above; and (b) evaluating the amount of reaction complexes formed, which amount of reaction complexes corresponds to the level of polypeptide of the invention in the biological sample.

Further there are provided *in vitro* methods for monitoring therapeutic treatment of a disease associated with *B. hyodysenteriae* in an animal host by evaluating, as describe above,
15 the levels of antibodies to a polypeptide of the invention in a series of biological samples obtained at different time points from an animal host undergoing such therapeutic treatment.

The present invention further provides methods for detecting the presence or absence of *B. hyodysenteriae* in a biological sample by: (a) bringing the biological sample into contact with a polynucleotide probe or primer of polynucleotide of the invention under suitable
20 hybridizing conditions; and (b) detecting any duplex formed between the probe or primer and nucleic acid in the sample.

According to one embodiment of the invention, detection of *B. hyodysenteriae* may be accomplished by directly amplifying polynucleotide sequences from biological sample, using known techniques and then detecting the presence of polynucleotide of the invention
25 sequences.

In one form of the invention, the target nucleic acid sequence is amplified by PCR and then detected using any of the specific methods mentioned above. Other useful diagnostic techniques for detecting the presence of polynucleotide sequences include, but are not limited to: 1) allele-specific PCR; 2) single stranded conformation analysis; 3) denaturing gradient
30 gel electrophoresis; 4) RNase protection assays; 5) the use of proteins which recognize nucleotide mismatches, such as the *E. coli* mutS protein; 6) allele-specific oligonucleotides; and 7) fluorescent *in situ* hybridisation.

In addition to the above methods polynucleotide sequences may be detected using conventional probe technology. When probes are used to detect the presence of the desired

polynucleotide sequences, the biological sample to be analysed, such as blood or serum, may be treated, if desired, to extract the nucleic acids. The sample polynucleotide sequences may be prepared in various ways to facilitate detection of the target sequence; *e.g.* denaturation, restriction digestion, electrophoresis or dot blotting. The targeted region of the sample polynucleotide sequence usually must be at least partially single-stranded to form hybrids with the targeting sequence of the probe. If the sequence is naturally single-stranded, denaturation will not be required. However, if the sequence is double-stranded, the sequence will probably need to be denatured. Denaturation can be carried out by various techniques known in the art.

Sample polynucleotide sequences and probes are incubated under conditions that promote stable hybrid formation of the target sequence in the probe with the putative desired polynucleotide sequence in the sample. Preferably, high stringency conditions are used in order to prevent false positives.

Detection, if any, of the resulting hybrid is usually accomplished by the use of labelled probes. Alternatively, the probe may be unlabeled, but may be detectable by specific binding with a ligand that is labelled, either directly or indirectly. Suitable labels and methods for labelling probes and ligands are known in the art, and include, for example, radioactive labels which may be incorporated by known methods (*e.g.*, nick translation, random priming or kinasing), biotin, fluorescent groups, chemiluminescent groups (*e.g.*, dioxetanes, particularly triggered dioxetanes), enzymes, antibodies and the like. Variations of this basic scheme are known in the art, and include those variations that facilitate separation of the hybrids to be detected from extraneous materials and/or that amplify the signal from the labelled moiety.

It is also contemplated within the scope of this invention that the nucleic acid probe assays of this invention may employ a cocktail of nucleic acid probes capable of detecting the desired polynucleotide sequences of this invention. Thus, in one example to detect the presence of polynucleotide sequences of this invention in a cell sample, more than one probe complementary to a polynucleotide sequences is employed and in particular the number of different probes is alternatively 2, 3, or 5 different nucleic acid probe sequences.

The polynucleotide sequences described herein (preferably in the form of probes) may also be immobilised to a solid phase support for the detection of *Brachyspira* species, including but not limited to *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*. Alternatively the polynucleotide sequences described herein will form part of a library of DNA molecules that may be used to detect

simultaneously a number of different genes from *Brachyspira* species, such as *B. hyodysenteriae*. In a further alternate form of the invention polynucleotide sequences described herein together with other polynucleotide sequences (such as from other bacteria or viruses) may be immobilised on a solid support in such a manner permitting identification of the presence of a *Brachyspira* species, such as *B. hyodysenteriae* and/or any of the other polynucleotide sequences bound onto the solid support.

Techniques for producing immobilised libraries of DNA molecules have been described in the art. Generally, most prior art methods describe the synthesis of single-stranded nucleic acid molecule libraries, using for example masking techniques to build up various permutations of sequences at the various discrete positions on the solid substrate. U.S. Patent No. 5,837,832 describes an improved method for producing DNA arrays immobilised to silicon substrates based on very large scale integration technology. In particular, U.S. Patent No. 5,837,832 describes a strategy called "tiling" to synthesize specific sets of probes at spatially defined locations on a substrate that may be used to produced the immobilised DNA libraries of the present invention. U.S. Patent No. 5,837,832 also provides references for earlier techniques that may also be used. Thus polynucleotide sequence probes may be synthesised *in situ* on the surface of the substrate.

Alternatively, single-stranded molecules may be synthesised off the solid substrate and each pre-formed sequence applied to a discrete position on the solid substrate. For example, polynucleotide sequences may be printed directly onto the substrate using robotic devices equipped with either pins or pizo electric devices.

The library sequences are typically immobilised onto or in discrete regions of a solid substrate. The substrate may be porous to allow immobilisation within the substrate or substantially non-porous, in which case the library sequences are typically immobilised on the surface of the substrate. The solid substrate may be made of any material to which polypeptides can bind, either directly or indirectly. Examples of suitable solid substrates include flat glass, silicon wafers, mica, ceramics and organic polymers such as plastics, including polystyrene and polymethacrylate. It may also be possible to use semi-permeable membranes such as nitrocellulose or nylon membranes, which are widely available. The semi-permeable membranes may be mounted on a more robust solid surface such as glass. The surfaces may optionally be coated with a layer of metal, such as gold, platinum or other transition metal.

Preferably, the solid substrate is generally a material having a rigid or semi-rigid surface. In preferred embodiments, at least one surface of the substrate will be substantially

flat, although in some embodiments it may be desirable to physically separate synthesis regions for different polymers with, for example, raised regions or etched trenches. It is also preferred that the solid substrate is suitable for the high density application of DNA sequences in discrete areas of typically from 50 to 100 μm , giving a density of 10000 to 40000 dots/ cm^{-2} .

The solid substrate is conveniently divided up into sections. This may be achieved by techniques such as photoetching, or by the application of hydrophobic inks, for example teflon-based inks (Cel-line, USA).

Discrete positions, in which each different member of the library is located may have any convenient shape, e.g., circular, rectangular, elliptical, wedge-shaped, etc.

Attachment of the polynucleotide sequences to the substrate may be by covalent or non-covalent means. The polynucleotide sequences may be attached to the substrate via a layer of molecules to which the library sequences bind. For example, the polynucleotide sequences may be labelled with biotin and the substrate coated with avidin and/or streptavidin. A convenient feature of using biotinylated polynucleotide sequences is that the efficiency of coupling to the solid substrate can be determined easily. Since the polynucleotide sequences may bind only poorly to some solid substrates, it is often necessary to provide a chemical interface between the solid substrate (such as in the case of glass) and the nucleic acid sequences. Examples of suitable chemical interfaces include hexaethylene glycol. Another example is the use of polylysine coated glass, the polylysine then being chemically modified using standard procedures to introduce an affinity ligand. Other methods for attaching molecules to the surfaces of solid substrate by the use of coupling agents are known in the art, see for example WO98/49557.

Binding of complementary polynucleotide sequences to the immobilised nucleic acid library may be determined by a variety of means such as changes in the optical characteristics of the bound polynucleotide sequence (*i.e.* by the use of ethidium bromide) or by the use of labelled nucleic acids, such as polypeptides labelled with fluorophores. Other detection techniques that do not require the use of labels include optical techniques such as optoacoustics, reflectometry, ellipsometry and surface plasmon resonance (see WO97/49989).

Thus, the present invention provides a solid substrate having immobilized thereon at least one polynucleotide of the present invention, preferably two or more different polynucleotide sequences of the present invention.

The present invention also can be used as a prophylactic or therapeutic, which may be utilised for the purpose of stimulating humoral and cell mediated responses in animals, such as chickens and swine, thereby providing protection against colonisation with *Brachyspira* species, including but not limited to *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B.*
 5 *alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*. Natural infection with a *Brachyspira* species, such as *B. hyodysenteriae* induces circulating antibody titres against the proteins described herein. Therefore, the amino acid sequences described herein or parts thereof, have the potential to form the basis of a systemically or orally administered prophylactic or therapeutic to provide protection against intestinal spirochaetosis.

10 Accordingly, in one embodiment the present invention provides the amino acid sequences described herein or fragments thereof or antibodies that bind the amino acid sequences or the polynucleotide sequences described herein in a therapeutically effective amount admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient.

15 The phrase "therapeutically effective amount" is used herein to mean an amount sufficient to reduce by at least about 15%, preferably by at least 50%, more preferably by at least 90%, and most preferably prevent, a clinically significant deficit in the activity, function and response of the animal host. Alternatively, a therapeutically effective amount is sufficient to cause an improvement in a clinically significant condition in the animal host.

20 The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similarly untoward reaction, such as gastric upset and the like, when administered to an animal. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut
 25 oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical carriers are described in Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

30 In a more specific form of the invention there are provided pharmaceutical compositions comprising therapeutically effective amounts of the amino acid sequences described herein or an analogue, fragment or derivative product thereof or antibodies thereto together with pharmaceutically acceptable diluents, preservatives, solubilizes, emulsifiers, adjuvants and/or carriers. Such compositions include diluents of various buffer content (e.g., Tris-HCl, acetate, phosphate), pH and ionic strength and additives such as detergents and

solubilizing agents (e.g., Tween 80, Polysorbate 80), anti-oxidants (e.g., ascorbic acid, sodium metabisulfite), preservatives (e.g., Thimersol, benzyl alcohol) and bulking substances (e.g., lactose, mannitol). The material may be incorporated into particulate preparations of polymeric compounds such as polylactic acid, polyglycolic acid, etc. or into liposomes.

5 Hylauronic acid may also be used. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the present proteins and derivatives. See, e.g., *Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435-1712 that are herein incorporated by reference. The compositions may be prepared in liquid form, or may be in dried powder,
10 such as lyophilised form.

Alternatively, the polynucleotides of the invention can be optimized for expression in plants (e.g., corn). The plant may be transformed with plasmids containing the optimized polynucleotides. Then the plant is grown, and the proteins of the invention are expressed in the plant, or the plant-optimized version is expressed. The plant is later harvested, and the
15 section of the plant containing the proteins of the invention is processed into feed for the animal. This animal feed will impart immunity against *B. hyodysenteriae* when eaten by the animal. Examples of prior art detailing these methods can be found in U.S. Patent 5,914,123 (Arntzen, et al.); U.S. Patent 6,034,298 (Lam, et al.); and U.S. Patent 6,136,320 (Arntzen, et al.).

20 It will be appreciated that pharmaceutical compositions provided accordingly to the invention may be administered by any means known in the art. Preferably, the pharmaceutical compositions for administration are administered by injection, orally, or by the pulmonary, or nasal route. The amino acid sequences described herein or antibodies derived therefrom are more preferably delivered by intravenous, intraarterial, intraperitoneal,
25 intramuscular, or subcutaneous routes of administration. Alternatively, the amino acid sequence described herein or antibodies derived therefrom, properly formulated, can be administered by nasal or oral administration.

Also encompassed by the present invention is the use of polynucleotide sequences of the invention, as well as antisense and ribozyme polynucleotide sequences hybridisable to a
30 polynucleotide sequence encoding an amino acid sequence according to the invention, for manufacture of a medicament for modulation of a disease associated *B. hyodysenteriae*.

Polynucleotide sequences encoding antisense constructs or ribozymes for use in therapeutic methods are desirably administered directly as a naked nucleic acid construct. Uptake of naked nucleic acid constructs by bacterial cells is enhanced by several known

transfection techniques, for example those including the use of transfection agents. Example of these agents include cationic agents (for example calcium phosphate and DEAE-dextran) and lipofectants. Typically, nucleic acid constructs are mixed with the transfection agent to produce a composition.

5 Alternatively the antisense construct or ribozymes may be combined with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent to produce a pharmaceutical composition. Suitable carriers and diluents include isotonic saline solutions, for example phosphate-buffered saline. The composition may be formulated for parenteral, intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraocular, oral or transdermal administration. The routes of
10 administration described are intended only as a guide since a skilled practitioner will be able to determine readily the optimum route of administration and any dosage for any particular animal and condition.

The invention also includes kits for screening animals suspected of being infected with a *Brachyspira* species, such as *B. hyodysenteriae* or to confirm that an animal is infected
15 with a *Brachyspira* species, such as *B. hyodysenteriae*. In a further embodiment of this invention, kits suitable for use by a specialist may be prepared to determine the presence or absence of *Brachyspira* species, including but not limited to *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli* in suspected infected animals or to quantitatively measure a *Brachyspira* species, including but
20 not limited to *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi* and *B. pilosicoli* infection. In accordance with the testing techniques discussed above, such kits can contain at least a labelled version of one of the amino acid sequences described herein or its binding partner, for instance an antibody specific thereto, and directions depending upon the method selected, e.g., "competitive," "sandwich," "DASP" and the like. Alternatively,
25 such kits can contain at least a polynucleotide sequence complementary to a portion of one of the polynucleotide sequences described herein together with instructions for its use. The kits may also contain peripheral reagents such as buffers, stabilizers, etc.

Accordingly, a test kit for the demonstration of the presence of a *Brachyspira* species, including but not limited to *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*, may contain the following:
30

- (a) a predetermined amount of at least one labelled immunochemically reactive component obtained by the direct or indirect attachment of one of the amino acid sequences described herein or a specific binding partner thereto, to a detectable label;
- (b) other reagents; and

(c) directions for use of said kit.

More specifically, the diagnostic test kit may contain:

(a) a known amount of one of the amino acid sequences described herein as described above (or a binding partner) generally bound to a solid phase to form an immunosorbent, or in the alternative, bound to a suitable tag, or there are a plural of such end products, etc;

(b) if necessary, other reagents; and

(c) directions for use of said test kit.

In a further variation, the test kit may contain:

(a) a labelled component which has been obtained by coupling one of the amino acid sequences described herein to a detectable label;

(b) one or more additional immunochemical reagents of which at least one reagent is a ligand or an immobilized ligand, which ligand is selected from the group consisting of:

(i) a ligand capable of binding with the labelled component (a);

(ii) a ligand capable of binding with a binding partner of the labelled component (a);

(iii) a ligand capable of binding with at least one of the component(s) to be determined; or

(iv) a ligand capable of binding with at least one of the binding partners of at least one of the component(s) to be determined; and

(c) directions for the performance of a protocol for the detection and/or determination of one or more components of an immunochemical reaction between one of the amino acid sequences described herein and a specific binding partner thereto.

Preparation of genomic library

A genomic library is prepared using an Australian porcine field isolate of *B. hyodysenteriae* (strain WA1). This strain has been well-characterised and shown to be virulent following experimental challenge of pigs. The cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method is used to prepare high quality chromosomal DNA suitable for preparation of genomic DNA libraries. *B. hyodysenteriae* is grown in 100 ml anaerobic trypticase soy broth culture to a cell density of 10^9 cells/ml. The cells are harvested at 4,000 x g for 10 minutes, and the cell pellet resuspended in 9.5 ml TE buffer. SDS is added to a final concentration of 0.5 % (w/v), and the cells lysed at 37°C for 1 hour with 100 µg of Proteinase K. NaCl is added to a final concentration of 0.7 M and 1.5 ml CTAB/NaCl solution (10%

w/v CTAB, 0.7 M NaCl) is added before incubating the solution at 65°C for 20 minutes. The lysate is extracted with an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol, and the tube is centrifuged at 6,000 x g for 10 minutes to separate the phases. The aqueous phase is transferred to a fresh tube and 0.6 volumes of isopropanol are added to precipitate the high molecular weight DNA. The precipitated DNA is collected using a hooked glass rod and transferred to a tube containing 1 ml of 70 % (v/v) ethanol. The tube is centrifuged at 10,000 x g and the pelleted DNA redissolved in 4 ml TE buffer overnight. A cesium chloride gradient containing 1.05 g/ml CsCl and 0.5 mg/ml ethidium bromide is prepared using the redissolved DNA solution. The gradient is transferred to 4 ml sealable centrifuge tubes and centrifuged at 70,000 x g overnight at 15°C. The separated DNA is visualized under an ultraviolet light, and the high molecular weight DNA is withdrawn from the gradient using a 15-g needle. The ethidium bromide is removed from the DNA by sequential extraction with CsCl-saturated isopropanol. The purified chromosomal DNA is dialysed against 2 litres TE buffer and precipitated with isopropanol. The resuspended genomic DNA is sheared using a GeneMachines Hydroshear (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI), and the sheared DNA is filled-in using Klenow DNA polymerase to generate blunt-end fragments. One hundred ng of the blunt-end DNA fragments is ligated with 25 ng of pSMART VC vector (Lucigen, Meddleton, WI) using CloneSmart DNA ligase. The ligated DNA is then electroporated into *E. coli* electrocompetent cells. A small insert (2-3 kb) library and medium insert (3-10 kb) library is constructed into the low copy version of the pSMART VC vector.

Genomic sequencing

After the genomic library is obtained, individual clones of *E. coli* containing the pSMART VC vector are picked. The plasmid DNA is purified and sequenced. The purified plasmids are subjected to automated direct sequencing of the pSMART VC vector using the forward and reverse primers specific for the pSMART VC vector. Each sequencing reaction is performed in a 10 µl volume consisting of 200 ng of plasmid DNA, 2 pmol of primer, and 4 µl of the ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Cycling conditions involve a 2 minute denaturing step at 96°C, followed by 25 cycles of denaturation at 96°C for 10 seconds, and a combined primer annealing and extension step at 60°C for 4 minutes. Residual dye terminators are removed from the sequencing products by precipitation with 95% (v/v) ethanol containing 85 mM sodium acetate (pH 5.2), 3mM EDTA (pH 8), and vacuum dried. The plasmids are

sequenced in duplicate using each primer. Sequencing products are analysed using an ABI 373A DNA Sequencer (PE Applied Biosystems).

Annotation

Partial genome sequences for *B. hyodysenteriae* are assembled and annotated using a range of public domain bioinformatics tools to analyse and re-analyse the sequences as part of a quality assurance procedure on data analysis. Open reading frames (ORFs) are predicted using a variety of programs including GeneMark, GLIMMER, ORPHEUS, SELFID and GetORF. Putative ORFs are examined for homology (DNA and protein) with existing international databases using searches including BLAST and FASTA. All the predicted ORFs are analysed to determine their cellular localisation using programs including PSI-BLAST, FASTA, MOTIFS, FINDPATTERNS, PHD, SIGNALP and PSORT. Databases including Interpro, Prosite, ProDom, Pfam and Blocks are used to predict surface associated proteins such as transmembrane domains, leader peptides, homologies to known surface proteins, lipoprotein signature, outer membrane anchoring motifs and host cell binding domains. Phylogenetic and other molecular evolution analysis is conducted with the identified genes and with other species to assist in the assignment of function. The *in silico* analysis of both partially sequenced genomes produces a comprehensive list of all the predicted ORFs present in the sequence data available. Each ORF is interrogated for descriptive information such as predicted molecular weight, isoelectric point, hydrophobicity, and subcellular localisation to enable correlation with the *in vitro* properties of the native gene product. Predicted genes which encode proteins similar to surface localized components and/or virulence factors in other pathogenic bacteria are selected as potential vaccine targets.

Bioinformatics results

The shotgun sequencing of the *B. hyodysenteriae* genome results in 94.6% (3028.6 kb out of a predicted 3200 kb) of the genome being sequenced. The *B. hyodysenteriae* sequence is comprised of 294 contigs with an average contig size of 10.3 kb. For *B. hyodysenteriae*, 2,593 open-reading frames (ORFs) are predicted from the 294 contigs. Comparison of the predicted ORFs with genes present in the nucleic acid and protein databases indicate that approximately 70% of the ORFs have homology with genes contained in the public databases. The remaining 30% of the predicted ORFs have no known identity.

Vaccine candidates

To help reduce the number of ORFs that would be tested as a vaccine candidate, ORF's showing reasonable homology (E-value less than e^{-15}) with outer surface proteins, secreted proteins, and possible virulence factors present in public databases are selected as

potential vaccine candidates. Of the 2,593 ORFs obtained in the genomic shotgun sequencing, many passed this test but the results of thirty-three genes are presented here.

Table 1 shows thirty-three genes selected as potential vaccine targets and their similarity with other known amino acid sequences obtained from SWISS-PROT database. It is noted that the percent identity of amino acids does not raise above 58% while the percent similarity or homology of amino acids remains less than 71%, thus indicating that these ORFs are unique.

Table 1

Gene	Identity of Protein With Highest Homology	Identity (amino acids)	Similarity (amino acids)	Accession Number
NAV-H54	Variable surface protein (VspD) of <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	106/223 (47%)	136/223 (60%)	O68157
NAV-H55	Flagellar protein B of <i>Leptospira interrogans</i>	58/213 (27%)	108/213 (50%)	Q72SJ3
NAV-H56	Myosin-like major antigen	288/1509 (19%)	609/1509 (40%)	P21249
NAV-H57	Lytic murein transglycosylate (possibly outer membrane-bound)	97/318 (25%)	158/318 (41%)	Q6F7W9
NAV-H58	Outer membrane protein of <i>Treponema pallidum</i>	57/175 (32%)	90/175 (51%)	P96127
NAV-H59	Myosin-like major antigen	204/1012 (20%)	432/1012 (42%)	P21249
NAV-H60	Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated lipoprotein	46/139 (33%)	68/139 (48%)	COG2885
NAV-H61	Putative lipoprotein of <i>Treponema denticola</i>	336/805 (41%)	483/805 (60%)	Q73NT0
NAV-H62	NlpA lipoprotein of <i>Streptococcus suis</i>	92/269 (34%)	151/269 (56%)	Q303L3
NAV-H63	NlpA lipoprotein of <i>Streptococcus suis</i>	106/312 (33%)	167/312 (53%)	Q303L3
NAV-H64	NlpA lipoprotein of <i>Streptococcus suis</i>	112/337 (33%)	198/337 (58%)	Q303L3
NAV-H65	Putative secreted protein of <i>Streptomyces violaceoruber</i>	50/127 (39%)	68/127 (53%)	Q849M9
NAV-H66	Toxin (YoeB) of <i>Escherichia coli</i>	42/85 (58%)	60/85 (76%)	P69349
NAV-H67	Outer membrane protein (TolC)	80/350 (20%)	171/350 (39%)	Q2Z054
NAV-H68	Probable hemolysin-related protein of <i>Dehalococcoides</i> sp.	121/415 (29%)	204/415 (49%)	Q3ZYG1
NAV-H69	Outer surface protein of <i>Bacillus cereus</i>	193/357 (54%)	256/357 (71%)	Q4MWS0
NAV-H70	Membrane associated lipoprotein of <i>Vibrio vulnificus</i>	146/417 (35%)	203/417 (48%)	Q2SRL9
NAV-H71	Surface layer protein of <i>Methanosarcina barkeri</i>	72/201 (36%)	112/201 (49%)	Q8TJE3
NAV-H72	Lytic murein transglycosylate (possibly outer membrane-bound)	51/141 (36%)	6/141 (53%)	P44049

Table 1 (continued)

Gene	Identity of Protein With Highest Homology	Identity (amino acids)	Similarity (amino acids)	Accession Number
NAV-H73	Toxin (YoeB) of <i>Escherichia coli</i>	42/84 (50%)	62/84 (73%)	P69349
NAV-H74	Outer membrane protein/protective antigen	210/833 (25%)	339/833 (40%)	COG4775
NAV-H22	variable surface protein (VspH) of <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	29% (133/454)	43% (199/454)	AAK14803.1
NAV-H23	membrane associated lipoprotein of <i>Mycoplasma mycoides</i>	43% (114/263)	60% (159/263)	AAF27178.1
NAV-H24	Outer membrane lipoprotein of <i>Geobacter metallireducens</i>	32% (46/142)	53% (76/142)	ZP00300921.1
NAV-H30	surface antigen (BspA) of <i>Bacteroides forsythus</i>	38% (83/216)	55% (120/216)	AAC82625.1
NAV-H32	hemolytic protein (HlpA) of <i>Nostoc</i> sp.	35% (49/137)	56% (77/137)	NP488469.1
NAV-H33	hemolytic protein of <i>Prevotella intermedia</i>	54% (64/117)	70% (83/117)	AAC05836.1
NAV-H37	virulence-mediating protein (VirC) of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	36% (58/159)	63% (101/159)	NP800579.1
NAV-H40	lytic murein transglycosylase (contains LysM/invasin domains)	26% (120/449)	41% (185/449)	ZP00146104.1
NAV-H41	surface antigen BspA of <i>Bacteroides forsythus</i>	41% (84/201)	57% (115/201)	AAC82625.1
NAV-H43	Hemolysins and related proteins of <i>Anabaena variabilis</i>	35% (150/425)	56% (242/425)	ZP00162711.2
NAV-H44	outer membrane porin of <i>Leptospira interrogans</i>	20% (79/393)	41% (163/393)	YP001419.1
NAV-H45	virulence factor (MviN) protein of <i>Geobacter sulfurreducens</i>	32% (153/469)	49% (231/469)	NP952225.1

5 The DNA and amino acid sequences of NAV-H54 are found in SEQ ID NOs: 1 and 2, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H55 are found in SEQ ID NOs: 3 and 4, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H56 are found in SEQ ID NOs: 5 and 6, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H57 are found in SEQ ID NOs: 7 and 8, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H58 are found in SEQ ID NOs: 9 and 10, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H59 are found in SEQ ID NOs: 11 and 12, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H60 are found in SEQ ID NOs: 13 and 14, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H61 are found in SEQ ID NOs: 15 and 16, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H62 are found in SEQ ID NOs: 17 and 18, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H63 are found in SEQ ID NOs: 19 and 20, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H64 are found in SEQ ID NOs:

21 and 22, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H65 are found in SEQ ID NOs: 23 and 24, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H66 are found in SEQ ID NOs: 25 and 26, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H67 are found in SEQ ID NOs: 27 and 28, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H68 are found in SEQ ID NOs: 29 and 30, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H69 are found in SEQ ID NOs: 31 and 32, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H70 are found in SEQ ID NOs: 33 and 34, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H71 are found in SEQ ID NOs: 35 and 36, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H72 are found in SEQ ID NOs: 37 and 38, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H73 are found in SEQ ID NOs: 39 and 40, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H74 are found in SEQ ID NOs: 41 and 42, respectively.

The DNA and amino acid sequences of NAV-H22 are found in SEQ ID NOs: 43 and 44, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H23 are found in SEQ ID NOs: 45 and 46, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H24 are found in SEQ ID NOs: 47 and 48, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H30 are found in SEQ ID NOs: 49 and 50, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H32 are found in SEQ ID NOs: 51 and 52, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H33 are found in SEQ ID NOs: 53 and 54, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H37 are found in SEQ ID NOs: 55 and 56, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H40 are found in SEQ ID NOs: 57 and 58, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H41 are found in SEQ ID NOs: 59 and 60, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H43 are found in SEQ ID NOs: 61 and 62, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H44 are found in SEQ ID NOs: 63 and 64, respectively. The DNA and amino acid sequences of NAV-H45 are found in SEQ ID NOs: 65 and 66, respectively.

To further reduce the number of ORFs that would be tested as a vaccine candidate, gene products predicted by the in silico analysis to be localised in the cytoplasm or inner membrane of the spirochaete are abandoned. As a result, twenty one of the thirty three genes presented in Table 1 are further analysed. These include NAV-H58, NAV-H60, NAV-H62, NAV-H64, NAV-H66, NAV-H67, NAV-H69, NAV-H71, NAV-H73, NAV-H22, NAV-H23, NAV-H24, NAV-H30, NAV-H32, NAV-H33, NAV-H37, NAV-H40, NAV-H41, NAV-H43, NAV-H44, and NAV-H45.

Analysis of gene distribution using polymerase chain reaction (PCR)

One or two primer pairs which anneal to different regions of the target gene encoding region are designed and optimised for PCR detection. Individual primers are designed using Oligo Explorer 1.2 and primer sets with calculated melting temperatures of approximately 55-60°C are selected. These primers sets are also selected to generate PCR products greater than 200 bp. A medium-stringency primer annealing temperature of 50°C is selected for the distribution analysis PCR. The medium-stringency conditions would allow potential minor mismatched sequences (because of strain differences) occurring at the primer binding sites to not affect primer binding. Distribution analysis of the twenty one *B. hyodysenteriae* target genes are performed on 23 strains of *B. hyodysenteriae*, including two strains which have been shown to be avirulent. PCR analysis is performed in a 25 µl total volume using *Taq* DNA polymerase (Biotech International, Thurmont, MD). The amplification mixture consists of 1x PCR buffer (containing 1.5 mM of MgCl₂), 1 U of *Taq* DNA polymerase, 0.2 mM of each dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 0.5 µM of the primer pair, and 1 µl purified chromosomal template DNA. Cycling conditions involve an initial template denaturation step of 5 minutes at 94°C, follow by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 15 seconds, and primer extension at 68°C for 4 minutes. The PCR products are subjected to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), staining with a 1 µg/ml ethidium bromide solution and viewing over UV light.

The primers used for eighteen genes (out of twenty one) are indicated in Table 2. Of these eighteen genes, three of them (NAV-H23, NAV-H41 and NAV-H71) are present in 83% of the *B. hyodysenteriae* strains tested; three of them (NAV-H24, NAV-H30 and NAV-H73) are present in 87% of the strains tested, seven of them (NAV-H22, NAV-H32, NAV-H33, NAV-H37, NAV-H43, NAV-H64 and NAV-H69) are present in 91% of the strains tested, and three of them (NAV-H40, NAV-H44, and NAV-H45) are present in 100% of the strains tested. The remaining three genes are present in less than 80% of the *B. hyodysenteriae* strains tested. The poor distribution of these genes makes them less useful as a vaccine subunit. For this reason, further analysis of these genes has been abandoned.

Table 2

Gene	Primer name	Primer Sequence (5'-3')
NAV-H22	H22-F4	AAACGTTTATATTTTATTTTATC (SEQ ID NO: 67)
	H22-R1308	AAACTTCCAAGTGATACC (SEQ ID NO: 68)
NAV-H23	H23-F4	AAATATAAACCTACAAGCAG (SEQ ID NO: 69)
	H23-R2366	AATATTTCAGTTAATCTAAAATC (SEQ ID NO: 70)

NAV-H24	H24-F19	ACTTTAATCTTTGTATTAATTTTG (SEQ ID NO: 71)
	H24-R729	TTGTTTAAATTTGATAATATCAG (SEQ ID NO: 72)

Table 2 (continued)

Gene	Primer name	Primer Sequence (5'-3')
NAV-H30	H30-F4	AAAAAAATTATTTTATTAATTTTATATT (SEQ ID NO: 73)
	H30-R969	TTCTCTTATAATCTTTACAGTTG (SEQ ID NO: 74)
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC (SEQ ID NO: 75)
	H32-R564	TTTTTTGATAAATAAGTTTTTTATTTG (SEQ ID NO: 76)
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTATTT (SEQ ID NO: 77)
	H33-R396	AAGGAGAATCACCAGAAA (SEQ ID NO: 78)
NAV-H37	H37-F4	AATGATATTATTAAGTGATAAA (SEQ ID NO: 79)
	H37-R825	AAAATCTAATATAACGGATT (SEQ ID NO: 80)
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCCATTATAGG (SEQ ID NO: 81)
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTTAAC (SEQ ID NO: 82)
NAV-H41	H41-F19	TATATTTTCATTATATATTATTAG (SEQ ID NO: 83)
	H41-R1067	CTAGGCATAGATTTTCCA (SEQ ID NO: 84)
NAV-H43	H43-F46	TTTGCCATGTTCGAAATTGCAG (SEQ ID NO: 85)
	H43-R1236	TATTCTAGCACCGTCCATATC (SEQ ID NO: 86)
NAV-H44	H44-F43	GTATGTTTATATGCTCAGGATAC (SEQ ID NO: 87)
	H44-R2931	AACAGCAGCACTATCTTGTA (SEQ ID NO: 88)
	H44-F80	CAGCAGCAACAAATAACTACTG (SEQ ID NO: 89)
	H44-R929	TGAATATAAACACCTTCTCTCAAAG (SEQ ID NO: 90)
NAV-H45	H45-F52	AAAATGTCATTGGTAACTACTGTAAG (SEQ ID NO: 91)
	H45-R1595	CTTGATAATCTGCCTTTAAACATAC (SEQ ID NO: 92)
NAV-H62	H62-F69	ATGTGAGGAAAAAACAGAAAG (SEQ ID NO: 93)
	H62-R866	TCATTACCAGAAAACCATACTC (SEQ ID NO: 94)
NAV-H64	H64-F69	AGGAAATAAAGCTCCTGCTGCTTCAGC (SEQ ID NO: 95)
	H64-R253	GCATAGCAGCAACTTCAGAAGGTCCA (SEQ ID NO: 96)
NAV-H66	H66-F114	CTTATTAATTGGTATAGGAAAACC (SEQ ID NO: 97)
	H66-R200	AATCTATGTTCTTGATTATTAGCC (SEQ ID NO: 98)
NAV-H69	H69-F546	AGAAGCTACTTTTGGACCTTGGCCTGT (SEQ ID NO: 99)
	H69-R662	ACACAGTCAACACCAAGAGC (SEQ ID NO: 100)
NAV-H71	H71-F568	AAACAGCAGACTAGCTGGTG (SEQ ID NO: 101)
	H71-R773	TGACCATTACTTACACCGGATACCCCA (SEQ ID NO: 102)
	H71-F37	TTAATGACTATATCGCTTTCATACACTTC (SEQ ID NO: 103)
	H71-R1241	TCAATTCTTCCAGACATAAAATCAGTAAG (SEQ ID NO: 104)
NAV-H73	H73-F37	TATATAGAGTGGGTATCAGAAG (SEQ ID NO: 105)
	H73-R254	TCATAATGGTATTTACAAGATG (SEQ ID NO: 106)

pTrcHis plasmid extraction

Escherichia coli JM109 clones harboring the pTrcHis plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) are streaked out from glycerol stock storage onto Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with 100 mg/l ampicillin and incubated at 37°C for 16 hours. A single colony is used to inoculate 10 ml of LB broth supplemented with 100 mg/l ampicillin, and the broth culture is incubated at 37°C for 12 hours with shaking. The entire overnight culture is centrifuged at 5,000 x g for 10 minutes, and the plasmid contained in the cells is extracted using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Doncaster VIC). The pelleted cells are

resuspended with 250 µl cell resuspension buffer P1 and then are lysed with the addition of 250 µl cell lysis buffer P2. The lysed cells are neutralized with 350 µl neutralization buffer N3, and the precipitated cell debris is pelleted by centrifugation at 20,000 x g for 10 minutes. The supernatant is transferred to a spin column and centrifuged at 10,000 x g for 1 minute.

- 5 After discarding the flow-through, 500 µl wash buffer PE is applied to the column and centrifuged as before. The flow-through is discarded, and the column is dried by centrifugation at 20,000 x g for 3 minutes. The plasmid DNA is eluted from the column with 100 µl elution buffer EB. The purified plasmid is quantified using a Dynaquant DNA fluorometer (Hoefer, San Francisco, CA), and the DNA concentration is adjusted to 100
- 10 µg/ml by dilution with TE buffer. The purified pTrcHis plasmid is stored at -20°C.

Vector preparation

- Two µg of the purified pTrcHis plasmid is digested at 37°C for 1-4 hours in a total volume of 50 µl containing 5 U of two restriction enzymes in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 100 µg/ml BSA. The particular pair of restriction
- 15 enzymes used depends on the sequence of the primers and the sequence of the ORF; the goal being to use primers that would not cut the ORFs. The restricted vector is verified by electrophoresing 1 µl of the digestion reaction through a 1% (w/v) agarose gel in 1X TAE buffer at 90V for 1 hour. The electrophoresed DNA is stained with 1 µg/ml ethidium bromide and is viewed over ultraviolet (UV) light.

- 20 Linearised pTrcHis vector is purified using the UltraClean PCR Clean-up Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). Briefly, the restriction reaction (50 µl) is mixed with 250 µl SpinBind buffer B1, and the entire volume is added to a spin-column. After centrifugation at 8,000 x g for 1 minute, the flow-through is discarded and 300 µl SpinClean buffer B2 is added to the column. The column is centrifuged as before, and the flow-through is discarded
- 25 before drying the column at 20,000 x g for 3 minutes. The purified vector is eluted from the column with 50 µl TE buffer. Purified linear vector is quantified using a fluorometer, and the DNA concentration is adjusted to 50 µg/ml by dilution with TE buffer. The purified restricted vector is stored at -20°C.

Primer design for insert preparation

- 30 Primer pairs are designed to amplify as much of the coding region of the target gene as possible using genomic DNA as the starting point. All primers sequences include terminal restriction enzyme sites to enable cohesive-end ligation of the resultant amplicon into the linearised pTrcHis vector. The primers are tested using Amplify 1.2 (University of

Wisconsin, Madison, WI) and the theoretical amplicon sequence is inserted into the appropriate position in the pTrcHis vector sequence. Deduced translation of the chimeric pTrcHis expression cassette is performed using Vector NTI version 6 (InforMax) to confirm that the gene inserts would be in the correct reading frame. Table 3 also provides the gene size, the protein size, the predicted molecular weight of the native protein in daltons and the predicted pI of the protein. It is noted that the histidine-fusion of the recombinant protein adds approximately 4 kDa to the native protein's predicted molecular weight.

Table 3

Gene	Gene size (bp)	Protein size (aa)	Predicted MW of native protein (Da)	Predicted pI
NAV-H40	1815	605	97,733	9.4853
NAV-H41	1068	356	39,870	5.2168
NAV-H44	2940	980	113,722	5.1864
NAV-H62	1014	338	37642	4.3944
NAV-H64	1011	337	36468	4.4953
NAV-H66	264	88	10629	9.3027
NAV-H69	1080	360	41525	5.7123
NAV-H73	258	86	10527	9.5920

Amplification of the gene inserts

Using genomic DNA, all target gene inserts are amplified by PCR in a 100 µl total volume using *Taq* DNA polymerase (Biotech International) and *Pfu* DNA polymerase (Promega, Madison, WI). The amplification mixture consists of 1x PCR buffer (containing 1.5 mM of MgCl₂), 1 U of *Taq* DNA polymerase, 0.01 U *Pfu* DNA polymerase, 0.2 mM of each dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 0.5 µM of the appropriate primer pair and 1 µl of purified chromosomal DNA. The chromosomal DNA is prepared from the same *B. hyodysenteriae* strain used for genome sequencing. Cycling conditions involve an initial template denaturation step of 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 15 seconds, and primer extension at 68°C for 4 minutes. The PCR products are subjected to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1x TAE buffer, are stained with a 1 µg/ml ethidium bromide solution and are viewed over UV light. After verifying the presence of the correct size PCR product, the PCR reaction is purified using the UltraClean PCR Clean-up Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). The PCR reaction (100 µl) is mixed with 500 µl SpinBind buffer B1, and the entire volume is added to a spin-column. After centrifugation at 8,000 x g for 1 minute, the flow-through is

discarded, and 300 µl SpinClean buffer B2 is added to the column. The column is centrifuged as before and the flow-through is discarded before drying the column at 20,000 x g for 3 minutes. The purified vector is eluted from the column with 100 µl TE buffer.

Restriction enzyme digestion of the gene inserts

5 Thirty µl of the purified PCR product are digested in a 50 µl total volume with 1 U of each restriction enzyme compatible with the terminal restriction endonuclease recognition site determined by the cloning oligonucleotide primer. The restriction reaction consists of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 100 µg/ml BSA with 1 U of each restriction enzyme at 37°C for 1-4 hours. The digested insert DNA are
10 purified using the UltraClean PCR Clean-up Kit (see above). Purified digested insert DNA are quantified using the fluorometer, and the DNA concentration is adjusted to 20 µg/ml by dilution with TE buffer. The purified restricted insert DNA are used immediately for vector ligation.

Ligation of the gene inserts into the pTrcHis vector

15 Ligation reactions are all performed in a total volume of 20 µl. One hundred ng of linearised pTrcHis is incubated with 20 ng of restricted insert at 16°C for 16 hours in 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 1 mM ATP containing 1 U of T4 DNA ligase (Promega). An identical ligation reaction containing no insert DNA is also included as a vector re-circularisation negative control. The appropriate restriction enzyme is used for
20 each reaction.

Transformation of pTrcHis ligations into *E. coli* cells

Competent *E. coli* JM109 (Promega) cells are thawed from -80°C storage on ice and then 50 µl of the cells are transferred into ice-cold 1.5 ml microfuge tubes containing 5 µl of the overnight ligation reactions (equivalent to 25 ng of pTrcHis vector). The tubes are mixed
25 by gently tapping the bottom of each tube on the bench and left on ice for 30 minutes. The cells are then heat-shocked by placing the tubes into a 42°C water bath for 45 seconds before returning the tube to ice for 2 minutes. The transformed cells are recovered in 1 ml LB broth for 1 hour at 37°C with gentle mixing. The recovered cells are harvested at 2,500 x g for 5 minutes, and the cells are resuspended in 50 µl of fresh LB broth. The entire 50 µl of
30 resuspended cells are spread evenly onto a LB agar plate containing 100 mg/l ampicillin using a sterile glass rod. Plates are incubated at 37°C for 16 hours.

Detection of recombinant pTrcHis constructs in *E. coli* by PCR

Twelve single transformant colonies for each construct are streaked onto fresh LB agar plates containing 100 mg/l ampicillin and incubated at 37°C for 16 hours. A single colony from each transformation event is resuspended in 50 µl of TE buffer and is boiled for 1 minute. Two µl of boiled cells are used as template for PCR. The amplification mixture consists of 1x PCR buffer (containing 1.5 mM of MgCl₂), 1 U of *Taq* DNA polymerase, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of the pTrcHis-F primer (5'-CAATTTATCAGACAATCTGTGTG-3' SEQ ID NO: 107) and 0.5 µM of the pTrcHis-R primer (5'-TGCCTGGCAGTTCCCTACTCTCG-3' SEQ ID NO: 108). Cycling conditions involve an initial template denaturation step of 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 15 seconds, and a primer extension at 72°C for 1 minute. The PCR products are subjected to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1x TAE buffer, are stained with a 1 µg/ml ethidium bromide solution and are viewed over UV light. Cloning of the various inserts into the pTrcHis expression vector produces recombinant constructs of various sizes.

Pilot expression of recombinant His-tagged proteins

Five to ten isolated colonies of recombinant pTrcHis construct in *E. coli* JM109 are inoculated into 3 ml LB broth in a 5 ml tube containing 100 mg/l ampicillin and 1 mM IPTG and incubated at 37°C for 16 hours with shaking. The cells are harvested by centrifugation at 5,000 x g for 10 minutes at 4°C. The supernatant is discarded, and each pellet is resuspended with 10 µl Ni-NTA denaturing lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0). After vortexing the tube for 1 minute, the cellular debris is pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 10 minute at 4°C. The supernatant is transferred to a new tube and stored at -20°C until analysis.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE analysis of protein is performed using a discontinuous Tris-glycine buffer system. Thirty µl of protein sample are mixed with 10 µl of 4x sample treatment buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.0), 8% (w/v) SDS, 200 mM DTT, 40% (v/v) glycerol and 0.04 % (w/v) bromophenol blue). Samples are boiled for 5 minutes immediately prior to loading 10 µl of the sample into wells in the gel. The gel comprises a stacking gel (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% w/v acylamide, 0.15% w/v bis-acrylamide and 0.1% w/v SDS) and a separating gel (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 12% w/v acylamide, 0.31% w/v bis-acrylamide and 0.1% w/v SDS). These gels are polymerised by the addition of 0.1% (v/v) TEMED and 0.05% (w/v) freshly prepared ammonium sulphate solution and cast into the mini-Protean dual slab cell (Bio-Rad,

Hercules, California). Samples are run at 150 V at room temperature (RT) until the bromophenol blue dye reaches the bottom of the gel. Pre-stained molecular weight standards are electrophoresed in parallel with the samples in order to allow molecular weight estimations. After electrophoresis, the gel is immediately stained using Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad) or is subjected to electro-transfer onto nitrocellulose membrane for Western blotting.

Western blot analysis

Electrophoretic transfer of separated proteins from the SDS-PAGE gel to nitrocellulose membrane is performed using the Towbin transfer buffer system. After electrophoresis, the gel is equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3) for 15 minutes. The proteins in the gel are electro-transferred to nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher and Schuell BioScience, Inc., Keene, NH) using the mini-Protean transblot apparatus (Bio-Rad) at 30 V overnight at 4°C. The freshly transferred nitrocellulose membrane containing the separated proteins is blocked with 10 ml of tris-buffered saline (TBS) containing 5% (w/v) skim milk powder for 1 hour at room temperature. The membrane is washed with TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST) and then is incubated with 10 mL mouse anti-his antibody (diluted 5,000-fold with TBST) for 1 hour at room temperature. After washing three times for 5 minutes with TBST, the membrane is incubated with 10 mL goat anti-mouse IgG (whole molecule)-AP diluted 5,000-fold in TBST for 1 hour at RT. The membrane is developed using the Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad). The development reaction is stopped by washing the membrane with distilled water. The membrane is then dried and scanned for presentation.

Verification of reading frame of the recombinant pTrcHis constructs by direct sequence analysis

Two transformant clones for each construct which produced the correct sized PCR products are inoculated into 10 ml LB broth containing 100 mg/l ampicillin and incubated at 37°C for 12 hours with shaking. The entire overnight cultures are centrifuged at 5,000 x g for 10 minutes, and the plasmid contained in the cells are extracted using the QIAprep Spin Miniprep Kit as described previously. The purified plasmid is quantified using a fluorometer. Both purified plasmids are subjected to automated direct sequencing of the pTrcHis expression cassette using the pTrcHis-F and pTrcHis-R primers. Each sequencing reaction is performed in a 10 µl volume consisting of 200 ng of plasmid DNA, 2 pmol of primer, and 4 µl of the ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE

Applied Biosystems, Foster City, CA). Cycling conditions involve a 2 minute denaturing step at 96°C, followed by 25 cycles of denaturation at 96°C for 10 seconds, and a combined primer annealing and extension step at 60°C for 4 minutes. Residual dye terminators are removed from the sequencing products by precipitation with 95% (v/v) ethanol containing 85 mM sodium acetate (pH 5.2), 3mM EDTA (pH 8), and vacuum dried. The plasmids are sequenced in duplicate using each primer. Sequencing products are analysed using an ABI 373A DNA Sequencer (PE Applied Biosystems). Nucleotide sequencing of the pTrcHis is performed to verify that the expression cassette is in the correct reading frame for each constructs.

10 Expression and purification of recombinant His-tagged proteins

A single colony of the recombinant pTrcHis construct in *E. coli* JM109 is inoculated into 50 ml LB broth in a 250 ml conical flask containing 100 mg/l ampicillin and incubated at 37°C for 16 hours with shaking. A 2 l conical flask containing 1 l of LB broth supplemented with 100 mg/l ampicillin is inoculated with 10 ml of the overnight culture and incubated at 37°C until the optical density of the cells at 600 nm is 0.5 (approximately 3-4 hours). The culture is then induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM, and the cells are returned to 37°C with shaking. After 5 hours of induction, the culture is transferred to 250 ml centrifuge bottles, and the bottles are centrifuged at 5,000 x g for 20 minutes at 4°C. The supernatant is discarded, and each pellet is resuspended with 8 ml Ni-NTA denaturing lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0). The resuspended cells are stored at -20°C overnight.

The cell suspension is removed from -20°C storage and thawed on ice. The cell lysate is then sonicated on ice 3 times for 30 seconds with 1 minute incubation on ice between sonication rounds. The lysed cells are cleared by centrifugation at 20,000 x g for 10 minutes at 4°C, and the supernatant is transferred to a 15 ml column containing a 0.5 ml bed volume of Ni-NTA agarose resin (Qiagen). The recombinant His₆-tagged protein is allowed to bind to the resin for 1 hour at 4°C with end-over-end mixing. The resin is then washed with 30 ml of Ni-NTA denaturing wash buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6.3) before elution with 12 ml of Ni-NTA denaturing elution buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4.5). Four 3 ml fractions of the eluate are collected and stored at 4°C. Thirty µl of each eluate is treated with 10 µl of 4x sample treatment buffer and boiled for 5 minutes. The samples are subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue

G250 (Bio-Rad). The stained gel is equilibrated in distilled water for 1 hour and dried between two sheets of cellulose overnight at RT.

Expression of the selected recombinant *E. coli* clones is performed in medium-scale to generate sufficient recombinant protein for vaccination of mice (see below).

5 Dialysis and lyophilisation of the purified recombinant His-tagged protein

The eluted proteins are pooled and transferred into a hydrated dialysis tube (Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) with a molecular weight cut-off (MWCO) of 3,500 Da. A 200 µl aliquot of the pooled eluate is taken and quantified using a commercial Protein Assay (Bio-Rad). The proteins are dialysed against 2 l of distilled water at 4°C with stirring.

10 The dialysis buffer is changed 8 times at 12-hourly intervals. The dialysed proteins are transferred from the dialysis tube into a 50 ml centrifuge tubes (40 ml maximum volume), and the tubes are placed at -80°C overnight. Tubes are placed into a MAXI freeze-drier (Heto-Holten, Allerød, Denmark) and lyophilised to dryness. The lyophilised proteins are then re-hydrated with PBS to a calculated concentration of 2 mg/ml and stored at -20°C.

15 Following dialysis and lyophilisation, stable recombinant antigen is successfully produced.

Eight of the eighteen genes are successfully cloned into the *E. coli* Expression System and recombinant protein can be expressed stably from these clones.

Serology using purified recombinant protein

20 Twenty µg of purified recombinant protein is loaded into a 7 cm IEF well, electrophoresed through a 10% (w/v) SDS-PAGE gel, and electro-transferred to nitrocellulose membrane. The membrane is blocked with TBS-skim milk (5% w/v) and assembled into the multi-screen apparatus (Bio-Rad). The wells are incubated with 100 µl of diluted pig serum (100-fold) for 1 hour at room temperature. The pig serum is obtained from

25 high health status pigs (n=3), experimentally challenged pigs showing clinical SD (n=5), naturally infected seroconverting pigs (n=5), and pigs recovered from natural infection (n=4). The membrane then is removed from the apparatus and washed three times with TBST (0.1% v/v) before incubating with 10 ml of goat anti-swine IgG (whole molecule)-AP (5,000-fold) for 1 hour at RT. The membrane is washed three times with TBST before color development

30 using an Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad). The membrane is washed with tap water when sufficient development has occurred, dried and scanned for presentation.

The reactivity of the pig serum obtained from animal of differing health status is shown in the table below. All proteins are recognised by 100% of the panel of serum thus

indicating that the genes are expressed in vivo and that they are able to induce a systemic immune response following exposure to the spirochaete.

5 Table 4. Gene distribution and serologic reactivity of the eight successfully expressed *B. hyodysenteriae* vaccine candidates. The gene distribution was analysed by PCR using a panel of 23 different strains. Serology was performed using 19 serum samples from five different categories of disease.

Gene	Distribution (%)	Serology (%)
NAV-H40	100	100%
NAV-H41	83	100%
NAV-H44	100	100%
NAV-H62	96	100%
NAV-H64	91	100%
NAV-H66	96	100%
NAV-H69	91	100%
NAV-H73	87	100%

10 Vaccination of mice using the purified recombinant his-tagged proteins

For each of the purified recombinant his-tagged proteins, ten mice are systemically and orally immunized to determine whether the recombinant protein would be immunogenic. The recombinant protein is emulsified with 30% (v/v) water in oil adjuvant and injected intramuscularly into the quadriceps muscle of ten mice (Balb/cJ: 5 weeks old males). All
 15 mice receive 100 µg of protein in a total volume of 100 µl. Three weeks after the first vaccination, all mice receive a second intramuscular vaccination identical to the first vaccination. All mice are killed two weeks after the second vaccination. Sera are obtained from the heart at post-mortem and tested in Western blot analysis for antibodies against cellular extracts of *B. hyodysenteriae*.

20 Western blot analysis

Twenty µg of purified recombinant protein is loaded into a 7 cm IEF well, electrophoresed through a 10% (w/v) SDS-PAGE gel, and electro-transferred to nitrocellulose membrane. The membrane is blocked with TBS-skim milk (5% w/v) and assembled into the multi-screen apparatus (Bio-Rad). The wells are incubated with 100 µl of
 25 diluted mouse serum (100-fold) for 1 hour at room temperature. The membrane is removed

from the apparatus and washed three times with TBST (0.1% v/v) before incubating with 10 ml of goat anti-mouse IgG (whole molecule)-AP (5,000-fold) for 1 hour at room temperature. The membrane is washed three times with TBST before color development using an Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad). The membrane is washed with tap water when
5 sufficient development has occurred, dried and scanned for presentation.

Western blot analysis shows a significant increase in antibody reactivity in the mice towards the recombinant vaccine antigens following vaccination. All the mice recognise recombinant proteins which are similar in molecular weight to that of the coomassie blue stained purified recombinant proteins. These experiments provide evidence that the
10 recombinant proteins are immunogenic when used to vaccinate mice and that the vaccination protocol employed can induce specific circulating antibody titres against the antigen. The results indicate that the recombinant proteins can be useful in an effective vaccine for animal species from being colonised by *B. hyodysenteriae*.

15 Vaccination of pigs using the purified recombinant his-tagged proteins

For each of the purified recombinant his-tagged proteins, ten sero-negative pigs are injected intramuscularly with 1 mg of the particular antigen in 1 ml vaccine volume. The antigen is emulsified with an equal volume of a water-in-oil adjuvant. The pigs are vaccinated at three weeks of age and again at six weeks of age. A second group of ten sero-
20 negative pigs is used as negative controls and are left unvaccinated. All pigs are challenged with 100 ml of an active *B. hyodysenteriae* culture ($\sim 10^9$ cells/ml) at eight weeks of age, and the pigs are observed for clinical signs of swine dysentery during the experiment (up to six weeks post-challenge) and at post-mortem examination.

Diagnostic kit

25 Serum is obtained from pigs in a piggery with known infection of *B. hyodysenteriae*, from pigs known to have not been infected with *B. hyodysenteriae*, and from pigs in piggery with unknown infection with *B. hyodysenteriae*. Twenty μ g of purified recombinant protein is loaded into a 7 cm IEF well, electrophoresed through a 10% (w/v) SDS-PAGE gel, and electro-transferred to nitrocellulose membrane. The membrane is blocked with TBS-skim
30 milk (5% w/v) and assembled into the multi-screen apparatus (Bio-Rad). The wells are incubated with 100 μ l of diluted pig serum (100-fold) for 1 hour at room temperature. The membrane then is removed from the apparatus and washed three times with TBST (0.1% v/v) before incubating with 10 ml of goat anti-swine IgG (whole molecule)-AP (5,000-fold) for 1

hour at room temperature. The membrane is washed three times with TBST before color development using an Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad). The membrane is washed with tap water when sufficient development has occurred, dried and scanned for presentation. One can determine if pigs are infected with *B. hyodysenteriae* by comparing the results to the positive and negative control.

While this invention has been described with a reference to specific embodiments, it will be obvious to those of ordinary skill in the art that variations in these methods and compositions may be used and that it is intended that the invention may be practiced otherwise than as specifically described herein. Accordingly this invention includes all modifications encompassed within the spirit and scope of the invention as defined by the claims.

Claims

Claim 1. A polynucleotide comprising the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, and 65.

5 Claim 2. A plasmid comprising the polynucleotide of Claim 1.

Claim 3. The plasmid of Claim 2 wherein said plasmid is an expression vector.

Claim 4. A cell containing the plasmid of Claim 2.

Claim 5. A cell containing the plasmid of Claim 3.

Claim 6. An immunogenic composition comprising the plasmid of Claim 3.

10 Claim 7. A vaccine composition for the treatment or prevention of *Brachyspira hyodysenteriae* comprising the expression vector of Claim 3.

Claim 8. A vaccine composition for the treatment or prevention of *Brachyspira hyodysenteriae* comprising the cell of Claim 4.

15 Claim 9. A DNA molecule comprising a sequence that is at least 70% identical to the polynucleotide of Claim 1.

Claim 10. A plasmid comprising the polynucleotide of Claim 9.

Claim 11. The DNA molecule of Claim 9 wherein said DNA molecule is at least 80% identical to the polynucleotide of Claim 1.

Claim 12. A plasmid comprising the polynucleotide of Claim 11.

20 Claim 13. The DNA molecule of Claim 9 wherein said DNA molecule is at least 90% identical to the polynucleotide of Claim 1.

Claim 14. A plasmid comprising the polynucleotide of Claim 13.

25 Claim 15. A polypeptide comprising the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, and 66.

Claim 16. A polynucleotide comprising a sequence which encodes the polypeptide of Claim 15.

Claim 17. A plasmid comprising the polynucleotide of Claim 16.

Claim 18. The plasmid of Claim 17 wherein said plasmid is an expression vector.

30 Claim 19. A cell containing the plasmid of Claim 17.

Claim 20. An immunogenic composition comprising the cell of Claim 19.

Claim 21. A protein comprising a sequence that is at least 70% homologous to the polypeptide of Claim 15.

Claim 22. The protein of Claim 21 wherein said protein is at least 80% homologous to the polypeptide of Claim 15.

Claim 23. The protein of Claim 22 wherein said protein is at least 90% homologous to the polypeptide of Claim 15.

5 Claim 24. An immunogenic composition comprising the protein of Claim 23.

Claim 25. An immunogenic composition comprising the polypeptide of Claim 15.

Claim 26. A vaccine composition for the treatment or prevention of *Brachyspira hyodysenteriae* comprising the polypeptide of Claim 15.

Claim 27. A monoclonal antibody that binds to the polypeptide of Claim 15.

10 Claim 28. A kit for the diagnosis of presence of *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal, said kit comprising the monoclonal antibody of Claim 27.

Claim 29. A kit for the diagnosis of presence of *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal, said kit comprising the polypeptides of Claim 15.

15 Claim 30. A kit for the diagnosis of presence of *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal, said kit comprising the polynucleotides of Claim 1.

Claim 31. A method of generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal comprising administering to said animal the immunogenic composition of Claim 24.

Claim 32. A method of generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal comprising administering to said animal the immunogenic composition of Claim 25.

20 Claim 33. A method of generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal comprising administering to said animal the immunogenic composition of Claim 6.

Claim 34. A method of generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal comprising administering to said animal the immunogenic composition of Claim 20.

25 Claim 35. A method of treating or preventing a disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal in need of said treatment comprising administering to said animal a therapeutically effective amount of the vaccine composition of Claim 7.

Claim 36. A method of treating or preventing a disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal in need of said treatment comprising administering to said animal a therapeutically effective amount of the vaccine composition of Claim 8.

30 Claim 37. A method of treating or preventing a disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal in need of said treatment comprising administering to said animal a therapeutically effective amount of the vaccine composition of Claim 26.

Claim 38. Use of the protein of Claim 23 for the preparation of a medicament for generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal.

Claim 39. Use of the protein of Claim 15 for the preparation of a medicament for generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal.

Claim 40. Use of the plasmid of Claim 3 for the preparation of a medicament for generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal.

5 Claim 41. Use of the cell of Claim 19 for the preparation of a medicament for generating an immune response to *Brachyspira hyodysenteriae* in an animal.

Claim 42. Use of the expression vector of Claim 3 for the preparation of a medicament for treating or preventing a disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* an animal in need of said treatment.

10 Claim 43. Use of the cell of Claim 4 for the preparation of a medicament for treating or preventing a disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* an animal in need of said treatment.

Claim 44. Use of the polypeptide of Claim 15 for the preparation of a medicament for treating or preventing a disease caused by *Brachyspira hyodysenteriae* an animal in need of
15 said treatment.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/058049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/20 C12N15/31 A61K39/02 A61K39/40 A61K48/00
C12N1/21 C12N15/63 C12Q1/68 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBL, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91/04036 A (ML TECHNOLOGY VENTURES [US]) 4 April 1991 (1991-04-04) pages 1-12; claims; examples	1-44
A	WO 2004/007726 A (AKZO NOBEL NV [NL]; ADLER BEN [AU]; CULLEN PAUL ANTONY [AU]; COUTTS SC) 22 January 2004 (2004-01-22) pages 4-8; claims; examples	1-44
A	WO 03/095480 A (AKZO NOBEL NV [NL]; ADLER BEN [AU]; CULLEN PAUL ANTONY [AU]; COUTTS SC) 20 November 2003 (2003-11-20) pages 4-8; claims; examples	1-44
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2007

Date of mailing of the international search report

06/03/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Steffen, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/058049

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LA TOM ET AL: "Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>" VETERINARY MICROBIOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 102, no. 1-2, 19 August 2004 (2004-08-19), pages 97-109, XP002395514 ISSN: 0378-1135 cited in the application pages 98-103; table 1 -----	1-44
A	DAVIS A J ET AL: "The <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> ftnA gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease" CURRENT MICROBIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 50, no. 6, June 2005 (2005-06), pages 285-291, XP002409195 ISSN: 0343-8651 cited in the application the whole document. -----	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/058049

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 31-37 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-44 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-44 (all partially)

Nucleic acids, plasmids, cells, immunogenic compositions and vaccines comprising the nucleic acids and up to 70% identical sequences thereof, when relating to SEQ ID NO: 1. Proteins, immunogenic compositions and vaccines comprising the proteins and up to 70% homologues thereof as well as antibodies thereto, when relating to SEQ ID NO: 2. Various methods of treatment and medical and diagnostic uses making use of the above nucleic acids and proteins as well as the compositions containing them.

Inventions 2-33: claims 1-44 (all partially)

Nucleic acids, plasmids, cells, immunogenic compositions and vaccines comprising the nucleic acids and up to 70% identical sequences thereof, when relating respectively to SEQ ID NO's: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 or 65. Proteins, immunogenic compositions and vaccines comprising the proteins and up to 70% homologues thereof as well as antibodies thereto, when relating respectively to SEQ ID NO's: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 or 66. Various methods of treatment and medical and diagnostic uses making use of the above nucleic acids and proteins as well as the compositions containing them.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/058049

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9104036	A	04-04-1991	CA 2025230 A1	14-03-1991
			EP 0491859 A1	01-07-1992
			JP 5502370 T	28-04-1993
WO 2004007726	A	22-01-2004	AU 2003250057 A1	02-02-2004
			CA 2492716 A1	22-01-2004
			JP 2005532804 T	04-11-2005
			US 2006153875 A1	13-07-2006
WO 03095480	A	20-11-2003	AU 2003232745 A1	11-11-2003
			CA 2484669 A1	20-11-2003
			JP 2006500914 T	12-01-2006
			US 2005163791 A1	28-07-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 50346-WO-PCT	FOR FURTHER ACTION	See item 4 below
International application No. PCT/EP2007/058049	International filing date (day/month/year) 03 August 2007 (03.08.2007)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant SPIROGENE PTY LTD		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 11 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒ Box No. I	Basis of the report
☐ Box No. II	Priority
☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☒ Box No. IV	Lack of unity of invention
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐ Box No. VI	Certain documents cited
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application
☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

	Date of issuance of this report 09 February 2010 (09.02.2010)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Yolaine Cussac
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt05.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2007/058049

International filing date (day/month/year)
03.08.2007

Priority date (day/month/year)
09.08.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

INV. C07K14/20 C12N15/31 A61K39/02 A61K39/40 A61K48/00 C12N1/21 C12N15/63 C12Q1/68 G01N33/569

Applicant
NOVARTIS AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Steffen, Pierre

Telephone No. +49 89 2399-7307



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No..
PCT/EP2007/058049

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

 International application No.
PCT/EP2007/058049

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 1-44 (all partially); 31-37 (I.A.)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 31-37 (I.A.) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-44 (all partially); 31-37 (I.A.)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

 International application No.
PCT/EP2007/058049

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. Invention 1: claims 1-44 (all partially)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-44 (all partially)</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-44 (all partially)</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-30, 38-44 (all partially)</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/EP2007/058049

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/058049

Re Item I

Basis of the report

In view of the non-unity of the current application, the present written opinion of the ISA is established on the first of the below identified inventions, that is the claims with regard to SEQ ID NO's 1 and 2 only.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 31-37 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1 (iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item IV

Lack of unity of invention

The present application relates to the cloning of 33 genes of *Brachyspira hyodysenteriae* and the provision of the corresponding proteins. Disclosed are the nucleic acids, plasmids, cells, immunogenic compositions and vaccines comprising the nucleic acids and up to 70% identical sequences thereof. Disclosed are also the proteins, immunogenic compositions and vaccines comprising the proteins and up to 70% homologues thereof as well as antibodies thereto. Disclosed are also various methods of treatment and medical and diagnostic uses making use of the nucleic acids and proteins as well as the compositions containing them.

However nucleic acids and the proteins encoded thereby of *Brachyspira hyodysenteriae* origin, as well as their use in vaccination of animals, detection of the pathogen, antibody production therewith and related embodiments are known in the art.

For example WO9194036 discloses the cloning and expression of several *Treponema* (= *Brachyspira*) *hyodysenteriae* surface antigens and their use in vaccination against swine dysentery. Production of antibodies and detection methods therewith are also disclosed.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/058049

WO2004/007726 discloses the cloning of the genes and expression of 61 and 20 kDa Brachyspira hyodysenteriae surface expressed lipoproteins and their use in vaccination/immunisation against swine dysentery. Production of antibodies and detection methods using the proteins, nucleic acids and the antibodies are also disclosed. Disclosed are also recombinant hosts.

WO03/095480 discloses the cloning of the genes and expression of four Brachyspira hyodysenteriae surface expressed lipoproteins and their use in vaccination/immunisation against swine dysentery. Production of antibodies and detection methods using the proteins, nucleic acids and the antibodies are also disclosed. Disclosed are also recombinant hosts.

La et al. (Veterinary Microbiology, 2004, vol. 102, pp. 97-109) disclose the use of protein fusions of a 29,7 kDa outer-membrane lipoprotein BmpB of Brachyspira hyodysenteriae in the vaccination of pigs against swine dysentery. Antibody responses are elicited in the vaccinated cohort (as measured with BmpB purified antigen and whole cells) and some protection against the disease is also obtained.

Davis et al. (Current Microbiology, 2005, vol. 50, pp. 285-291) disclose the cloning, expression and use of Brachyspira hyodysenteriae ftnA gene (intracellular) in vaccination studies in a mouse model (both with protein and DNA vaccination). A real time PCR quantification of the bacteria was performed in the studies, using two specific primers.

From the above it follows that the problem to be solved by the present application consists in the provision of alternative genes of Brachyspira hyodysenteriae and the proteins encoded by those genes that are suitable for therapeutic/vaccine and diagnostic purposes in relation to Brachyspira hyodysenteriae and the disease caused thereby. The problem was solved by the provision of 33 genes of respectively SEQ ID NO's: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 or 65 encoding the proteins of respectively SEQ ID NO's: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 or 66.

However, no special technical character linking these genes and proteins to a common, single new and inventive concept can be made up, apart from the known property to be suitable as immunogen/vaccine against Brachyspira hyodysenteriae. Indeed, these genes and proteins

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/058049

do not share any significant sequence similarity or identity. SEQ ID NO: 2 is closer related to the *Brachyspira hyodysenteriae* antigens (and vaccine candidates) of WO9194036 (ca 60% similarity) than to the other genes/proteins presented in the application (that share only a few % of similarity). Similarly it is clear from the other prior art, that many other membrane and non-membrane genes and proteins of *Brachyspira hyodysenteriae* can be used as immunogen/vaccine. The sequences are also not linked by any other apparent special technical feature such as a single operon or expression unit, a single specific location or a single specific function, apart from the known property to be suitable as immunogen/vaccine against *Brachyspira hyodysenteriae*. Therefore it is concluded that the solutions presented for the above identified problem are independent from each other and consequently the claims lack unity of invention, in accordance with Rule 13.2 PCT.

Accordingly, the application was divided into the 33 inventions as mentioned above and in line with Article 17(3)(a) PCT the search report was drawn up on the main invention, being the invention first mentioned in the claims, namely the claims with regard to SEQ ID NO's 1 and 2. The present opinion is equally restricted to this subject-matter.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The present application relates to the cloning of 33 genes of *Brachyspira hyodysenteriae* and the provision of the corresponding proteins. The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 and the protein of SEQ ID NO: 2 encoded thereby is one such gene/protein pair and the protein appear to be membrane-located. Disclosed are the nucleic acids, plasmids, cells, immunogenic compositions and vaccines comprising the nucleic acids and up to 70% identical sequences thereof. Disclosed are also the proteins, immunogenic compositions and vaccines comprising the proteins and up to 70% homologues thereof as well as antibodies thereto. Disclosed are also various methods of treatment and medical and diagnostic uses making use of the nucleic acids and proteins as well as the compositions containing them.

Reference is made to the following documents:

D1: WO 91/04036 A (ML TECHNOLOGY VENTURES [US]) 4 April 1991 (1991-04-04)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/058049

- D2: WO 2004/007726 A (AKZO NOBEL NV [NL]; ADLER BEN [AU]; CULLEN PAUL ANTONY [AU]; COUTTS SC) 22 January 2004 (2004-01-22)
- D3: WO 03/095480 A (AKZO NOBEL NV [NL]; ADLER BEN [AU]; CULLEN PAUL ANTONY [AU]; COUTTS SC) 20 November 2003 (2003-11-20)
- D4: LA TOM ET AL: "Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*" VETERINARY MICROBIOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 102, no. 1-2, 19 August 2004 (2004-08-19), pages 97-109, XP002395514 ISSN: 0378-1135 cited in the application

D1 discloses the cloning and expression of several *Treponema* (= *Brachyspira*) *hyodysenteriae* surface antigens and their use in vaccination against swine dysentery. Production of antibodies and detection methods therewith are also disclosed. The ORF of gene 2 has 49 % amino acid identity in the overlap with SEQ ID NO: 2 and 60% similarity. The ORF of gene 4 has 47 % amino acid identity in the overlap with SEQ ID NO: 2 and 60% similarity. Overall nucleic acid identity is lower (72% in a 200 of 600 nt overlap).

D2 discloses the cloning of the genes and expression of 61 and 20 kDa *Brachyspira hyodysenteriae* surface expressed lipoproteins and their use in vaccination/immunisation against swine dysentery. Production of antibodies and detection methods using the proteins, nucleic acids and the antibodies are also disclosed. Disclosed are also recombinant hosts. The genes and proteins thereof do not share however significant sequence identity with SEQ ID NO's 1 and 2.

D3 discloses the cloning of the genes and expression of four *Brachyspira hyodysenteriae* surface expressed lipoproteins and their use in vaccination/immunisation against swine dysentery. Production of antibodies and detection methods using the proteins, nucleic acids and the antibodies are also disclosed. Disclosed are also recombinant hosts. The genes and proteins thereof do not share however significant sequence identity with SEQ ID NO's 1 and 2.

D4 discloses the use of protein fusions of a 29,7 kDa outer-membrane lipoprotein BmpB of *Brachyspira hyodysenteriae* in the vaccination of pigs against swine dysentery. Antibody responses are elicited in the vaccinated cohort (as measured with BmpB purified antigen and

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/058049

whole cells) and some protection against the disease is also obtained. The genes and proteins thereof do not share however significant sequence identity with SEQ ID NO's 1 and 2.

From the above prior art it follows, that none of the documents discloses either a polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or a polypeptide of SEQ ID NO: 2, or a sequence 70 % identical thereto. Thus the sequences and the claims relating thereto are novel. Also does not follow from these documents, the existence of any other gene of *Brachyspira hyodysenteriae* encoding a membrane protein, that is suitable in vaccination/immunisation against this bacterium or the treatment of the disease caused thereby, let alone the gene and protein of SEQ ID NO's: 1 and 2. Therefore are the claims relating to these sequences also based on inventive step.

In conclusion, as regards claims 1-44, in relation to SEQ ID NO's 1 and 2, these are considered both novel and inventive, in accordance with the provisions of Articles 33(2) and 33(3) PCT.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Several claims relate to 70, 80 and 90 % homologues of SEQ ID NO's 1 and 2. These claims are however not functionally limited such that it is not readily apparent that all these homologous sequences fulfill the required immunogenic/vaccine function. Such non-functional sequences would however not be supported by the description in terms of a technical basis and it would moreover be undue burden to the skilled person to find out from the manifold pool of possibilities, which of these homologues would display the required function. Thus the claims 9, 11, 13 and 21-23 are contrary to the requirements of Articles 5 and 6 PCT.



No. 10-024772- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 11:17:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 250

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
BONILLA CASTRO MARTHA

REFERENCIA	Radicación No.	10 24772
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/058049
	Fecha inicio fase nacional	03/03/2010
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	4304

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

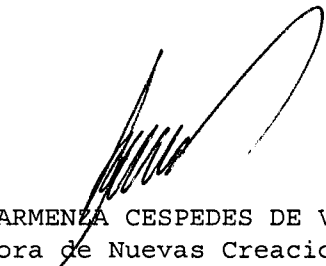
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.:10 24772


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall 26 MAR. 2010